



7  
21

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"Bioquímica de las Bacterias Acetogénicas  
y Metanogénicas en Sistemas de  
Depuración de Efluentes"

TRABAJO ESCRITO  
Via Cursos de Educación Continua  
Que para obtener el título de  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
p r e s e n t a  
MARIA DEL PILAR ARENAS SOTO



México, D. F.

1997

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

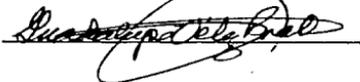
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

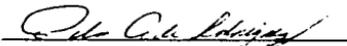
<b>Presidente:</b>	<b>Prof. Guadalupe Vélez Pratt</b>
<b>Vocal:</b>	<b>Prof. Biserka Sveshtarova Pekarkova</b>
<b>Secretario:</b>	<b>Prof. Hilda E. Calderón Villagomez</b>
<b>1er suplente:</b>	<b>Prof. José Pedraza Chaverri</b>
<b>2do suplente:</b>	<b>Prof. Ivonne A. Herrera Teigeiro</b>

**Sitio donde se desarrolló el tema: Bibliotecas del Campus  
C.U.**

**Asesor del tema: Q.F.B. Guadalupe Vélez Pratt**

  
Guadalupe Vélez Pratt

**Sustentante: María del Pilar Arenas Soto**

  
María del Pilar Arenas Soto

## INDICE

	Pág.
Introducción.	1
Generalidades.	3
I. Síntesis de acetato por diversos sistemas bacterianos.	9
I.1 Acetato.	10
I.2 Propiedades de los microorganismos acetógenos.	14
I.3 La vía de Wood autotrófica de fijación - de CO <sub>2</sub> en acetato.	20
I.3.1 Enzimas involucradas en la vía de Wood.	23
I.3.2 Metanol como precursor de acetato.	31
I.3.3 Acetil-CoA como precursor de carbono - celular en acetógenos.	31
I.4 Asociación sintrófica facultativa en fermentación de azúcares.	33
I.5 Asociación sintrófica obligada.	33
II. Catabolismo del acetato.	37
II.1 Bacterias metanogénicas.	38
II.2 Catabolismo del acetato a CO <sub>2</sub> y CH <sub>4</sub> .	40
II.3 Oxidación del acetato por la vía del ácido cítrico.	45
II.4 Oxidación del acetato vía CO-deshidrogenasa.	49
Discusión.	53
Conclusiones.	56
Bibliografía.	58

### Introducción.

Los consorcios microbianos que llevan a cabo la depuración de efluentes en procesos anaerobios son un reflejo de los que se encuentran en muchos habitats naturales.

Aunque no se puede decir que se conozcan todos los microorganismos que intervienen en estos procesos y su fisiología se tiene una gran aproximación de los factores que pueden influir el equilibrio de tales consorcios.

Lo anterior es de suma importancia ya que contribuye a lograr una mayor comprensión de los procesos y de lo que sucede en los habitats naturales. En este caso se busca conocer mejor la interacción de los microorganismos en el agua - principalmente y también en el suelo, ya que su metabolismo determina la depuración de dichos sistemas. actualmente amenazados por varios contaminantes, pues estos microorganismos tienen capacidad de degradar y por lo tanto eliminar muchos compuestos que contaminan el ambiente.

El objetivo de este trabajo es revisar las características de las principales bacterias que contribuyen a la mineración de la materia orgánica, es decir, a realizar la depuración de los efluentes.

Con esta revisión se pretende ofrecer a los interesados del tema un apoyo y a los alumnos de carreras biológicas un material de consulta para su formación en el área ambiental.

### Generalidades.

El tratamiento anaerobio es un proceso biotecnológico en ausencia de oxígeno que se usa para la estabilización de materiales orgánicos y su conversión a metano y productos inorgánicos finales incluido el dióxido de carbono y el amoníaco. Desde 1881 el tratamiento anaerobio se había reportado como un método que se puede utilizar para reducir el material orgánico y removerlo de las aguas de desecho municipales (2).

En años recientes se ha expandido considerablemente el interés en el tratamiento anaerobio debido a que el metano, producto principal del tratamiento, puede ser utilizado como combustible y así ayudar a balancear la creciente demanda de energía. En la mayoría de los casos la degradación del material orgánico es realizada por cultivos mixtos, en los cuales, las bacterias crecen sintróficamente en asociación unas con otras (2).

Uno de los factores que han contribuido a incrementar el conocimiento sobre este tema, es la aplicación de la biología molecular que provee excelente herramienta para el análisis genético de las proteínas involucradas en las reacciones metabólicas; ya que en el proceso anaerobio intervienen bacterias con una fisiología y metabolismo muy diversos (1).

La degradación anaerobia eficiente del material orgánico complejo hasta metano, es el resultado de la combinación y - coordinación de la actividad metabólica de las poblaciones - que van a degradar dicho material. Estas poblaciones están formadas de diversos grupos tróficos (Figura 1), que poseen diferentes funciones para catabolizar los sustratos orgánicos (3).

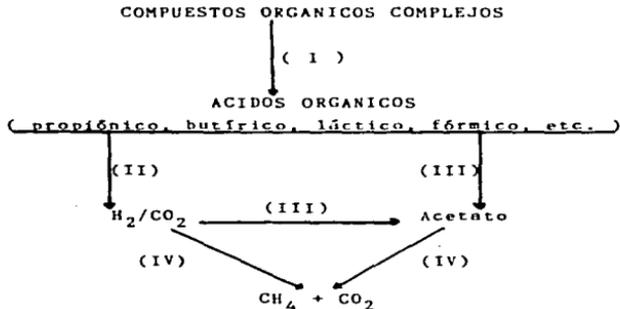


Figura 1. Intervención de varios grupos tróficos en un proceso de degradación anaerobia: (I), Bacterias hidrolíticas; (II), Bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno; (III), Bacterias homoacetogénicas; y (IV), Bacterias metanogénicas (3).

Hasta ahora, cuatro diferentes grupos tróficos pueden ser reconocidos e incluidos, y son: (grupo I), bacterias hidrolíticas que degradan polisacáridos, proteínas, lípidos y otros constituyentes químicos; (grupo II), bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno que catabolizan ácidos orgánicos y otros productos finales neutros; (grupo III), bacterias homocetogénicas que utilizan compuestos de un solo átomo de carbono ( $H_2/CO_2$  o  $HCOOH$ ) o compuestos con varios átomos de carbono para sintetizar ácido acético; (grupo IV), bacterias metanogénicas que utilizan el acetato y compuestos con un átomo de carbono para producir metano (3).

Los microorganismos involucrados en cada etapa son metabólicamente dependientes unos de otros para su sobrevivencia. Las bacterias metanogénicas requieren de los productos finales catabolizados por las bacterias formadoras de ácidos; sin embargo, estas últimas especies eventualmente se inhiben por la presencia de sus productos si éstos no son degradados por las bacterias metanogénicas. Aunque las bacterias son el grupo mayoritario involucrado en la digestión anaerobia, los protozoarios, ciliados y flagelados y algunos hongos anaerobios también están presentes (10).

El proceso se realiza en presencia de aceptores de electrones tales como sulfato, nitrato y  $CO_2$ . La obtención de la energía es por medio del sistema de respiración anaerobia y fermentación (10).

En la primera etapa, la mayor parte de los sustratos de los lodos son hidrolizados a componentes básicos, proteínas-

a aminoácidos por proteasas extracelulares; las grasas a glicerol y ácidos grasos de cadena larga y los polisacáridos a mono o disacáridos (7).

Las proteasas son producidas por un grupo pequeño de bacterias. La mayoría de las bacterias son capaces de utilizar pequeños péptidos o los aminoácidos, los cuales pasan a través de la pared celular, membrana y son degradados dentro de la célula. La producción de proteasas es mayor que la requrida aun cuando las bacterias productoras de estas enzimas - están presentes en menor porcentaje del total de las bacterias (7).

La mayoría de las bacterias proteolíticas son formadoras de esporas como Clostridium sp. Se sabe poco acerca de las bacterias lipolíticas aun cuando han demostrado ser altamente efectivas en digestores anaerobios (7).

Las bacterias celulolíticas anaerobias están presentes - en lodos anaerobios y son predominantemente cocobacilos Gram negativos (7).

La heterogeneidad del grupo de las bacterias en cuanto a ser facultativas o anaerobias estrictas, hace ver que son - también responsables de la formación de los ácidos, así como de la hidrólisis.

En la siguiente etapa del proceso, el sustrato hidrolizado es convertido a ácidos orgánicos y alcoholes con produc - ción de nuevas células, para lo cual son utilizadas diversas vías metabólicas, incluyendo fermentación y beta oxidación.

Las bacterias anaerobias obligadas están presentes en mu

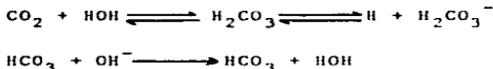
cho mayor cantidad que las facultativas o las aerobias. Entre los organismos formadores de ácidos están Bacillus sp., Micrococcus sp., y Pseudomonas sp., las principales fuentes de carbono para su crecimiento son mono y disacáridos, ácidos grasos de cadena larga, glicerol, aminoácidos y péptidos de cadena corta y como productos finales, agua, dióxido de carbono y amoníaco. Además se producen en menores cantidades alcoholes, aldehídos y cetonas. En esta etapa, cuando no está presente un aceptor de electrones, como es el caso de la fermentación ácida, el piruvato puede seguir diversas reacciones con regeneración de NAD a NADH<sup>+</sup>. Los ácidos acético, propiónico, butírico y láctico son los productos finales más frecuentes de esta etapa (7).

El propiónico y los ácidos de cadena larga son degradados por las bacterias acetogénicas obligadas productoras de hidrógeno, mientras que las homoacetogénicas producen ácido acético y algunas veces otros ácidos (4).

En la última etapa de la digestión anaerobia, los productos finales de la fermentación ácida son convertidos a gases principalmente metano y dióxido de carbono por diversas especies de bacterias anaerobias obligadas. Las bacterias responsables de la metanogénesis en los digestores son similares a las encontradas en otros medios; la mayoría de éstas pertenecen a los géneros: Metanobacterium sp., Metanosarcina sp., Metanospirillum sp. y Metanococcus sp. (22).

En esta etapa ocurre la estabilización completa del sustrato y como su producto final es gas se considera más eficiente que la estabilización aeróbica completa (7).

El metano es un producto final ideal y no es tóxico, se recupera fácilmente utilizando un proceso de separación, no es muy soluble e inerte en condiciones anaerobias. En cambio el dióxido de carbono se escapa parcialmente, ya que a diferencia del metano es relativamente soluble en agua, reacciona con cualquier ión hidróxido del sistema para producir iones bicarbonato. El comportamiento del dióxido de carbono depende del pH, concentración de bicarbonato, temperatura y composición del sustrato. La biodegradación de proteínas implica desaminación para producir amonio que reacciona con el agua. Esta es la mejor fuente de iones hidróxido los cuales al reaccionar con el  $\text{CO}_2$  durante la metanogénesis forman los iones bicarbonato:



Por lo tanto, el contenido de proteínas de las aguas residuales como sustrato afectará significativamente la cantidad de  $\text{CO}_2$  liberado en la solución así como su función de buffer del sistema en términos de bicarbonato.

La porción del dióxido de carbono incorporado en el ión bicarbonato es removida del reactor en su fase líquida.

La digestión anaerobia y producción de metano no sólo se realiza en digestores, también se lleva a cabo en ambientes naturales incluyendo el tracto digestivo de la mayoría de los animales, en los sedimentos de los lagos y ríos, en los estuarios y pantanos (7).

**I. Sintesis de acetato por diversos  
sistemas bacterianos.**

### I.1 Acetato

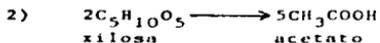
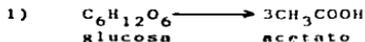
El acetato en la naturaleza es un producto intermedio - clave en la degradación anaeróbica bacteriana de materia orgánica. Los procesos biológicos de formación, utilización y desecho del acetato son, de considerable interés para los microbiólogos, bioquímicos y ecologistas.

El acetato es un producto de fermentación de diferentes compuestos. También se produce por síntesis a partir de  $\text{CO}_2$  y/u otros precursores de un átomo de carbono: las bacterias que realizan esta síntesis y las que producen acetato por fermentación son denominadas acetogénicas (4).

En 1932, Fischer y colaboradores observaron que un cultivo de bacterias obtenido de sedimento de aguas negras podía sintetizar acetato a partir de  $\text{CO}_2$  con hidrógeno molecular como agente reductor. En 1940, Wieringa describió a Clostridium aceticum, el cual convierte los azúcares en acetato y sintetiza acetato a partir de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ . Sin embargo los estudios más detallados de la síntesis de acetato a partir de-

CO<sub>2</sub> han sido llevados a cabo con Clostridium thermoaceticum, que fué descubierto en 1942 (4).

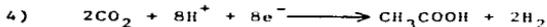
C. thermoaceticum degrada totalmente los azúcares como - la glucosa y xilosa, a acetato como se muestra en las si - guientes reacciones: 1,2.



La conversión cuantitativa de los azúcares en acetato in volucra una fermentación, así como la síntesis a partir de - CO<sub>2</sub>, como se muestra en las reacciones 3 y 4. La reacción 3 representa la fermentación de la glucosa vía glucolítica de - Embden-Meyerhof-Parnas a piruvato, el cual es metabolizado - posteriormente a acetato y CO<sub>2</sub> (4).



La reacción 4 representa la vía de fijación de CO<sub>2</sub>, que - conduce hacia la síntesis de acetato.



De acuerdo con las reacciones anteriores se puede consi - derar que la fermentación se lleva a cabo como se muestra en la figura 2. En donde el CO<sub>2</sub> formado en la fermentación si

ve como aceptor de electrones y es reducido a acetato. Este  $\text{CO}_2$  también está en equilibrio con el  $\text{CO}_2$  libre del medio.

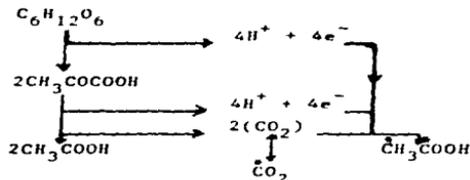
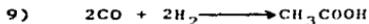


Figura 2. Fermentación de glucosa a 3 moléculas de acetato, mostrando al  $\text{CO}_2$  como aceptor de electrones y la síntesis de un tercio del acetato a partir de  $\text{CO}_2$  (4).

Recientemente se descubrió que Clostridium thermoaceti - cum puede vivir en una mezcla de gases  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$ , así como sobre otros compuestos de un átomo de carbono incluyendo  $\text{CO}$ , formiato y metanol, como se ilustra en las siguientes reacciones (4):

- 5)  $2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \longrightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}_2\text{O}$
- 6)  $4\text{CO} + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{CO}_2$
- 7)  $4\text{HCOOH} \longrightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$
- 8)  $4\text{CH}_3\text{OH} + 2\text{CO}_2 \longrightarrow 3\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$



Varios acetógenos se desarrollan en mezclas de  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  como única fuente de carbono y energía. Por lo tanto estas bacterias son autótrofos oxidantes del  $\text{H}_2$ . Sin embargo, no usan ribulosa-bisfosfato carboxilasa, enzima clave del ciclo de Calvin, para fijar  $\text{CO}_2$  y asimilarlo a carbono celular. En su lugar sintetizan acetyl-CoA, un intermediario en la vía de síntesis de acetato a partir de  $\text{CO}_2$ . Por lo tanto, la acetyl-CoA puede considerarse como el primer producto de fijación autótrófica de  $\text{CO}_2$  en acetógenos (4).

Todas las enzimas de esta vía han sido aisladas de Clostridium thermoaceticum. De estas enzimas, la formato deshidrogenasa, monóxido deshidrogenasa, una proteína corrinóide y la metiltransferasa, son únicas. La formato deshidrogenasa contiene tungsteno, selenio y hierro; la CO-deshidrogenasa tiene níquel, zinc y hierro; y la enzima corrinóide tiene un derivado de la vitamina  $\text{B}_{12}$ . Los intermediarios en la síntesis son: formato, derivados de tetrahidrotolato de un carbono y un metilcorrinóide como se muestra en la figura 3.

El camino establecido para la síntesis de acetato a partir de  $\text{CO}_2$  en C. thermoaceticum, fue sugerido por Wood y colaboradores y pudiera constituir la única vía autótrófica de la fijación de  $\text{CO}_2$ . La misma vía o muy similar puede presentarse en bacterias metanogénicas y bacterias sulfato-reductoras (4).

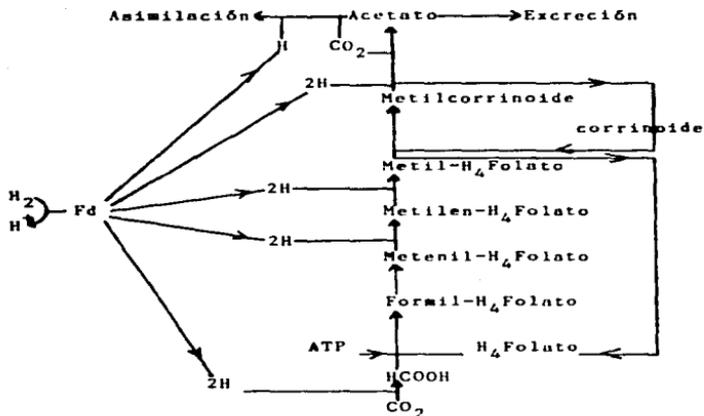


Figura 3. Esquema del metabolismo para  $H_2/CO_2$  en bacterias homoacetogénicas. Propuesta hipotética basada en el metabolismo encontrado en C. thermoaceticum y A. woodii. (3).

## I.2 Propiedades de los microorganismos acetógenos

Clostridium thermoaceticum era el único homoacetógeno - disponible hasta 1967. En ese mismo año se describió otro microorganismo que se pensaba era Clostridium aceticum, pero-

como no se apeaba a la descripción original se le red denominó posteriormente Clostridium formicoaceticum (4). Un tercer homoacetógeno fue descubierto en 1977, Acetobacterium woodii que difiere de los clostridios en que no forma esporas (4).

Los homoacetógenos tienen en común la formación de acetato como el principal o único producto. Todos, excepto Acetanaerobium noterae y Sporomusa sphaeroides convierten 1 mol de fructosa en casi 3 mol de acetato. La glucosa no es fermentada por Acetobacterium wieringae, C. aceticum, C. formicoaceticum y Sporomusa acidovorans. Como grupo, los homoacetógenos convierten a acetato hexosas, pentosas, polioles, azúcares oxidados tales como ácidos óxicos y urónicos, ácidos del ciclo del ácido tricarbóxico, serina, glutamato, dióles, acetofina, lactato y etanol. En la fermentación de los sustratos mencionados el  $CO_2$  sirve como aceptor de electrones y se convierte a acetato (4).

De los homoacetógenos enlistados en la tabla 1, todos a excepción de C. formicoaceticum y C. magnum se desarrollan en una mezcla de  $H_2$  y  $CO_2$  y pueden ser considerados acetógenos autotróficos oxidantes de hidrógeno. Aunque se desarrollan mejor en medios que contengan una pequeña cantidad de extracto de levadura y algunas vitaminas, muchos han demostrado que se desarrollan en medios esencialmente desprovistos de compuestos orgánicos. Varias trazas de metales son esenciales para el desarrollo de acetógenos, entre ellos están: cobalto, hierro, molibdeno, níquel, selenio y tungsteno los cuales son constituyentes de enzimas que están involucra

Tabla 1. Propiedades de algunos homoacetógenos y otros acetógenos.

	Topt (°C)	pHopt	Crecimiento en un átomo de carbon			
			CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub>	CO	CH <sub>3</sub> (OH)/CO <sub>2</sub>	HCOOH
<u>Homoacetógenos</u>						
<i>Acetomicrobium noterae</i>	37	7.0-7.8	<sup>a</sup>	nd	-	nd
<i>Acetobacterium carbinolicum</i> <sup>b</sup>	27	7	+	nd	+	+
<i>A. wieringae</i>	30	7.2-7.8	+	nd	nd	+
<i>A. woodii</i> <sup>b</sup>	30	nd	+	+	+	+
<i>Acetogenium kivui</i>	66	6.4	+	nd	-	+
<i>Clostridium acetificum</i>	30	8.3	+	nd	-	+
<i>C. formicoaceticum</i>	37	7.2-7.8	<sup>c</sup>	nd	+	<sup>c</sup>
<i>C. magnum</i>	31	7	-	nd	-	-
<i>C. thermoaceticum</i>	60	6.8	+	+	+	+
<i>C. thermoautotrophicum</i>	60	5.7	+	+	+	+
<i>Sporomusa acidovorans</i>	35	6.5	+	nd	+	+
<i>S. ovata</i>	34	6.3	+	nd	+	+
<u>Otros acetógenos</u>						
<i>Butyrivacterium methylotrophicum</i> <sup>d</sup>	39	7.5	+	+	+	+
<i>Eubacteria limosum</i> <sup>e</sup>	39	7.2	+	+	+	nd
<i>Desulfotomaculum orientis</i> <sup>f</sup>	37		+	+	+	+
<i>Desulfovibrio boursii</i> <sup>h</sup>	37		+	+	-	+

<sup>a</sup> Requiere extracto de levadura. <sup>b</sup> Forma acetato a partir de grupos metilo de fenilmetiléteres. <sup>c</sup> Sintetiza acetato a partir de CO<sub>2</sub> y formato cuando se desarrolla en fructosa. <sup>d</sup> Producen butirato y acetato. <sup>e</sup> Producen butirato y caproato, además del acetato. <sup>f</sup> Crece en trimetoxibenzato, acetato y algunas veces butirato cuando se desarrolla en medio libre de sulfato. <sup>h</sup> El donador de electrones no es H<sub>2</sub> sino formato. Formato/CO<sub>2</sub> son incorporados en carbono celular vía acetyl-CoA. nd no determinado. <sup>2</sup> (4).

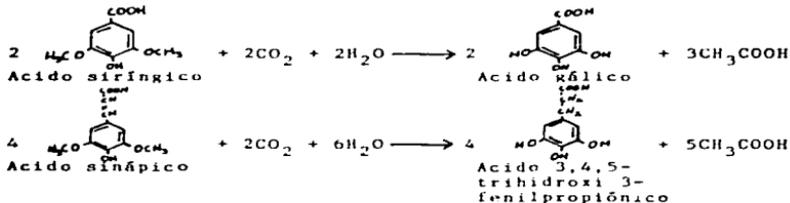
das en la síntesis de acetato a partir de  $\text{CO}_2$ . Sin embargo es difícil demostrar que los acetógenos requieren trazas de metales debido a que toman los metales necesarios de los que están presentes como contaminantes en el medio (4).

Debido a que C. formicoaceticum y C. magnum no crecen en mezclas de  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$ , no pueden considerarse autótrofos; sin embargo sintetizan acetato a partir de  $\text{CO}_2$ . Con C. formicoaceticum se estableció la síntesis demostrando la incorporación de ( $^{14}\text{C}$ )-formato y ( $^{14}\text{C}$ )- $\text{CO}_2$ , con lo que se vio que el  $\text{CO}_2$  marca al grupo carboxilo ligeramente mejor que al grupo metilo mientras que el formato hace lo contrario. La síntesis de acetato a partir de  $\text{CO}_2$  no ha sido establecida usando experimentos de rastreo. Sin embargo, en las fermentaciones de glucosa, fructosa y silosa, la estequiometría es similar a la obtenida con C. thermoaceticum (4).

Es evidente que la hidrogenasa es esencial para el crecimiento autótrofo en mezclas de  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$ , ya que es un mecanismo de síntesis de ATP. La presencia de hidrogenasa no se ha demostrado en C. formicoaceticum y el crecimiento que produce con la fructosa como sustrato indica que el ATP formado es sólo por la fosforilación de sustrato. Sin embargo, C. formicoaceticum tiene un citocromo tipo b y menaquinona, los cuales están asociados con el transporte de electrones y a una fosforilación (4).

Acetobacter woodii se caracteriza como una bacteria homoacetogénica consumidora de hidrógeno. Pero es caracterizada mejor como un mixótrofo capaz de crecer heterótroficamente - vía hidrólisis de compuestos de varios átomos de carbono y -

crecer autotróficamente en compuestos de un sólo átomo de carbono. Se ha visto que A. woodii en presencia de bicarbonato utiliza los grupos metilo de fenilmetiléteres incluyendo ácidos siríngico, 3,4,5-trimetoxibenzóico, sináptico, 3,4,5-trimetoxicinámico, 2,4-dimetoxibenzóico y 3-metoxicinámico. La bacteria también puede reducir la doble ligadura en la cadena lateral del ácido acrílico, caifíco, sináptico y 3,4,5-trimetoxicinámico. Las conversiones de los ácidos siríngico y sináptico a los respectivos derivados hidroxí y acetato se muestran en las siguientes reucciones (24):



Se puede asumir que los grupos metoxi- de los compuestos antes mencionados son la fuente del grupo metil del acetato. Debido a que A. woodii también utiliza metanol para la síntesis de acetato, es posible que el metanol sea un intermedio (24).

La reducción de la doble ligadura en la cadena lateral del ácido acrílico se ha demostrado que está asociada con la generación de ATP, cuyo rendimiento es aproximadamente 1 ATP

mol  $10^{-1}$  por cada reducción de la cadena lateral de ácido acrílico. Así, el ácido caféico y compuestos similares pueden reemplazar al  $CO_2$  como aceptor de electrones en el sistema de producción de energía de A. woodii. Los tenilmetiléteres pueden estar presentes como productos de degradación de lignina. Por lo que su degradación por A. woodii en un ambiente natural anaeróbico es de importancia ecológica (4).

Entre los acetógenos, Butiribacterium methylotrophicum y Eubacterium limosum, los cuales son semejantes entre sí y los homoacetógenos. La diferencia es que además de acetato forman butirato y caproato. Ambos utilizan el metanol pero sólo en presencia de acetato. Crecen en mezclas de  $H_2$  y  $CO_2$  sin que se presente ningún acetato en el medio. El CO también es sustrato para ambas bacterias, el cual es convertido a  $CO_2$  y acetato (4).

Peptostreptococcus productus, U-1, aislado de una muestra de lodo en un recolector de aguas negras, fermenta la glucosa a  $H_2$ , acetato, lactato y succinato por lo que no puede ser considerado un homoacetógeno. Sin embargo se desarrolla en mezclas de  $H_2/CO_2$  con acetato como único producto y también se desarrolla en CO con acetato y  $CO_2$  como productos por lo que se considera un acetógeno. No se desarrolla en metanol o formato (14).

Desulfotomaculum orientis y Desulfovibrio baarsii son bacterias sulfato reductoras que pueden desarrollarse en  $CO_2$  u otros compuestos de un átomo de carbono como únicas fuentes. Por lo tanto son autótrofos y, debido a que el acetato es el producto de asimilación del átomo de carbono, son considerados acetógenos (4).

D. orientis, al igual que A. woodii utiliza grupos metoxi del trimetoxibenzoato y puede desarrollarse en mezcla de  $H_2/CO_2$ , en  $CO$ , formato y metanol. En estos sustratos, en un medio libre de sulfatos con una fase gaseosa de  $H_2/CO_2$  (80/20) ó  $N_2/CO_2$  (80/20), se produce acetato. Aquí el  $CO_2$  se está utilizando como aceptor de electrones en lugar del sulfato. Esto sugiere que D. orientis sintetiza el acetato por el camino autotrófico encontrado en C. thermoaceticum. La evidencia para este camino se obtuvo con Desulfotomaculum baarsii. (4).

También Desulfotomaculum ruminans y Desulfotomaculum nigrificans utilizan compuestos de un átomo de carbono como sustrato. (4).

I.3 La vía de Wood autotrófica de fijación de  $CO_2$  en acetato.

La vía de síntesis de acetato a partir de  $CO_2$  por C. thermoaceticum se muestra en la figura 4. El dióxido de carbono es reducido para formar el grupo metilo de un Co-metilcorrinoide ligado a una proteína vía formato, formil-, metenil-, metilen-, y metiltetrahidrofolato.

En experimentos donde se usó ( $^{13}C$ ) en  $CO_2$  se mostró que un tercio del acetato producido por C. thermoaceticum en fermentaciones de glucosa provenía únicamente a partir de  $CO_2$  (4). Además se presentó una reacción de intercambio entre el grupo carboxilo del acetato y  $CO_2$  lo cual se vio que era catalizado por monóxido de carbono-deshidrogenasa. (4).



La síntesis del acetato a partir de  $\text{CO}_2$ , Co-metilcorri - noide o metiltetrahidrofolato por extractos libres de célula - los mostró ser dependiente de piruvato. El piruvato sirve - como agente reductor y el grupo carboxilo del piruvato es la fuente del grupo carboxilo del acetato. Con la incorpora - ción de  $^{14}\text{CO}_2$  en el carboxilo del acetato se vió que ocurría la síntesis por un intercambio entre  $^{14}\text{CO}_2$  y el grupo carboxilo del piruvato. Este intercambio es catalizado por piruvato-ferredoxina-oxidoreductasa (piruvato deshidrogenasa), - presente en extractos libres de células de C. thermoaceticum. Sin embargo, el  $\text{CO}_2$  el grupo carboxilo del piruvato y el monóxido de carbono son todos precursores del grupo carboxilo del acetato. (4).

Un sistema de cinco proteínas aislado de C. thermoaceticum, cataliza la síntesis de acetato a partir de piruvato y de metiltetrahidrofolato. Este sistema está constituido - por: fosfotransacetilasa, metiltransferasa, piruvato-ferredoxina-oxidoreductasa, ferredoxina y una fracción designada -  $F_3$  que contiene una mezcla de tres o cuatro proteínas.(4).

En la fracción  $F_3$  se encontró que contenía CO-deshidrogenasa y una proteína corrinoide. Esta fracción junto con metiltransferasa y ATP cataliza la síntesis de acetyl-CoA del monóxido de carbono, metiltetrahidrofolato y coenzima A.



Por lo tanto, piruvato y la enzima asociada con el metabolismo de piruvato pueden ser reemplazados por CO, el cual-

se encontró que es un precursor del grupo carboxilo del acetato. El monóxido de carbono deshidrogenasa ha sido purificado de C. thermoaceticum.

Como se ve en la figura 3, la CO-deshidrogenasa ( enzima que contiene níquel ) reacciona con  $CO_2$ , CO y el carboxilo - del piruvato para formar un complejo de un átomo de carbono- de CO-deshidrogenasa, ( CO-Ni-E ). Este complejo reacciona con el grupo metilo de la proteína metilcorrinoide, (  $CH_3-CoE$  ), y coenzima A para producir acetyl-CoA. La acetyl-CoA - puede ser usada para la síntesis de carbono celular o para - convertirse a acetato vía fosfotransacetilasa y acetato quinasa (4).

#### I.3.1 Enzimas involucradas en la vía de Wood.

##### a) Formato deshidrogenasa.-

Las formato deshidrogenasas catalizan la oxidación reversible de formato a  $CO_2$ . Las enzimas purificadas se han obtenido de Clostridium pasteurianum, C. thermoaceticum, Methanobacterium formicicum y Methanococcus vannielii. Esta última bacteria tiene dos formato-deshidrogenasas: una proteína con molibdeno-tungsteno-selenio-hierro-azufre y una proteína con molibdeno-hierro-azufre. Las enzimas de C. pasteurianum y M. formicicum contienen centros de molibdeno y hierro-azufre

La mayoría de las formato deshidrogenasas usan ferredoxina como aceptor de electrones. La formato deshidrogenasa de C. thermoaceticum es la única enzima conocida que cataliza -

reversiblemente la reducción de  $\text{CO}_2$  ó bicarbonato con NADPH.  
(4).



La función fisiológica de la formato deshidrogenasa en bacterias acetogénicas que se desarrollan en mezclas de  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  es reducir el dióxido de carbono a formato. El formato, es por lo tanto, un precursor del grupo metilo del acetato.

Se ha propuesto que estas bacterias pueden convertir el CO directamente a formato cuando se desarrollan en CO. Por lo que se sugirió que el CO forma un intermediario de un carbono ligado a CO-deshidrogenasa. El cual serviría entonces tanto como precursor del grupo carboxilo del acetato como podría ser convertido a formato y entrar a la vía que conduce al grupo metilo del acetato. De esta manera el  $\text{CO}_2$  también podría ser convertido a formato mediante la acción de CO-deshidrogenasa y la formato deshidrogenasa no sería necesaria. Sin embargo no se encontró evidencia para la formación de formato a partir de CO ó  $\text{CO}_2$ . Por lo que se vio que era más probable que a fin de que el CO sea incorporado en un grupo metilo del acetato; en primer lugar debe ser oxidado a  $\text{CO}_2$  por CO-deshidrogenasa, y después ser reducido a formato por formato deshidrogenasa. En estudios realizados con isótopos radioactivos se encontró que  $\text{CO}_2$  y formato son los mejores precursores del grupo metilo y que CO es el mejor precursor-

del grupo carboxilo del acetato (4).

b) Enzimas con tetrahidrofolato.-

En las bacterias acetogénicas, el formato es reducido a un grupo metilo por medio de un intermediario de tetrahidrofolato con un átomo de carbono. Se han reportado cuatro enzimas involucradas (4):

Formil-H<sub>4</sub>folato sintetasa



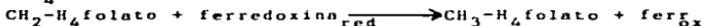
Metenil-H<sub>4</sub>folato ciclohidrolasa



Metilen-H<sub>4</sub>folato deshidrogenasa



Metilen-H<sub>4</sub>folato reductasa



Estas enzimas están presentes en grandes concentraciones y con actividades altamente específicas en C. formicoaceticum, C. thermoaceticum, C. thermoaerophilum y A. woodii. Las cuatro han sido purificadas de C. thermoaceticum y de C. formicoaceticum. También se ha obtenido metilen-H<sub>4</sub>folato deshidrogenasa a partir de A. woodii.

La metilen-H<sub>4</sub>folato deshidrogenasa de C. thermoaceticum-

y C. thermoautotrophicum son dependientes de NAD. Otra diferencia significativa entre las deshidrogenasas es que las enzimas dependientes de NADP de los termófilos son bifuncionales, teniendo actividad de ciclohidrolasa además de la actividad deshidrogenasa (4).

Las deshidrogenasas de C. formicoaceticum y A. woodii no tienen actividad de ciclohidrolasa por lo que son monofuncionales. En cambio las enzimas homogéneas de eucariotes son trifuncionales, catalizando las reacciones de la sintetasa, ciclohidrolasa y deshidrogenasa.

La metilen- $H_4$ folato de C. cylindrosporum es dependiente de NADP, pero carece de actividad de ciclohidrolasa. Esta bacteria sintetiza acetato del  $CO_2$  durante la fermentación de purinas por una vía dependiente del  $H_4$ folato que es diferente de la que presenta la bacteria acetogénica.

La metilen- $H_4$ folato reductasa cataliza la reducción de varios aceptores de electrones artificiales y rubredoxina con metil- $H_4$ folato. También reduce FAD, pero con un gran exceso de metil- $H_4$ folato. No se reduce ferredoxina. En la vía fisiológica, la metilen- $H_4$ folato reductasa cataliza la reducción de metilen- $H_4$ folato con  $FADH_2$  o ferredoxina reducida, pero no con rubredoxina reducida, NADH o NADPH. La ferredoxina reducida es formada por varias reacciones en bacterias acetogénicas y parece ser el reductor natural (4).

c) Metiltransferasa y proteínas corrinoideas.-

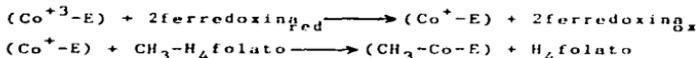
En la síntesis de acetato por C. thermoaceticum, el gru-

po metilo del 5-metil- $H_4$ folato es transferido via una proteina corrinoide a CO-deshidrogenasa, que cataliza la formacion de acetil-CoA. La metilacion de la proteina corrinoide requiere de una metiltransferasa (transmetilasa), como se ve en la via propuesta por Wood en la figura 4.

Se han obtenido dos proteinas corrinoideas de C. thermoaceticum. Una contiene una molécula de 5-metoxibenzimidazolilcobamida, pero no se ha establecido si tiene ingerencia en la sintesis del acetato. La otra, una proteina corrinoide de almacenamiento, si está presente en la sintesis del acetato (4).

El cobalto en corrinoideas está presente como  $Co^+$ ,  $Co^{+2}$  y  $Co^{+3}$ . La reduccion de cob(III)alamina a cob(I)alamina se efectúa por una reductasa especifica & con ferredoxina (4).

La proteina corrinoide de C. thermoaceticum debe también reducirse para aceptar un grupo metilo de 5-metil- $H_4$ folato. La ferredoxina reducida necesaria para este propósito se puede generar usando piruvato con ferredoxina-piruvato oxidoreductasa & CO con CO-deshidrogenasa. La metilacion de la proteina corrinoide reducida con metil- $H_4$ folato se cataliza por una transmetilasa. El grupo CO-metilo de la proteina corrinoide metilada se condensa con CO y CoA para dar acetil-CoA en una reaccion catalizada por CO-deshidrogenasa. De esta manera la proteina corrinoide sufre tres reacciones separadas como se muestra en las siguientes reacciones (4):





En esta última reacción se puede reemplazar el CO ya sea por  $\text{CO}_2$  e hidrogenasa o por piruvato, piruvato-ferredoxina - oxidoreductasa, pirofosfato de tiamina y ferredoxina (4).

d) Monóxido de carbono deshidrogenasa y CO-deshidrogenasa-- disulfuro reductasa.-

Ya se ha mencionado que la CO-deshidrogenasa tiene un pa pel fundamental y es la última de una serie de enzimas necesaria para la síntesis autotrófica de acetyl-CoA. La enzima ha sido purificada de C. thermoaceticum y A. woodii. Las CO deshidrogenasas de las dos bacterias son muy similares, y contienen níquel, zinc o magnesio y varios centros de  $\text{F}_4\text{S}_4$ .

El níquel, descubierto recientemente y de importancia biológica, en la CO-deshidrogenasa de C. thermoaceticum y A. woodii es el lugar de unión para una molécula de carbono yasea CO,  $\text{CO}_2$  o del grupo carboxilo del piruvato que es la fuente del grupo carboxilo de la acetyl-CoA. (15).

Se ha visto que la CO-deshidrogenasa cataliza la condensación de un grupo metilo, CO y CoA para formar acetyl-CoA, - esto nos indica que la enzima debe tener sitios de unión para esos sustratos (15).

Se requiere de una proteína Fx para la síntesis de acetyl-CoA de la proteína corrinóide metilada, CO y CoA catalizada por CO-deshidrogenasa. Esta proteína contiene calcio y

zinc. Cataliza la reducción de disulfuros incluyendo CoAS--SCoA, CoAS-glutati6n y cistina. A esta proteina Fx se le llama mon6xido deshidrogenasa-disulfuro reductasa, cuya funci6n es la de activar la CO deshidrogenasa y así aumentar la sntesis de acetyl-CoA (4).

De esta manera la CO-deshidrogenasa en las bacterias acetog6nicas es la enzima que cataliza el paso final en la sntesis de acetyl-CoA de CO<sub>2</sub>. Por lo que, la funci6n primaria de la CO-deshidrogenasa en estas bacterias puede ser la de sintetizar acetyl-CoA, y la reducci6n de CO<sub>2</sub> a CO unido al níquel lo que puede ser el primer paso en 6sta sntesis (4).

e) Hidrogenasa y generaci6n de energía en acet6genos.-

Se ha demostrado la presencia de hidrogenasas en varias bacterias acetog6nicas incluyendo C. thermoaceticum, C. thermototróficum, C. aceticum y D. orientis (4).

La enzima en A. woodii contiene centros de hierro-azufre y reduce la ferredoxina y flavodoxina, así como también la CO deshidrogenasa con H<sub>2</sub>. Se ha demostrado que la hidrogenasa de C. thermoaceticum reduce en particular el citocromo b de las mismas bacterias (4).

Una funci6n de la hidrogenasa es la de oxidar H<sub>2</sub> en acet6genos que est6n creciendo autotróficamente en mezcla de H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (4).

Se produce hidrógeno cuando C. thermoaceticum crece en glucosa en una fase de CO, pero cuando est6 presente CO<sub>2</sub> no-

se produce en cantidades significativas. Con esto se demuestra que, bajo ciertas circunstancias, C. thermoaceticum puede usar la formación de  $H_2$  como un medio para disponer electrones. La formación de hidrógeno también ha sido demostrada en A. woodii, C. aceticum y A. carbinolicum (16), (17), (18).

Cuando la fructosa o glucosa es fermentada por C. thermoaceticum opera un sistema que requiere de hidrogenasas citoplasmáticas y periplásmicas, transporte de electrones por membranas y una translocación de  $H^+$  en un sistema de ATPasa.

El  $H_2$  tal vez se forme como un intermediario obligatorio durante las fermentaciones conducidas por acetógenos, pero también lo toman y lo reciclan eficientemente para la generación de ATP (4).

La operación de un sistema cíclico  $H_2$  generador de energía pudiera explicar los altos rendimientos de crecimiento obtenidos con varios acetógenos cuando fermentan azúcares; y a que cuando crecen los acetógenos en una mezcla de  $H_2/CO_2$  - su necesidad de hidrógeno citoplasmático no es obvia, y es posible que el ATP pueda ser generado por un sistema como se muestra en la figura 5:

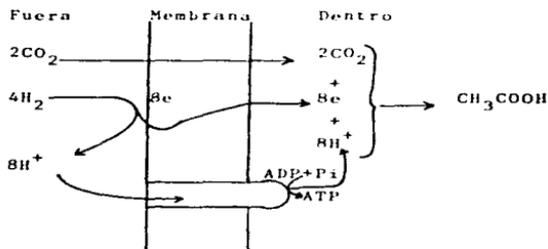


Figura 5. Generación de ATP por un sistema cíclico que utiliza  $H_2$  (4).

### I.3.2 Metanol como precursor de acetato.

En estudios realizados con  $^{13}\text{C}$ , indicaron que el metanol en presencia de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}$  o formato marca predominantemente al grupo metilo. Estos análisis también mostraron que el metanol se oxida a  $\text{CO}_2$  y se incorpora directamente al grupo metilo del acetato (14).

La entrada del metanol a la vía de síntesis del acetato en la vía de Wood, parece efectuarse a la altura de la protéina corrinoide (CoE) y metiltransferasa (4).

Supuestamente se puede oxidar el metanol a  $\text{CO}_2$  al invertir las reacciones de tetrahidrolato de la síntesis del acetato. Sin embargo, es más probable que el metanol se oxide por una nueva metanol deshidrogenasa que contenga la coenzima pirroloquinolin-quinona (PQQ) asociada con NADH deshidrogenasa. Hay evidencias de esta metanol deshidrogenasa en C. thermoceticum y E. limosum, y es posible que esta enzima junto con formato deshidrogenasa pueda catalizar la oxidación de metanol a  $\text{CO}_2$ . Si estas reacciones son reversibles, puede haber una ruta alterna para la síntesis del grupo metilo del acetato que no requiera tetrahidrolato (4).

### I.3.3 Acetil-CoA como precursor de carbono celular en acetógenos.

Acetil-CoA es el precursor de lípidos, aminoácidos, nucleótidos, carbohidratos y de una variedad de metabolitos secundarios. Es el compuesto ideal con el que se debe empezar

la síntesis de material celular (4).

En estudios con ( $^{14}\text{CO}_2$ ) se vió que la acetil-CoA formada es incorporada a los azúcares fosfatados, aminoácidos y ácidos carboxílicos. Estos datos fueron obtenidos con células de C. thermoaceticum fermentando xilosa y expuesto por 5 segundos a ( $^{14}\text{CO}_2$ ) (20).

En estudios hechos con carbono marcado y de las enzimas involucradas en la fijación de  $\text{CO}_2$  y de la síntesis de carbono celular de acetil-CoA en A. woodii, los resultados fueron similares a los obtenidos con C. thermoaceticum. También se mostró que el piruvato es convertido directamente a fosfo-enolpiruvato seguramente por una piruvato fosfato diquinasa:



Además se forma oxalacetato a partir de fosfoenolpiruvato por PEP-carboxi-transfosforilasa (20):



La bacteria sulfato-reductora Desulfovibrio baarsii se desarrolla en formato y  $\text{CO}_2$  como única fuente de carbono(4).

En estudios similares se demostró que el acetato (acetil CoA) es un producto de la asimilación del formato y  $\text{CO}_2$  y se usa para la síntesis de compuestos celulares. Sugiriéndose que la vía de síntesis del acetato es la misma tanto para D. baarsii como en C. thermoaceticum. El metabolismo del acetil CoA parece ser también como en el de C. thermoaceticum y A. woodii (4).

#### 1.4 Asociación sintrófica facultativa en fermentación de azúcares.

Un ejemplo del efecto de la transferencia de electrones-interespecies en fermentación de azúcares, es Ruminococcus albus creciendo en la presencia y ausencia de Wolinella succinogenes (anteriormente vibrio). En cultivos puros este organismo forma acetato, CO<sub>2</sub>, hidrógeno y etanol como productos finales (1).

En cocultivos el hidrógeno es eliminado eficientemente, mientras que el etanol no se produce. Debido a que el organismo forma ATP durante la síntesis de acetato de acetyl-CoA pero no sucede así con etanol, el ATP producido por la glucosa es más alto en el cocultivo que en el cultivo puro (1).

#### 1.5 Asociación sintrófica obligada.

La degradación sintrófica obligada ha sido descrita para un número de compuestos. Estos incluyen alcoholes (etanol, metanol), ácidos grasos (acetato, propionato, butirato), aminoácidos (glutamato, aspartato, alanina, valina, histidina, leucina, isoleucina), otros ácidos orgánicos (lactato, malato, glicolato), y otros compuestos aromáticos (benzoato, hidroquinona, fenol) (1).

Por lo menos un paso de oxidación en la conversión de estos compuestos es energéticamente difícil, y tiene que ser inducido por bacterias metanogénicas o por otros anaerobios que utilizan H<sub>2</sub>/formato. Por lo que, son esenciales bajas -

concentraciones de hidrógeno y formato. Además, la proporción de conversión es determinada por el flujo de hidrógeno y formato en el sistema. Esto último es de particular importancia debido a que el gradiente de concentración entre las bacterias acetogénicas y metanogénicas puede ser más bien bajo (1).

#### Syntrophomonas wolfei.-

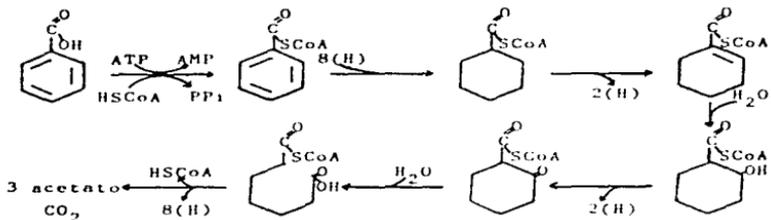
Es una bacteria que degrada sintróficamente butirato y otros ácidos grasos de cadena corta con Syntrophospora bryantii (anteriormente clostridium) (1).

En S. wolfei y S. bryantii el butirato es convertido a acetato por B-oxidación. El butirato es activado a butiril-CoA, el cual es convertido a 2 acetil-CoA vía de oxidación en dos pasos. Un acetil-CoA es usado para la activación del butirato, mientras que el otro junto con ATP, en la conversión a acetato (1).

#### Syntrophus buswellii.-

Crece en cocultivos con una bacteria metanogénica o con Desulfovibrio sp. Se ha propuesto una vía reductiva que esta involucrada en la degradación sintrófica del benzoato. En ésta, el anillo de benceno es primero reducido y ocurre después la fisión del anillo como resultado de una oxidación. El ácido dicarboxílico que se forma es entonces degradado vía B-oxidación a 3 acetato y  $\text{HCO}_3$  (1).

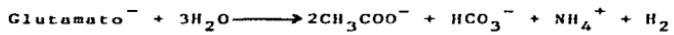
Vía hipotética de la oxidación sintrónica del benzoato (1).



Clostridium sporogenes, Eubacterium acidaminophilum, Acidaminobacter hydrogenoformans y Selenomonas acidaminovorans, son ejemplos de bacterias que pueden crecer sinttricamente con uno o mäs aminoácidos, como aspartato, alanina, leucina, isoleucina o valina (1).

El paso inicial en la degradación de alanina, valina, leucina e isoleucina es una deaminación dependiente de NADP al correspondiente cetoácido. El cetoácido es convertido además por una probable descarboxilación oxidativa dependiente de ferredoxina a ácidos grasos (1).

El glutamato es fermentado por Acidaminobacter hydrogenoformans a:



En cultivos puros, esta bacteria sólo puede producir fogmato (1).

II. Catabolismo del acetato.

## II.1 Bacterias Metanogénicas.

Las bacterias metanogénicas llevan a cabo la última etapa de la digestión anaerobia, en la cual los productos finales de la fermentación ácida son convertidos a gases, principalmente metano y  $CO_2$ . Las bacterias metanogénicas están representadas por varias especies con diferente morfología y estructura celular, encontrándose entre ellas especies mesófilas y termófilas (21).

Estas bacterias son esenciales para la digestión anaerobia debido a que son los únicos microorganismos capaces de metabolizar anaeróbicamente acetato e hidrógeno (21).

Las bacterias metanogénicas oxidan un número reducido de sustratos entre los que se encuentran: hidrógeno, formato, metanol, acetato, etanol y otros compuestos de un átomo de carbono (21).

Entre las bacterias metanogénicas están: las bacterias hidrogenotróficas no acetoclásticas, las cuales obtienen energía de la oxidación del hidrógeno en presencia de  $CO_2$  co-

mo aceptor de electrones. La mayoría de estos grupos de bacterias pueden utilizar el formato como sustrato:



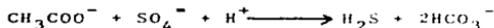
Otro grupo está formado por bacterias metanogénicas acetotolísticas, las cuales producen metano a partir del ácido acético:



Estas bacterias son muy importantes ya que el 90% del metano obtenido en un reactor se debe a ellas (21).

Cuando en el agua residual hay una concentración de sulfatos no limitante, pueden crecer también las bacterias sulfato reductoras, las cuales tienen la capacidad de reducir los sulfatos a sulfuros de hidrógeno, utilizando al sulfato como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria y la materia orgánica como donador de electrones (21).

Las bacterias sulfato reductoras no establecen relaciones simbióticas con las metanogénicas, sino por el contrario entran en competencia, inhibiendo el crecimiento de estas glútimas y deteniéndose la producción de metano (21):



## II.2 Catabolismo del acetato a $\text{CO}_2$ y $\text{CH}_4$ .

La degradación del acetato a  $\text{CO}_2$  en los organismos aerobios es a través del ciclo del ácido cítrico. Este ciclo en forma modificada, también opera en algunas bacterias anaerobias. Sin embargo la mayoría de las bacterias anaerobias - que oxidan acetato (acetil-CoA) utilizan un mecanismo completamente nuevo que involucra unidades de un átomo de carbono como intermediarios y como enzima clave la monóxido de carbono deshidrogenasa. Esta vía tiene muchas reacciones en común con la vía precedente a la degradación del acetato a  $\text{CO}_2$  y metano (5).

Entre los organismos anaerobios que pueden oxidar acetato (acetil-CoA) a  $\text{CO}_2$  son filogenéticamente divergentes: se encuentran tanto en el reino Eubacteria como en el reino Arqueobacteria. La habilidad para degradar acetato a  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$  se restringe a los géneros Methanosarcina y Methanothrix del filum Methanomicrobiales, que pertenecen a las arqueobacterias (5).

El acetato es el único compuesto orgánico con una cadena C-C que las bacterias metanogénicas pueden degradar. Algunos metanógenos pueden oxidar alcoholes como el isopropanol y etanol con  $\text{CO}_2$  como aceptor de electrones, pero la oxidación no es completa (5).

### Methanosarcina barkeri.-

Es un metanógeno metabólicamente versátil, puede crecer en  $\text{CO}_2/\text{H}_2$ , en  $\text{CH}_3\text{OH}$  o en metilamina, acetato y piruvato.

En estudios realizados con (2-<sup>14</sup>C) en acetato, se vio - que el grupo metilo del acetato es incorporado intacto al me tano (5).

En estos últimos años se ha dilucidado la vía metaboli - ca. El acetato se activa a acetyl-CoA vía acetato quinasa y fosfotransacetilasa. La acetyl-CoA es entonces separada a - dos unidades de C<sub>1</sub>, una a nivel de oxidación de CH<sub>3</sub>OH y otra a nivel de oxidación de CO. La primera unidad de C<sub>1</sub> es redu cida a metano, derivando los electrones de la oxidación de - la última unidad de C<sub>1</sub>. Los intermediarios del grupo metilo del acetato en la formación del metano, son metil-H<sub>4</sub>-metano - pterina y metil-CoM (5).

La ruptura del enlace carbono-carbono de acetyl-CoA y la oxidación de CO a CO<sub>2</sub> son catalizadas por la enzima CO-des<sup>h</sup>i drogenasa. La transferencia del grupo metilo a H<sub>4</sub>-metano<sup>pt</sup>erina y de metil-H<sub>4</sub>-metano<sup>pt</sup>erina a CoM involucra proteínas - que contienen corrinoides. La reducción de metil-CoM a met no es catalizada por metil-CoM reductasa que contiene la co - enzima F<sub>430</sub> (porfirinoide-níquel). El donador directo de elec - trones para metil-CoM reductasa es 7-mercaptoheptanoil<sup>treon</sup>i na fosfato (H-S-HTP), como se muestra en la figura 6 (5).

La activación de acetato a acetyl-CoA a través de aceta - to-quinasa y fosfotransacetilasa requiere de una mol de ATP. De manera que debe ser generado más de un mol de ATP durante la formación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> a partir de acetyl-CoA. La conver sión de CO/H<sub>2</sub>O a CH<sub>4</sub>/H<sub>2</sub> y la reducción de metanol con H<sub>2</sub> a - metano son acopladas con la fosforilación de ATP vía poten -

cial electroquímico protón-matriz. (5).

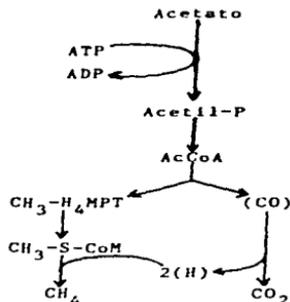


Figura 6. Vía de la fermentación del acetato en *M. barkeri* creciendo en acetato.  $\text{CH}_3\text{-H}_4\text{MPT}$ : metiltetrahidrometanoptina;  $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ : metil-coenzima M; (CO): monóxido-deshidrogenasa (5).

*Methanosarcina thermophila*.

Esta especie crece a 55°C, y contiene las mismas enzimas que *Methanosarcina barkeri* como: acetato-quinasa, fosfotrans acetilasa, CO-deshidrogenasa y metil-CoM reductasa, por lo -

que probablemente utilice la misma vía para la fermentación del acetato a  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$  (5).

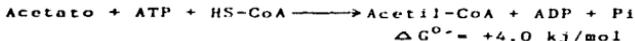
Methanotherix shoehngeni. -

Las especies del género Methanotherix difieren de las especies Methanosarcina en que se especializan por el acetato como única fuente de energía. Methanotherix no puede crecer en  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  o en metanol, y además crecen muy lentamente en el laboratorio.

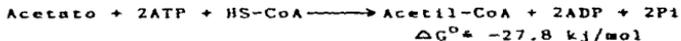
Estos dos tipos de metanógenos difieren considerablemente en morfología y fisiología. Methanosarcina sp. crece en altas concentraciones de acetato, sin embargo Methanotherix - sp. aunque tiene una gran afinidad por el acetato crece mejor a bajas concentraciones de éste en un bioreactor anaerobio (5).

La diferencia en la afinidad por el acetato es causada por los diferentes sistemas enzimáticos que intervienen en la activación del acetato (1).

Methanosarcina como se mencionó anteriormente, activa al acetato a acetil-CoA vía acetato-quinasa y fosfotransacetilasa:



Mientras que Methanothrix, activa al acetato con una acetil-CoA sintetasa y una fosfotransacetilasa, el AMP es convertido en ADP por una adenilato quinasa:

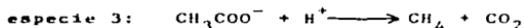
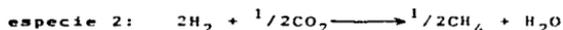
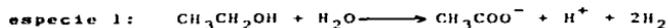


Esta reacción de activación del acetato es más exergónica y por esto, se pueden alcanzar concentraciones bajas de acetato por Methanothrix (1).

Methanobacterium omelianski. -

Esta bacteria oxida etanol a acetato y metano. Se sugiere que un sólo organismo no puede llevar a cabo estas transformaciones. En 1967 Brvant y colaboradores reportaron que un cultivo de M. omelianski contenía en realidad dos especies bacterianas y no una (2).

Con el aislamiento de estas bacterias se demostró que la completa oxidación de un compuesto simple como es el etanol a  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$  requiere la contribución de tres especies separadas:



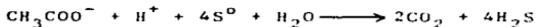
Demostrándose de ésta manera una asociación simbiótica entre las bacterias (23).

### II.3 Oxidación del acetato por la vía del ácido cítrico.

Dos tipos metabólicos de bacterias anaerobias utilizan - el ciclo del ácido cítrico para la oxidación del acetato: - las eubacterias sulfato-reductoras Desulfuromonas y Desulfobacter (5).

#### Desulfuromonas acetoxidans. -

Es una eubacteria gram-negativa que crece en acetato y - sulfuro como única fuente de energía (5).



La deshidrogenación del acetato en esta bacteria es por la vía del ciclo del ácido cítrico; esta bacteria tiene una alta actividad específica de isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP, una 2-oxoglutarato: ferredoxina oxidoreducta

sa: menaquinona oxidoreductasa y una malato deshidrogenasa -  
 específica de NAD. También presenta actividad de citrato -  
 sintasa, aconitasa y fumarasa. El acetato es activado vía -  
 succinil-CoA como se muestra en la figura 7:

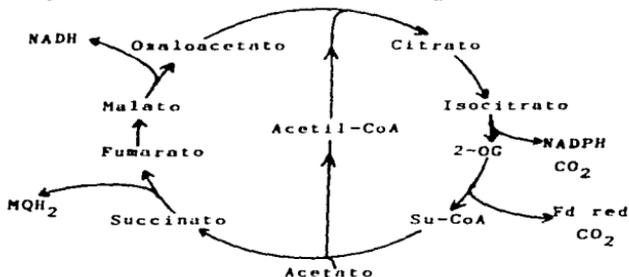


Figura 7. Ciclo del Acido cítrico que opera en Desulfuromonas acetoxidans, creciendo en acetato y sulfuro. 2-OG: 2-oxo glutarato; Su-CoA: succinil-CoA; Fr. red: ferredoxina reducida; MQH<sub>2</sub>: menaquinona H<sub>2</sub>; (5).

Ninguna de las reacciones de este ciclo consumen o generan ATP; por lo tanto, el transporte de electrones de una coenzima reducida a un aceptor final de electrones S<sup>0</sup> debe a coplarse con la fosforilación de ADP. La reducción de S<sup>0</sup> con ferredoxina, es el sitio más probable de conservación de energía (5).

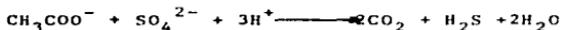
En Desulfuromonas acetoxidans, el acetato después de activarse a acetyl-CoA es carboxilado a piruvato. Del piruva-

to se forma fosfoenolpiruvato, el cual es también carboxilado a oxaloacetato. La bacteria tiene actividad anabólica de acetil-CoA sintetasa, piruvato: ferredoxina oxidoreductasa - (piruvato sintetasa), fosfoenolpiruvato sintetasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa (5).

La ferredoxina reducida para la síntesis del piruvato de acetil-CoA y  $\text{CO}_2$ , es generada por la oxidación del 2-oxoglutarato en el ciclo del ácido cítrico (5).

#### Desulfobacter postgatei.-

También es una eubacteria gram-negativa sulfato-reductora, vive a expensas de la oxidación del acetato con sulfato para producir  $\text{CO}_2$  (5).



En *Desulfobacter postgatei* se encontró la misma secuencia de oxidación del acetato que en Desulfuromonas acetoxidans: acetato  $\longrightarrow$  acetil-CoA  $\longrightarrow$  piruvato  $\longrightarrow$  fosfoenolpiruvato  $\longrightarrow$  oxaloacetato (5).

La síntesis de citrato a partir de acetil-CoA y oxaloacetato es catalizada por una liasa citrato-ATP, más bien que por una citrato sintetasa (5).

Para la activación del sulfato se requiere de 2 moles de ATP. Pero sólo un mol de ATP es formado durante la vía, por fosforilación a nivel de sustrato, por lo que más de un mol de ATP debe ser generado durante el transporte de elec -

trones hasta el aceptor terminal APS y sulfito. Hay evidencia de que esa transferencia de electrones desde NADPH a menaquinona es el sitio de conservación de energía (5).

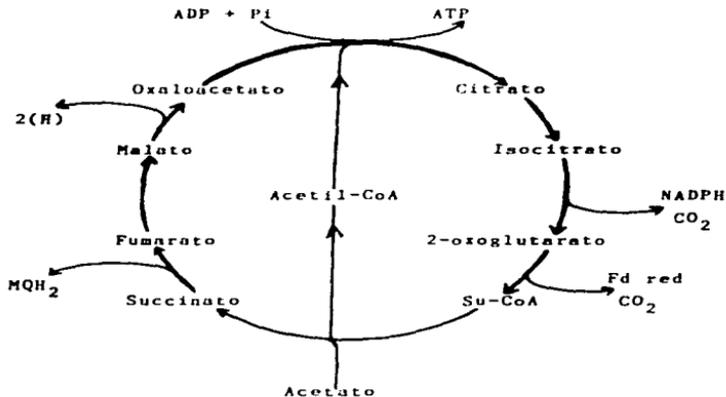


Figura 8. Ciclo del ácido cítrico que opera en Desulfobacter postgatei, creciendo en acetato y sulfato (5).

#### II.4 Oxidación del acetato vía CO-deshidrogenasa.

##### Desulfotomaculum acetoxidans. -

Es una eubacteria gram-positiva, crece en acetato como única fuente de energía y sulfato como aceptor de electrones (5).



En extractos de células de esta bacteria se encontró gran actividad de acetato quinasa, fosfotransacetilasa, metilén-H<sub>4</sub>folato reductasa, metilén-H<sub>4</sub>folato deshidrogenasa, metenil-H<sub>4</sub>folato ciclohidrolasa, formil-H<sub>4</sub>folato sintetasa, formato deshidrogenasa y CO-deshidrogenasa, que intervienen en la vía:

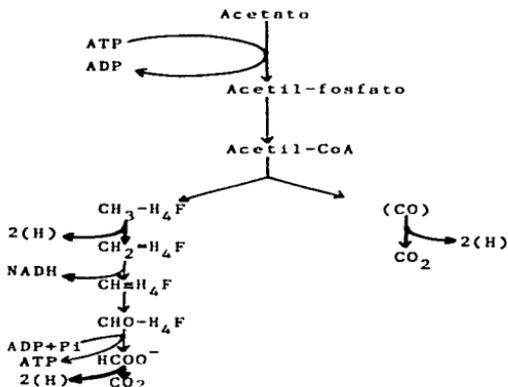


Figura 9. Vía CO-deshidrogenasa que opera en Desulfotomaculum acetoxidans, creciendo en acetato y sulfato (5).

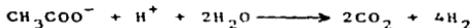
En esta vía se requiere de un mol de ATP para la activación del acetato a acetyl-fosfato y un mol de ATP es generado de ADP y fósforo en la reacción de formil-H<sub>4</sub>-folato sintetasa. Así, la deshidrogenación del acetato a través de esta vía no se asocia con la generación de ATP vía fosforilación a nivel de sustrato. La reducción del sulfato se lleva a cabo igual que en otras bacterias sulfato-reductoras (5).

#### Desulfobacterium autotrophicum. -

Es una eubacteria gram-negativa sulfato reductora, que puede crecer litoautotróficamente en H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y sulfato como única fuente de carbono y energía, u organoheterotróficamente en acetato y sulfato. Todas las enzimas de la vía CO-deshidrogenasa están presentes con suficiente actividad específica, cuando la bacteria crece en acetato y sulfato. Aunque la vía difiere de la que realiza la bacteria anterior (5).

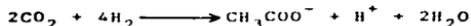
#### Reversibacterium. -

Es una eubacteria gram-positiva que oxida el acetato a - 2CO<sub>2</sub> con protones como aceptores de electrones (5).



Esta bacteria sólo crece en asociación simbiótica con bacterias consumidoras de H<sub>2</sub>. Recientemente se ha encontrado que después de un periodo de adaptación, el organismo puede crecer a altas presiones parciales de H<sub>2</sub>, pero reduciendo

el CO<sub>2</sub> a acetato:



Células crecidas en acetato e H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> contienen una CO - deshidrogenasa activa y formato deshidrogenasa, por lo que - la vía de oxidación del acetato es similar a la de Desulfotomaculum acetoxidans (5).

Bacterias desnitrificantes.-

Muchas bacterias pueden crecer en acetato y nitrato como fuente de energía con la formación acompañada de N<sub>2</sub>:



Se ha determinado que bajo condiciones aerobias y anaerobias, estos organismos utilizan el ciclo del ácido cítrico - como mecanismo de respiración terminal (5).

La bacteria desnitrificante Thiobacillus versatus, cuando se cultiva anaerobicamente en acetato y nitrato, tiene alta actividad específica de isocitrato liasa y malato sintasa. En cambio cuando la bacteria crece en condiciones aerobias, la isocitrato liasa se encuentra completamente inhibida (5).

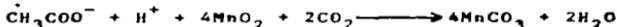
Bacteria reductora de iones férrico y manganeso.-

La bacteria denominada GS-15 recientemente aislada, es u

na bacteria estrictamente anaerobia que crece en acetato y  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ,  $\text{MnO}_2$ , o  $\text{NO}_3^-$  como aceptores de electrones. El acetato es oxidado a  $\text{CO}_2$  con la reducción de óxido de hierro amorfo (III) a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ):



la reducción de  $\text{MnO}_2$  a rodocrosita ( $\text{MnCO}_3$ ):



y la reducción de nitrato a amoníaco:



El oxígeno no sirve como aceptor de electrones, incluso inhibe el crecimiento de la bacteria. El mecanismo por el cual el acetato es catabolizado no se ha determinado, pero se cree que el acetato no se oxida por la vía de CO-deshidrogenasa debido a los altos potenciales de oxido-reducción de  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  y de  $\text{Mn}^{4+}/\text{Mn}^{2+}$  que inhiben la función de la enzima. La enzima clave de esta vía es sólo activa cuando el potencial de oxido-reducción en la célula es bajo (5).

### Discusión.

La digestión anaerobia de materia orgánica hasta metano, es un proceso estable cuando se desempeña bajo condiciones ambientales definidas, debido a las actividades catabólicas de las poblaciones de bacterias anaerobias de los diversos aunque específicos sustratos.

El metabolismo combinado e interdependiente de estas poblaciones explica la estabilidad y actividad del proceso.

La estabilidad de la población se refleja en las interacciones de las especies que proporcionan las condiciones óptimas para el metabolismo anaerobio, incluyendo el suministro de nutrientes esenciales, remoción de metabolitos que inhiben el proceso y/o incrementar los índices catabólicos específicos.

Los pasos limitantes en la digestión anaerobia parecen estar relacionados a las características fisiológicas de la-

degradación de biopolímeros por bacterias hidrolíticas y al-  
metabolismo del acetato por bacterias metanogénicas.

El metano, producto final de la última reducción en el -  
proceso de digestión anaerobia, es el único producto de la -  
fermentación bacteriana que aparece catabólicamente inerte y  
no tóxico en ausencia de aceptores de electrones microbianos  
como es el oxígeno.

Se ha encontrado que el  $H_2$  es esencial en la interacción  
entre estas bacterias, lo que involucra un proceso llamado -  
transferencia de  $H_2$  interespecies, ya que algunas bacterias-  
producen hidrógeno, mientras que otras lo consumen. Las aso-  
ciaciones sintróficas basadas en este proceso pueden estar -  
formadas por Syntrophomonas wolfei con especies de los géne-  
ros Desulfovibrio y A. woodii con metanógenas. Las bacte-  
rias acetogénicas tienen un papel importante en los procesos  
de transferencia de  $H_2$ , debido a que pueden funcionar como -  
productoras de hidrógeno cuando fermentan compuestos orgáni-  
cos y como consumidoras de hidrógeno cuando se desarrollan -  
autotróficamente.

La vía de síntesis de metano a partir de  $CO_2$  en metanóge-  
nas involucra varias coenzimas únicas que incluyen al metano  
furano y tetrahidrometanopterina. Estos cofactores sirven co-  
mo portadores de un átomo de carbono como lo hace el tetrahi-  
drololato en las bacterias acetogénicas.

La mayoría de las bacterias acetogénicas crecen sintrófi-  
camente con bacterias metanogénicas en ácidos grasos y com-  
puestos aromáticos, pero también muestran crecimiento en o-  
tros sustratos en ausencia de bacterias metanogénicas.

Algunas bacterias acetogénicas pueden crecer simbióticamente con bacterias metanogénicas cuando utilizan sólo  $H_2$ , - pero otras requieren de las bacterias metanogénicas cuando - ambas utilizan  $H_2$  y formato.

Los compuestos alifáticos y aromáticos altamente clora - dos, son difíciles de degradar en condiciones aerobias pero - si son degradados anaerobicamente.

La compleja relación simbiótica entre las numerosas espe - cias bacterianas existentes es de gran utilidad para el pro - ceso anaerobio en el tratamiento de aguas residuales con la - producción de gas biogénico ( metano ). Por lo que se está - utilizando cada vez más para el tratamiento de aguas residuo - les industriales, en la agricultura y en desechos municipa - les, con una gran variedad en características y concentracio - nes de materiales orgánicos.

### Conclusiones.

- En ambientes anaerobios, la materia orgánica se degrada por diversos grupos de bacterias: hidrolíticas, fermentadoras, acetogénicas y metanogénicas.
- Se encuentra una gran similitud entre las vías que conducen a la síntesis del acetato en bacterias acetogénicas y las vías de síntesis del metano en arqueobacterias.
- Muchos microorganismos acetógenos encontrados en ambientes anaerobios naturales están involucrados en la degradación de fenilmetiléteres.
- El  $H_2$  es esencial en la interacción entre las bacterias involucradas en el proceso anaerobio.
- Las bacterias acetogénicas pueden actuar como producto-

ras de  $H_2$  cuando fermentan compuestos orgánicos y como consumidoras de  $H_2$  cuando se desarrollan autotróficamente.

- El significado ecológico de la interacción metabólica de las bacterias homoacetogénicas y metanogénicas sugiere que existe una asociación mutualista y antagonista.

- La necesidad de eliminar productos da como resultado que crezcan sintróficamente bacterias acetogénicas y metanogénicas.

- Las bacterias involucradas en el proceso anaerobio, pueden tener un papel relevante en la bioremediación del suelo y el agua.

- Se sugiere la importancia de profundizar en el estudio filogenético del metabolismo de bacterias acetogénicas y metanogénicas.

**Bibliograffa.**

1. Stams Alfons J.M. Metabolic interactions bewteen anaerobic bacteria in methanogenic environments. Antonie van Leeuwenhoek. International Journal of General and Molecular Microbiology, 66: 271-294, 1994. Kluwer Academic Publishers.- Netherlands.
2. McCarty Perry L. One hundred years of Anaerobic treatment. Elsevier Biomedical Press B.V. Pags 2-22, 1982. Hughes et al.,Eds. EUA.
3. Zeikus J.G. Microbial Populations in Digesters, in: Anaerobic Digestion, D.A. Stafford, B.I. Wheatley and D.E. Hughes Eds. Pags 61-85, 1979. Applied Science Publishers LTD London.
4. Ljungdahl Lars G. The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. Annual Review of Microbio

logy, 40: 415-450, 1986.

5. Thauer R.K., D. Möller-Zinkhan, y A.M. Spormann. Biochemistry of acetate catabolism in anaerobic chemotrophic bacteria. Annual Review of Microbiology, 43: 43-67, 1989.

6. Gray N.F. Biology of Wastewater treatment, in Biological Waste Treatment, Eckenfelder Jr. W.W. O'Connor D.J. - Pags 150-231, 1991. Ed. Pergamon. EUA.

7. Thakur M.S., Kennedy M.J., Karant N.G. An Environmental Assessment of Biotechnological Processes. Advances in Applied Microbiology, 30: 67-85, 1991.

8. Gerardi M.H., Horsfall F.L. Wastewater Biology. The Microlife. Pags 121-122, 1991. Ed. Imperial Printing Co. - EUA.

9. Rittman B.E. Innovations in Biological Processes for Pollution Control, in Environmental Microbiology, Ralph Mitchell. Pags 265-286. Ed. Willey-Liss, 1992. EUA.

10. Colby John, Howard Dalton, and Roger Whittenbury. Biological and Biochemical aspects of microbial growth on  $C_1$  compounds. Annual Review of Microbiology, 33: 481-517. - 1979.

11. Drake, H.L., 1982 in Ljungdahl Lars G. The autotrophic

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. Ann -  
Rev of Microbiol, 40: 415-450, 1986.

12. Pezacka, E., Wood, H.G. 1984 in Ljungdahl Lars G. The-  
autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacte-  
ria. Ann.Rev. of Microbiol, 40: 415-450, 1986.

13. Ragsdale, S.W., Wood, H.G. 1985 in Ljungdahl Lars G. -  
The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic -  
bacteria. Ann.Rev. of Microbiol, 40: 415-450, 1986.

15. Ferry James G. CO-Dehydrogenase. Annual Review of Mi-  
crobiology, 49: 305-333, 1995.

14. Lorowitz, W.H., Bryant, M.P. 1984 in Ljungdahl Lars G.-  
The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic -  
bacteria. Ann.Rev. of Microbiol. 40: 415-450, 1986.

16. Braun, K., Gottschalk, G. 1981 in Ljungdahl Lars G. -  
The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic -  
bacteria. Ann.Rev. of Microbiol. 40: 415-450, 1986.

17. Winter, J.V., Wolfe, R.S. 1980 in Ljungdahl Lars G. The  
autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacte-  
ria. Ann.Rev. of Microbiol, 40: 415-450, 1986.

18. Eichler, B., Schink, R.S. 1984 in Ljungdahl Lars G. The  
autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacte

ria. Ann.Rev. of Microbiol. 40: 415-450, 1986.

19. Kerby, R., et al. 1983 in Ljungdahl Lars G. The auto-trophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. Ann.Rev. of Microbiol. 40: 415-450, 1986.

20. Ljungdahl, L., Wood, H.G. 1965 in Ljungdahl Lars G. The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. Ann.Rev. of Microbiol. 40: 415-450, 1986.

21. Ferry James G. Methanogenesis. Ecology, Physiology. - Biochemistry 7 Genetics. Chapman and Hall Microbiology series. Pags 207-395. 1993. London.

22. Namsarnev, B.B., Dulov, L.E., Sokolova, E.N., Zenskaya, T.I. Bacterial Methane Production in the Bottom Sediments - of Lake Baikal. Microbiol. Vol. 63 No 3. Pags 346-352. - 1995.

23. Bryant et al, 1967 in McCarty Perry L. One hundred - years of Anaerobic treatment. Elsevier Biomedical Press B.V Pags 2-22, 1982. Hughes et al.,Eds. EUA.

24. Bache, R., Pfennig, N. 1981 in Ljungdahl Lars G. The - autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. Ann.Rev. of Microbiol. 40: 415-450, 1986.

25. Duine, J.A., Frank, J. Jzn. 1981 in Ljungdahl Lars G. - The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic - bacteria. Ann.Rev. of Microbiol,40: 415-450, 1986.