



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A CADMIO**  
*EN *Methanosarcina acetivorans**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

**Q.A. ELIZABETH LIRA SILVA**

TUTOR: DR. RAFAEL MORENO SÁNCHEZ  
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA “IGNACIO CHÁVEZ”

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología bajo la dirección de los Drs. Ricardo Jasso Chávez y Rafael Moreno Sánchez.

### Integrantes del comité tutor

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez (Facultad de Medicina, UNAM)

Dr. Guillermo Gosset Lagarda (Instituto de Biotecnología, UNAM)

La autora de esta tesis agradece la beca otorgada por el CONACyT (268871) y también al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB, UNAM).

Este proyecto fue financiado por los donativos otorgados por CONACyT SEP- Ciencia Básica No. 156969 al Dr. Ricardo Jasso Chávez y No. 239930 al Dr. Rafael Moreno Sánchez y por la Secretaría de Ciencia y Tecnología, antes ICyTDF, PIC508-5 (a los doctores RMS y RJC).

El jurado del examen doctoral estuvo constituido por

|             |  |
|-------------|--|
| Presidente: | Dr. Otto Geiger<br>Centro de Ciencias Genómicas, UNAM                                |
| Secretario: | Dr. Rafael Moreno Sánchez<br>Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez       |
| Vocal:      | Dr. Wilhelm Hansberg Torres<br>Instituto de Fisiología Celular, UNAM                 |
| Vocal:      | Dr. Alfredo Martínez Jiménez<br>Instituto de Biotecnología, UNAM                     |
| Vocal:      | Dr. José Salud Rodríguez Zavala<br>Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez |

**“Al que cae desde una dicha cumplida no le importa cuán profundo sea el abismo”.**

**Lord Byron**

**A René Gerardo por su amor y apoyo incondicional.**

**Gracias, sabes que esto no habría sido posible sin ti...**

**A las tres mujeres más importantes de mi vida: mi mamá Mary, mi mamá Irene y a mi tía Reyna. Gracias por todo su amor y enseñanzas.**



## Contenido

|  |     |
|--|-----|
| Agradecimientos .....  | I   |
| Índice de figuras .....  | VI  |
| Índice de tablas .....   | VII |
| Resumen .....  | 1   |
| Abstract .....   | 3   |
| Capítulo 1. Introducción.....  | 5   |
| 1.1 Importancia ecológica y biotecnológica de los metanogénicos.....   | 5   |
| 1.2 <i>Methanosarcina acetivorans</i> .....  | 8   |
| 1.3 Metanogénesis .....  | 9   |
| 1.3.1 Metanogénesis acetoclástica .....  | 13  |
| 1.4 Factores necesarios para la producción de biogás .....   | 16  |
| 1.5 Factores que afectan la producción de biogás .....   | 18  |
| 1.6 Efecto de los metales pesados sobre la producción de biogás.....   | 19  |
| 1.7 Mecanismos de resistencia a los metales pesados en arqueas .....   | 21  |
| 1.7.1 Expulsión activa .....   | 21  |
| 1.7.2 Enlace externo .....   | 23  |
| 1.7.3 Transporte disminuido.....   | 24  |
| 1.7.4 Biotransformación.....   | 24  |
| 1.7.5 Inactivación extra o intracelular con agentes quelantes .....  | 25  |
| Capítulo 2. Planteamiento del problema .....   | 28  |
| Capítulo 3. Efecto del cadmio sobre la metanogénesis y los mecanismos de resistencia en<br><i>Methanosarcina acetivorans</i> ..... | 30  |
| 3.1 Antecedentes.....  | 30  |
| 3.2 Hipótesis .....  | 31  |

|   |   |    |
|---|---|----|
| 3.3   | Objetivos.....  | 31 |
| 3.3.1   | Objetivo general .....  | 31 |
| 3.3.2   | Objetivos particulares.....   | 31 |
| 3.4   | Estrategia experimental .....   | 32 |
| 3.4.1   | Curvas de crecimiento.....  | 33 |
| 3.4.2   | Exposición a tiempos cortos.....  | 33 |
| 3.4.3   | Exposición crónica.....   | 33 |
| 3.5   | Métodos .....   | 34 |
| 3.5.1   | Condiciones de cultivo.....   | 34 |
| 3.5.2   | Cuantificación de metabolitos.....  | 34 |
| 3.5.3   | Determinación de las actividades enzimáticas.....                                   | 36 |
| 3.5.4   | Cuantificación de cadmio intracelular.....  | 37 |
| 3.5.5   | Determinación de la biopelícula.....  | 37 |
| 3.5.6   | Caracterización de la biopelícula .....   | 38 |
| 3.6   | Resultados.....   | 38 |
| 3.6.1   | Efecto del cadmio sobre la metanogénesis en <i>Methanosarcina acetivorans</i> ..... | 38 |
| 3.6.2   | Mecanismos de resistencia al cadmio en <i>Methanosarcina acetivorans</i> .....      | 46 |
| 3.7   | Discusión de resultados .....   | 57 |
| 3.8   | Conclusión.....   | 60 |
| Capítulo 4. Caracterización de las células preadaptadas al Cd <sup>2+</sup> ..... |   | 61 |
| 4.1   | Antecedentes.....   | 61 |
| 4.2   | Hipótesis .....   | 61 |
| 4.3   | Objetivo general .....  | 62 |
| 4.3.1   | Objetivos particulares.....   | 62 |
| 4.4   | Estrategia experimental .....   | 62 |

|             |   |     |
|-------------|---|-----|
| 4.5         | Métodos .....   | 63  |
| 4.5.1       | Determinación del Pi extracelular y de la síntesis de polyP .....       | 63  |
| 4.5.2       | Determinación del nivel de mRNA.....                                    | 63  |
| 4.5.3       | Determinación de la actividad de PPX.....                               | 64  |
| 4.5.1       | Clonación y sobreexpresión heteróloga de las enzimas recombinantes..... | 64  |
| 4.6         | Resultados.....   | 67  |
| 4.7         | Discusión .....   | 76  |
| 4.8         | Conclusiones.....   | 77  |
| Capítulo 5. | Resumen de resultados y perspectivas .....                              | 78  |
| 5.1         | Resumen de resultados .....   | 78  |
| 5.2         | Perspectivas .....  | 80  |
| Referencias | .....   | 82  |
| Anexos..... | .....   | 92  |
| A.          | Artículos publicados.....   | 92  |
| B.          | Otras publicaciones .....   | 127 |
| C.          | Abreviaciones.....  | 134 |

## Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| <i>Figura 1.1 Ciclo del Carbono</i> .....   | 6  |
| <i>Figura 1.2 Principales vías metanogénicas</i> .....  | 12 |
| <i>Figura 1.3 Metanogénesis acetoclástica en Methanosarcina acetivorans</i> .....   | 15 |
| <i>Figura 1.4 Digestión anaeróbica para la producción de biogás</i> . ....  | 17 |
| <i>Figura 1.5 Principales mecanismos de resistencia a metales pesados en arqueas</i> .....  | 22 |
| <i>Figura 1.6 Moléculas de polyP</i> .....  | 26 |
| <i>Figura 3.1 Estrategia experimental</i> .....   | 32 |
| <i>Figura 3.2 Actividad de Pta en M. acetivorans</i> .....  | 40 |
| <i>Figura 3.3 Actividad del complejo CODH/AcS en M. acetivorans</i> . ....  | 41 |
| <i>Figura 3.4 Formación de CO<sub>2</sub> por la CA de M. acetivorans</i> . ....  | 42 |
| <i>Figura 3.5 Actividad de CA en la fracción citosólica</i> . ....  | 43 |
| <i>Figura 3.6 Activación de la metanogénesis por el Cd<sup>2+</sup></i> .....   | 44 |
| <i>Figura 3.7 Agregados intracelulares de cadmio en M. acetivorans</i> . ....   | 45 |
| <i>Figura 3.8 Cromatogramas representativos de moléculas con grupos tiol</i> . ....   | 48 |
| <i>Figura 3.9 Curva de calibración para la cuantificación de sulfuro</i> .....  | 49 |
| <i>Figura 3.10 Producción de CH<sub>4</sub> en cultivos con metanol</i> . ....  | 49 |
| <i>Figura 3.11 Formación de agregados celulares inducidos por el Cd<sup>2+</sup> en cultivos de M. acetivorans con metanol</i> . .... | 50 |
| <i>Figura 3.12 Curva de calibración para la cuantificación de carbohidratos</i> . ....  | 51 |
| <i>Figura 3.13 Efecto de la DNAsa I sobre la biopelícula</i> . ....   | 52 |
| <i>Figura 3.14 Agregados de cadmio intracelulares y extracelulares en cultivos de M. acetivorans</i> . ....                           | 54 |
| <i>Figura 3.15 Imágenes de M. acetivorans en ausencia y presencia de Cd<sup>2+</sup> obtenidas mediante HAADF-STEM</i> . ....         | 55 |
| <i>Figura 4.1 Crecimiento de M. acetivorans</i> .....   | 67 |
| <i>Figura 4.2 Consumo de Pi y síntesis de polyP en las células de M. acetivorans cultivadas con acetato</i> .....                     | 70 |
| <i>Figura 4.3 Imágenes de M. acetivorans obtenidas mediante HAADF-STEM</i> .....  | 71 |

|   |    |
|---|----|
| <i>Figura 4.4 Nivel de transcritos de las enzimas polifosfato cinasa (ppk), la exopolifosfatasa (ppx) y el transportador de fosfato (pstA).</i> .....         | 72 |
| <i>Figura 4.5 Clonación y purificación de las enzimas recombinantes PPK y PPX de M. acetivorans.</i> .....  | 74 |
| <i>Figura 4.6 Formación de la biopelícula por las células de M. acetivorans cultivadas con acetato.</i> .....   | 75 |
| <i>Figura 4.7 Producción de CH<sub>4</sub> en células de M. acetivorans cultivadas con acetato y expuestas al Zn<sup>2+</sup> o al Cu<sup>2+</sup>.</i> ..... | 76 |
| <i>Figura 5.1 Esquema general de los principales mecanismos de resistencia al Cd<sup>2+</sup> expresados en M. acetivorans.</i> .....                         | 79 |

### Índice de tablas

|  |    |
|--|----|
| <i>Tabla 1.1 Principales cofactores de la metanogénesis.</i> .....   | 8  |
| <i>Tabla 1.2 Enzimas y cofactores de la metanogénesis con centros metálicos.</i> .....   | 10 |
| <i>Tabla 1.3 Ecuaciones balanceadas de las principales vías metanogénicas.</i> .....   | 11 |
| <i>Tabla 3.1 Peso seco y Cd<sup>2+</sup> removido por M. acetivorans embebida en la biopelícula.</i> .....                             | 53 |
| <i>Tabla 3.2 Contenido de malato, citrato y Pi total en M. acetivorans cultivada en ausencia o presencia de Cd<sup>2+</sup>.</i> ..... | 56 |
| <i>Tabla 4.1 Secuencias de oligonucleótidos utilizados para medir el nivel de transcritos.</i> .....                                   | 66 |
| <i>Tabla 4.2 Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la clonación heteróloga.</i> .....   | 66 |
| <i>Tabla 4.3 Remoción del cadmio en M. acetivorans cultivada en presencia de 54 μM CdCl<sub>2</sub> y acetato.</i> .....               | 68 |
| <i>Tabla 4.4 Contenido de moléculas con grupos tiol presentes en las células CdPA cultivadas con acetato.</i> .....                    | 69 |
| <i>Tabla 4.5 Contenido de polyP y la remoción de Cd en M. acetivorans cultivada con acetato.</i>                                       | 73 |

## Resumen

*Methanosarcina acetivorans* es una arquea metanogénica perteneciente al orden de los methanosarcinales aislada de sedimentos marinos en La Jolla (California, USA). Este metanogénico consume acetato, metanol, metilaminas, formato y monóxido de carbono (CO) como fuentes de carbono, pero no dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) más hidrógeno (H<sub>2</sub>). Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y también en los biodigestores para la producción de biogás.

En la actualidad se busca optimizar el uso de los desechos industriales y domésticos para la producción de biogás como fuente de energía. Una limitante para este proceso es la acumulación de metales pesados en los biodigestores, los cuales inhiben el crecimiento de los metanogénicos y, en consecuencia, la producción de biogás. Se ha sugerido que algunos organismos tienen mecanismos para resistir el estrés por metales pesados, pero, en el caso de los metanogénicos, esta información es aún muy limitada.

El objetivo principal de este proyecto de tesis doctoral fue el caracterizar el efecto del cadmio (Cd<sup>2+</sup>) sobre la síntesis de metano (CH<sub>4</sub>) y los posibles mecanismos de resistencia a este metal en *M. acetivorans*. Para ello, se utilizaron tres tipos de experimentos de exposición al Cd<sup>2+</sup>: subaguda (curvas de crecimiento), aguda (en suspensiones celulares (HDCS: High Density Cell Suspensions) con exposición al metal durante 24 h) y crónica (células preadaptadas (CdPA: Cadmium Preadapted Cells) por 6 meses). Los resultados obtenidos mostraron que *M. acetivorans* se puede cultivar en presencia de hasta 100 µM Cd<sup>2+</sup> (226 pM libre) sin que su crecimiento o la producción de CH<sub>4</sub> disminuyan. El Cd<sup>2+</sup> incrementó nueve veces la velocidad de síntesis de CH<sub>4</sub> a tiempos cortos (<10 min) cuando las células se cultivaron en acetato. Esta activación también se observó con el cobalto (Co<sup>2+</sup>) y el zinc (Zn<sup>2+</sup>). El incremento en la velocidad de síntesis de CH<sub>4</sub> se puede atribuir en parte a que la acetato cinasa (Ack) y la anhidrasa carbónica (CA) incrementaron su actividad en presencia del Cd<sup>2+</sup>. Por otro lado, se determinó que los cultivos con 100 µM Cd<sup>2+</sup> removieron el 40 y 69% del metal presente en el medio con acetato y metanol, respectivamente, mientras que en HDCS expuestos a 500 µM Cd<sup>2+</sup>, la remoción fue hasta del 80%.

Se determinó un incremento en el contenido de moléculas con grupos tiol como la cisteína (Cys), el sulfuro ( $S^{2-}$ ) y la coenzima M (CoM-SH) como mecanismos de inactivación del  $Cd^{2+}$ . Este incremento fue mayor cuando las células se cultivaron en metanol, lo que sugiere una regulación metabólica dependiente de la fuente de carbono. Los ácidos orgánicos malato y citrato también aumentaron en respuesta al  $Cd^{2+}$ , aunque su incremento parece no ser suficiente para la inactivación del metal. Sin embargo, el contenido intracelular de fosfato total (fosfato inorgánico, Pi; pirofosfato, PPi; y polifosfato, polyP) sugirió que estas moléculas podrían participar en la inactivación del metal.

La preadaptación a  $54 \mu M Cd^{2+}$  por 6 meses permitió a *M. acetivorans* duplicarse cuando se expuso a concentraciones  $> 0.5 mM Cd^{2+}$  debido a la formación de una biopelícula compuesta por DNA, carbohidratos y proteínas. Las células CdPA cultivadas en metanol incrementaron preferentemente la síntesis de tioles, mientras que las células cultivadas en acetato sintetizaron grandes cantidades de polyP, lo que les permitió acumular más metal e inactivarlo. Esta característica de las CdPA fue reversible cuando las células se cultivaron en ausencia del metal, lo que sugiere que estos cambios fueron el resultado de una regulación metabólica inducida por la constante exposición al  $Cd^{2+}$  pero no debido a mutaciones génicas.

En condiciones adversas, esta plasticidad metabólica de *M. acetivorans* le puede dar una ventaja de crecimiento frente a otros metanogénicos. Además, el conocer estos mecanismos puede ser el primer paso para realizar modificaciones genéticas de *M. acetivorans* con fines biotecnológicos y utilizarlo como remediador de lodos activados y contaminados con metales pesados con el fin de mantener la síntesis de biogás.

## Abstract

*Methanosarcina acetivorans* is a methanogenic archaeon that belong to the order of methanosarcinales and was isolated from marine sediments in La Jolla (California, USA). It consumes a variety of substrates (acetate, methanol, methylamines, formate, and CO) and is widely distributed in nature and used in biodigesters for biogas production.

At the present times it is important to optimize the use of industrial and domestic wastes for biogas production as an alternative energy source. However, the accumulation of heavy metals in biodigesters is the main limitation of this process since the metals inhibit growth of methanogens and consequently biogas production. It has been suggested that some organisms may activate diverse mechanisms to contend with heavy metal stress; there is limited information about methanogens.

To characterize the effect of  $\text{Cd}^{2+}$  on  $\text{CH}_4$  synthesis and the possible resistance mechanisms against  $\text{Cd}^{2+}$ , *M. acetivorans* was exposed to  $\text{Cd}^{2+}$  in three types of experiments: sub-acute (growth curves), acute ( $\text{Cd}^{2+}$  exposure during 24 hours in HDCS) and chronic (CdPA cells).

Results showed that *M. acetivorans* duplicated in the presence of up to 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  (226 pM free) without changes in growth or  $\text{CH}_4$  production.  $\text{Cd}^{2+}$  increased  $\text{CH}_4$  synthesis rate by 9 times during short periods (<10 min) when cells were growing on acetate. This activation also occurred with  $\text{Co}^{2+}$  or  $\text{Zn}^{2+}$  additions. The activation of methanogenesis can be explained partly by increased activity of carbonic anhydrase and acetate kinase by  $\text{Cd}^{2+}$ .

Cultures with 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  were able to remove 40 and 69% of the metal present in the medium with acetate or methanol, respectively, whereas in HDCS the removal reached up to 80%.

One of the mechanisms for  $\text{Cd}^{2+}$  inactivation was due to an increment in thiol compounds such as Cys,  $\text{S}^{2-}$  and CoM-SH. This increment was higher when cells were cultured with methanol, suggesting a carbon source metabolic regulation. The organic acids malate and citrate were also increased in response to  $\text{Cd}^{2+}$  exposure, although increment appeared not to be relevant in the inactivation of the heavy metal. However, the total intracellular phosphate



content (Pi + PPi + polyP) suggested that these molecules could participate in metal inactivation.

The constant exposition of *M. acetivorans* to 54  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  for six months allowed cell duplication when it was exposed to higher concentrations  $> 0.5 \text{ mM}$   $\text{Cd}^{2+}$  may be due to the synthesis of a biofilm composed of DNA, carbohydrates and proteins. CdPA cells cultured with methanol showed mainly a significant increment in the synthesis of thiol molecules, whereas the cells cultured with acetate synthesized huge amounts of polyP, which was more than enough to bind  $\text{Cd}^{2+}$  and inactivate it. Remarkably, the CdPA characteristics were reversible when cells were cultured in the absence of  $\text{Cd}^{2+}$ , suggesting that these mechanisms were the result of strong metabolic changes resulting of the constant exposition to  $\text{Cd}^{2+}$  and they were not due to genetic mutations.

This work shows for the first time that methanogens might present different mechanisms to contend with heavy metals, depending on the culture conditions. This metabolic plasticity of *M. acetivorans* may represent an advantage compared with other methanogens in adverse growth conditions. Additionally, the knowledge of these mechanisms may be the first step to carry out subsequent genetic modifications of *M. acetivorans* for biotechnological purposes and to use it in remediation of activated sludge contaminated with heavy metals to improve the synthesis of biogas.

## Capítulo 1. Introducción

### 1.1 Importancia ecológica y biotecnológica de los metanogénicos

El dominio *Archaea* fue propuesto por Woese y colaboradores (1990) con base en las diferencias moleculares encontradas en la subunidad pequeña del RNA ribosomal (16S) con respecto a los dominios *Bacteria* y *Eukarya*, aunque, también características bioquímicas y genéticas difieren en estos dominios, como la ausencia de péptidoglicanos y de enlaces tipo éter en los lípidos de la membrana celular, lo que modifica la composición química de la membrana celular y de su metabolismo (Lattuati *et al.*, 1998). Sin embargo, recientemente se ha propuesto que el Dominio *Eukarya* proviene del *Archaea* (William *et al.*, 2013).

Las arqueas se encuentran en diversos ambientes terrestres y acuáticos, incluso en aquellos donde no habitan otras formas de vida, lo que ha provocado que su aislamiento y cultivo sea limitado porque frecuentemente requieren condiciones extremas para su crecimiento. Se han descrito algunos organismos que habitan en ambientes con temperaturas mayores a 100°C (hipertermófilos) o temperaturas muy bajas que pueden alcanzar -20°C (psicrófilos); otros pueden crecer en elevadas concentraciones de sal >2 M (halófilos) o en ambientes con pH extremos (3<pH>9) y en ausencia de oxígeno (anaerobios estrictos). Dichas características convierten a estas especies en los modelos ideales para procesos biotecnológicos en los que se requieren enzimas o compuestos estables en condiciones extremas de pH y temperatura o microorganismos metanogénicos para la producción de biogás (Jeong *et al.*, 2009; Martín-González *et al.*, 2010; Zarafeta *et al.*, 2016).

Los metanogénicos pertenecen al phylum *Euryarchaeota*. Estos microorganismos anaerobios estrictos obtienen el ATP a partir de la metanogénesis, una cadena transportadora de electrones de gran relevancia ecológica y biotecnológica, ya que es el último paso de la degradación de materia orgánica en ambientes anaerobios (Thauer *et al.*, 2008). Este grupo de microorganismos se han encontrado en diferentes ambientes, como en el tracto digestivo de las termitas, los rumiantes y recientemente también en el de humanos (Lurie-Weinberger & Gophna 2015; Triantafyllou *et al.*, 2014), en los arrozales y en los sedimentos marinos o de zonas lacustres. También son parte importante de los microorganismos utilizados para el

tratamiento de aguas residuales y biodigestores (Martín-González *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2010).

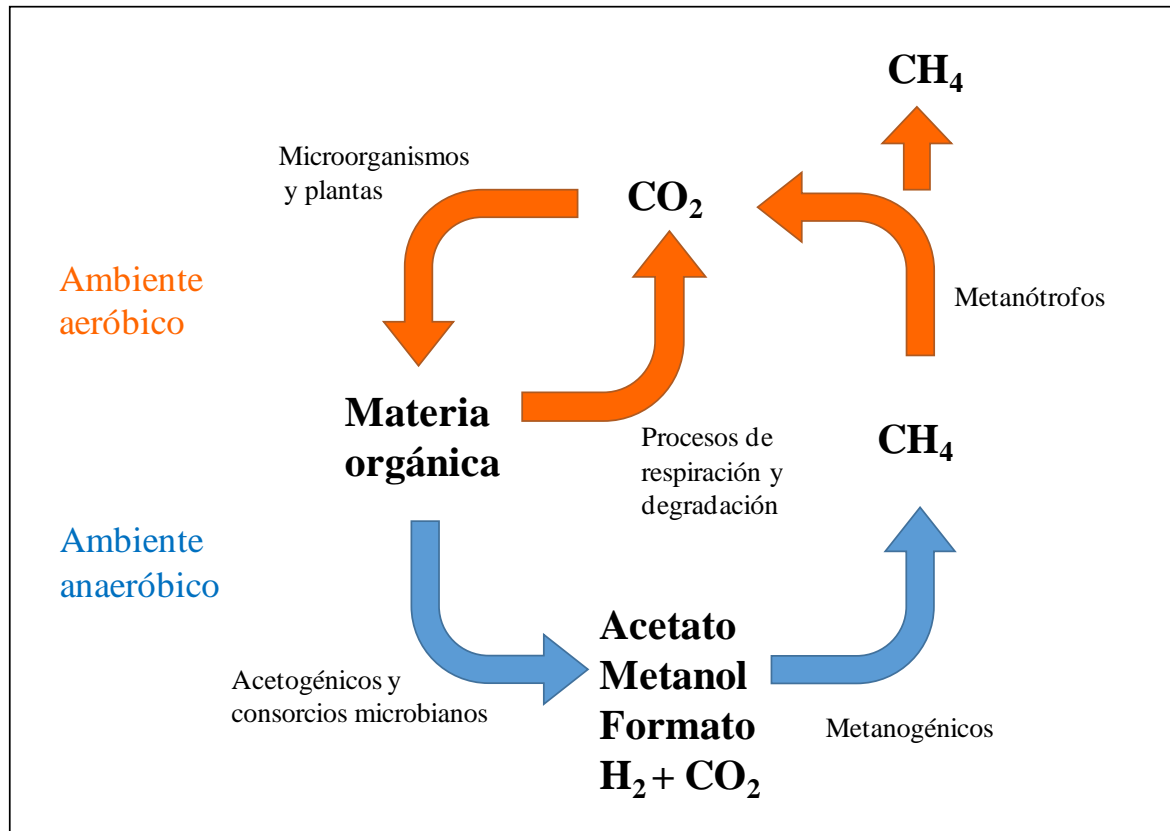


Figura 1.1 Ciclo del Carbono. En condiciones aerobias, el CO<sub>2</sub> se incorpora en la materia orgánica a través de microorganismos o de las plantas, quienes llevan a cabo la fotosíntesis para generar carbohidratos, biomasa y energía. La materia orgánica producida es degradada mediante diversos procesos metabólicos como la respiración para regresar al ambiente en forma de CO<sub>2</sub>. En condiciones anaerobias, la materia orgánica es degradada por diferentes microorganismos que producen moléculas como acetato, metanol y H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>. Estas moléculas son consumidas por los metanogénicos quienes producen CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>. Una fracción del metano producido es liberada al ambiente y el resto es oxidado hasta CO<sub>2</sub> por organismos metanotróficos. Modificado de Ferry & Lessner (2008).

Los metanogénicos juegan un papel muy importante en el ciclo del carbono porque a través de la metanogénesis el carbono proveniente de la materia orgánica en condiciones anaeróbicas retorna al ambiente en forma de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> (Figura 1.1). Aproximadamente el 43% del CH<sub>4</sub>

producido es de origen biológico (109 toneladas CH<sub>4</sub>/año) y el otro 57 % proviene de fuentes antropogénicas (EPA, 2010), lo que contribuye de manera significativa al calentamiento global. En el mar la mayoría del metano producido por los metanogénicos es oxidado por organismos metanotróficos y sólo una fracción escapa al ambiente (Boetius *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2016; Orphan *et al.*, 2002).

En la actualidad, los metanogénicos son ampliamente utilizados para la producción de biogás debido a la creciente necesidad de encontrar fuentes de energía renovables. En algunos países como Brasil, Austria y Finlandia se ha implementado el uso de residuos agrícolas y ganaderos, así como desechos orgánicos e industriales para la producción de biogás que es utilizado principalmente para la generación de calor y electricidad. En México también se han desarrollado diversos proyectos en los que se promueve el uso sustentable de los recursos para producir fuentes de energía alternativas que beneficien al medio ambiente. Un ejemplo de ello es la construcción de instalaciones adecuadas para la producción de electricidad a partir del biogás producido y capturado en los rellenos sanitarios en los estados de Aguascalientes, México y Nuevo León (Biogás | Red Mexicana de Bioenergía", "Generarán Energía Eléctrica Limpia", 2017; SEISA, 2017). Otro ejemplo es la generación de biogás a partir de diversos tipos de residuos agrícolas (biomasa de nopal, semillas, forraje o malezas), estiércol de origen animal y residuos urbanos para producir electricidad que es utilizada en el municipio de Calvillo, Aguascalientes (Producción de biogás, energía eléctrica y fertilizante a partir del nopal & SEISA, 2017).

También se han realizado adaptaciones de biodigestores a plantas de tratamiento de aguas residuales con la finalidad de utilizar el biogás producido para generar electricidad y cubrir los requerimientos de energía dentro de esas plantas, con el propósito de disminuir los costos de producción y la liberación de CH<sub>4</sub> al ambiente, debido a que este gas es un contaminante que contribuye 25 veces más al calentamiento global que el CO<sub>2</sub> (Bacenetti *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2014; Martens & Böhm, 2009).

Tabla 1.1 Principales cofactores de la metanogénesis

|                                      |                  |                  |        |
|--------------------------------------|------------------|------------------|--------|
| Acarreadores de electrones           |                  |                  |        |
|                                      | MP               | F <sub>420</sub> | CoB-SH |
| Acarreadores de moléculas de carbono |                  |                  |        |
|                                      | MFR              | THSPT            | CoM-SH |
| Acarreadores de moléculas de carbono |                  |                  |        |
|                                      | F <sub>430</sub> | Factor III       | MGD    |

Basada en Deppenmeier (2002), Ferry (1999) y DiMarco *et al.* (1990).

## 1.2 *Methanosarcina acetivorans*

*Methanosarcina acetivorans* es un metanogénico aislado de los sedimentos marinos en La Jolla, California (Sowers *et al.*, 1984). Pertenece al orden de los methanosarcinales los cuales

pueden consumir diversas fuentes de carbono. Debido a su diversidad metabólica y fisiológica generan el 75% del metano de origen biogénico (Galagan *et al.*, 2002).

Este metanogénico tiene un genoma de gran tamaño (5.7 Mb) en concordancia con su gran diversidad metabólica. En su genoma se encuentran múltiples copias de algunos genes, lo que sugiere que algunos de ellos podrían tener una regulación diferente o codificar para enzimas con propiedades cinéticas diferentes, permitiéndole consumir múltiples sustratos y adaptarse a diversos ambientes, así como contender con diferentes tipos de estrés (Galagan *et al.*, 2002; Jasso-Chávez *et al.*, 2015). Además, *M. acetivorans* tiene la capacidad de expresar enzimas específicas para utilizar varios sustratos para la generación de ATP, tales como metanol, metilaminas, metilsulfuros, CO y acetato. Estas vías de obtención de energía han sido ampliamente estudiadas y también se han desarrollado algunas herramientas para su manipulación genética (transfección mediada por liposomas, vectores de replicación y recombinación homóloga), con el objetivo de mejorar la producción de metano (Kohler & Metcalf, 2012; Metcalf *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000).

### 1.3 Metanogénesis

La metanogénesis es el último paso en la degradación de la materia orgánica en condiciones anaerobias y es realizada por arqueas metanogénicas (Liu & Whitman, 2008). En estos organismos la metanogénesis es la vía principal de producción de energía, la cual es una cadena transportadora de electrones que genera gradientes electroquímicos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{H}^+$  que son necesarios para la síntesis del ATP y que genera  $\text{CH}_4$  como un producto de desecho (Deppenmeier, 2002; Welte & Deppenmeier, 2014).

En la metanogénesis se utilizan coenzimas y cofactores únicos, los cuales participan como acarreadores de moléculas de un solo carbono: 2-aminometilfurano o metanofurano (MFR), 5,6,7,8-tetrahidrosarcinopterina ( $\text{H}_4\text{SPT}$  o  $\text{THSPT}$ ), 2-mercaptoetanosulfonato (coenzima M o  $\text{CoM-SH}$ ) y molibdopterina guanina dinucleótido (MGD); también cuenta con moléculas que participan como donadores de electrones: 8-hidroxi-5-deazaflavina (coenzima  $\text{F}_{420}$ ), metanofenazina (MP), 5-hidroxibenzimidazolil-cobamida (factor III), 7-mercapto heptanoil-L-treonina fosfato (coenzima B o  $\text{CoB-SH}$ ) y ferredoxina (Fd). En la Tabla 1.1 se muestra la

estructura y función de estas moléculas, las cuales pueden presentar algunas diferencias dependiendo del organismo (Deppenmeier, 2002; DiMarco *et al.*, 1990).

Los metanogénicos necesitan metales esenciales para su crecimiento, tales como hierro (Fe), molibdeno (Mo), tungsteno (W), cobalto (Co), zinc (Zn) y níquel (Ni) porque algunas de las enzimas de la metanogénesis requieren metales de transición como cofactores para el transporte de electrones o en su sitio activo para la catálisis (Tabla 1.2).

Tabla 1.2 Enzimas y cofactores de la metanogénesis con centros metálicos

| <b>Metal</b>                    | <b>Enzima</b>                                  | <b>Referencia</b>   |
|---------------------------------|--|---|
| <b>Hierro</b>                   | Heterodisulfuro reductasa                      | Scheller <i>et al.</i> (2010)                                   |
|                                 | Formilmetanofurano deshidrogenasa              | Vorholt <i>et al.</i> (1996)                                    |
|                                 | Ferredoxina                                    | Daas <i>et al.</i> (1994)                                       |
|                                 | Anhidrasa carbónica                            | Macauley <i>et al.</i> (2009)                                   |
|                                 | Complejo CODH/AcS                              | Maupin-Furlow & Ferry, (1996)                                   |
| <b>Níquel</b>                   | Metil-CoM reductasa                            | Ermiler <i>et al.</i> (1997)                                    |
|                                 | F <sub>420</sub> H <sub>2</sub> deshidrogenasa | Afting <i>et al.</i> (1998)                                     |
|                                 | Cofactor F <sub>430</sub>                      | Whitman & Wolfe, (1980)   |
|                                 | Complejo CODH/AcS                              | Maupin-Furlow & Ferry, (1996)                                   |
| <b>Zinc</b>                     | Metil transferasas                             | Hagemeier <i>et al.</i> (2006)                                  |
|                                 | Heterodisulfuro reductasa                      | Simianu <i>et al.</i> (1998)                                    |
| <b>Cobalto</b>                  | Factor III                                     | DiMarco <i>et al.</i> (1990)                                    |
|                                 | Metil transferasa                              | Fischer <i>et al.</i> (1992)                                    |
| <b>Molibdeno/<br/>tungsteno</b> | Formilmetanofurano deshidrogenasa              | Hochheimer <i>et al.</i> (1996)<br>Vorholt <i>et al.</i> (1996) |

La mayoría de los metanogénicos pueden consumir sólo una fuente de carbono, mientras que *Methanosarcina spp.* es el único que puede consumir diferentes sustratos (Ferry & Lessner,

2008). Los principales sustratos para la metanogénesis son acetato (vía acetoclástica), H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (vía hidrogenotrófica) y en menor proporción los compuestos metilados como metanol, trimetilaminas y dimetilsulfuro (vía metilotrófica). En la Tabla 1.3 se muestran los valores de  $\Delta G^{\circ}$  para las reacciones químicas de consumo para los principales sustratos metanogénicos. Estas vías requieren enzimas y cofactores específicos debido a que la fuente de obtención del grupo metilo difiere en cada una de ellas. Sin embargo, existen algunas enzimas esenciales conservadas en todos los metanogénicos como: la metil tetrahidrosarcinapterina: coenzima M metiltransferasa (Mtr), la metil CoM reductasa (Mcr) y la heterodisulfuro reductasa (Hdr) (Hedderich & Whitman, 2006; Thauer, 1998). Las tres vías convergen en la desmetilación reductiva de la metil-CoM (CH<sub>3</sub>-S-CoM) mediante la Mcr dependiente de CoB-SH quien dona los electrones necesarios para formar CH<sub>4</sub> como un producto secundario y el heterodisulfuro (CoM-S-S-CoB). Este último es reducido por la Hdr para regenerar la CoM-SH y la CoB-SH (Figura 1.2). En esta vía el CoM-S-S-CoB es el último aceptor de electrones de la cadena respiratoria, la cual genera gradientes electroquímicos de Na<sup>+</sup> y H<sup>+</sup> para ser utilizados por la A<sub>1</sub>A<sub>0</sub> ATP sintasa en la síntesis de ATP (Schlegel *et al.*, 2012).

Tabla 1.3 Ecuaciones balanceadas de las principales vías metanogénicas

| Vía metanogénica        | Ecuación balanceada  | $\Delta G^{\circ}$ (kJ/mol CH <sub>4</sub> ) |
|-------------------------|--|--|
| <b>Acetoclástica</b>    | CH <sub>3</sub> COOH → CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub>   | -36.5  |
| <b>Hidrogenotrófica</b> | 4 H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> → CH <sub>4</sub> + 2 H <sub>2</sub> O  | -138.8                                       |
|                         | 4 CH <sub>3</sub> OH → 3 CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O  | -106.5                                       |
|                         | 4 HCOOH → CH <sub>4</sub> + 3 CO <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O   | -119.5                                       |
| <b>Metilotrófica</b>    | 4 CH <sub>3</sub> NH <sub>3</sub> Cl + 2 H <sub>2</sub> O → 3 CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 4 NH <sub>4</sub> Cl | -75.2  |
|                         | 2(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S + 2 H <sub>2</sub> O → 3 CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> S     | - 49   |

Basada en Thauer (1998).

En la vía acetoclástica el grupo metilo del acetato es reducido a CH<sub>4</sub> usando los electrones provenientes de la oxidación del grupo carboxilo para formar CO<sub>2</sub>. Para ello se requiere ATP



para activar al acetato y producir acetil-coenzima A (acetil-CoA), que es utilizada por el complejo monóxido de carbono deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa (CODH/AcS) para sintetizar metil-tetrahidrosarcinopterina ( $\text{CH}_3\text{-THSPT}$ ). Finalmente, el grupo metilo de la  $\text{CH}_3\text{-THSPT}$  es transferido a la  $\text{CoM-SH}$  para sintetizar el  $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$  que es reducido a  $\text{CH}_4$  (Ferry, 1997; Li *et al.*, 2006).

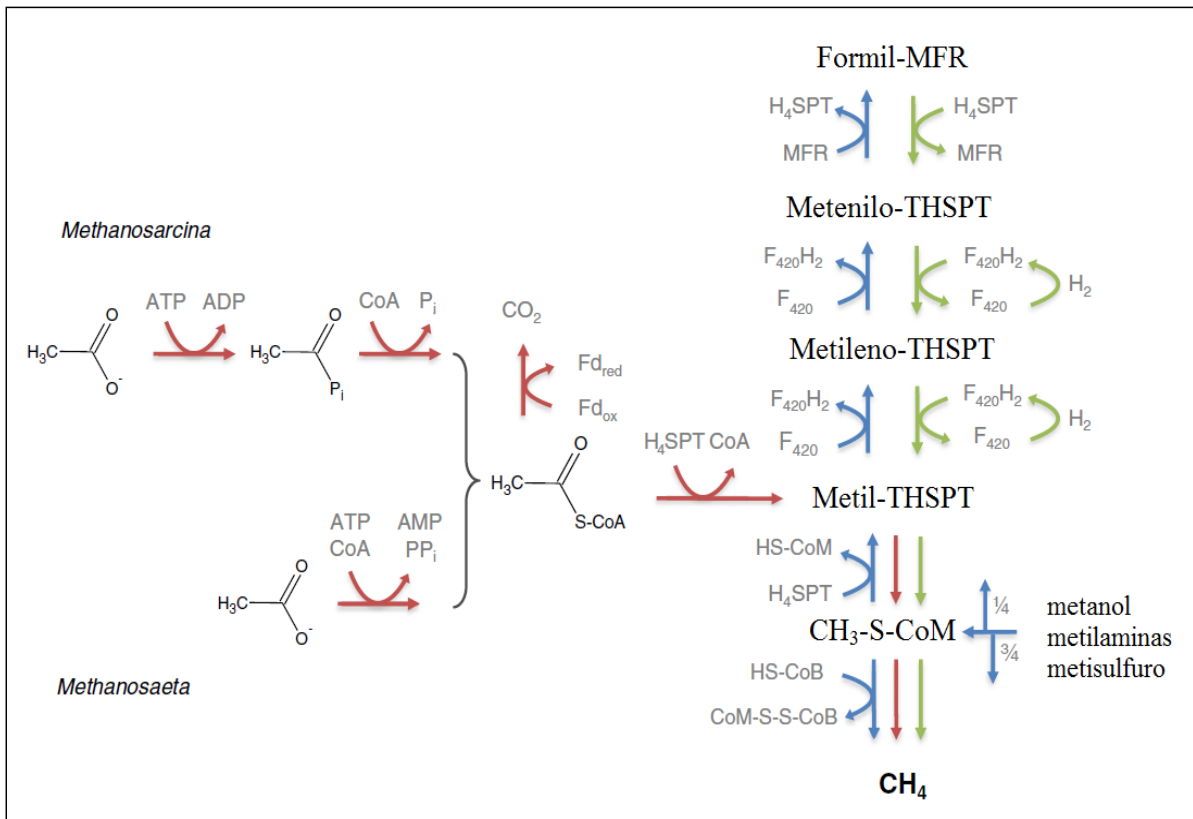


Figura 1.2 Principales vías metanogénicas. En esta figura se muestran las vías metanogénicas presentes en las diferentes especies de *Methanosarcina* y *Methanosaeta*: vía acetoclástica (flechas rojas), metilotrófica (flechas azules) y la vía hidrogenotrófica (flechas verdes). Modificado de Welte & Deppenmeier (2014).

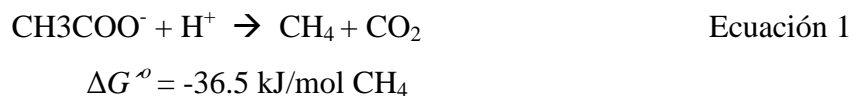
En la vía hidrogenotrófica, el formato y el  $\text{H}_2$  son oxidados para proveer los electrones necesarios para llevar a cabo la reducción del  $\text{CO}_2$  a  $\text{CH}_4$ . Esta vía utiliza como acarreadores de carbono al MFR, la THSPT y la  $\text{CoM-SH}$ , los cuales participan como intermediarios para reducir el  $\text{CO}_2$  y el MFR a formil-MFR (Figura 1.2). El grupo formilo del formil-MFR se transfiere a

diferentes intermediarios a través de una serie de reacciones para formar CH<sub>3</sub>-THSPT (Vorholt *et al.*, 1996) y producir CH<sub>4</sub> a través de la desmetilación reductiva de la CH<sub>3</sub>-S-CoM. En la vía metilotrónica, el grupo metilo se transfiere a la CoM-SH mediante metiltransferasas para formar CH<sub>3</sub>-S-CoM, el cual se reduce a CH<sub>4</sub> utilizando los electrones obtenidos de la oxidación del grupo metilo a CO<sub>2</sub> mediante la reacción reversa de la vía de reducción del CO<sub>2</sub>. En esta vía se forman tres moléculas de CH<sub>4</sub> y una molécula de CO<sub>2</sub> debido a que en la reacción de oxidación se producen seis electrones, de los cuales se utilizan dos para llevar a cabo la reducción del grupo metilo a CH<sub>4</sub> (Figura 1.2).

*M. acetivorans* posee vías metabólicas que pueden soportar el crecimiento celular usando diferentes fuentes de carbono mediante la metanogénesis acetoclástica, metilotrónica y carboxidotrónica (CO), pero no a través de la vía hidrogenotrónica debido a la ausencia de hidrógenasas (Deppenmeier *et al.*, 1999; Rother & Metcalf, 2004). Como el acetato es presumiblemente la principal fuente de carbono utilizada por *M. acetivorans* en sus hábitats naturales, a continuación se describe a detalle la metanogénesis acetoclástica.

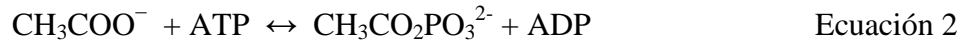
### 1.3.1 Metanogénesis acetoclástica

El 75% del CH<sub>4</sub> de origen biológico proviene del consumo de acetato (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), pero sólo las especies del género *Methanosarcina* y *Methanosaeta* pueden consumir este sustrato como fuente de carbono (Figura 1.2). La metanogénesis a partir de acetato en *M. acetivorans* presenta algunas similitudes con las vías descritas para los methanosarcinales de agua dulce (Ferry, 1997, 1999). La metanogénesis acetoclástica (Figura 1.3) es una vía termodinámicamente poco favorecida con respecto al resto de las vías metanogénicas descritas (Figura 1.2), debido a que requiere la hidrólisis de un ATP para generar acetyl-CoA (CH<sub>3</sub>COSCoA). La ecuación general de esta vía (Ecuación 1) es la siguiente:

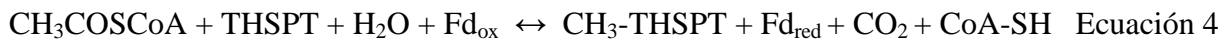


El acetato es transportado al interior de la célula mediante un transportador de acetato recientemente descrito en *M. mazei*, el cual podría transportar acetato en co-transporte con un

protón (Welte *et al.*, 2014), pero no se puede descartar que el acetato también pueda ingresar a la célula mediante difusión simple como ácido acético, aunque seguramente a una menor velocidad. Una vez dentro de la célula el acetato es fosforilado por la Ack para formar acetil-fosfato ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{PO}_3^{2-}$ ) (Ecuación 2), el cual es sustrato de la fosfotransacetilasa (Pta) para sintetizar acetil-CoA (Ecuación3).



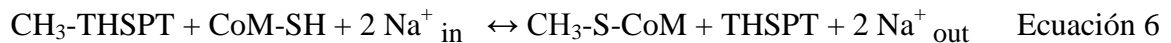
La siguiente reacción es catalizada por el complejo CODH/AcS, el cual rompe el enlace C-C y C-S del acetil-CoA para transferir el grupo metilo al cofactor THSPT, oxidar al grupo carbonilo a  $\text{CO}_2$  y reducir a la ferredoxina (Ecuación 4).



La CA convierte al  $\text{CO}_2$  en bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) (Ecuación 5) con la finalidad de facilitar su remoción del citosol, debido a la baja permeabilidad del bicarbonato (Alber & Ferry, 1994).



La Mtr transfiere el grupo metilo del compuesto  $\text{CH}_3\text{-THSPT}$  a la  $\text{CoM-SH}$  para sintetizar metil-CoM (Ecuación 6). Esta enzima se encuentra unida a la membrana celular y es la encargada de translocar los iones  $\text{Na}^+$  del citosol al espacio intermembranal, generando un gradiente electroquímico de  $2\text{Na}^+$  por cada grupo metilo transferido (Schlegel *et al.*, 2012). Una parte del gradiente electroquímico de iones  $\text{Na}^+$  es transformado a un gradiente de protones por medio del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Mrp) para la síntesis de ATP (Jasso-Chávez *et al.*, 2013).



Se ha descrito que las enzimas involucradas en la transferencia del grupo metilo son más abundantes cuando las células se cultivan con acetato en comparación con los cultivos con metanol, mientras que las enzimas involucradas en el transporte de electrones son diferentes entre *M. acetivorans* y las especies de agua dulce debido al ambiente en el que habitan (Li *et al.*, 2006).

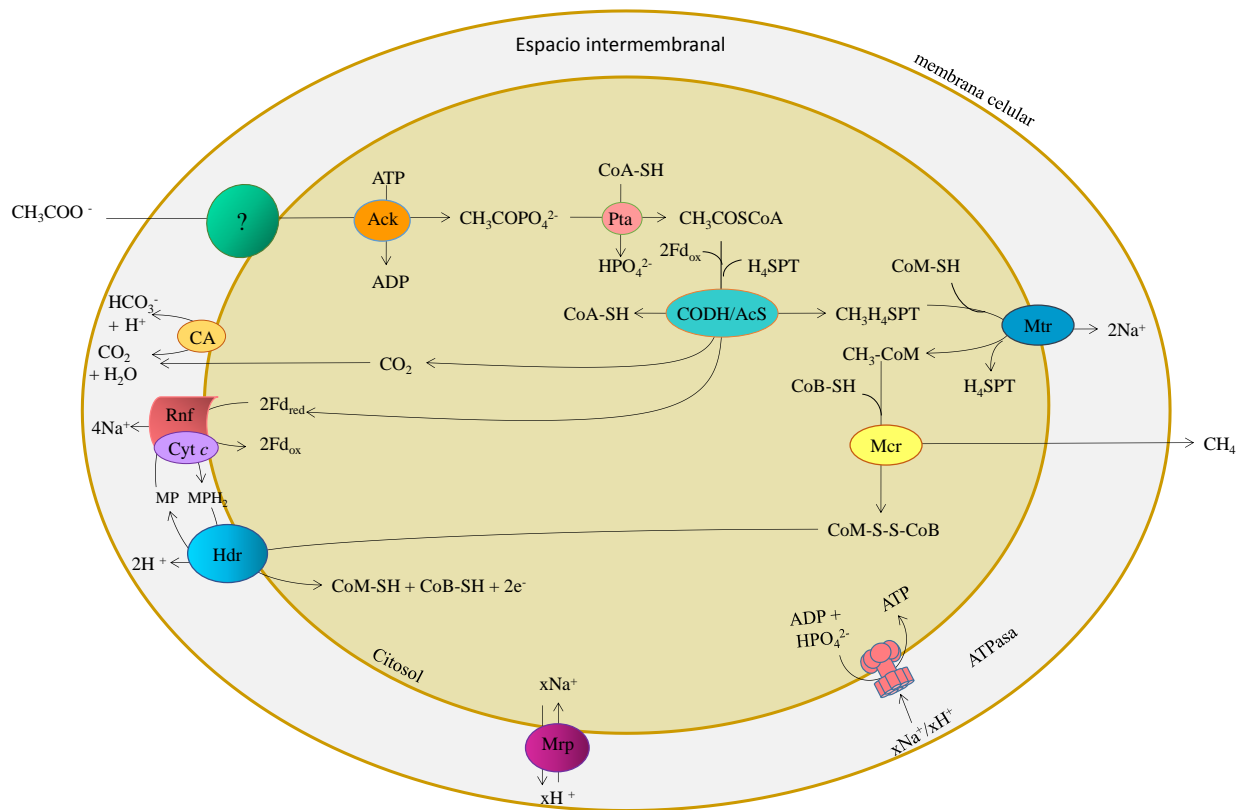


Figura 1.3 Metanogénesis acetoclástica en *Methanosarcina acetivorans*. Abreviaciones: Ack, acetato cinasa; Pta, fosfotransacetilasa; CODH/AcS, complejo monóxido de carbono deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa; Mtr, Metil-THSPT: Coenzima M metiltransferasa; Mcr, metil-CoM reductasa; Hdr, heterodisulfuroreductasa; CA, anhidrasa carbónica; CoA-SH, coenzima A; H<sub>4</sub>SPT, 5,6,7,8-tetrahidrosarcinopterin; Ma-Rnf, complejo Rnf de *M. acetivorans*; Cyt *c*, citocromo *c*; MP, metanofenazina oxidada; MPH<sub>2</sub>, metanofenazina reducida; Fd<sub>ox</sub>, ferredoxina oxidada; Fd<sub>red</sub>, ferredoxina reducida; CoM-SH, coenzima M o 2-mercaptoetanosulfonato; CoB-SH, coenzima B o 7-mercapto heptanoil-L-treonina fosfato; CoM-S-S-CoB, heterodisulfuro.

La última etapa de la vía acetoclástica es la desmetilación reductiva de la CH<sub>3</sub>-S-CoM para sintetizar CH<sub>4</sub> mediante la enzima Mcr. En esta reacción la CoB-SH dona dos electrones a la ferredoxina para la formación de CoM-S-S-CoB (Ecuación 7). Este compuesto es el último aceptor de electrones de la cadena transportadora de electrones acoplada a la formación de un gradiente electroquímico de protones para la síntesis de ATP (Suharti *et al.*, 2014).



La Hdr cataliza la reducción del CoM-S-S-CoB a CoM-SH y CoB-SH acoplada a la generación de un gradiente de H<sup>+</sup> (Ecuación 8). También se ha descrito que el Mrp participa en la generación un gradiente de H<sup>+</sup> para impulsar la síntesis de ATP mediante la A<sub>1</sub>A<sub>0</sub> ATP sintasa. Este antiportador es más abundante cuando las células se cultivan en acetato (Jasso-Chávez *et al.*, 2013).



El complejo homologo al de *Rhodobacter nitrogen fixation* de bacteria (Ma-Rnf/Cyt *c*) es esencial para el crecimiento de *M. acetivorans* cuando se cultiva con acetato, debido a que el citocromo *c* (Cyt *c*) acepta los electrones de la ferredoxina reducida y los transfiere a la Hdr para generar un gradiente electroquímico de H<sup>+</sup>. Esta transferencia esta mediada por la MP localizada en el espacio intermembranal. Además, se ha descrito que el complejo Ma-Rnf/Cyt *c* también puede bombear Na<sup>+</sup> para generar un gradiente electroquímico y llevar a cabo la síntesis de ATP (Suharti *et al.*, 2014).

Por otro lado, se ha observado que cuando las células se cultivan en acetato hay un aumento en el nivel de transcritos de las enzimas que participan en el metabolismo del acetato como el complejo CODH/AcS y la CA, los complejos de conservación de energía (Ech hidrogenasa, el complejo Ma-Rnf/Cyt *c* y la A<sub>1</sub>A<sub>0</sub> ATP sintasa), así como para la ferredoxina, algunas flavoproteínas y los transportadores de hierro y cobalto (Galagan *et al.*, 2002), lo que sugiere que estas enzimas y cofactores tienen un papel importante cuando *M. acetivorans* crece en acetato.

#### 1.4 Factores necesarios para la producción de biogás

El biogás es una mezcla de gases cuya composición puede variar dependiendo de la materia prima y del proceso utilizado, pero el CH<sub>4</sub> es el componente principal (50-70%), seguido por el CO<sub>2</sub> (30-50%) y otros gases como sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), nitrógeno (N<sub>2</sub>) e H<sub>2</sub> que constituyen menos del 1%.

El proceso para la obtención de biogás consiste básicamente en una digestión anaerobia, en la cual participan diversos grupos de microorganismos que llevan a cabo la degradación de la materia orgánica. El primer paso consiste en hidrolizar la materia orgánica compleja (lípidos,

carbohidratos, proteínas y polisacáridos) a moléculas sencillas como aminoácidos, ácidos grasos, péptidos y azúcares, por medio de enzimas hidrolíticas. Las bacterias acidogénicas transforman estas moléculas en compuestos no volátiles (propionato, butirato, succinato y alcoholes). Los ácidos orgánicos no volátiles son convertidos por las bacterias acetogénicas en acetato, formato, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, los cuáles finalmente son consumidos por los metanogénicos para producir metano y CO<sub>2</sub> (Figura 1.4).

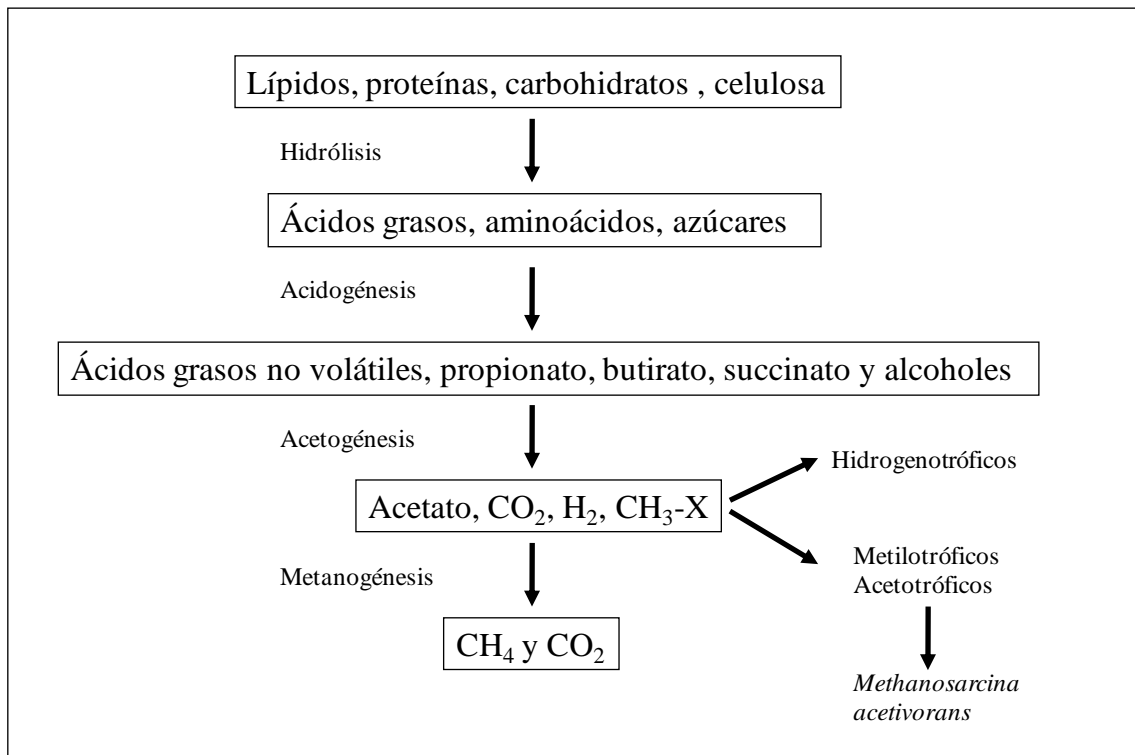


Figura 1.4 Digestión anaeróbica para la producción de biogás. Modificado de Wirth *et al.* (2012).

La eficiencia del proceso de digestión anaerobia para la producción de biogás está relacionada con factores como la temperatura, el pH, la naturaleza del sustrato, la relación carbono: nitrógeno, la agitación, el tiempo de retención y la concentración de elementos traza, ya que de ellos depende el óptimo crecimiento de los microorganismos en cada una de las etapas, pero

sobre todo para los metanogénicos los cuales son clave para la producción de biogás (Rademacher *et al.*, 2012).

En los biodigestores también se requieren macronutrientes como nitrógeno para la síntesis de proteínas, fosfato para la síntesis de ATP y NADP, sulfuro como constituyente de aminoácidos y nutriente esencial debido a que favorece un ambiente reductor para los metanogénicos (O'Flaherty *et al.*, 1998), además de la presencia de algunos iones esenciales como potasio ( $K^+$ ), calcio ( $Ca^{2+}$ ) y magnesio ( $Mg^{2+}$ ) para los procesos celulares, o metales traza como el  $Fe^{3+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , los cuales son esenciales para algunas proteínas o como acarreadores de electrones (Demirel & Scherer, 2011).

Los metanogénicos son los microorganismos más importantes dentro de las asociaciones microbianas utilizados en los biodigestores porque de ellos depende directamente la producción de biogás. Estos microorganismos requieren condiciones específicas para que su crecimiento sea óptimo, tales como: anaerobiosis, un medio altamente reductor con un potencial redox  $< -350$  mV, pH 6-8, así como disponibilidad de sustratos y micronutrientes. Se ha descrito que el acetato es el principal producto de la fermentación de la materia orgánica y considerando que el 70% de la metanogénesis proviene de este sustrato, las especies de *Methanosarcina* y *Methanosaeta* pueden ser de gran relevancia en este proceso (Ince & Ince, 2000; Lins *et al.*, 2014) aunque también se han encontrado metanogénicos hidrogenotróficos (Mosey & Fernandes, 1989). En algunos biodigestores se ha encontrado a *Methanosarcina acetivorans* y *Methanosarcina barkeri*, probablemente porque poseen una gran versatilidad metabólica y fisiológica que les permite adaptarse a diferentes ambientes (Jasso-Chávez *et al.*, 2015; Wirth *et al.*, 2012).

## 1.5 Factores que afectan la producción de biogás

En los procesos de digestión anaerobios se usan asociaciones microbianas con células que tienen características diferentes entre ellas pero cada una tiene una función definida en el biodigestor, por lo que es importante mantener el balance adecuado para no afectar la producción de biogás. En la digestión de la materia orgánica es posible encontrar compuestos provenientes de los desechos utilizados o formados durante el proceso fermentativo, algunos de los cuales disminuyen los rendimientos de la digestión o pueden inhibir la producción de  $CH_4$ . Se ha

reportado que los ácidos orgánicos no volátiles en altas concentraciones son también tóxicos porque disminuyen el pH; la presencia de una elevada concentración de amonio también puede inhibir la metanogénesis (Hajarnis & Ranade, 1993; Sprott & Patel, 1986) y la formación de ácido sulfhídrico inhibe el crecimiento de los metanogénicos (Karhadkar *et al.*, 1987). Además, se ha descrito que la presencia de concentraciones altas de metales pesados como cobre, níquel y zinc inhibe el crecimiento tanto de los microorganismos acidogénicos como de los metanogénicos acetotróficos, lo que altera la estabilidad del proceso y disminuye su eficiencia (Ahring & Westermann, 1985; Jarrell *et al.*, 1987).

### **1.6 Efecto de los metales pesados sobre la producción de biogás**

Los metales pesados son aquellos metales cuya densidad es mayor a  $5 \text{ g (cm}^3\text{)}^{-1}$ . Algunos de ellos como Fe, Ni, Mn, Cu y Zn en concentraciones traza son considerados esenciales debido a que participan en diversos procesos metabólicos y son cofactores de algunas enzimas. Otros metales como el Cd, cromo (Cr), mercurio (Hg), plomo (Pb) y metaloides como el arsénico (As) no tienen ninguna función biológica y son altamente tóxicos incluso en bajas concentraciones (Ehrlich, 1997).

La concentración de metales pesados en aguas residuales se ha incrementado a causa de las diversas actividades antropogénicas, siendo los principales contaminantes metales como:  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  (Altaş, 2009; Zhang *et al.*, 2005). Los cuales se pueden acumular y permanecer de manera indefinida en el ambiente causando severos daños. Por ello ha sido necesario buscar alternativas para eliminarlos de las aguas residuales utilizando procesos de digestión. La contaminación por metales pesados se ha convertido en un importante problema ecológico debido a su elevada toxicidad (Sarioglu *et al.*, 2010).

Se han realizado diversos estudios analizando el efecto de los metales pesados durante la digestión anaerobia (Baath, 1989; Fang & Hui, 1994). Por ejemplo, se ha determinado que estos metales inhiben o estimulan la producción de biogás dependiendo de la concentración de los metales libres, de sus formas iónicas, la biomasa y del tiempo de exposición, entre otros factores. Cabe señalar que en los biodigestores pueden estar presentes algunos aniones (sulfuro, sulfatos,



carbonatos, hidróxidos) que forman complejos con los metales para así inactivarlos (Sterritt & Lester, 1980; Zayed & Winter, 2000).

Los metales traza son esenciales para el crecimiento óptimo de los metanogénicos y su deficiencia puede causar una disminución en la producción de CH<sub>4</sub> debido que son cofactores de muchas de las enzimas que participan en la metanogénesis. Se ha descrito que la suplementación de los medios de cultivo con selenio (Se) y W estimula la producción de CH<sub>4</sub> entre 7-15%, mientras que la adición de Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> y Fe<sup>3+</sup> incrementa la producción entre 45-60%, en los biodigestores con bajo contenido de metales traza (Feng *et al.*, 2010; Kida *et al.*, 2001). También se ha determinado que la adición de 0.05-0.1 mM Zn<sup>2+</sup> estimula el crecimiento y la producción de CH<sub>4</sub>, mientras que una concentración mayor a 0.2 mM disminuye significativamente la producción del mismo (Tuo *et al.*, 2014).

El efecto inhibitorio de algunos metales pesados sobre la producción de CH<sub>4</sub> se puede atribuir a que tienen efectos negativos sobre el metabolismo y el crecimiento de los diferentes grupos de microorganismos acidogénicos, acetogénicos y metanogénicos, así como en las bacterias reductoras de sulfato presentes en los biodigestores (Karri *et al.*, 2006; Li & Fang, 2007; Mori *et al.*, 2000; Utgikar *et al.*, 2003; Yu & Fang, 2001; Zayed *et al.*, 2000). También se ha determinado de manera específica la inhibición de los metanogénicos por metales pesados (Colussi *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 1994).

Se ha descrito que algunos metales pesados inhiben la producción de CH<sub>4</sub> en biodigestores a diferentes concentraciones, por ejemplo 0.19 - 6.2 mM Cu<sup>2+</sup>, 0.08 - 2.9 mM Zn<sup>2+</sup>, 0.17 - 34 mM Ni<sup>2+</sup> y 0.06 - 2.9 mM Cd<sup>2+</sup> (Ahring *et al.*, 1985; Altaş, 2009; Zayed *et al.*, 2000). En diversos reportes se ha determinado que el Cd<sup>2+</sup> es uno de los metales más tóxicos porque inhibe por completo la producción de biogás a una concentración de 0.17 mM por arriba del Cu<sup>2+</sup> (0.47 mM) y el Cr<sup>6+</sup> (1.5 mM) (Bhattacharya, 1995; Jain *et al.*, 1992; Yue *et al.*, 2007). La toxicidad de estos metales se debe a que inactivan algunas enzimas ya que remplazan a los metales de los grupos prostéticos o reaccionan con los grupos tiol inhibiendo la catálisis (Brady & Duncan, 1994; Wani *et al.*, 2012). Los valores de IC<sub>50</sub> sobre la producción de CH<sub>4</sub> en metanogénicos acetotróficos son 0.06, 0.19 y 0.08 mM para el Cd<sup>2+</sup>, el Cu<sup>2+</sup> y el Zn<sup>2+</sup>, respectivamente (Altaş, 2009; Lin & Chen, 1999), mientras que en los biodigestores las concentraciones inhibitorias de

estos metales son mayores debido a la presencia de bacterias reductoras de sulfato o de sulfuro biogénico, lo que favorece la precipitación del metal disminuyendo así su toxicidad.

## **1.7 Mecanismos de resistencia a los metales pesados en arqueas**

El Co, Cu, Fe, Mn, Ni y Zn son metales esenciales para diversos procesos metabólicos, pero en concentraciones elevadas causan daño a las membranas celulares o modifican algunas enzimas y dañan la estructura del DNA. Los microorganismos han desarrollado diversas estrategias para contender con este tipo de estrés. Los microorganismos pertenecientes al dominio *Archaea* tienen la capacidad de adaptarse a ambientes extremos de pH, temperatura, salinidad y ausencia de oxígeno, pero algunos de ellos también logran adaptarse a la presencia de metales pesados. Almeida *et al.* (2009) reportaron la presencia de arqueas metanogénicas en los sedimentos marinos contaminados con metales pesados (2.8 mg /kg Cd, 181.4 mg/kg Cu, 164.7 mg/kg Pb y 2.3 mg/kg Hg), por lo que no resulta difícil pensar que han desarrollado la habilidad para manejar los efectos tóxicos causados por estos metales. Sin embargo, los mecanismos moleculares de respuesta al estrés sólo se han descrito parcialmente ya que la mayoría de los estudios realizados a la fecha están basados en análisis transcriptómicos o proteómicos sin efectuar la caracterización bioquímica y cinética en vista de que muchos de estos organismos son difíciles de cultivar en condiciones de laboratorio (Almárcegui *et al.*, 2014; Mangold *et al.*, 2013; McCarthy *et al.*, 2014).

Algunos de los mecanismos de resistencia que se han caracterizado en arqueas son: 1) la expulsión activa, 2) el enlace externo, 3) el transporte disminuido, 4) la biotransformación y 5) la inactivación extra o intracelular por agentes quelantes (Figura 1.5).

### **1.7.1 Expulsión activa**

Este mecanismo consiste en la expulsión de los metales pesados del citosol al exterior de la célula, a través de sistemas de expulsión de iones, como lo son las proteínas facilitadoras de cationes (CDF), las ATPasas metal-específicas y otros sistemas de expulsión de aniones.

La expulsión activa se ha descrito ampliamente en bacterias (Fagan & Saier, 1994; Nies, 2003; Paulsen & Saier, 1997), pero este mecanismo también se encuentra muy conservado en las arqueas (Mangold *et al.*, 2013; Spada *et al.*, 2002).

Las CDF pertenecen a una familia de proteínas que expulsan los metales al espacio periplásmico. Este transporte está mediado por un gradiente de concentración, un gradiente quimiosmótico o de pH. Las CDF se han descrito en microorganismos pertenecientes a los tres dominios de la vida (Kolaj-Robin *et al.*, 2015; Kaur *et al.*, 2006; Nies, 2003).

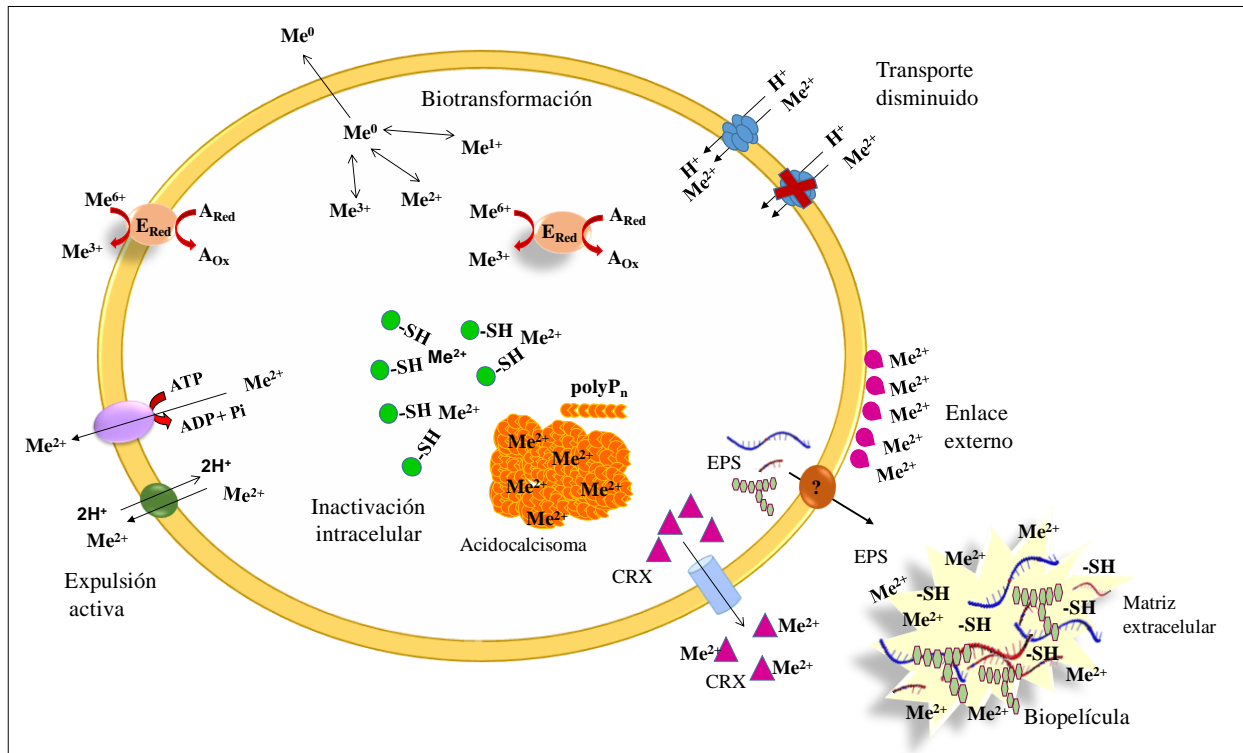


Figura 1.5 Principales mecanismos de resistencia a metales pesados en arqueas. Abreviaciones:  $Me^0$ , metal en estado metálico;  $Me^{1+}$ , metal monovalente,  $Me^{2+}$ , metal divalente;  $Me^{3+}$ , metal trivalente;  $Me^{6+}$ , metal hexavalente;  $A_{Red}$ , agente reducido;  $A_{Ox}$ , agente oxidado; ●-SH, molécula con grupo tiol;  $Er_{Red}$ , enzima que cataliza la reducción de un metal; EPS, sustancias poliméricas extracelulares; ▲-CRX, proteína de respuesta extracelular al cobre;  $polyP_n$ ; cadena de polifosfatos de diferentes longitudes; acidocalcisoma, asociación de polyP en forma de gránulos.

Las ATPasas tipo P son parte de una familia de transportadores transmembranales responsables de movilizar iones y moléculas orgánicas dentro y fuera de la célula, con hidrólisis de ATP. Las pertenecientes a la familia b son las encargadas de mantener la concentración de los metales esenciales en el citosol y de regular la expulsión de metales pesados tóxicos, confiriendo resistencia a dichos metales. En *Sulfolobus solfataricus*, *Ferroplasma acidarmanus* y *Sulfolobus metallicus* se han descrito un incremento en el nivel de transcritos de ATPasas tipo P en respuesta a la exposición al  $\text{Cd}^{2+}$  y al  $\text{Cu}^{2+}$ , por lo que los autores sugirieron que la expulsión de cationes mediante este transportador es el principal mecanismo de resistencia (Baker-Austin *et al.*, 2005; Remonsellez *et al.*, 2006).

### 1.7.2 Enlace externo

El mecanismo de enlace externo consiste en la unión inespecífica del metal a la superficie externa de la célula y/o a algunas sustancias poliméricas extracelulares (EPS) para impedir su transporte hacia el interior de la célula. La adsorción de los metales pesados a estas superficies se debe a la interacción entre los iones y las cargas de los grupos funcionales (amino, fosforilo, sulfhidrilo y carboxilo) que forman con la superficie celular y las EPS.

Las EPS contienen polisacáridos, glicoproteínas, ácidos nucleicos y lípidos los cuales son secretados en respuesta a diferentes tipos de estrés, como: pH extremo,  $\text{O}_2$ , temperatura o salinidad alta y metales pesados. Se ha reportado que *Haloferax* strain bbk2, una arquea halófila secreta un exopolisacárido que le permite crecer en presencia de hasta 4 mM  $\text{Cd}^{2+}$  (Das *et al.*, 2014).

Las EPS son el andamiaje para la formación de la biopelícula, la cual está formada principalmente por una matriz (90%) que es sintetizada por agregados celulares (10%), los cuales están embebidos en ella. La formación de una biopelícula ofrece algunas ventajas con respecto a la vida en estado planctónico, tales como: la acumulación y obtención de nutrientes, el almacenamiento de reservas de carbono y además proporciona una barrera de protección frente a condiciones ambientales desfavorables o frente a diferentes tipos de agentes externos como el  $\text{O}_2$ , los xenobióticos y los metales pesados. Estos últimos son retenidos en esta matriz disminuyendo así su entrada a la célula. Este tipo de mecanismo se ha reportado en bacterias y en

algunas arqueas expuestas a metales pesados (García-Contreras *et al.*, 2013; Veiga *et al.*, 1997; Vera *et al.*, 2013). En *Archaeoglobus fulgidus*, una arquea marina, la exposición a metales pesados induce la formación de biopelícula, que está compuesta principalmente de proteínas y polisacáridos, lo que le permite incrementar 50 veces la remoción de metales pesados y crecer en un medio deficiente de nutrientes, por lo que se ha sugerido que la biopelícula es un mecanismo que le confiere resistencia (Lapaglia & Hartzell, 1997).

### **1.7.3 Transporte disminuido**

La captación de metales esenciales o no esenciales por la célula está mediada por sistemas de transporte específicos o mediante difusión pasiva, los cuáles también son utilizados por los metales pesados para entrar a la célula. La presencia de metales pesados provoca cambios en el contenido de los transportadores, o modificaciones en la permeabilidad de la membrana, para disminuir la difusión pasiva y activa de los iones metálicos tóxicos.

Se ha descrito que el cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) y el arsenato ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ) son análogos químicos que mimetizan al sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) y al fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), respectivamente y entran por sus transportadores (García-García *et al.*, 2012; López-Bucio *et al.*, 2014). El arsenato (V) es un inhibidor competitivo del transporte de fosfato por lo que las células necesitan expresar más transportadores para restablecer el consumo de fosfato, lo cual redundaría en que la célula incrementa el transporte de arsenato (Lou *et al.*, 2010; Slaughter *et al.*, 2012).

### **1.7.4 Biotransformación**

Los mecanismos de biotransformación consisten en la reducción, oxidación o alquilación del metal pesado mediante enzimas que modifican su estado redox disminuyendo así su toxicidad. La reducción del  $\text{Cr}^{6+}$  a la forma trivalente ( $\text{Cr}^{3+}$ ) una especie menos tóxica se lleva a cabo mediante una reductasa dependiente de NADH asociada a la membrana en *Halomonas* sp. TA-04 y en *M. thermautotrophicus* (Focardi *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2015). Este mecanismo se ha estudiado ampliamente en bacterias y protistas con la finalidad de desarrollar procesos

microbiológicos para la biorremediación de las aguas residuales (Chandra & Singh, 2014; Lira-Silva *et al.*, 2011; Sandana Mala *et al.*, 2015; Sarkar *et al.*, 2016; Tanaka *et al.*, 2004).

Michalke *et al.* (2000) reportaron que un consorcio de microorganismos formado principalmente por metanogénicos (*Methanobacterium formicicum*, *Methanosarcina barkeri* y *Methanobacterium thermoautotrophicum*) puede llevar a cabo la biotransformación de algunos metales y metaloides como antimonio (Sb), As, bismuto (Bi) y (Te).

### 1.7.5 Inactivación extra o intracelular con agentes quelantes

El mecanismo de inactivación se lleva a cabo, tanto en el interior como en el exterior de la célula, mediante un incremento en el contenido de compuestos quelantes como moléculas con grupos tiol, ácidos orgánicos y polyP para inactivar al metal y disminuir así su toxicidad.

Los grupos funcionales de las biomoléculas tales como el sulfhidrilo, el carboxilo y el fosforilo poseen diferente afinidad por los metales pesados. Los metales de la clase A ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ ) tienen mayor afinidad por las moléculas con oxígeno, como fosfato, citrato, oxaloacetato y malato. La clase B ( $\text{Cu}^{1+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{1+}$ ) prefiere compuestos con sulfuro como: Cys,  $\text{S}^{2-}$ ,  $\gamma$ -glutamilcisteína ( $\gamma$ -EC), tripanotión ( $\text{Trp}(\text{SH})_2$ ), glutatión (GSH) y fitoquelatinas (FQ). La clase C ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) presentan afinidad intermedia por compuestos con oxígeno o con azufre (Nieboer & Richardson, 1980).

Se ha descrito la inactivación intracelular en microorganismos pertenecientes al dominio *Bacteria* y *Eukarya* por moléculas con grupos tiol en estrés por metales pesados (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005; Pal & Rai, 2010; Sochor *et al.*, 2011). Se ha sugerido que en algunos microorganismos la síntesis y acumulación de moléculas como Cys,  $\gamma$ -EC,  $\text{Trp}(\text{SH})_2$ , GSH y FQs es la primera línea de defensa frente a un estrés por metales pesados (Jobe *et al.*, 2012; Lira-Silva *et al.*, 2011).

El GSH es una de las moléculas más importantes porque participa en la quelación de metales pesados, además es un precursor de la síntesis de FQ y también protege contra el daño inducido por estrés oxidante. Sin embargo, en el dominio *Archaea* no se ha reportado la presencia de GSH, pero se han descrito algunas moléculas con grupo tiol tales como:  $\gamma$ -EC en *Haloarcheas* (Malki

*et al.*, 2009), la coenzima A (CoA-SH) en *Pyrococcus furiosus* (Harris *et al.*, 2005) y la CoM-SH y CoB-SH, que son moléculas esenciales en la metanogénesis (Ferry & Lessner; 2008) en *M. acetivorans* (Wang *et al.*, 2011). Algunos autores han sugerido que estas moléculas-tiol podrían tener un papel similar al del GSH debido a que la concentración intracelular de algunas de ellas se encuentra en el intervalo mM, por lo que podrían cumplir sus funciones esenciales como acarreadores de grupos metilo y, además, ser utilizadas para mantener el estado redox y también participar en la inactivación de los metales pesados en condiciones de estrés.

El incremento y la secreción de ácidos orgánicos como el citrato y el malato se ha asociado con la tolerancia e hiperacumulación de metales pesados en las plantas y algunos protistas (Avilés *et al.*, 2003; Haydon & Cobbett, 2007; Lira-Silva *et al.*, 2011), sin embargo, en arqueas no existen reportes sobre este tipo de mecanismo.

El polifosfato inorgánico es otra de las moléculas que puede participar en la inactivación de los metales pesados para disminuir su toxicidad. Los polifosfatos son cadenas lineales de ortofosfato unidas por enlaces fosfoanhídros de alta energía (Figura 1.6), las cuales se acumulan en grandes cantidades formando gránulos de polyP, que se detectan dentro de la célula como zonas electrodensas mediante microscopia de rayos X. Estos polímeros también pueden quelar cationes y así inactivarlos debido a su alta densidad de cargas negativas netas.

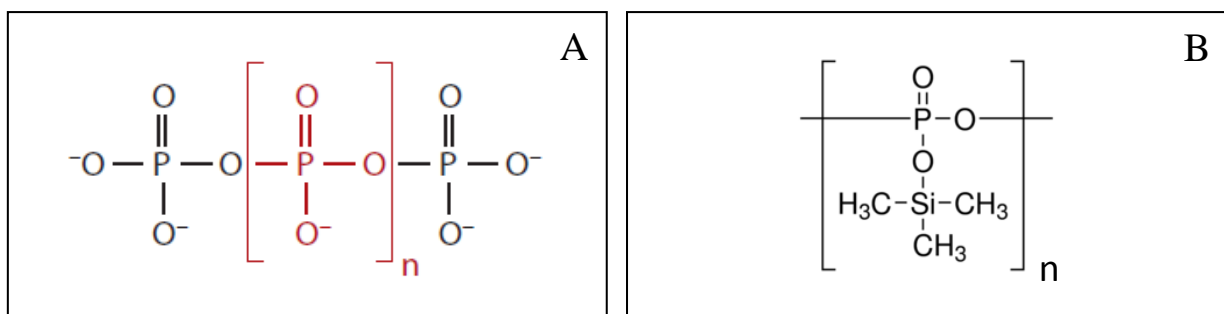


Figura 1.6 Moléculas de polyP. Se muestra la estructura del polyP inorgánico formado por residuos de ortofosfato (A) y la del trimetilsililpolyP comercial (Sigma-Aldrich, Suiza) (B). La longitud de la cadena (n) es variable.

Este polímero es sintetizado por la polifosfato cinasa (PPK), la cual cataliza la transferencia del fosfato terminal del ATP (o de otros donadores de grupos fosfato) a la cadena de polyP o resintetizando ATP. La degradación del polyP se realiza mediante una exopolifosfatasa (PPX), la enzima hidroliza el polyP liberando Pi.

Los gránulos de polyP (acidocalcisomas) se han localizado en organismos de los tres dominios filogenéticos y se ha sugerido que participan en la regulación de diversos procesos tales como: el *quorum sensing*, la formación de biopelícula, la motilidad y la virulencia (Docampo *et al.*, 2013; Grillo-Puertas *et al.*, 2012; Kornberg *et al.*, 1999). También se ha descrito como una respuesta frente a varios tipos de estrés como el osmótico, la temperatura, un pH extremo, falta de nutrientes, el O<sub>2</sub> y los metales pesados (Docampo *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2012; Jasso-Chávez *et al.*, 2015; Veiga *et al.*, 1997).

Se ha sugerido que en *Cryptococcus humicola* y *Anticarsia gemmatalis* el contenido de polyP está directamente relacionado con la resistencia a los metales pesados (Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup>), debido a que esta molécula los inactiva disminuyendo la concentración intracelular del metal y su toxicidad (Andreeva *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha propuesto que en *E. coli*, *A. ferrooxidans* y *S. metallicus* la resistencia a metales pesados no sólo depende del contenido de polyP sino también de su hidrólisis, la cual es mediada por la PPX y regulada por la concentración de metales pesados para poder expulsar el complejo metal-fosfato a través del sistema de transporte de fosfato (Pit) y con ello, desintoxicar a la célula (Álvarez & Jerez, 2004; Grillo-Puertas *et al.*, 2014; Keasling & Hupf, 1996; Remonsellez *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha descrito que en *Methanobacterium bryantii*, un metanogénico aislado de una zona minera, la exposición a elevadas concentraciones de Cu<sup>2+</sup> incrementa la secreción de una proteína de respuesta extracelular al cobre (CRX), sugiriendo que esta proteína puede ser un mecanismo de quelación externa para disminuir la concentración del metal (Kim *et al.*, 1996).



## Capítulo 2. Planteamiento del problema

En los últimos años ha aumentado el uso del gas natural con la finalidad de disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero y los daños causados al medio ambiente. El gas natural contiene principalmente  $\text{CH}_4$  (>84%, NOM-001-SECRE-2010) y otros hidrocarburos gaseosos, cuyo potencial calorífico es mayor que el de otros combustibles (2,232 kJ/kg) y se considera más amigable con el medio ambiente ya que genera  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  como producto final.

Los reportes indican que más del 60% de  $\text{CH}_4$  emitido al ambiente es de origen antropogénico, proveniente de algunos procesos industriales como la extracción de carbón mineral, del petróleo y del gas natural; de actividades agrícolas y ganaderas; y del tratamiento de aguas residuales (EPA, 2016). Sin embargo, también puede provenir de diversas fuentes naturales (de los humedales, sedimentos, volcanes y del océano) como resultado de la descomposición de materia orgánica bajo condiciones anaerobias.

Se han propuesto diversas iniciativas para implementar la recuperación y el uso del biogás como una fuente de energía limpia (Iniciativa Global del Metano, GMI 2016), con la finalidad de disminuir sus emisiones al ambiente y mitigar así el efecto invernadero teniendo a la vez beneficios a nivel ambiental, energético y económico. Esas iniciativas buscan mejorar los procesos de producción y recuperación de biogás en los biodigestores, el cual puede ser utilizado para la generación de calor y/o electricidad. En algunos casos, se ha propuesto utilizar desechos industriales y domésticos contaminados con metales pesados como  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  con la finalidad doble de, por un lado, eliminar estos metales y por el otro producir energía en un solo proceso. Sin embargo, la presencia de algunos compuestos como el amonio, los ácidos orgánicos y la acumulación de metales pesados ha sido una limitante para el crecimiento de los metanogénicos y, en consecuencia, para la producción del biogás (Hajarnis *et al.*, 1993; Jarrell *et al.*, 1987; Jeong *et al.*, 2009).

Algunos de los metales pesados ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ ) presentes en los biodigestores son muy tóxicos para los metanogénicos, siendo el  $\text{Cd}^{2+}$  uno de los más tóxicos, ya que inhibe la producción de  $\text{CH}_4$  a concentraciones muy bajas (Bhattacharya, 1995; Jain *et al.*, 1992). Como el  $\text{Cd}^{2+}$  es uno de los principales contaminantes de las aguas residuales (NOM, 0.009 mg/L; 80

nM), las concentraciones de este metal en los biodigestores son acumulativas y variables (0.03-5.4  $\mu\text{M}$ ).

A pesar de los efectos adversos que los metales pesados causan sobre los metanogénicos, se ha sugerido que algunos de ellos pueden tener un nivel de tolerancia mayor o incrementar su resistencia a la toxicidad causada por estos metales durante periodos largos de exposición (Karri *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 1999). En los consorcios de metanogénicos se ha descrito que la toxicidad de algunos metales como el  $\text{Cd}^{2+}$ , el  $\text{Zn}^{2+}$ , el  $\text{Cr}^{6+}$  y el  $\text{Ni}^{2+}$  inducen la secreción de compuestos para inactivar al metal y promover la formación de una biopelícula (Das *et al.*, 2014; Veiga *et al.*, 1997). No obstante, no ha sido posible caracterizar a detalle estos mecanismos para ofrecer una solución que mejore la producción de biogás. Cabe señalar que el biodigestor es un ambiente complejo en el cual existen numerosas variables (diversas asociaciones microbianas y metanogénicos, múltiples fuentes de carbono y mezclas de metales que pueden ser tóxicos y/o esenciales dependiendo de la concentración), además de que los metanogénicos aislados cultivables en laboratorio son escasos.

En este trabajo se utilizó a *Methanosarcina acetivorans*, un metanogénico aislado de los sedimentos marinos para analizar el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la metanogénesis y los mecanismos de resistencia frente a este metal, debido a que se ha reportado que forma parte del conjunto de microorganismos usados para la producción del biogás (Wirth *et al.*, 2012). En el genoma de *M. acetivorans* se han identificado genes que pueden codificar para algunas enzimas involucradas en la desintoxicación de los metales pesados como una ATPasa tipo P para cobre (MA0166) y otra para cadmio (MA3632), una PPK (MA0081) y una PPX (MA0083 y MA2351), enzimas que participan en la síntesis y degradación de polyP.

Este enfoque permitió evaluar el efecto de un metal pesado en un metanogénico aislado, ya que en la actualidad los estudios se realizan en biodigestores y la información obtenida no es concluyente porque en estas publicaciones se reportan resultados que son contradictorios sobre el efecto de los metales pesados. Esto se debe a que las condiciones y los grupos de microorganismos utilizados son muy diferentes en cada uno de los biodigestores. Por este motivo, es relevante el estudio de los mecanismos implicados en la resistencia al  $\text{Cd}^{2+}$  en *M. acetivorans* y sentar las bases para optimizar las condiciones de producción de biogás en presencia de metales pesados.

## Capítulo 3. Efecto del cadmio sobre la metanogénesis y los mecanismos de resistencia en *Methanosarcina acetivorans*

### 3.1 Antecedentes

En México la contaminación por metales pesados es un problema grave debido a que las industrias generan anualmente  $6 \times 10^9$  m<sup>3</sup> de aguas residuales contaminadas con metales pesados, tales como el Pb, el Hg, el Cd y el Cr. Con frecuencia, estas aguas residuales contienen niveles de metales pesados que rebasan los niveles máximos permitidos por las normas oficiales y son descargadas en los cuerpos de agua donde los metales pesados se acumulan, biomagnifican y alteran los ecosistemas. Por este motivo, se han desarrollado nuevos procesos para el tratamiento de las aguas residuales, donde se busca eliminar los metales pesados y aprovechar la materia orgánica para producir biogás, lo cual ocurre en un solo paso utilizando la energía producida durante el proceso y disminuyendo los costos de producción. Algunos reportes indican que la presencia de metales pesados inhibe el crecimiento de los metanogénicos y en consecuencia la producción de CH<sub>4</sub>.

Existen numerosos reportes sobre el efecto de algunos metales pesados en la producción de biogás en biodigestores pero en ninguno de ellos se determina a qué nivel ocurre la inhibición y las alternativas que ofrecen para mejorar el proceso son limitadas (Colussi *et al.*, 2009; Zayed *et al.*, 2000).

Los metales pesados afectan la actividad de muchas enzimas debido a que pueden unirse con alta afinidad a los grupos tiol y también pueden desplazar a los metales pesados presentes en el sitio activo, lo cual impide la catálisis. Entonces, la inhibición de la metanogénesis por los metales pesados podría atribuirse a que éstos modifican la actividad de algunas enzimas tales como el complejo CODH/AcS, la Mtr, la Hdr y la CA que tienen átomos de Co, Ni, W, Mo, y Fe en su sitio catalítico o de las enzimas Ack, CODH/AcS y la Mcr, que poseen cisteínas esenciales (Glass & Orphan, 2012; Ferry, 1999).

El mecanismo de quelación intracelular es una respuesta general en muchos organismos para contener contra los efectos tóxicos del Cd<sup>2+</sup>. Además de las moléculas con grupos tiol, existen otras moléculas como ácidos orgánicos y polyP que también podrían participar en la quelación del metal. En este sentido, se ha descrito que la vía de producción de CH<sub>4</sub> involucra coenzimas

como la CoM-SH y la CoB-SH que son esenciales para la metanogénesis. En *Methanococcus voltae* la concentración de CoM-SH es 14.8 mM y la  $K_m$  de la Mtr por CoM-SH es 0.25 mM en *Methanosarcina sp.* (Saavedra *et al.*, 2011), lo que sugiere que fisiológicamente la Mtr está saturada por su sustrato a una concentración aproximada de 2.5 mM y que la CoM-SH remanente podría ser utilizada para neutralizar los cationes metálicos divalentes dentro de la célula. Por otro lado, se ha descrito que la presencia de  $Cr^{6+}$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  en los biodigestores induce la formación de una biopelícula para crear una barrera de protección contra el metal en algunos organismos pertenecientes al dominio *Archaea* (Lapaglia *et al.*, 1997).

### 3.2 Hipótesis

Los principales mecanismos de resistencia al  $Cd^{2+}$  en *Methanosarcina acetivorans* involucran la modulación de los contenidos intracelulares de moléculas con grupos tiol (Cys, CoM-SH, CoB-SH, sulfuro) y polyP, así como la formación de una biopelícula.

### 3.3 Objetivos

#### 3.3.1 Objetivo general

Caracterizar los mecanismos de resistencia al  $Cd^{2+}$  en *Methanosarcina acetivorans*.

#### 3.3.2 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto del  $Cd^{2+}$  sobre la duplicación celular y la producción de metano.
- Determinar la actividad de las enzimas Ack, Pta, CODH/AcS y CA en presencia y ausencia de  $Cd^{2+}$ .
- Determinar la remoción del metal por las células.
- Determinar el contenido intracelular de Cys, sulfuro, CoM-SH, CoB-SH (grupos tiol) y polyP.
- Determinar la formación de biopelícula en respuesta a la exposición al  $Cd^{2+}$ .

### 3.4 Estrategia experimental

En este proyecto se utilizó la cepa *Methanosarcina acetivorans* C2A, la cual fue donada por el Prof. James G. Ferry de la Universidad Estatal de Pensilvania, USA.

Se diseñaron tres tipos de experimentos para evaluar los mecanismos de resistencia al  $\text{Cd}^{2+}$ : (i) una exposición subaguda (curvas de crecimiento), (ii) una aguda por 24 h y (iii) una crónica con células preadaptadas al  $\text{Cd}^{2+}$  por varios meses (Figura 3.1).

Las células de *M. acetivorans* fueron cultivadas en condiciones anaerobias en un medio salino llamado HS (*high salt*) cuya composición es 400 mM NaCl y pH de 7.2, con la adición de cisteína y sulfuro para garantizar la anaerobiosis y con acetato o metanol como fuente de carbono (Lira-Silva *et al.*, 2012, 2013).

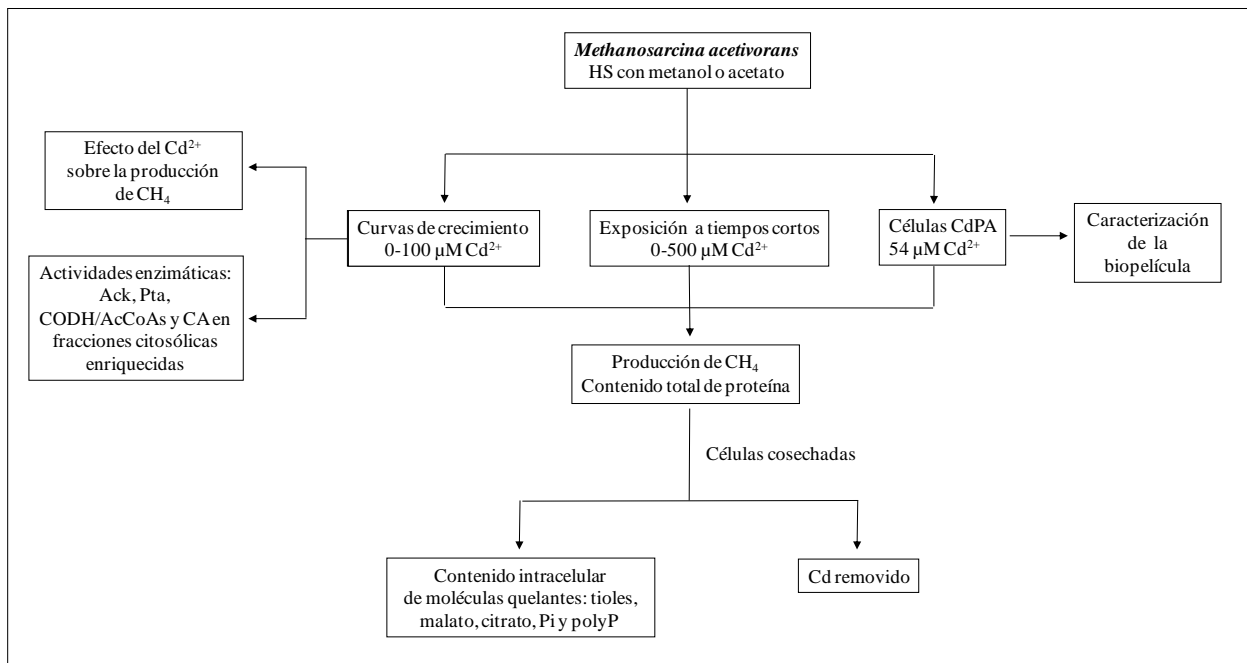


Figura 3.1 Estrategia experimental.

### **3.4.1 Curvas de crecimiento**

Se hicieron cultivos con 100 mM de metanol o acetato durante 4 y 12 días respectivamente, en presencia de diferentes concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  (0, 1, 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ). El crecimiento celular fue determinado mediante: (i) la producción de metano, (ii) el cambio en la absorbancia a 600 nm y (iii) el contenido de proteína en cultivos de 60 mL.

### **3.4.2 Exposición a tiempos cortos**

Las suspensiones celulares (10-15 mg de proteína) se incubaron por 24 h en presencia de 0, 10, 25, 50, 100, 250 y 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$  en un medio HS modificado, en el cual se disminuyeron las concentraciones de algunos componentes para evitar la duplicación celular e incrementar la disponibilidad del  $\text{Cd}^{2+}$  libre ( $\text{NaCl}$  de 500 a 200 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  de 5 a 0.66 mM, metanol o acetato de 100 a 25 mM, cisteína de 8 a 2 mM y sulfuro de 1 a 0.12 mM). La viabilidad celular fue determinada mediante la producción de  $\text{CH}_4$  y el contenido de proteína en cultivos de 60 mL.

### **3.4.3 Exposición crónica**

Las células cultivadas con metanol o acetato fueron expuestas a 54  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  durante más de 270 generaciones (cultivos CdPA), obteniendo cultivos estables a la exposición del metal que no afecta la síntesis de metano ni el contenido de proteína. Estas células se expusieron posteriormente a concentraciones desde 0.6 hasta 2.5 mM  $\text{Cd}^{2+}$  durante 18 días. Los cultivos se iniciaron con 100 mM de la fuente de carbono y cada tercer día se efectuaron adiciones de la fuente de carbono a la misma concentración para mantener el cultivo (6 adiciones en total). La duplicación celular se determinó mediante la producción de  $\text{CH}_4$ , debido a que la turbidez causada por el  $\text{Cd}^{2+}$  no permitió medir con certeza el cambio en la absorbancia.

Se cuantificó el contenido de compuestos quelantes (moléculas con grupos tiol, malato, citrato, polyP) y el metal incorporado en las células provenientes de los tres tipos de experimentos. También se cuantificó la formación de biopelícula en estos cultivos y se caracterizó su composición. El efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la metanogénesis se analizó en cultivos con acetato o metanol. A estos cultivos se les adicionó diferentes concentraciones de  $\text{Cd}^{2+}$  u otros

metales ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  y  $Co^{2+}$ ) para evaluar la producción de metano durante tiempos cortos (1-60 min). Se determinó la actividad de las enzimas de la vía metanogénica en las fracciones citosólicas enriquecidas, en presencia y ausencia de  $Cd^{2+}$ .

## **3.5 Métodos**

### **3.5.1 Condiciones de cultivo**

Las células se cultivaron bajo condiciones anaerobias en medio HS. El medio se preparó dentro de una cámara de anaerobiosis (COY laboratory products, Grass Lake, Michigan, USA), la cual tiene una atmósfera de 80%  $N_2$ , 15%  $CO_2$  y 5%  $H_2$  (v/v) durante 2-3 horas en constante agitación y burbujeo con una bomba peristáltica. Se adicionó 8.2 mM cisteína-HCl y 1.04 mM  $Na_2S$  para eliminar el  $O_2$  remanente en el medio de cultivo y así crear un ambiente anóxico altamente reductor. Se utilizó 100 mM de acetato o metanol como fuente de carbono. También se añadió resazurina como un indicador redox, el cual es de color azul en presencia de oxígeno e incoloro cuando esta reducido (Lira-Silva *et al.*, 2012).

### **3.5.2 Cuantificación de metabolitos**

La cuantificación de gas metano se realizó por cromatografía de gases utilizando un detector de ionización de flama (FID) como se reportó previamente (Lira-Silva *et al.*, 2012).

#### ***3.5.2.1 Moléculas con grupos tiol***

La cuantificación de moléculas con grupos tiol se realizó mediante HPLC derivatizando post columna ( $C_{18}$  de fase reversa) con un buffer de 0.1 M  $NaH_2PO_4$  a pH 8.0 que contenía 1 mM ácido 5, 5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico) (DTNB) a pH 8 (Lira-Silva *et al.*, 2013). El DTNB reacciona espontánea- y rápidamente con el grupo tiol y forma un compuesto amarillo que se cuantifica a 412 nm. Al final de cada corrida se procedió a lavar la columna con 100% de ACN

durante 5 min para eliminar la posible materia orgánica retenida, pero se hizo posteriormente un lavado con agua para evitar que el fosfato del buffer de corrida se precipitara.

Durante el procesamiento de las muestras se obtuvieron extractos ácidos al romper las células con PCA. Los extractos ácidos fueron incubados durante 5 minutos con borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) para reducir completamente los tioles presentes en la muestra y cuantificar el contenido de tioles totales. La concentración de estas moléculas se calculó usando el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_{\text{DTNB}} = 13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) a 412 nm.

### **3.5.2.2 Cuantificación de sulfuro**

Este método se llevó a cabo en frascos anaerobios de 10 mL sellados para evitar la pérdida del sulfuro, debido a las condiciones ácidas del método (Lira-Silva *et al.*, 2012), por lo que la adición de los reactivos para la mezcla de reacción (2.5 mL) se realizó con ayuda de una jeringa. La concentración de sulfuro se determinó en condiciones anaerobias por espectrofotometría mediante la formación de azul de metileno a 670 nm. Los tiempos de incubación para favorecer el desarrollo del color (o la formación de azul de metileno) no deben ser mayores a 30 min para evitar la degradación del compuesto cromóforo. La concentración se obtuvo por interpolación en una curva estándar utilizando una solución estándar de sulfuro, la cual fue lineal hasta 350 nmol.

### **3.5.2.3 Cuantificación de ácidos orgánicos**

El contenido intracelular de malato y citrato se determinó espectrofotométricamente mediante ensayos enzimáticos descritos previamente (Lira-Silva *et al.*, 2011; Marín-Hernández *et al.*, 2006).

### **3.5.2.4 Cuantificación de fosfato**

El fosfato se determinó por espectrofotometría mediante un método colorimétrico que mide la formación de azul de molibdeno a 870 nm (modificado de LeBel *et al.*, 1978). La muestra se



incubó en una mezcla de reacción (5mL) que contiene 2.5 mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 84 mM  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  y 0.5 M ácido acético a pH 4. Esta mezcla se homogeneizó y se le adicionó 5 mM  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 14.5 mM metol y 60 mM  $\text{NaHSO}_3$ . En esta reacción el fosfato forma un complejo con el molibdato ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ) produciendo fosfomolibdato ( $[\text{PO}_4\text{12MoO}_3]^{3-}$ ), el cual se reduce con ayuda del metol y el  $\text{NaHSO}_3$  para formar azul de molibdeno. La reacción se dejó incubando durante 10 min para favorecer la formación del compuesto colorido y fue estable al menos durante una hora. La concentración de Pi se obtuvo por interpolación en una curva utilizando un estándar comercial de fosfato (Sigma-Aldrich, Suiza), la cual fue lineal hasta 800 nmol

### 3.5.3 Determinación de las actividades enzimáticas

La actividad de la Pta se determinó en fracciones citosólicas enriquecidas (3-5  $\mu\text{g}$  de proteína) incubadas en buffer Hepes-Mg, 5 mM acetil-fosfato y 160  $\mu\text{M}$  CoA-SH. La reacción se inició con la adición de la CoA-SH. Se tomaron alícuotas de la mezcla de reacción a diferentes tiempos y se mezclaron con un buffer de fosfatos 0.1 M y 1 mM DTNB (Lira-Silva *et al.*, 2012). La concentración de CoA-SH remanente fue calculada usando el coeficiente de extinción molar  $\epsilon_{\text{DTNB}} = 13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

La actividad del complejo CODH/AcS se determinó añadiendo 80 mM acetil-CoA a una celda que contenía una alícuota de la fracción citosólica (10-25  $\mu\text{g}$  de proteína) y se midió mediante la liberación de la CoA-SH al reaccionar con DTNB a 412 nm (Lira-Silva *et al.*, 2012).

La actividad de la CA se determinó incubando una fracción citosólica (2.5-5  $\mu\text{g}$  de proteína) en un buffer con 100 mM bicarbonato de sodio a pH 8, en un frasco sellado herméticamente. El  $\text{CO}_2$  formado y acumulado en el espacio vacío del frasco (headspace), se cuantificó a diferentes tiempos (0, 30, 60 y 120 s) mediante cromatografía de gases (CG) utilizando un detector de conductividad térmica (TCD) y una columna HP-PLOT /U. Las condiciones experimentales del equipo fueron: un Split de 16, la temperatura del horno fue de 150°C, la temperatura de la columna de 75°C y la temperatura del TCD de 200°C. El flujo de la columna fue 1.6 mL/min a una velocidad lineal de 31.5 cm/s usando helio con un flujo de 5 mL/min.

El CO<sub>2</sub> producido por la CA se determinó como la concentración del CO<sub>2</sub> formado en presencia de la enzima y a este valor se restó el CO<sub>2</sub> presente en el buffer de reacción sin la enzima y con la enzima desnaturalizada. La concentración de CO<sub>2</sub> se calculó a partir de una curva patrón realizada con un estándar de CO<sub>2</sub> al 99.8% (v/v). El límite de detección fue de 25 nmol de CO<sub>2</sub> (Lira-Silva *et al.*, 2012).

#### **3.5.4 Cuantificación de cadmio intracelular**

Los cultivos se cosecharon en la fase estacionaria (día 14) y se lavaron por centrifugación con buffer TME a pH 7.2. Las células se resuspendieron en buffer fresco (5 mg proteína/mL) y fueron digeridas hasta claridad con una mezcla de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + HNO<sub>3</sub> (1:3) por 2 h a 100° C para cuantificar el cadmio intracelular por espectrometría de absorción atómica (Lira-Silva *et al.*, 2012).

Para determinar la localización del cadmio y el azufre en el interior de la célula, los cultivos control y expuestos a 100 µM CdCl<sub>2</sub> se fijaron por inmersión en 3% de glutaraldehído para su análisis por microscopia de transmisión electrónica y barrido, como se reportó previamente (Lira-Silva *et al.*, 2012).

#### **3.5.5 Determinación de la biopelícula**

La formación de la biopelícula se determinó en placas de poliestireno de 96 pozos, donde se adicionaron alícuotas de las células control y las CdPA, las cuales se expusieron a diferentes concentraciones de Cd<sup>2+</sup> durante 3 días. La biopelícula se midió como el cambio en la absorbancia a 595 nm debido a la adherencia de las células a la placa, como una consecuencia de la formación de la biopelícula, la cual fue teñida previamente utilizando 0.1 % (p/v) cristal violeta (Zhang *et al.*, 2007, Lira-Silva *et al.*, 2013). La tinción con cristal violeta se realizó incubando durante 20 min con el colorante, posteriormente se realizaron 2 lavados con un buffer TME pH 7.2. Finalmente se realizó un tercer lavado con etanol absoluto para solubilizar el colorante y realizar la medición.

### 3.5.6 Caracterización de la biopelícula

Los cultivos preadaptados y expuestos a una concentración mayor de  $\text{Cd}^{2+}$  se cosecharon por centrifugación, se resuspendieron en buffer TME a pH 7.2 y se homogenizaron por sonicación para analizar la composición de la biopelícula por métodos colorimétricos. El contenido de carbohidratos se cuantificó mediante el método fenol-sulfúrico modificado por Jasso-Chávez *et al.* (2010). La reacción se incubó durante 30 min en la obscuridad y se midió por espectrofotometría a 490 nm. El contenido de DNA se determinó como el cambio en la absorbancia a 540 nm, para lo cual se colocó una fracción de la biopelícula (1 mg de proteína) y 2 mL de buffer TME en una celda de cuarzo. La muestra se incubó en presencia de 1 mU de DNAsa I durante varios minutos y se midió la disminución en la DO a 540 nm debido a la ruptura del DNA. Otra fracción de la biopelícula se utilizó para determinar el contenido de cadmio.

## 3.6 Resultados

### 3.6.1 Efecto del cadmio sobre la metanogénesis en *Methanosarcina acetivorans*

La primera parte de este proyecto consistió en determinar el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre el crecimiento y la producción de metano en *M. acetivorans*, debido a la escasa información sobre el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  en la metanogénesis, la principal vía de producción de ATP.

A continuación se muestra un resumen de los resultados más importantes.

Se analizó que la concentración del metal libre en el medio de cultivo estaba en el intervalo pM debido a que éste contiene  $1.7 \pm 0.03$  mM Cys reducida y  $1.2 \pm 0.4$  mM  $\text{S}^{2-}$ . También se determinó que las concentraciones de  $\text{Cd}^{2+}$  de hasta 100  $\mu\text{M}$  (226 pM  $\text{Cd}^{2+}$  libre) no afectaron el crecimiento ni la producción de metano en *M. acetivorans* cultivada con metanol. En cambio, en células cultivadas con acetato el  $\text{Cd}^{2+}$  aumentó la velocidad de síntesis de metano ligeramente ( $\sim 10$  %). Este efecto activador sobre la metanogénesis también se observó a tiempos cortos ( $>10$  min) con 10  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ , donde la velocidad de producción de metano se incrementó 6 y 9 veces con metanol y acetato, respectivamente con respecto a un cultivo sin  $\text{Cd}^{2+}$ . Otros metales como el  $\text{Co}^{2+}$  y el  $\text{Zn}^{2+}$  también estimularon la metanogénesis. Estos datos sugirieron que el metal

podría regular a nivel enzimático la velocidad de producción de metano, por lo que se midieron las actividades de las enzimas de la parte alta de la vía y de aquellas que tienen metales en sus centros activos como la Ack, la Pta, el complejo CODH/AcS y la CA. Se determinó que la Ack y la CA se activaron directamente por el  $\text{Cd}^{2+}$ . Además, los cultivos con  $100 \mu\text{M Cd}^{2+}$  fueron capaces de acumular entre el 40 y 69% del metal presente en el medio, cuando las células se cultivaron con metanol y acetato, respectivamente.

Estos resultados fueron publicados en el artículo (Anexo A):

### **Activation of methanogenesis by cadmium in the marine archaeon**

#### ***Methanosarcina acetivorans***

**Lira-Silva E.**, Santiago-Martínez M.G., Hernández-Juárez V., García-Contreras R., Moreno-Sánchez R., Jasso-Chávez R. (2012). *PLoS One*, 7(11):e48779.

doi: 10.1371/journal.pone.0048779. Factor de Impacto 2016: 4.4. N° de citas: 6

### **3.6.1.1 Datos del material suplementario**

#### **3.6.1.1.1 Determinación de la actividad de la Pta**

La Pta es una enzima que participa en la metanogénesis acetoclástica catalizando la formación de acetyl-CoA a partir de acetyl-fosfato y CoA-SH con la liberación de Pi. A continuación se muestra un trazo representativo de la actividad de la Pta en ausencia y en presencia de  $\text{Cd}^{2+}$ . La actividad de esta enzima se midió como la cantidad de CoA-SH remanente y fue lineal durante 30 s. La CoA-SH permaneció constante en ausencia de la enzima (Figura 3.2).

#### **3.6.1.1.2 Determinación de la actividad del complejo CODH/AcS**

El complejo CODH/AcS cataliza una reacción en la que participan la acetyl-CoA, la ferredoxina oxidada (como aceptor de electrones) y la THSPT (acarreador de grupos metilo). En este experimento se asumió que la fracción citosólica contenía concentraciones suficientes de ferredoxina y de THMPT como se ha reportado para células cultivadas con acetato (Feist *et al.*,

2006; Wang *et al.*, 2011). En la Figura 3.3 se muestra que la reacción para medir la actividad del complejo CODH/AcS fue lineal hasta los 30 s y dependiente de la cantidad de proteína añadida.

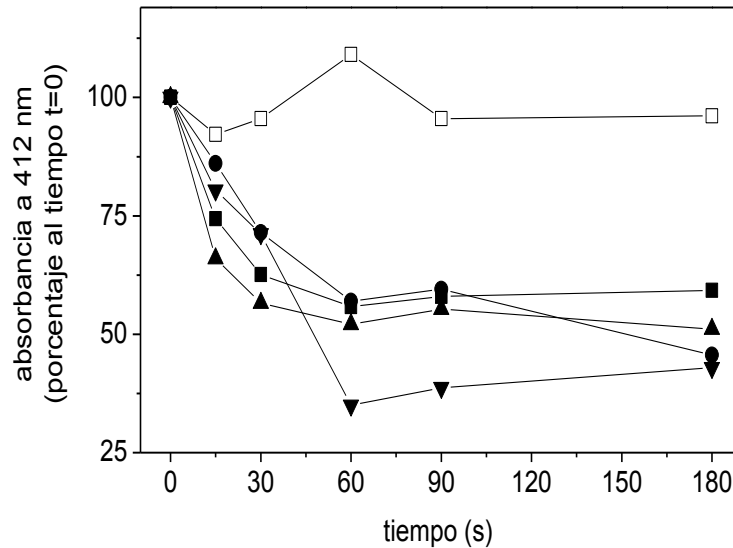


Figura 3.2 Actividad de Pta en *M. acetivorans*. Una alícuota de la fracción citosólica se incubó con los sustratos acetyl-fosfato y CoA-SH en ausencia (□) o en presencia de 0.1 (●), 1 (▲) o 10 (▼)  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ . En ausencia de proteína la concentración de CoA-SH permaneció constante (□).

Debido a que el complejo CODH/AcS no es la única enzima que puede catalizar la liberación de CoA-SH a partir de acetyl-CoA, también se determinó la actividad de esta enzima utilizando la reducción del metilviológeno dependiente de CO (Sowers, 1995). Para esta determinación se utilizó un buffer Hepes-Mg + 0.5 mM metilviológeno previamente saturado con CO (burbujeando gas durante 30 min en un frasco sellado que contenía el buffer). A continuación se tomaron 1.2 ml de la mezcla de reacción y se colocaron en una celda de vidrio anaerobia y previamente purgada con CO. La reacción se inició con la adición de 50  $\mu\text{g}$  de proteína y se cuantificó como el cambio en la absorbancia a 603 nm. Estos ensayos se hicieron en condiciones anaerobias debido a que la enzima es sensible al oxígeno porque posee centros Fe-S que pueden ser oxidados. La exposición al aire durante más de 10 min o la adición de 0.5 mM de cianuro

disminuyeron más del 50% la actividad enzimática como se ha reportado (Abbanat & Ferry, 1990).

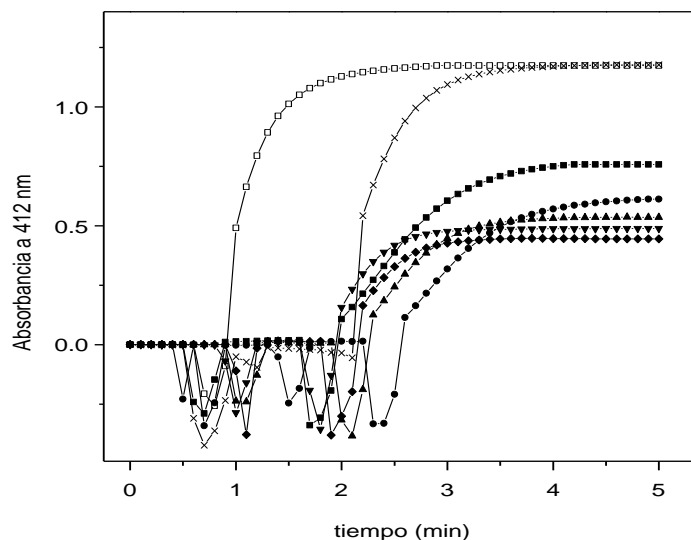


Figura 3.3 Actividad del complejo CODH/AcS en *M. acetivorans*. La actividad se determinó adicionando una alícuota de la fracción citosólica (que contenía el complejo enzimático, ferredoxina y THMPT) y 80  $\mu\text{M}$  de acetil-CoA. Se muestra un trazo representativo de esta reacción utilizando 125 ( $\square$ ), 62 ( $\times$ ) y 25 ( $\blacksquare$ )  $\mu\text{g}$  de la fracción citosólica en ausencia y presencia de 0.01 ( $\bullet$ ), 0.1 ( $\blacktriangle$ ), 1 ( $\blacktriangledown$ ) y 10  $\mu\text{M}$  total  $\text{CdCl}_2$  ( $\blacklozenge$ ).

### 3.6.1.1.3 Determinación de la actividad de la CA

La CA es la enzima que cataliza la conversión reversible de  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$  a bicarbonato. La columna utilizada permite cuantificar el  $\text{CO}_2$  y otros compuestos como el  $\text{N}_2$  y el  $\text{H}_2\text{O}$ . Los tiempos de retención ( $t_R$ ) para estos compuestos fueron 2.4 min para el  $\text{CO}_2$ , 2.12 min para el  $\text{N}_2$  y 7 min para el  $\text{H}_2\text{O}$ . Además, este método permitió hacer hasta cuatro inyecciones consecutivas en la misma corrida sin que los picos del compuesto de interés se estorbaran entre sí (Figura 3.4).

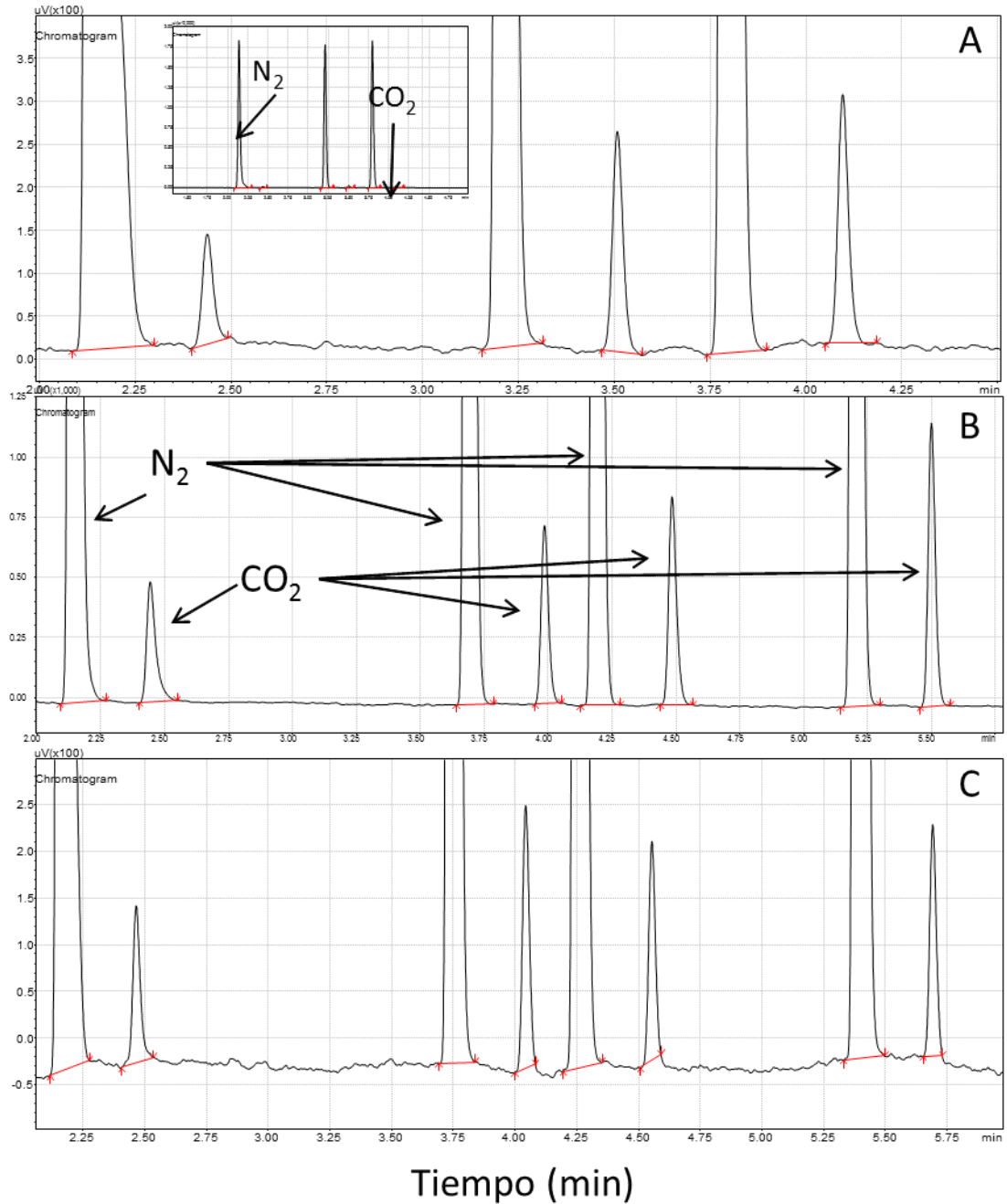


Figura 3.4 Formación de CO<sub>2</sub> por la CA de *M. acetivorans*. La actividad de la enzima se determinó en ausencia de Cd<sup>2+</sup> (cromatograma A), en presencia de 1 μM Cd<sup>2+</sup> (cromatograma B) y en una fracción citosólica previamente calentada (cromatograma C). Los picos en cada uno de los cromatogramas representan inyecciones consecutivas de la misma muestra a diferentes tiempos. Es importante notar que la escala del “eje y” es mayor en el cromatograma B.

En la Figura 3.4 se muestra que el contenido de CO<sub>2</sub> se incrementó con el tiempo (cromatograma A). También se demostró que la adición de 1 μM Cd<sup>2+</sup> al ensayo causó un incremento en el contenido de CO<sub>2</sub> (cromatograma B). Por otro lado, cuando la fracción citosólica fue calentada durante 10 min no hubo cambio en el contenido de CO<sub>2</sub> (cromatograma C), lo que sugirió que el incremento en CO<sub>2</sub> fue debido a la actividad enzimática.

La actividad de la enzima CA fue lineal durante un minuto (Figura 3.5). Sin embargo, no fue posible cuantificar la reacción reversa utilizando este método (datos no mostrados).

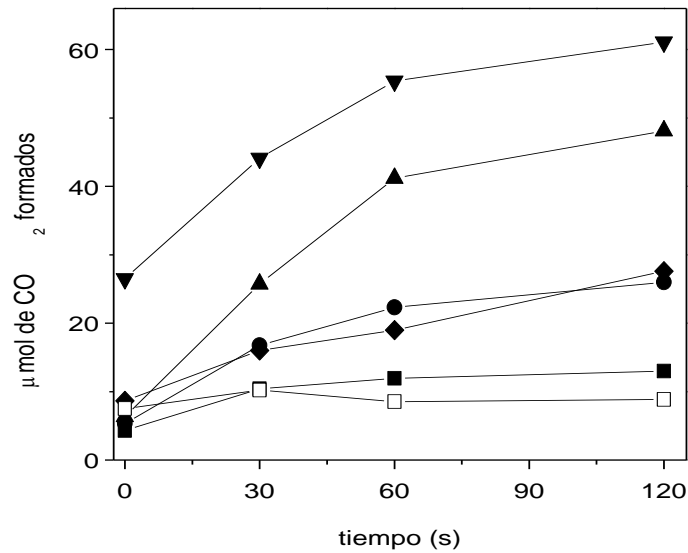


Figura 3.5 Actividad de CA en la fracción citosólica. Se determinó en ausencia (▴) o en presencia de 0.01 (●), 0.1 (▲), 1 (▼) o 10 μM Cd<sup>2+</sup> (◆). Se muestra un dato representativo de una fracción citosólica previamente calentada y en presencia de 0.1 μM Cd<sup>2+</sup> (□).

#### 3.6.1.1.4 Activación de la metanogénesis por Cd<sup>2+</sup>

La activación de la metanogénesis por Cd<sup>2+</sup> se determinó en cultivos de acetato o metanol metabólicamente activos (en la fase de crecimiento estacionaria temprana), los cuales fueron despresurizados y purgados gaseando N<sub>2</sub> durante 5 min (Figura 3.6). A continuación, se tomaron muestras del headspace a diferentes tiempos durante 60 min para cuantificar el metano por CG. Es importante mencionar que en el método se utilizó un Split de 25 para cuantificar con mayor certidumbre la concentración de CH<sub>4</sub>.



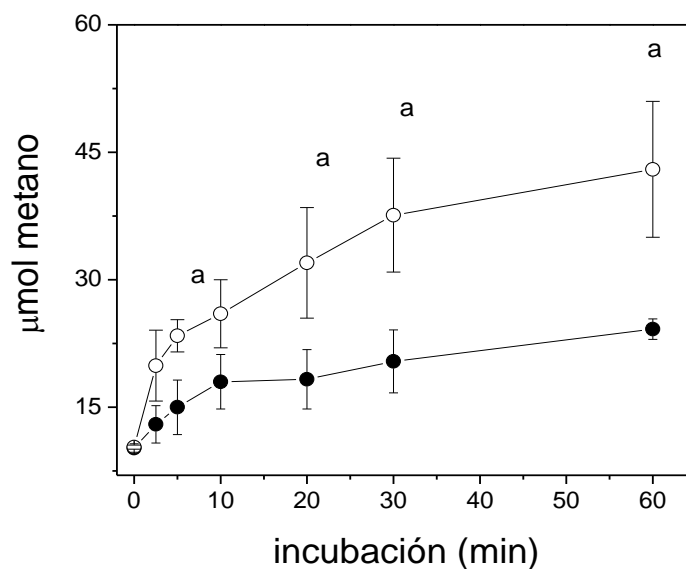


Figura 3.6 Activación de la metanogénesis por el  $\text{Cd}^{2+}$ . La producción de metano se determinó en cultivos con acetato durante diferentes tiempos de incubación (0, 5, 10, 20, 30 y 60 min) sin (símbolos llenos) o con  $10 \mu\text{M Cd}^{2+}$  (símbolos abiertos) para su análisis mediante CG. Estos experimentos iniciaron con la adición de 20 mM de acetato. Los valores son la media  $\pm$  desviación estándar de 3 preparaciones diferentes. La Prueba de t-Student indicó una  $P < 0.05$  para a vs control (sin  $\text{Cd}^{2+}$ ).

#### 3.6.1.1.5 Identificación de los agregados intracelulares de $\text{Cd}^{2+}$

Las células cultivadas con metanol y expuestas a  $100 \mu\text{M Cd}^{2+}$  durante 5 días removieron el 40% del metal presente en el cultivo, por lo que se realizó un análisis por High Angle Annular Dark-Field Scanning Transmission Electron Microscopy (HAADF-STEM) para localizar al metal dentro de la célula. En la Figura 3.7 se muestra la acumulación intracelular del metal en zonas electrodensas. El análisis realizado mediante rayos X mostró que estas zonas electrodensas eran gránulos formados por cadmio y azufre, lo que sugirió que el metal estaba acomplexado con moléculas con grupos tiol como Cys,  $\text{S}^{2-}$  y CoM-SH, como un mecanismo para disminuir la toxicidad del metal.

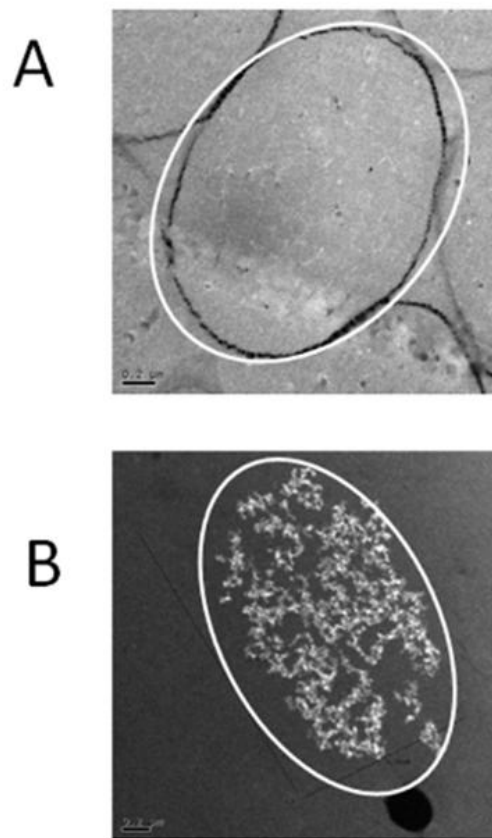


Figura 3.7 Agregados intracelulares de cadmio en *M. acetivorans*. Las imágenes mostradas fueron obtenidas mediante un análisis por HAADF-STEM de células cultivadas con metanol en ausencia (A) y en presencia de Cd<sup>2+</sup> durante 5 días (B). En la imagen B se pueden observar gránulos de cadmio y azufre dentro de la célula (zonas electrodensas).

### 3.6.2 Mecanismos de resistencia al cadmio en *Methanosarcina acetivorans*

Las células de *M. acetivorans* fueron capaces de remover hasta el 60% del metal total, el cual se encontró en gránulos intracelulares compuestos también por azufre. Estos resultados sugirieron que *M. acetivorans* tiene mecanismos de resistencia para contender contra el estrés causado por el metal.

A continuación se presenta un resumen de los datos más relevantes obtenidos en esta sección.

La exposición de *M. acetivorans* al  $\text{Cd}^{2+}$  durante 24 h (HDSC) incrementó la remoción del metal hasta un 80%, el cual fue un porcentaje mayor a lo reportado previamente (Lira-Silva *et al.*, 2012). Estos datos descartaron la presencia de una posible ATPasa de  $\text{Cd}^{2+}$ , cuya función sería expulsar al metal para disminuir su toxicidad como ha sido descrito en bacterias.

En cuanto a los mecanismos de inactivación, se determinó un incremento en el contenido de moléculas con grupos tiol (Cys,  $\text{S}^{2-}$  y CoM-SH) tanto en las células cultivadas en presencia de  $\text{Cd}^{2+}$  durante 14 días como en las HDSC. Este incremento fue mayor cuando las células se cultivaron con metanol, lo que sugirió una regulación metabólica mediada por la fuente de carbono. Estos datos indicaron que la CoM-SH, además de ser una coenzima esencial para la metanógenesis puede tener un papel importante (como el GSH) en la inactivación de metales pesados, una función que no había sido descrita en metanogénicos. Además, permitió establecer que este mecanismo de inactivación por tioles se encuentra conservado en el dominio *Archaea*. También se determinó que el contenido de malato y citrato no se modificó por la exposición al  $\text{Cd}^{2+}$ , mientras que el fosfato total (Pi + PPI + polyP) se incrementó como consecuencia de la exposición al metal en las células cultivadas con acetato.

Por otro lado, se demostró que la preadaptación al  $\text{Cd}^{2+}$  le permitió a *M. acetivorans* duplicarse en presencia de concentraciones muy altas de  $\text{Cd}^{2+}$  (0.5-2.4 mM), debido probablemente a que estas células tuvieron una elevada capacidad para sintetizar una biopelícula compuesta por DNA, carbohidratos y proteínas para resistir altas concentraciones de este metal. Además, se determinó que las moléculas con grupos tiol también se incrementaron en la biopelícula, lo que permitió la remoción de  $71 \pm 20 \mu\text{mol}$  de  $\text{Cd}^{2+}$ /60 ml de cultivo de un total de  $\text{Cd}^{2+}$  de  $85.8 \pm 6 \mu\text{mol}$  ( $85 \pm 18\%$  remoción).

Estos resultados fueron publicados en el artículo (Anexo A):

**Cd<sup>2+</sup> resistance mechanisms in *Methanosarcina acetivorans* involve the increase in the coenzyme M content and induction of biofilm synthesis**

**Lira-Silva E.**, Santiago-Martínez M.G., García-Contreras R., Zepeda-Rodríguez A., Marín-Hernández A., Moreno-Sánchez R., Jasso-Chávez R. (2013). *Environ Microbiol Rep.*, 5 (6):799-808. doi: 10.1111/1758-2229.12080. Factor de impacto al 2016: 3.5. N° de citas: 11

### **3.6.2.1 Datos del material suplementario**

#### **3.6.2.1.1 Determinación de moléculas con grupos tiol**

El método utilizado para cuantificar moléculas con grupos tiol permitió separar y cuantificar de manera confiable cada una de las moléculas de interés. Los tiempos de retención fueron: 2.29 min para Cys, 3.06 para CoM-SH y 3.8 para sulfuro (Figura 3.8), pero no fue posible cuantificar la CoB-SH, debido a su bajo contenido intracelular, ya que los cromatogramas de los extractos celulares no revelaron otros compuestos.

#### **3.6.2.1.2 Determinación de sulfuro intracelular**

La cuantificación de S<sup>2-</sup> se realizó en muestras recién cosechadas para evitar su volatilización. La relación del contenido de S<sup>2-</sup> y la absorbancia fue lineal hasta 350 nmol y el límite de detección fue de 10 nmol (Figura 3.9). La medición del azul de metileno se realizó dentro de una cámara de anaerobiosis, porque en presencia de oxígeno el color desaparece.

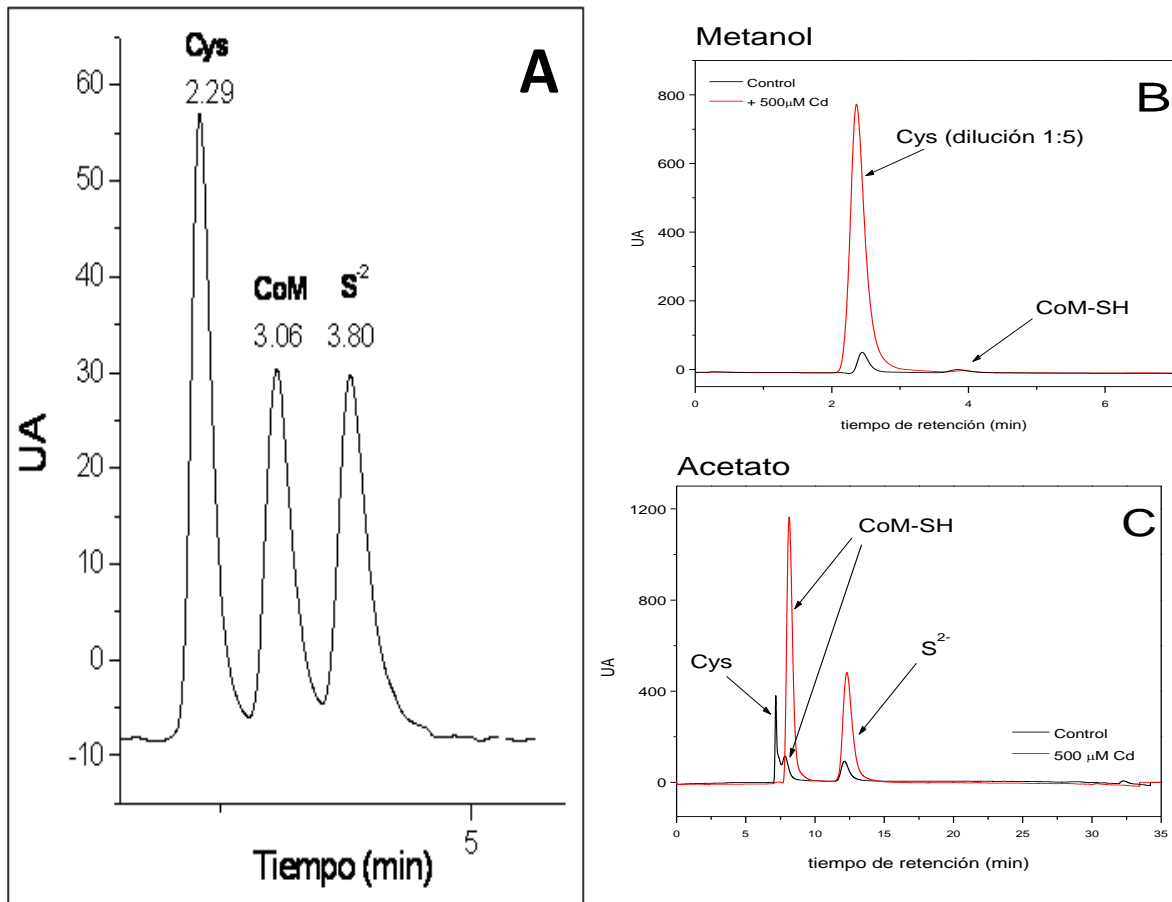


Figura 3.8 Cromatogramas representativos de moléculas con grupos tiol. Se preparó una mezcla de estándares comerciales que contenía 7.5 nmol de Cys, de CoM-SH y de S<sup>2-</sup> (A). Los números representan los tiempos de retención en minutos. En (B) y (C) se muestra un cromatograma obtenido a partir de un extracto ácido de células HDCS en metanol y acetato, respectivamente (0.5-0.75 mg proteína). Las células fueron incubadas sin (líneas negras) o con 0.5 mM Cd<sup>2+</sup> (líneas rojas). Es importante mencionar que una fracción significativa del contenido de sulfuro total se pierde debido a las condiciones ácidas del procesamiento de la muestra, por lo que el sulfuro se cuantificó mediante el método de formación de azul de metileno.

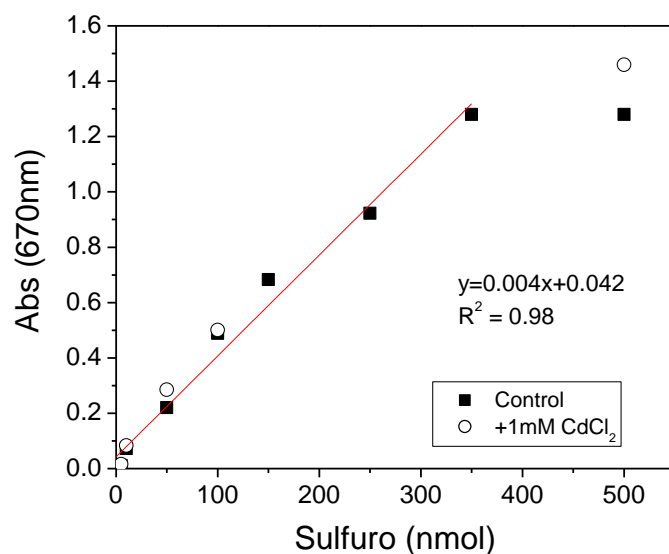


Figura 3.9 Curva de calibración para la cuantificación de sulfuro por el método de azul de metileno a 670 nm. En la gráfica se observa que el  $\text{Cd}^{2+}$  hasta 1 mM no interfiere con el método para la determinación de sulfuro.

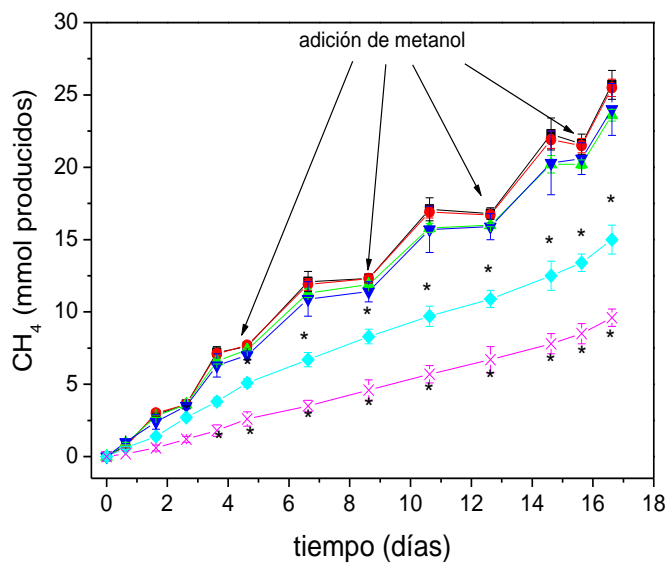


Figura 3.10 Producción de  $\text{CH}_4$  en cultivos con metanol. En la gráfica se muestran células control (cuadros) y células CdPA expuestas a 0.054 (226  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  libre, círculos), 0.63 (12.9  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  libre, triángulos hacia arriba), 1.4 (78.4  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  libre, triángulos hacia abajo), 1.94 (339  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  libre, rombos) o 2.5 mM  $\text{CdCl}_2$  (835  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  libre; cruces). Los valores mostrados son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos diferentes. Prueba de t-Student \* $P > 0.005$  vs control sin cadmio.

### 3.6.2.1.3 Formación de biopelícula

La síntesis de biopelícula se observó sólo en células CdPA que fueron expuestas a un pulso mayor de  $\text{Cd}^{2+}$  (0.6-2.4 mM  $\text{Cd}^{2+}$ ). En la Figura 3.9 se muestra la cinética de producción de  $\text{CH}_4$ , donde las células CdPA y las CdPA expuestas a 1.4 mM  $\text{Cd}^{2+}$  produjeron la misma cantidad de  $\text{CH}_4$  que un cultivo control (25.7 mmol /cultivo), mientras que las células CdPA expuestas a 1.94 y 2.5 mM  $\text{Cd}^{2+}$  disminuyeron la producción de  $\text{CH}_4$  hasta un 60% comparado con un cultivo control. Estos resultados sugirieron que la biopelícula funcionó como una barrera de protección que les permitió a las células duplicarse y seguir metabólicamente activas pese a las elevadas concentraciones de  $\text{Cd}^{2+}$  (Figura 3.11).

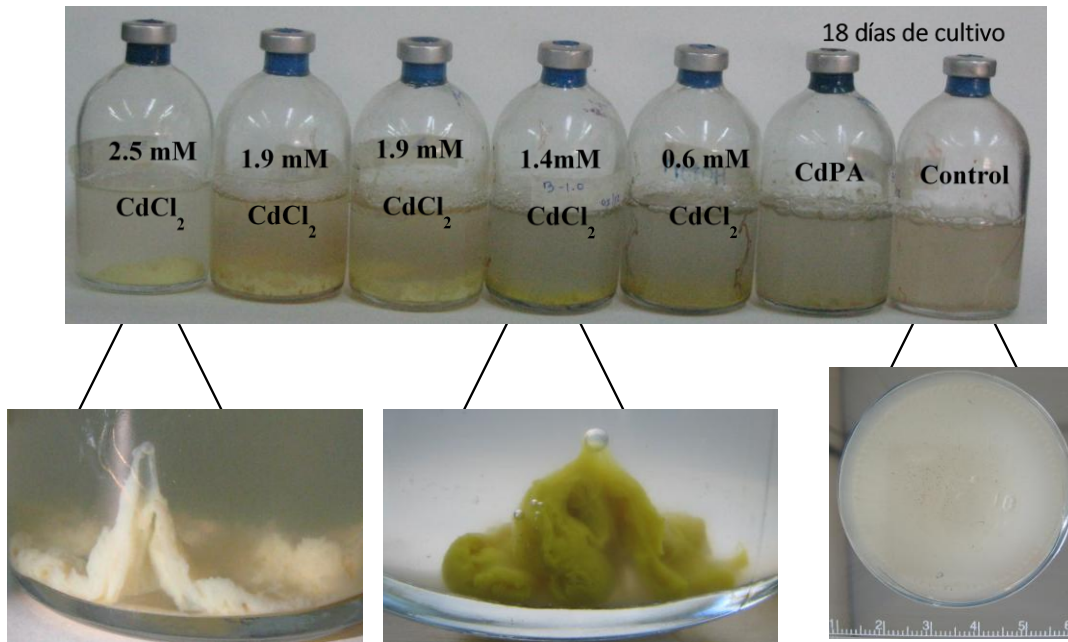


Figura 3.11 Formación de agregados celulares inducidos por el  $\text{Cd}^{2+}$  en cultivos de *M. acetivorans* con metanol. Se muestran imágenes representativas de cultivos CdPA expuestos a diferentes concentraciones del metal. Es importante notar que los cultivos sin cadmio no presentan algún agregado celular, mientras que los cultivos de células CdPA expuestas a 1.4 y 1.9 mM  $\text{Cd}^{2+}$  mostraron agregados celulares metabólicamente activos.

### 3.6.2.1.4 Caracterización de la biopelícula

Para caracterizar la biopelícula de las células CdPA expuestas a 1.4 mM Cd<sup>2+</sup> se determinó el peso seco, el contenido de proteína, los carbohidratos solubles y no solubles, el contenido de DNA y la cantidad de Cd<sup>2+</sup> removido por la biopelícula.

El peso seco de las células CdPA expuestas a 1.4 mM Cd<sup>2+</sup> fue mayor al de las células control (Tabla 3.1), sugiriendo que los esqueletos de carbono derivados del metabolismo fueron utilizados para la formación de la biopelícula (Figura 3.11), mientras que en estas condiciones el contenido de proteína no se modificó.

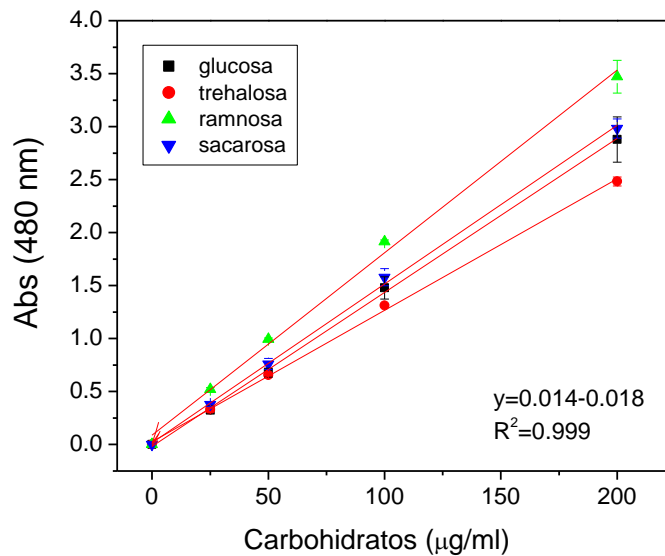


Figura 3.12 Curva de calibración para la cuantificación de carbohidratos mediante el método fenol-sulfúrico a 480 nm. Los valores mostrados son la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. Se muestran los valores de la regresión lineal para la curva de glucosa, la cual fue utilizada para cuantificar el contenido de carbohidratos no solubles.

Los carbohidratos no solubles se incrementaron 8 veces en las células CdPA + 1.4 mM Cd<sup>2+</sup> que sintetizaron la biopelícula con respecto a los cultivos control ( $1.44 \pm 0.57$  vs  $0.18 \pm 0.15$  mg/cultivo, respectivamente;  $n=7$ ;  $P < 0.001$ ), mientras que el contenido de los carbohidratos solubles no se modificó. Para la cuantificación, se realizaron curvas estándar a partir de 25 hasta 200 µg/mL de diferentes tipos de carbohidratos (glucosa, trehalosa, sacarosa y ramnosa) debido a



que se desconocía la naturaleza de los carbohidratos presentes en la biopelícula. Las curvas obtenidas fueron similares entre ellas, sin embargo, los valores de carbohidratos totales se calcularon a partir de la curva de glucosa (Figura 3.12).

Se determinó que el DNA es un componente importante de la biopelícula, el cual proporciona estabilidad a la matriz como se había descrito previamente en bacterias (Flemming & Wingender, 2010). Para determinar la presencia de DNA se añadió DNAsa I a una celda de cuarzo que contenía una fracción de la biopelícula homogenizada por sonicación y se determinó el decremento en la absorbancia a 540 nm debido a la ruptura del DNA por la incubación con DNAsa I (Figura 3.13).

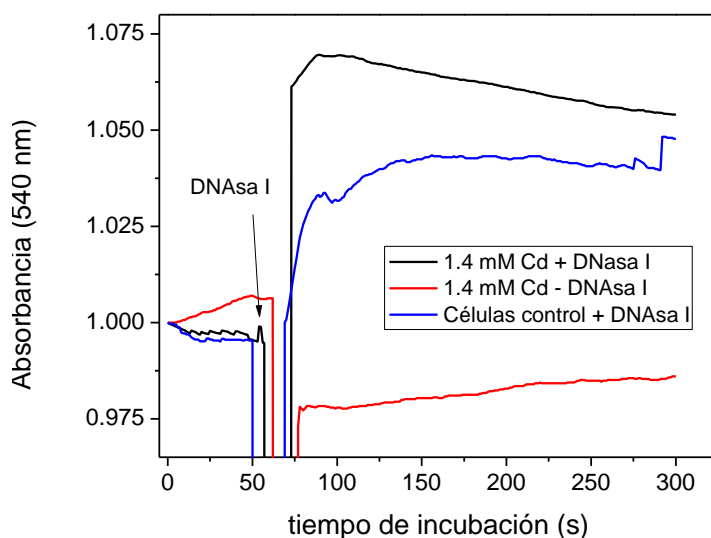


Figura 3.13 Efecto de la DNAsa I sobre la biopelícula. Se muestra que la adición de DNAsa I sobre la turbidez de células control (línea azul) no tiene efecto y la turbidez se mantiene constante, mientras que la DNAsa I facilita la disgregación de la biopelícula formada en presencia de 1.4 mM  $\text{Cd}^{2+}$  (línea negra), lo que se observa como una disminución en la absorbancia a 540 nm. También se muestra que la absorbancia de la biopelícula homogeneizada sin la adición de DNAsa I (línea roja) es menor al resto de las muestras y se mantiene constante. Se utilizó 1mg de proteína en cada caso.

Por otro lado, los cultivos CdPA + 1.4 mM  $\text{Cd}^{2+}$  que formaron la biopelícula removieron hasta un  $85 \pm 18$  % del  $\text{Cd}^{2+}$  presente en el medio de cultivo ( $71 \pm 20$   $\mu\text{mol}$  de  $\text{Cd}^{2+}$ /60 ml de

cultivo, de un total de 84  $\mu\text{mol}$ ), lo que equivale al 8% del Cd en peso seco (94 mg Cd/g peso seco) por lo que *M. acetivorans* podría considerarse como un microorganismo hiperremovedor de  $\text{Cd}^{2+}$  (Tabla 4.1). Esta particularidad de este metanogénico marino podría ser útil en la recuperación de  $\text{Cd}^{2+}$  en biodigestores durante el tratamiento de aguas residuales, considerando que para plantas el valor de referencia estándar es de 0.1 mg de Cd/g peso seco (Ali *et al.*, 2013). Los valores de hiper remoción de  $\text{Cd}^{2+}$  en *M. acetivorans* exceden por mucho lo reportado para otros organismos como *Euglena gracilis* (1.1- 4.4 mg/g peso seco (Moreno-Sánchez *et al.*, 2017).

### 3.6.2.1.5 Análisis de muestras por STEM

Para determinar la localización del  $\text{Cd}^{2+}$  y azufre intracelular las células fueron fijadas con glutaraldehído y tetróxido de osmio durante 2 h para llevar a cabo su análisis elemental por rayos X mediante HAADF-STEM (Figura 3.14). En las células CdPA expuestas a 1.4 mM  $\text{Cd}^{2+}$  se observó un incremento en zonas electrodensas intracelulares que podrían ser acidocalcisomas (Figura 3.15).

Tabla 3.1 Peso seco y  $\text{Cd}^{2+}$  removido por *M. acetivorans* embebida en la biopelícula

| [CdCl <sub>2</sub> ] mM | Peso seco/cultivo (mg) | % Cd en peso seco |
|-------------------------|------------------------|-------------------|
| <b>0</b>                | 68 ± 3                 | ---               |
| <b>0.1</b>              | 75 ± 12                | 1                 |
| <b>0.63</b>             | 79 ± 14                | 5.7               |
| <b>1.4</b>              | 84 ± 7 *               | 8.4               |
| <b>1.94</b>             | 96 ± 11 *              | 10.2              |

Los valores son la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes. Prueba t-Student \* P < 0.05 vs células control sin cadmio.

En la tabla 3.2 se muestra que no hubo cambio en los contenidos de malato y citrato en presencia de  $\text{Cd}^{2+}$  durante el protocolo de exposición crónica y aguda. En cambio, el fosfato total se incrementó en cultivos con acetato como respuesta a la exposición al  $\text{Cd}^{2+}$ .

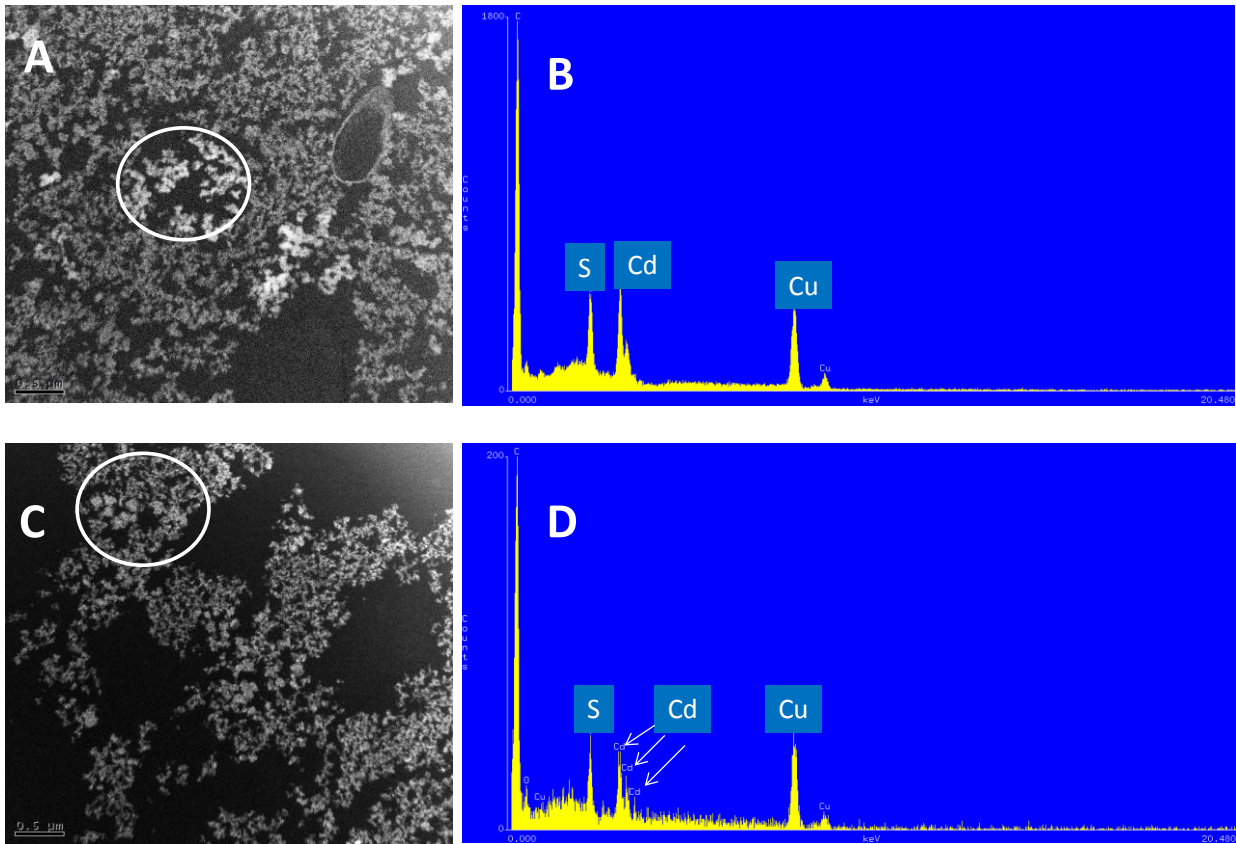


Figura 3.14 Agregados de cadmio intracelulares y extracelulares en cultivos de *M. acetivorans*. Imágenes obtenidas mediante HAADF-STEM de células CdPA cultivadas en presencia de 1.4 mM  $\text{Cd}^{2+}$  durante 18 días muestran zonas electrodensas dentro de la célula (A) y a lo largo de la biopelícula (C). Se analizaron las regiones marcadas con un círculo blanco y se detectó la presencia de cadmio y azufre en esas zonas (B y D). Las unidades del “eje y” corresponden al # de cuentas que van desde 0 hasta 1800 y las del “eje x” son keV que van desde 0 hasta 20.48. El cobre detectado proviene de la rejilla en la que fueron fijadas las muestras.

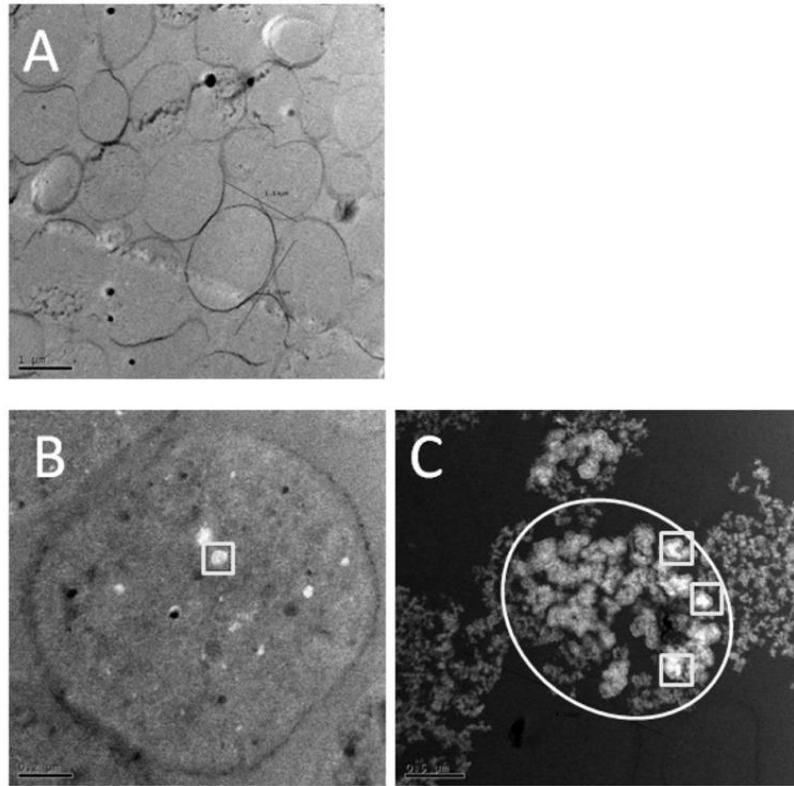


Figura 3.15 Imágenes de *M. acetivorans* en ausencia y presencia de  $\text{Cd}^{2+}$  obtenidas mediante HAADF-STEM. Las células cultivadas en ausencia de  $\text{Cd}^{2+}$  durante 18 días no mostraron zonas electrodensas de cadmio y azufre (A). Las células cultivadas con  $100 \mu\text{M Cd}^{2+}$  mostraron zonas electrodensas que podrían ser acidocalcisomas (las regiones blancas enmarcadas en el cuadro blanco) (B) y en células CdPA expuestas a  $1.4 \text{ mM Cd}^{2+}$  los acidocalcisomas fueron de mayor tamaño (C).

Tabla 3.2 Contenido de malato, citrato y Pi total en *M. acetivorans* cultivada en ausencia o presencia de Cd<sup>2+</sup>

| [CdCl <sub>2</sub> ]<br>μM | acetato          |           |                   |                      |                      | metanol        |           |                    |                      |                   |
|----------------------------|------------------|-----------|-------------------|----------------------|----------------------|----------------|-----------|--------------------|----------------------|-------------------|
|                            | HDCS             |           |                   | Curva de crecimiento |                      | HDCS           |           |                    | Curva de crecimiento |                   |
|                            | Mal              | Cit       | Fosfato<br>Total  | Mal                  | Fosfato<br>Total     | Mal            | Cit       | Fosfato<br>Total   | Mal                  | Fosfato<br>Total  |
| <b>0</b>                   | 45 ± 12<br>(3)   | 37<br>(1) | 2900±1500<br>(3)  | 23 ± 4<br>(3)        | 1100 ± 190<br>(4)    | 40 ± 15<br>(4) | 47<br>(1) | 3220 ± 1110<br>(3) | 33 ± 15<br>(3)       | 1320 ± 137<br>(4) |
| <b>100</b>                 | ND               | ND        | ND                | 46 ± 18<br>(3)       | 2625 ± 796<br>(4) ** | ND             | ND        | ND                 | 17 ± 3<br>(3)        | 1430 ± 230<br>(4) |
| <b>250</b>                 | 38 ± 25<br>(3)   | 41<br>(1) | 1750± 1000<br>(3) | ND                   | ND                   | 50 ± 3<br>(4)  | 55<br>(2) | 3945 ± 1510<br>(3) | ND                   | ND                |
| <b>500</b>                 | 73 ± 13*<br>(3)* | 43<br>(2) | 3723± 520<br>(3)  | ND                   | ND                   | 24 ± 6<br>(4)  | 55<br>(1) | 3430 ± 330<br>(3)  | ND                   | ND                |

Las unidades son nmol/cultivo y representan la media ± desviación estándar. Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de experimentos independientes realizados \* P<0.05; \*\* P<0.01 vs control sin cadmio. Mal, malato; Cit, citrato; ND, no determinado.

### 3.7 Discusión de resultados

El cultivo de *M. acetivorans* en presencia de  $\text{Cd}^{2+}$  no causó un efecto inhibitor en la producción de  $\text{CH}_4$  en las células con metanol, incluso la velocidad de síntesis de  $\text{CH}_4$  aumentó ligeramente cuando las células fueron cultivadas en acetato. Este es el primer reporte en donde se demuestra que el  $\text{Cd}^{2+}$  a  $100\ \mu\text{M}$  ( $226\ \text{pM}$  libre) no es tóxico para el crecimiento de un microorganismo. El contenido de proteína tampoco se modificó en los cultivos expuestos al metal respecto a cultivos sin  $\text{Cd}^{2+}$  y además, la presencia del metal activó la vía metanogénica durante tiempos cortos. Para determinar la viabilidad celular, se inocularon medios frescos con células provenientes de los cultivos sin  $\text{Cd}^{2+}$  y de aquellos expuestos a  $100\ \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ , debido a que tanto el contenido de proteína como la producción de  $\text{CH}_4$  son parámetros indirectos, sobre todo considerando que la activación de la metanogénesis por el metal podría sobreestimar la viabilidad celular. De esta forma fue posible determinar que la velocidad de producción de  $\text{CH}_4$  en los cultivos expuestos al  $\text{Cd}^{2+}$  no cambió con respecto a los cultivos sin  $\text{Cd}^{2+}$ , sugiriendo que ambos cultivos estaban activos metabólicamente y la viabilidad era similar (datos no mostrados). Por otro lado, la exposición a concentraciones mayores a  $500\ \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  sí inhibió el crecimiento y la metanogénesis.

La baja toxicidad del  $\text{Cd}^{2+}$  se debió parcialmente a que la concentración del metal libre en el medio de cultivo fue muy baja (intervalo nM) debido a que el  $\text{S}^{2-}$  y la Cys añadidos al medio para crear un ambiente anaerobio y reductor, tienen una alta afinidad por el metal. Este efecto se determinó previamente en *Methanobacterium thermoautotrophicum* KHT-2, un metanogénico sensible al  $\text{Cd}^{2+}$  y al  $\text{Cu}^{2+}$ , el cual pudo resistir altas concentraciones de estos metales cuando se realizó un co-cultivo de éste metanogénico con *Desulfotomaculum* sp. RHT-3, una bacteria reductora de sulfato que produce  $\text{H}_2\text{S}$  disminuyendo así la solubilidad de ambos metales (Mori *et al.*, 2000).

La activación de la metanogénesis por el  $\text{Cd}^{2+}$  se observó desde tiempos muy cortos ( $< 2$  min), lo que sugirió que este metal tuvo un efecto directo sobre alguna de las enzimas de la vía metanogénica. Es importante mencionar que este efecto estimulante también se observó en presencia de  $\text{Co}^{2+}$  y de  $\text{Zn}^{2+}$ , mientras que otros metales esenciales no tuvieron efecto ( $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$ ). La actividad de la Ack, la Pta y la CA determinada en células control fue menor comparada con las reportadas para *M. thermophila* (Macauley *et al.*, 2009; Singh-Wissmann &

Ferry, 1995), mientras que la actividad de CODH/AcS fue mayor. También se ha descrito que el contenido de estas proteínas es mayor cuando las células se cultivan en acetato comparado con metanol (Ingram-Smith *et al.*, 2005; Lundie & Ferry, 1989).

En *M. thermophila* se ha descrito que la CA puede tener en su centro activo diferentes metales como zinc, cobalto o hierro (Zimmerman *et al.*, 2010), mientras que algunos reportes indican la presencia de cadmio en el sitio activo de la CA de diferentes especies de diatomeas, debido a la baja disponibilidad de zinc en el ambiente marino (Park *et al.*, 2007). En este trabajo se determinó que en presencia de  $\text{Cd}^{2+}$ , la Ack y la CA incrementaron su actividad. Sin embargo, la activación de la Ack por  $\text{Cd}^{2+}$  es más difícil de explicar porque no hay evidencia de que esta enzima posea centros metálicos. Aunque también se ha descrito que la adición de  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  incrementan un 30 % la actividad de la enzima purificada de *M. thermophila* (Aceti & Ferry, 1988).

La activación de estas dos enzimas podría explicar parcialmente el incremento en la velocidad de síntesis de metano en las células cultivadas con acetato, porque ambas son enzimas rápidas y eficientes y ninguna controla el flujo de la vía (Saavedra *et al.*, 2011). Otra explicación sería que el  $\text{Cd}^{2+}$  desacopló la metanogénesis afectando la síntesis de ATP, pero ésta resulta poco probable debido a que el contenido de proteína total en los cultivos con  $\text{Cd}^{2+}$  no se modificó respecto a cultivos sin  $\text{Cd}^{2+}$ .

Por otra parte, se determinó que la acumulación fue de  $2.05 \pm 0.93 \mu\text{mol Cd/cultivo}$  (10 mg prot/cultivo) cuando *M. acetivorans* se cultiva con  $100 \mu\text{M Cd}^{2+}$  en metanol, mientras que con acetato acumuló  $3.45 \pm 1.34 \mu\text{mol Cd/cultivo}$  (5 mg prot/cultivo) (Lira-Silva *et al.*, 2012). La elevada acumulación de  $\text{Cd}^{2+}$  en *M. acetivorans* sugirió que la célula posee transportadores de alta afinidad por  $\text{Cd}^{2+}$  o que el metal se internalizó acompañado con el  $\text{S}^{2-}$  y la Cys externos. Además, en estas condiciones se encontraron gránulos intracelulares formados por cadmio y azufre, lo que indicó que el metal estaba unido a moléculas con grupos tiol.

El contenido de tioles totales (Cys,  $\text{S}^{2-}$  y CoM-SH) aumentó en los cultivos con  $\text{Cd}^{2+}$  respecto a células control. El  $\text{S}^{2-}$  y la Cys fueron las principales moléculas para inactivar al metal en células cultivadas con metanol, mientras que con acetato se incrementó la CoM-SH principalmente. El contenido de tioles totales en células cultivadas con metanol indicó que estas

moléculas podrían ser suficientes para inactivar al metal, considerando que se necesitan dos tioles para quelar a un  $\text{Cd}^{2+}$  ( $\text{tiol}/\text{Cd} \geq 2$ ) (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005), mientras que en acetato la relación fue muy baja ( $\text{tiol}/\text{Cd}^{2+} = 0.4$ ). Sin embargo, en los cultivos con acetato no sé modificó la viabilidad celular.

En las células HDCS, la remoción de  $\text{Cd}^{2+}$  fue 3 veces mayor en los cultivos con metanol ( $18.5 \pm 1.3 \mu\text{mol}$  de  $\text{Cd}^{2+}$ ) comparada con los de acetato ( $6.6 \pm 1.2 \mu\text{mol}$  de  $\text{Cd}^{2+}$ ). En estas condiciones también se incrementaron los tioles totales por la exposición al  $\text{Cd}^{2+}$ . La Cys aumentó preferencialmente en metanol, mientras que en acetato fue la CoM-SH y el  $\text{S}^{2-}$  en ambas fuentes de carbono. A pesar del incremento significativo en el contenido de estas moléculas, la relación  $\text{tiol}/\text{Cd}$  fue  $< 2$  en las células HDCS metanol a concentraciones  $> 100 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ . En acetato, los tioles fueron suficientes para inactivar al metal. En estas condiciones también se activó de 2-4 veces la metanogénesis, como se reportó anteriormente (Lira-Silva *et al.*, 2012) y sólo se inhibió hasta concentraciones  $> 250 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ , lo que indicó que posiblemente la célula contaba con otros mecanismos de protección. También se determinó que los ácidos orgánicos no son un mecanismo importante en *M. acetivorans* frente a un estrés por  $\text{Cd}^{2+}$ , debido a que el 90% de la fuente de carbono se utiliza en la metanogénesis para la síntesis de ATP, lo que sugiere un gran gasto de esqueletos de C necesarios para la metanogénesis. Sin embargo, el alto contenido intracelular de fosfato total ( $\text{Pi} + \text{PPi} + \text{polyP}$ ) sugirió que estas moléculas podrían participar en la inactivación del metal, a pesar de que sus constantes de afinidad por  $\text{Cd}^{2+}$  son menores a la del complejo sulfuro- $\text{Cd}^{2+}$  ( $\log K_d = 6.1$ ) a pH 7 (Sillén *et al.*, 1971).

DiMarco *et al.* (1990) describieron que la CoM-SH es esencial para la vía metanogénica, en tanto que los resultados del presente trabajo de tesis sugirieron que la CoM-SH podría participar también en la inactivación del metal. Cabe resaltar que los niveles de CoM-SH también aumentaron en presencia de  $500 \mu\text{M}$   $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ . Estos datos constituyeron el primer reporte donde se propone que la CoM-SH puede tener un papel en los mecanismos de inactivación del  $\text{Cd}^{2+}$  y de otros metales pesados. El mecanismo de inactivación de metales pesados por tioles se ha estudiado profusamente en diferentes organismos pertenecientes al dominio Bacteria y Eukarya (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005; Pal y Rai 2010; Sochor *et al.*, 2011);



sin embargo, es la primera vez que este mecanismo se describe para un metanogénico (dominio *Archaea*).

Las células CdPA con metanol fueron capaces de resistir concentraciones elevadas de  $\text{Cd}^{2+}$  (> 0.6 mM) debido a que sintetizaron una biopelícula para protegerse de la toxicidad del metal. En la actualidad se buscan microorganismos con gran capacidad para remover y resistir altas concentraciones de metales pesados, por lo que estos resultados sugieren que las células CdPA de *M. acetivorans* pueden ser utilizadas con fines biotecnológicos.

### 3.8 Conclusión

En este trabajo se demostró por primera vez (i) la activación de la metanogénesis por metales pesados como el  $\text{Cd}^{2+}$ , el  $\text{Co}^{2+}$  y el  $\text{Zn}^{2+}$  así como (ii) la acumulación masiva de  $\text{Cd}^{2+}$  en *M. acetivorans*. Los resultados demostraron que tanto la activación de la metanogénesis como la acumulación del metal son dependientes de la fuente de carbono y del tiempo de exposición, lo que sugirió que la célula puede modular la expresión de genes de respuesta a estrés (Li *et al.*, 2007). Los datos también demostraron que los metales pesados pueden ser utilizados para modificar la actividad de las enzimas de la vía metanogénica con la finalidad de incrementar la velocidad de síntesis de  $\text{CH}_4$  en los biodigestores y con ello mejorar la producción de biogás.

Asimismo, se describió que la CoM-SH, una coenzima esencial para la vía metanogénica, puede tener un papel accesorio importante en la resistencia a metales pesados. Del mismo modo, el polyP, determinado en este punto como un aumento en el contenido de fosfato total y en las zonas intracelulares electrodensas, además de participar en la inactivación del  $\text{Cd}^{2+}$  internalizado podría tener un papel importante en la síntesis de la biopelícula (Chen *et al.*, 2002; Grillo-Puertas *et al.*, 2012). El estudio y la caracterización tanto de la vía de síntesis de CoM-SH como del metabolismo del polyP podrían ofrecer una alternativa para modificar este metabolismo con la finalidad de crear una cepa que resista elevadas concentraciones de  $\text{Cd}^{2+}$  u otros metales pesados sin que se inhiba la velocidad de síntesis de  $\text{CH}_4$ .

## Capítulo 4. Caracterización de las células preadaptadas al Cd<sup>2+</sup>

Esta sección de la tesis no ha sido publicada debido a que aún falta redondear algunos experimentos. Los resultados aquí presentados forman parte de un artículo en preparación que será enviado en el transcurso de los próximos meses a una revista con un factor de impacto mayor a 3.

### 4.1 Antecedentes

En el capítulo 3, se describió que las células control expuestas de manera constante a 54  $\mu\text{M}$  Cd<sup>2+</sup> durante más de 2 años (CdPA, cultivadas con metanol) resistieron concentraciones mayores de 0.63 y hasta 2.5 mM Cd<sup>2+</sup>, debido a la formación de una biopelícula (Lira-Silva *et al.*, 2013). Estos datos sugirieron que la preadaptación al Cd<sup>2+</sup> le permitió a *M. acetivorans* desarrollar mecanismos de resistencia alternos para producir CH<sub>4</sub> en presencia de altas concentraciones de Cd<sup>2+</sup>, como se ha descrito para otros microorganismos expuestos a bajas concentraciones de un metal tóxico (Devars *et al.*, 1998). También se descubrió que dichos mecanismos se regulaban por la fuente de carbono. En los cultivos con metanol, los tioles se incrementaron más que el Pi total, mientras que en acetato, el Pi total se incrementó significativamente (hasta 700 nmol Pi/mg proteína, Lira-Silva *et al.*, 2013). Este incremento tanto en el contenido de Pi total como en el número de acidocalcisomas, sugirió que la fracción perteneciente al polyP sería la predominante en los cultivos con acetato, lo cual le podría dar ventajas a la célula para enlazar al Cd<sup>2+</sup> y resistir la exposición a una mayor concentración del metal.

### 4.2 Hipótesis

Las células CdPA cultivadas con acetato modulan principalmente los contenidos de polyP para enlazar e inactivar al Cd<sup>2+</sup> internalizado.

### 4.3 Objetivo general

Caracterizar microbiológica y bioquímicamente la síntesis/degradación del polyP de las células CdPA cultivadas con acetato.

#### 4.3.1 Objetivos particulares

- Determinar los cambios en la producción de CH<sub>4</sub>, el contenido de polyP y de proteína a través de la curva de crecimiento.
- Determinar el contenido de tioles, de polyP y la remoción del Cd<sup>2+</sup> durante la fase estacionaria de la curva de crecimiento.
- Determinar el contenido de transcritos polifosfato cinasa (*ppk*) y exopolifosfatasa (*ppx*) así como las actividades enzimáticas en extractos celulares (PPX y PPK).
- Caracterización cinética de la PPX y la PPK recombinante de *M. acetivorans*.
- Evaluar la formación de la biopelícula.
- Evaluar la capacidad de las células CdPA para contender contra otros metales (Cu<sup>2+</sup> o Zn<sup>2+</sup>) en niveles tóxicos.

### 4.4 Estrategia experimental

Se realizó la caracterización de las células CdPA con la finalidad de determinar los cambios metabólicos que la preadaptación causó en estas células. Para tener un parámetro de comparación y poder evaluar si éstas características se presentaron desde la primera exposición al Cd<sup>2+</sup>, los experimentos se diseñaron en cultivos sin Cd<sup>2+</sup> (Cnt), en cultivos control con una primera exposición al Cd<sup>2+</sup> (Cnt + 1<sup>er</sup> P Cd<sup>2+</sup>) y en los CdPA. Así mismo, para determinar si los cambios en las células CdPA eran reversibles, a estos cultivos se les dejó de suministrar el Cd<sup>2+</sup> por primera vez desde su adaptación (CdPA-Cd<sup>2+</sup> 1<sup>er</sup> P). En estos cultivos se cuantificó el contenido de compuestos quelantes (las moléculas con grupos tiol, los ácidos orgánicos y el polyP), el metal internalizado y la formación de la biopelícula. También se determinó el nivel del RNA mensajero de la PPK y la PPX, las enzimas involucradas en la síntesis y degradación del polyP. Finalmente, se efectuó la clonación, sobreexpresión, purificación y caracterización de la PPK y la PPX.

## 4.5 Métodos

Se hicieron cultivos con 100 mM de acetato durante 14 días. El crecimiento celular fue determinado mediante: (i) la producción de metano y (ii) el contenido de proteína en cultivos de 60 mL. Las células fueron cosechadas por centrifugación al día 14 como se describió previamente (Lira-Silva *et al.*, 2012, 2013)

Los métodos utilizados para determinar la producción de CH<sub>4</sub>, el contenido de proteína y de metabolitos, así como la remoción del cadmio y la cuantificación de la biopelícula, se describieron en el capítulo 3.

### 4.5.1 Determinación del Pi extracelular y de la síntesis de polyP

La desaparición de fosfato del medio de cultivo se determinó durante la curva de crecimiento, para ello se tomó 1 ml del medio y se sometió a centrifugación a 16 000 x g durante 3 min para eliminar las células presentes. La cuantificación del polyP se realizó en una fracción de células que fue precipitada con 3% de ácido perclórico y calentada a 90° C durante 2 h para hidrolizar las cadenas de polyP. Se tomaron 100 µL del hidrolizado (0.5 mg proteína) para cuantificar el Pi total mediante el método del azul de molibdeno (Lira-Silva *et al.*, 2013). En otra fracción de esa misma muestra (células sin digerir) se determinó el Pi libre y este valor se restó del Pi total para conocer el contenido del polyP.

### 4.5.2 Determinación del nivel de mRNA

El mRNA fue aislado mediante un kit comercial Quick RNA Miniprep (Zymo Research, Irvine, CA, USA), a partir de las células cosechadas en la fase estacionaria. La integridad del RNA aislado se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v). Una muestra del RNA obtenido (5 µg) se utilizó para realizar la síntesis del cDNA, mediante una reacción de retro-transcriptasa reversa con el kit comercial RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). El cDNA obtenido se cuantificó por

espectrofotometría a 260 nm y se utilizó para determinar el nivel de transcritos mediante RT-PCR.

Para el RT-PCR se diseñaron los oligonucleótidos para cada uno de los genes de interés (*ppx*, *ppk*, *pstA*) y para un gen cuya expresión se mantuviera constante en las diferentes condiciones experimentales (*gapdh*), ver Tabla 4.1.

#### **4.5.3 Determinación de la actividad de PPX**

La actividad de la PPX se determinó en fracciones citosólicas enriquecidas obtenidas a partir de las células en la fase estacionaria. Estos cultivos fueron cosechados por centrifugación a 5 000  $\times$  g durante 10 min a 4°C. Las células se lavaron también por centrifugación utilizando un buffer TME pH 7.2 (Lira-Silva *et al.*, 2012). Las células se resuspendieron en 1 ml de buffer que contenía 50 mM Hepes Na, 100 mM KCl y 1 mM EDTA (buffer HKE a pH 7). Las células se rompieron por sonicación y posteriormente el homogenizado fue centrifugado a 14 000  $\times$  g durante 5 min a 4°C. El sobrenadante fue utilizado para determinar la actividad (fracción citosólica enriquecida).

La actividad de PPX se determinó en un buffer que contenía 50 mM Hepes y 10 mM MgCl<sub>2</sub> a pH 7.2, incubando 0.5 mg de proteína en agitación durante 30 min y utilizando trimetilsililpolyP como sustrato (Figura 1.6). La actividad se midió como la aparición del Pi liberado mediante el método de azul de molibdeno descrito previamente (Lira-Silva *et al.*, 2012).

#### **4.5.1 Clonación y sobreexpresión heteróloga de las enzimas recombinantes**

Los oligonucleótidos específicos para amplificar cada uno de los genes se diseñaron considerando los primeros y los últimos 18 nucleótidos del gen de interés, a los cuales se añadieron sitios de restricción presentes en el vector de sobreexpresión pET28a (Novagen, Darmstadt, Alemania), ver Tabla 4.2.

La amplificación de cada uno de los genes se realizó mediante PCR utilizando la DNA polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Las

condiciones del PCR fueron: un ciclo de desnaturalización inicial por 120 s a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento durante 30 s a 60°C para ambos genes, 90 s de extensión a 72°C y finalmente un ciclo de extensión a 72°C durante 10 min. Los productos de PCR obtenidos se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) y se purificaron para realizar la clonación. La purificación de cada uno de los genes se realizó cortando la banda del producto de PCR del gel de agarosa y utilizando un kit comercial Wizard SV gel and PCR Clean-Up System (Promega, Wisconsin, USA).

Se realizó la clonación del gen de interés en un vector de sobreexpresión pJET (Fermentas Waltham, Massachusetts, USA). El producto de ligación (pJET + gene) se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* TOP 10. La selección de colonias se realizó utilizando ampicilina (50 µg/ml). Se verificó que las colonias resistentes tuvieran el gene de interés digiriendo el plásmido con ambas enzimas de restricción (Tabla 4.2). Finalmente, el producto obtenido se ligó al vector de sobreexpresión pET28a (Novagen). Este vector tiene un gene de resistencia a kanamicina, por lo que para la selección de colonias que contenían el plásmido se utilizó 50 µg/ml de este antibiótico. Nuevamente se verificó que las clonas tuvieran el gene de interés mediante la digestión con enzimas de restricción (Tabla 4.2). Una muestra del vector pET28a que contenía el gene de interés fue utilizado para realizar la secuenciación (IFC, UNAM) y verificar que no hubiera cambios en la secuencia de cada uno de los genes y otra fracción se utilizó para transformar células de *E. coli* BL21. La sobreexpresión de estas enzimas se realizó utilizando IPTG como inductor a 16°C durante toda la noche. Finalmente se purificaron las enzimas utilizando una resina de afinidad por cobalto (TALON Clontech, Mountain View, CA, USA) ya que este vector presenta residuos de histidinas que facilitan la interacción de la proteína con la resina para mejorar su purificación.

Tabla 4.1 Secuencias de oligonucleótidos utilizados para medir el nivel de transcritos.

| gene          | Gene ID (NCBI) | Enzima | Secuencia  | Longitud producto de PCR (pb) |
|---------------|----------------|--------|--|-------------------------------|
| <b>MA0081</b> | 1471973        | PPK    | 5' -AATGCCCTCACAGGCTATTC-3'<br>5' -AAGATCAGGTGTCCGTTTCC-3' | 140                           |
| <b>MA0083</b> | 1471975        | PPX    | 5' -CCAGAGATAACGGTCAGCAA-3'<br>5' -GAGCTGCATGATACTGCGTT-3' | 123                           |
| <b>MA0889</b> | 1472781        | pstaA  | 5' -ATATGCAGGAGAAACACGCA-3'<br>5' -GTGAGGGAAGCCGACAGTAT-3' | 150                           |
| <b>MA1018</b> | 1472908        | GAPDH  | 5' -GCTATCCACCAGGAGTCCAAT-3'<br>5' -GCCCAATAGCCTTGTTTGT-3' | 115                           |

99

Tabla 4.2 Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la clonación heteróloga.

| gene          | Gen ID (NCBI) | Enzima | Secuencia                               | Enzimas de restricción utilizadas |
|---------------|---------------|--------|---|-----------------------------------|
| <b>MA0081</b> | 1471973       | PPK    | Fw 5'GCGCTAGCAATGGAGCGGAACTTC 3'        | NheI (GCTAGC)                     |
|               |               |        | Rw 5'GCCGAATTCATCAGCTCTTTTCCGTTTAAAG 3' | EcoRI (GAATTC)                    |
| <b>MA0083</b> | 1471975       | PPX    | Fw 5'CCGCATATGAGATGGAACCCGAGAAAATTT 3'  | NdeI (CATATG)                     |
|               |               |        | Rw 5'CAGGATCCGTCATTCCCGAGGGACTTT 3'     | BamHI (GGATCC)                    |

## 4.6 Resultados

Los resultados de las curvas de crecimiento mostraron que el contenido de proteína fue mayor en los cultivos que contenían el  $\text{Cd}^{2+}$  (las células CdPA y las Cnt + 1<sup>er</sup> P  $\text{Cd}^{2+}$ ); la velocidad de producción de  $\text{CH}_4$  también fue mayor en las células CdPA (Figura 4.1).

Por otro lado, las células CdPA mostraron una capacidad incrementada para llevar a cabo la acumulación del  $\text{Cd}^{2+}$ . Una fracción del  $\text{Cd}^{2+}$  acumulado se originó del  $\text{Cd}^{2+}$  intracelular presente en las células utilizadas como inóculo para mantener los cultivos CdPA; esta fracción se puede apreciar claramente en los cultivos CdPA -  $\text{Cd}^{2+}$  1<sup>er</sup> P (Tabla 4.3).

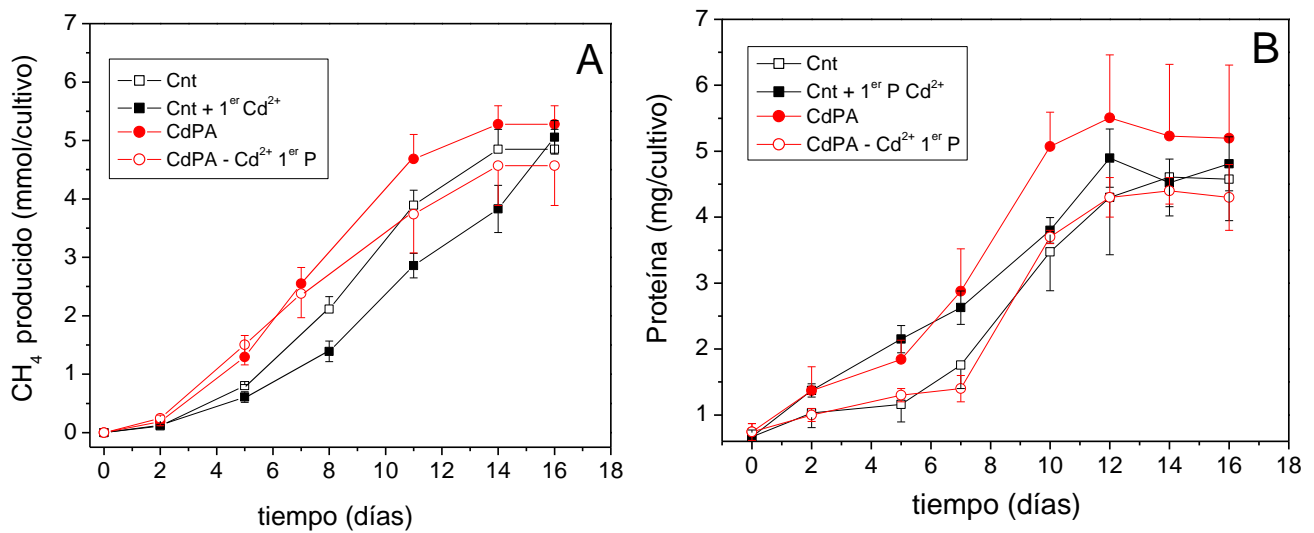


Figura 4.1 Crecimiento de *M. acetivorans*. Se determinó la producción de  $\text{CH}_4$  (A) y de proteína (B) a lo largo de la curva de crecimiento en las células Cnt ( $\square$ ), las Cnt+1<sup>er</sup>P  $\text{Cd}^{2+}$  ( $\blacksquare$ ), las CdPA ( $\bullet$ ) y las CdPA- $\text{Cd}^{2+}$  1<sup>er</sup> P ( $\circ$ ) cultivadas con acetato. Los cultivos se realizaron en frascos con 50 mL de medio HS. Los valores mostrados son la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes.

De acuerdo con el volumen intracelular de las células de *M. acetivorans* que varía entre 0.7- 1  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}/\text{mg}$  proteína y con el  $\text{Cd}^{2+}$  acumulado intracelularmente (Tabla 4.3), los niveles de éste metal podrían alcanzar concentraciones muy tóxicas de hasta 2.5 mM  $\text{Cd}^{2+}$ . Esto sugiere que el metal internalizado debe estar enlazado y neutralizado por moléculas que le permitan a las células continuar viables y metabólicamente activas. De esta forma, se procedió a medir el



contenido de Cys, S<sup>2-</sup> y CoM-SH (tioles), ácidos orgánicos (malato y citrato), así como el contenido de polyP.

El contenido de citrato y malato en las células CdPA fue muy bajo ( $8.8 \pm 5.4$  y  $27 \pm 9$  nmol/cultivo, respectivamente) comparado con el contenido de S<sup>2-</sup> que se incrementó 56 veces respecto a los cultivos Cnt; sin embargo, a pesar de este incremento significativo en el contenido de tioles totales (Tabla 4.4), estas moléculas no fueron suficientes para inactivar al Cd<sup>2+</sup> (ácido orgánico + tiol/Cd < 2). El contenido de moléculas con grupos tiol también fue insuficiente en los cultivos Cnt+1<sup>er</sup> P Cd<sup>2+</sup> y en los CdPA - Cd<sup>2+</sup> 1<sup>er</sup> P (Tabla 4.6). A pesar de la inactivación parcial del Cd<sup>2+</sup> por grupos tiol, la producción de metano en los cultivos CdPA no se modificó respecto a los cultivos sin Cd<sup>2+</sup>. Estos resultados indicaron que el Cd<sup>2+</sup> acumulado no estaba libre y por tanto no era tóxico para las células CdPA porque otras moléculas cooperaban en su neutralización. Entonces se determinó el contenido de polyP para evaluarlo como potencial quelante de Cd<sup>2+</sup>.

Tabla 4.3 Remoción del cadmio en *M. acetivorans* cultivada en presencia de 54 µM CdCl<sub>2</sub> y acetato.

|  | <b>Proteína<br/>mg/cultivo</b> | <b>Cd removido<br/>nmol/cultivo</b> |
|--|--------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Cnt</b>                                     | 4.6 ± 0.6                      | ---                                 |
| <b>Cnt+1<sup>er</sup> P Cd<sup>2+</sup></b>    | 4.8 ± 0.4                      | 1387 ± 255 <sup>1</sup>             |
| <b>CdPA</b>                                    | 5.2 ± 1.2                      | 2564 ± 865*                         |
| <b>CdPA - Cd<sup>2+</sup> 1<sup>er</sup> P</b> | 4.3 ± 0.5                      | 781 ± 14                            |

Los datos mostrados son la media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes. <sup>1</sup> Datos de Lira-Silva *et al.*, 2013. Prueba de t-Student \*P<0.05 vs Cnt+1<sup>er</sup>P Cd<sup>2+</sup>. En un cultivo de 60 mL con 54 µM Cd<sup>2+</sup> hay 3200 nmol de cadmio totales teóricos.

Estudios realizados en diferentes microorganismos han sugerido que el polyP tiene un papel muy importante en condiciones de estrés nutricional porque su hidrólisis puede proveer de Pi

para la producción de ATP y con ello mantener los requerimientos de energía durante situaciones de deficiencia de nutrientes (Brown *et al.*, 2008). Asimismo, se ha sugerido que la síntesis del polyP inicia durante la fase estacionaria de crecimiento como un mecanismo de reserva (Kulaev *et al.*, 1999). Por estos motivos, se determinó el consumo de fosfato extracelular y la síntesis de polyP en estos cultivos a lo largo de la curva de crecimiento.

La velocidad de consumo de Pi fue significativamente mayor en los cultivos CdPA y en los CdPA - Cd<sup>2+</sup> 1<sup>er</sup> P a partir del día 2 al 10 comparado con las células control y las Cnt + 1<sup>er</sup> P Cd<sup>2+</sup>, lo cual coincidió con una activa síntesis de polyP hasta el día 10 donde se alcanzó un máximo en su contenido (Figura 4.2).

Tabla 4.4 Contenido de moléculas con grupos tiol presentes en las células CdPA cultivadas con acetato.

|   | Cys          | CoM-SH     | Sulfuro      | Tioles<br>totales | Cd<br>Removido          | Tiol/Cd |
|---|--------------|------------|--------------|-------------------|-------------------------|---------|
|   | nmol/cultivo |            |              |                   |                         |         |
| <b>Cnt</b> <sup>1</sup>                           | 3.2 ± 1.4    | 0.3 ± 0.04 | 22 ± 13      | 25                | ---                     | ---     |
| <b>Cnt + 1<sup>er</sup> P<br/>Cd<sup>2+</sup></b> | 4.5 ± 0.4    | 4.5 ± 0.4* | 470 ± 146*   | 479               | 1387 ± 255 <sup>1</sup> | 0.3     |
| <b>CdPA</b>                                       | 8.8 ± 0.4**  | 8.4 (n=2)  | 1237 ± 163** | 1247              | 2564 ± 865              | 0.5     |
| <b>CdPA-Cd<sup>2+</sup><br/>1<sup>er</sup> P</b>  | 2.8 ± 0.1    | 0.8 ± 0.2  | 194 ± 27     | 205               | 781 ± 14                | 0.3     |

Los datos mostrados son la media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes.<sup>1</sup> Lira-Silva *et al.*, 2013. Prueba t-Student \* P<0.01 vs control y \*\*P<0.001 vs CdPA-Cd<sup>2+</sup> 1<sup>er</sup>P.

El contenido de polyP en las células CdPA al día 5 fue de 7 ± 1 μmol de Pi/cultivo, mientras que en las células Cnt y Cnt+1<sup>er</sup>P Cd<sup>2+</sup> fue de 1.6 ± 1 y 1.2 ± 0.8 μmol de Pi/cultivo, respectivamente; lo que sugirió que la continua exposición al Cd<sup>2+</sup> modula la síntesis y la degradación del polyP en *M. acetivorans* como se ha reportado para *S. metallicus* ante una exposición al Cu<sup>2+</sup> (Remonsellez *et al.*, 2006).

En los cultivos CdPA, el contenido de polyP fue mayor comparado con el cultivo Cnt y el Cnt+1<sup>er</sup> P Cd<sup>2+</sup> en la fase estacionaria de crecimiento (día 14). Sin embargo, en las células CdPA cultivadas por primera vez sin el Cd<sup>2+</sup> (CdPA - Cd<sup>2+</sup> 1<sup>er</sup> P), el contenido de polyP disminuyó drásticamente después del día 10 de cultivo, lo que sugiere que esta vía está modulada por la presencia del Cd<sup>2+</sup>. El contenido de polyP en todos los tipos de células fue suficiente para inactivar al Cd<sup>2+</sup> intracelular (considerando que al menos debe haber una relación de dos cargas negativas por un ión de Cd<sup>2+</sup> para su inactivación, en este caso la relación polyP/Cd>2) (Tabla 4.5). El análisis de las células CdPA por microscopía electrónica (HAADF-STEM) mostró que efectivamente hay un mayor contenido de polyP a juzgar por las numerosas regiones electrodensas o los acidocalcisomas (gránulos formados principalmente por el Cd, el Ca, el P y el S) presentes en las células CdPA respecto a las células control (Figura 4.3).

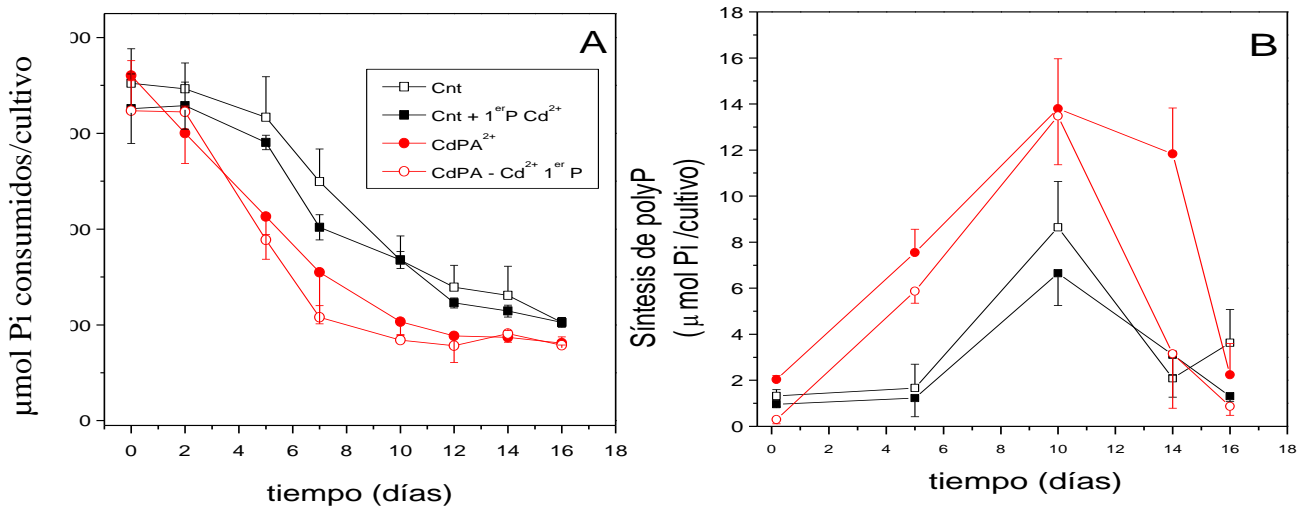


Figura 4.2 Consumo de Pi (A) y síntesis de polyP (B) en las células de *M. acetivorans* cultivadas con acetato. Las células Cnt (□), las Cnt+1<sup>er</sup> P Cd<sup>2+</sup> (■), las CdPA (●) y las CdPA-Cd<sup>2+</sup> 1<sup>er</sup> P (○). Los datos mostrados son la media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes. Prueba de t-Student \* P<0.01 vs control.

Una vez demostrado que el polyP puede ser la principal molécula quelante del Cd<sup>2+</sup> debido a su elevado contenido intracelular, con el fin de evaluar a qué nivel residía la regulación (transcripcional y/o metabólica) de la síntesis/degradación del polyP, se determinaron tanto el

contenido de transcritos *ppk*, *ppx* y *pstA*, así como los contenidos de proteína activa (las actividades enzimáticas de la PPK y la PPX).

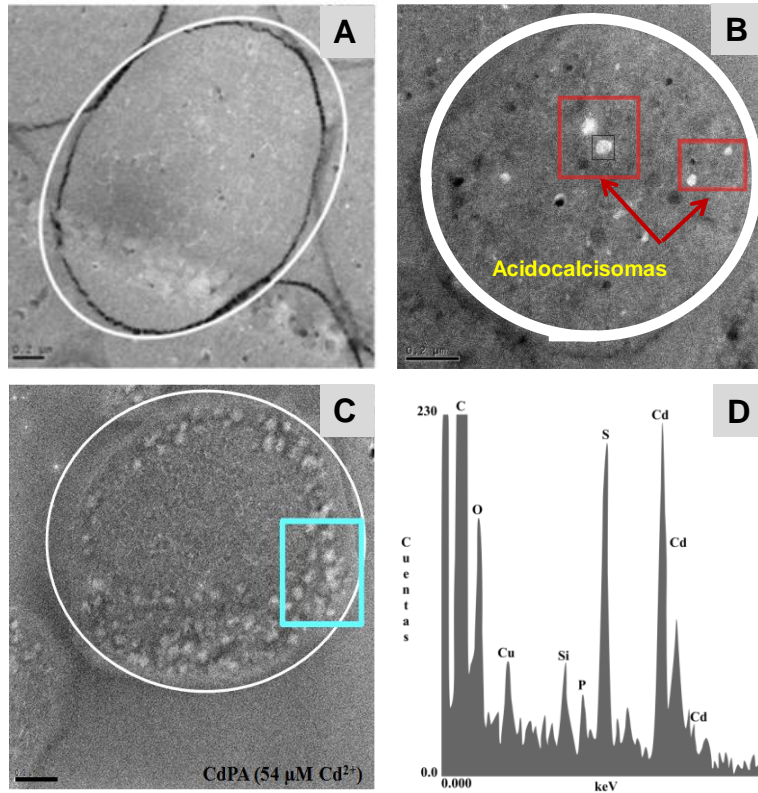


Figura 4.3 Imágenes de *M. acetivorans* obtenidas mediante HAADF-STEM. En la imagen se observa que las células Cnt (A) y las expuestas por primera vez al  $\text{Cd}^{2+}$  muestran menor cantidad de acidocalcisomas (B) mientras que las células CdPA mostraron grandes zonas electrodensoas o acidocalcisomas (C). En la figura D se muestra el microanálisis realizado a las zonas electrodensoas (la región blanca enmarcada en un cuadro en C) donde se observó que en esas regiones se encuentran los complejos de  $\text{Cd}^{2+}$  inactivado con el polyP (P) y los tioles (S). Las unidades del “eje y” corresponden al # de cuentas que van desde 0 hasta 230 y las del “eje x” son keV.

El nivel de transcritos se incrementó de 4-6 veces para la PPK y la PPX en las células Cnt +1<sup>er</sup> P  $\text{Cd}^{2+}$ , y en las CdPA vs las células Cnt. De forma interesante, en las células CdPA- $\text{Cd}^{2+}$ 1<sup>er</sup>P el contenido de transcritos disminuyó con respecto a los cultivos que tenían el  $\text{Cd}^{2+}$ , sugiriendo que el metal induce un incremento en los transcritos. Los resultados del contenido de transcritos del *pstA* no son concluyentes debido a que hubo una gran variación entre ellos (Figura 4.4). Sin

embargo, es importante realizar un análisis experimental exhaustivo y determinar el mRNA a tiempos cortos de exposición.

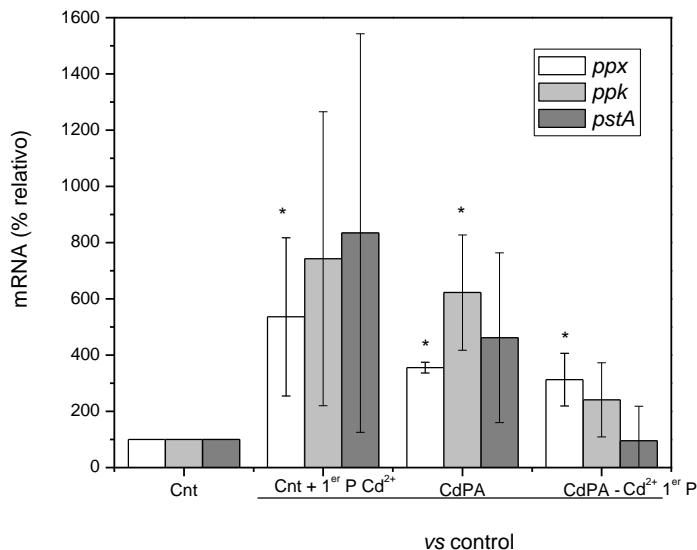


Figura 4.4 Nivel de transcritos de las enzimas polifosfato cinasa (*ppk*), la exopolifosfatasa (*ppx*) y el transportador de fosfato (*pstA*) en las células Cnt+1<sup>er</sup> P Cd<sup>2+</sup>, las CdPA y las CdPA - Cd<sup>2+</sup> 1<sup>er</sup> P vs las células control (Cnt). Los datos mostrados son la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. Prueba de t-Student \* P<0.01 vs control. El nivel de transcritos se determinó en las células que fueron cosechadas a los 14 días de cultivo.

Se realizó la secuenciación del genoma total de las células CdPA y las Cnt en colaboración con el Dr. Enrique Morett del IBT, UNAM (Winter Genomics, CDMX, México) y se comparó con el genoma reportado para *M. acetivorans* (Galagan *et al.*, 2002) con la finalidad de evaluar si la constante exposición al Cd<sup>2+</sup> provocó mutaciones en estas células. Los resultados preliminares de ambas cepas con respecto al genoma de referencia mostraron que no hubo mutaciones, al menos en los genes involucrados en el metabolismo del polyP y en la síntesis de CoM-SH. Sin embargo, es necesario analizar a detalle el resto de los genes.

La actividad de la PPX determinada en extractos de las células control y las CdPA cosechadas a los 14 días fue de 9 y 1 nmol Pi liberado x (min x mg prot)<sup>-1</sup>, respectivamente. Cuando el extracto celular se pasó por una columna de Penefsky (con sephadex G-25) para eliminar al Cd<sup>2+</sup> del extracto la actividad se restableció hasta 6 nmol de Pi liberado (min x mg prot)<sup>-1</sup>, lo que sugirió que el Cd<sup>2+</sup> inhibió fuertemente a la enzima. Se obtuvieron algunas constantes cinéticas

de la PPX en los extractos citosólicos: los cultivos control tuvieron una  $V_{max} = 8.2 \pm 0.3 \text{ nmol x (min x mg prot)}^{-1}$  y una  $Km_{TrimetilsililpolyP} = 0.36 \pm 0.06 \text{ mg/mL}$ . Los extractos en presencia de  $10 \mu\text{M Cd}^{2+}$  no cambiaron la  $V_{max}$  pero la  $Km_{TrimetilsililpolyP}$  fue  $= 0.66 \text{ mg/mL}$ . Las constantes cinéticas de los extractos citosólicos de los cultivos CdPA después de pasarlos por una columna de Penefsky fueron  $V_{max} = 7.2 \text{ nmol x (min x mg prot)}^{-1}$  y una  $Km_{TrimetilsililpolyP} = 2.2 \text{ mg/mL}$  (n=2). Aún falta evaluar la actividad de la PPK, pero estos resultados indican que a pesar de que el número de transcritos se incrementa por la presencia de  $\text{Cd}^{2+}$ , la actividad enzimática se mantiene constante.

Tabla 4.5 Contenido de polyP y la remoción de Cd en *M. acetivorans* cultivada con acetato

|  | <b>polyP</b>            | <b>Cd removido</b> | <b>polyP/ Cd</b> |
|--|-------------------------|--------------------|------------------|
|  | $\mu\text{mol/cultivo}$ |                    |                  |
| <b>Cnt</b>                                   | 2±0.13                  | ---                | ---              |
| <b>Cnt+1<sup>er</sup> P Cd<sup>2+</sup></b>  | 3±1.8                   | 1.4±0.2            | 2                |
| <b>CdPA</b>                                  | 11.8±1.9*               | 2.6±0.8            | 4.5              |
| <b>CdPA-Cd<sup>2+</sup> 1<sup>er</sup> P</b> | 3±2.3**                 | 0.78±0.01          | 3.8              |

Los datos mostrados se determinaron al día 14 de cultivo y representan la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. Prueba t-Student \*P<0.01 vs control y \*\*P<0.05 vs CdPA.

La caracterización cinética de las enzimas recombinantes nos dará más información de cómo pueden estar comportándose éstas dentro de la célula y ahondar más en el metabolismo del polyP. Ya se realizó la clonación, la sobreexpresión y la purificación de las enzimas PPK y PPX en *E. coli* y se obtuvieron con un 80 y 90% de pureza, respectivamente (Figura 4.5). El porcentaje de pureza se determinó mediante un análisis densitométrico utilizando el software Image J, para lo cual la banda principal correspondiente a la proteína de interés se normalizó respecto al total de bandas presentes en ese carril.

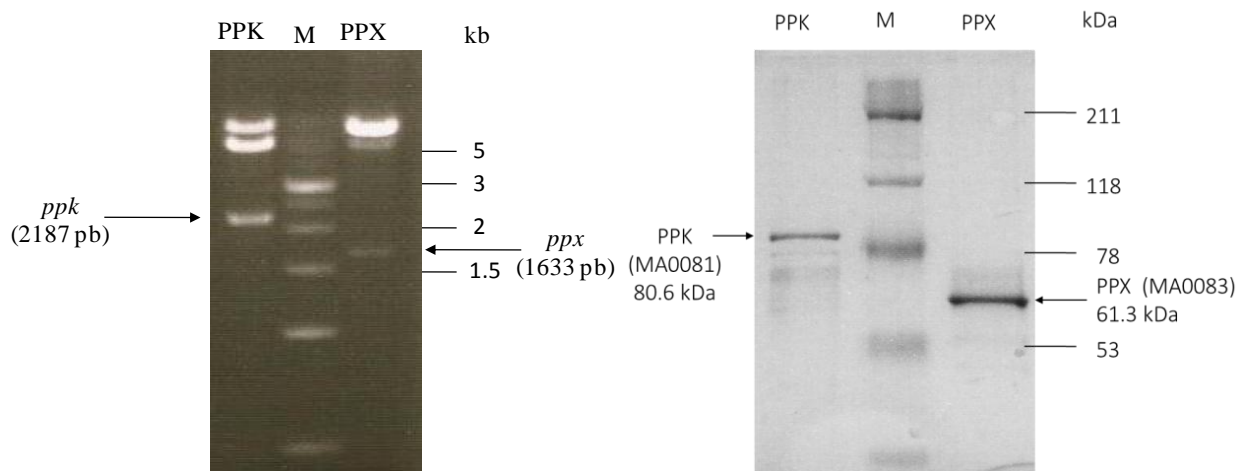


Figura 4.5 Clonación y purificación de las enzimas recombinantes PPK y PPX de *M. acetivorans*. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) de la construcción PPK/pET28a y PPX/pET28a digerido con las enzimas NheI/EcoRI y NdeI/BamHI, respectivamente. M, marcador de DNA (AMRESCO K181) (A). Electroforesis en gel SDS-PAGE al 10% (p/v) de la purificación de la PPK 80.6 kDa y la PPX 61.3kDa (B). M, marcador de peso molecular (Bio-Rad 161-0318).

Se determinó previamente que las células CdPA cultivadas con metanol sintetizaban grandes cantidades de biopelícula siempre y cuando se les adicionara regularmente más fuente de carbono (100 mM); de esta forma los cultivos resistían hasta 2.5 mM Cd<sup>2+</sup> (Lira-Silva *et al.*, 2013). En esta parte del trabajo se determinó la capacidad de las células CdPA para sintetizar biopelícula cultivadas ahora con acetato y sin más adiciones de fuente de carbono, con la intención de determinar la capacidad intrínseca de las células para invertir esqueletos de carbono en procesos no involucrados con la duplicación celular.

Las células control expuestas a concentraciones mayores a 250  $\mu$ M Cd<sup>2+</sup> disminuyeron 5 veces la formación de la biopelícula comparado con un cultivo control. Mientras que las células CdPA cultivadas con acetato sintetizaron 8 veces más biopelícula comparado con un cultivo control. La formación de la biopelícula en las células CdPA que se expusieron a concentraciones mayores a 250  $\mu$ M Cd<sup>2+</sup>, disminuyó hasta un 50% respecto a los cultivos CdPA, pero fue suficiente para proteger a la célula. Sin embargo, en las células CdPA-Cd<sup>2+</sup>1<sup>er</sup> P se revirtió el fenotipo y la formación de biopelícula fue similar al cultivo Cnt+1<sup>er</sup> P Cd<sup>2+</sup> (Figura 4.6).

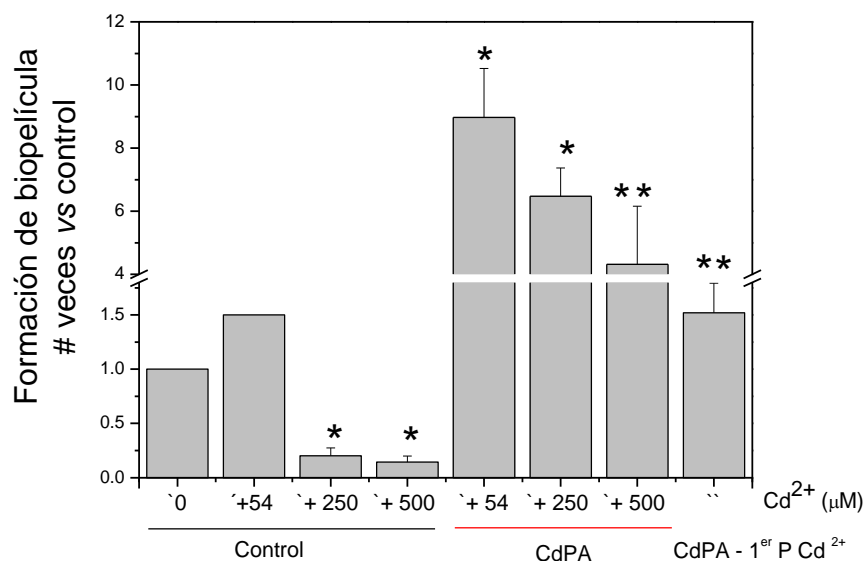


Figura 4.6 Formación de la biopelícula por las células de *M. acetivorans* cultivadas con acetato. La formación de la biopelícula se determinó en placas de 96 pozos mediante la tinción con cristal violeta a 540 nm. Los valores obtenidos por la tinción con el colorante fueron normalizados con respecto a la densidad óptica de cada cultivo y finalmente con respecto a la biopelícula formada por los cultivos control. Los datos mostrados son la media  $\pm$  desviación estándar de 5-7 experimentos independientes. Prueba t-Student \* $P < 0.001$  vs control, \*\*  $P < 0.025$  vs control.

Finalmente, para determinar si los mecanismos de resistencia al  $\text{Cd}^{2+}$  exacerbados en las células CdPA conferían resistencia a otros metales como el  $\text{Cu}^{2+}$  y el  $\text{Zn}^{2+}$ , los cuales que se acumulan preferencialmente en los biodigestores (Altas, 2009), se cultivaron las células CdPA en presencia de concentraciones de  $100 \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$  y se determinó la producción de biogás.

El  $\text{Cu}^{2+}$  resultó ser muy tóxico para las células control expuestas por primera vez al metal mientras que las células CdPA fueron más resistentes comparado con las células control (Figura 4.7), lo que sugirió que la preadaptación al  $\text{Cd}^{2+}$ , al activar la capacidad metabólica de *M. acetivorans*, facilita la resistencia a otros metales pesados sin modificar la producción de biogás.



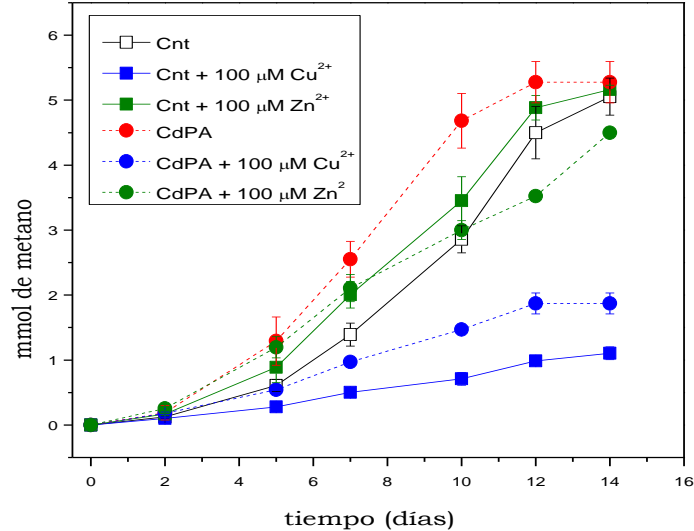


Figura 4.7 Producción de CH<sub>4</sub> en células de *M. acetivorans* cultivadas con acetato y expuestas al Zn<sup>2+</sup> o al Cu<sup>2+</sup>. Los cultivos se realizaron en frascos con 50 mL de medio HS. Los datos mostrados son la media ± desviación estándar de 4 experimentos independientes.

#### 4.7 Discusión

La preadaptación de *M. acetivorans* a bajas concentraciones del Cd<sup>2+</sup> (CdPA) cultivada en metanol, favoreció la síntesis de Cys y CoM-SH e incremento el contenido intracelular de S<sup>2-</sup>. Se determinó que no hubo cambio en el contenido de malato y citrato en estas condiciones, por lo que se demostró que el leve aumento en el contenido de los ácidos orgánicos en *M. acetivorans* se debió a cambios en el metabolismo intermediario y no a un mecanismo de inactivación de metales como se ha descrito en plantas (Haydon *et al.*, 2007). Por otra parte, la acumulación masiva de polyP pareció ser el mecanismo principal para enlazar e inactivar al Cd<sup>2+</sup> intracelularmente para ser almacenado en los acidocalcisomas. Es importante mencionar que el método (de hidrólisis ácida) utilizado para determinar el contenido de polyP podría no solo liberar al Pi del polyP sino también el de los fosfolípidos y otros compuestos fosfatados. Sin embargo, la fracción de Pi proveniente de estos compuestos sería la misma en todas las condiciones. Los datos mostraron que el metabolismo del polyP puede regularse a nivel transcripcional y metabólico por la presencia del Cd<sup>2+</sup>; sin embargo, considerando que ambos

genes se localizan en el mismo operón, es posible que la síntesis/degradación de polyP no se regule a nivel transcripcional, sino a nivel post-transduccional. Cabe señalar que también falta determinar el nivel de regulación de la síntesis de tioles.

La síntesis de la biopelícula inducida por el  $\text{Cd}^{2+}$  también resultó ser un mecanismo muy importante para las células CdPA, ya que con esta matriz compuesta por DNA, carbohidratos y proteínas, un gran porcentaje del  $\text{Cd}^{2+}$  se mantiene fuera de la célula lo que permite que la síntesis de metano no se vea afectada. Estos datos abren la posibilidad de que la biopelícula pueda ser utilizada con fines biotecnológicos para remover cantidades importantes de varios metales ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ ). La inducción de los mecanismos descritos aquí frente a una exposición al  $\text{Cd}^{2+}$  podría darle a *M. acetivorans* una ventaja para sobrevivir en la naturaleza o en condiciones adversas frente a otro tipo de microorganismos.

#### **4.8 Conclusiones**

Las estrategias experimentales utilizadas en este proyecto proporcionaron información importante sobre la gran capacidad metabólica que tiene *M. acetivorans* para resistir condiciones adversas y sobre cómo la preadaptación de estas células les permite resistir concentraciones mayores de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$  y ayuda a mantener activa la producción del biogás.

## Capítulo 5. Resumen de resultados y perspectivas

### 5.1 Resumen de resultados

En este trabajo se demostró que el  $\text{Cd}^{2+}$  fue un activador de la metanogénesis, la vía principal de síntesis de ATP en *M. acetivorans* debido parcialmente a la activación de la Ack y la CA.

En presencia de  $\text{Cd}^{2+}$  se incrementó el contenido de la CoM-HS, una molécula esencial para la metanogénesis pero que podría tener otras funciones, como el GSH que tiene un papel importante en la quelación del metal. La preadaptación de *M. acetivorans* a bajas concentraciones de  $\text{Cd}^{2+}$  (CdPA) indujo la síntesis de una biopelícula, lo que le permitió crecer en concentraciones de hasta 2 mM  $\text{Cd}^{2+}$ . Por otro lado, en estas células se incrementaron significativamente los niveles de polyP.

Los mecanismos de resistencia descritos en *M. acetivorans* se pueden modular por la exposición al  $\text{Cd}^{2+}$ . En la Figura 5.1 se muestran los principales mecanismos de resistencia expresados en *M. acetivorans* durante la primera exposición al  $\text{Cd}^{2+}$ , los cuales se potencian en las células CdPA presentando características diferentes que les permitió resistir una elevada concentración de  $\text{Cd}^{2+}$ ; sin embargo, al resembrar las células sin  $\text{Cd}^{2+}$  (CdPA- $\text{Cd}^{2+}$  1<sup>er</sup> P) dichas características desaparecieron.

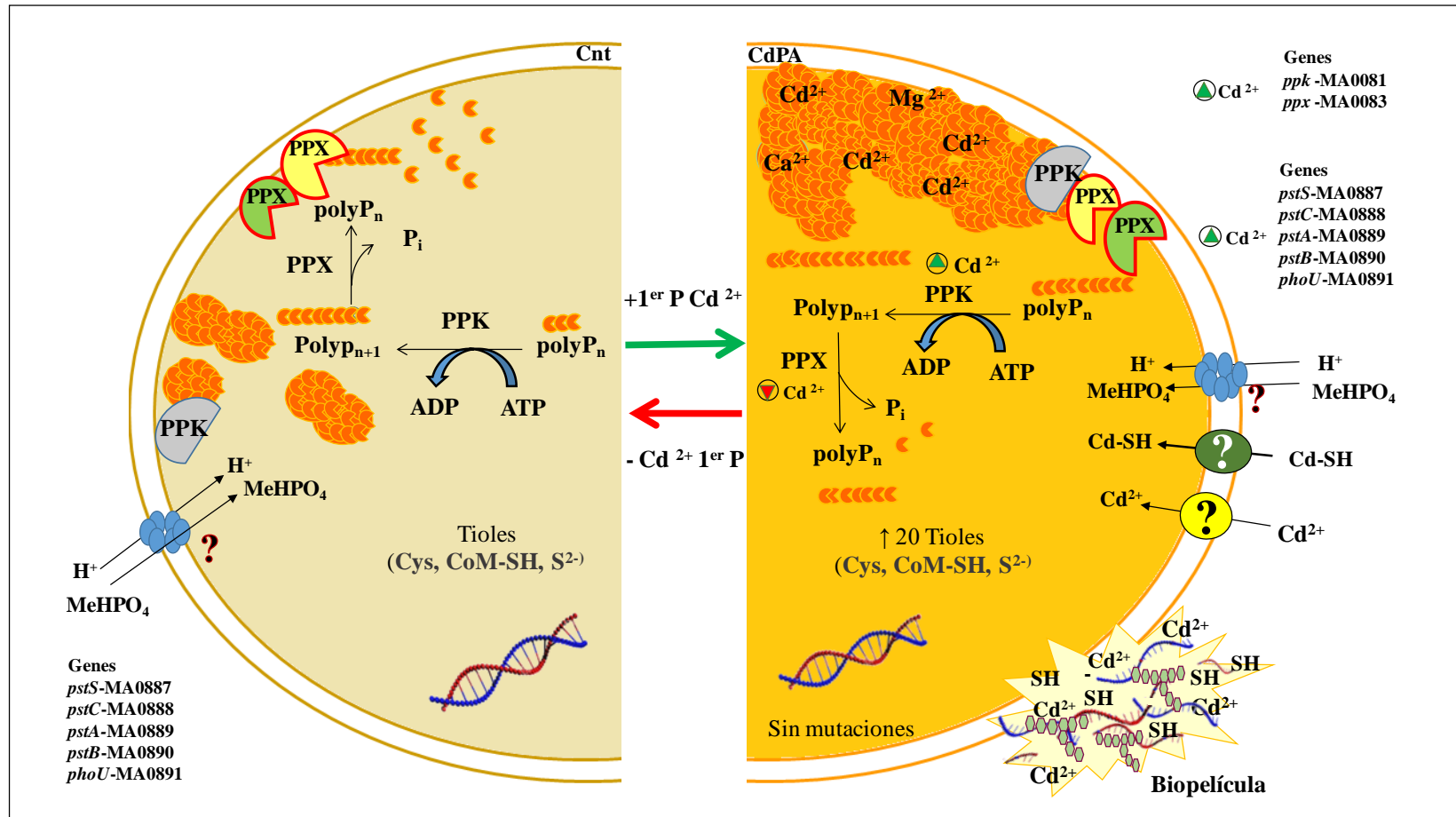


Figura 5.1 Esquema general de los principales mecanismos de resistencia al  $\text{Cd}^{2+}$  expresados en *M. acetivorans*. Abreviaciones: Cnt, las células control, Cnt  $1^{\text{er}} \text{P Cd}^{2+}$ ; Cnt +  $1^{\text{er}} \text{P Cd}^{2+}$ , cultivos control con una primera exposición al  $\text{Cd}^{2+}$ ; CdPA, cultivos preadaptados a  $54 \mu\text{M Cd}^{2+}$ ; las CdPA- $\text{Cd}^{2+} 1^{\text{er}} \text{P}$ , cultivos CdPA que se les dejó de suministrar el  $\text{Cd}^{2+}$  por primera vez desde su adaptación; PPK, polifosfato cinasa; PPX, exopolifosfatasa; -SH, molécula con grupo tior; Cys, cisteína, CoM-SH, coenzima M;  $\text{S}^{2-}$ , sulfuro;  $\text{H}^+$ , protón,  $\text{Cd}^{2+}$ , cadmio;  $\text{Mg}^{2+}$ , magnesio;  $\text{Ca}^{2+}$ , calcio; Me, metal;  $\text{polyP}_n$ ; cadena de polifosfatos de longitud  $n$ ;  $\text{polyP}_{n+1}$ ; cadena de polifosfatos de longitud  $n+1$ ;  $\text{polyP}_{n-1}$ ; cadena de polifosfatos de longitud  $n-1$ ; Cd-SH, complejo formado por una molécula con grupo tior y un cadmio;  $\text{MeHPO}_4$ , complejo formado por un metal y un fosfato inorgánico; acidocalcisoma, asociación de  $\text{polyP}$  en forma de gránulos. Genes de la polifosfato cinasa (*ppk*), de la exopolifosfatasa (*ppx*) y del transportador de fosfato (*pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB* y *phoU*).  $\text{⬆}$ , activación;  $\text{⬇}$ , inhibición.

## 5.2 Perspectivas

Los resultados obtenidos sobre la activación de la metanogénesis sugieren que es posible modular e incrementar la velocidad de producción de metano modificando la concentración de los metales pesados. La preadaptación a 0.05 mM  $\text{Cd}^{2+}$  en cultivos de *M. acetivorans* (cepa CdPA) no solo no inhibió la metanogénesis, sino que incluso activó la velocidad de síntesis de metano 6 veces más que en los cultivos sin  $\text{Cd}^{2+}$ . Se requiere determinar como el  $\text{Cd}^{2+}$  modifica la actividad de las enzimas metanogénicas, ya sea mediante una interacción directa o a través de una regulación transcripcional (la Mtr, la Mcr, la Hdr y el complejo Ma-Rnf). Una vez evaluado el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre estas enzimas, es importante identificar cuáles son las que controlan el flujo en la síntesis del metano y con ello modificar los pasos limitantes de la vía para favorecerla. Algunos reportes indican que, debido a su baja eficiencia catalítica, la CODH/ACS sería un sitio importante de control de la vía metanogénica (Saavedra *et al.*, 2011). Se ha establecido en los últimos años que el control de una vía metabólica se distribuye entre varios sitios, generalmente 2 o 3 enzimas/transportadores (Fell, 1997; Moreno-Sánchez *et al.*, 2008), por lo que sería importante realizar el análisis del control metabólico de la metanogénesis, debido a que es una de las mejores herramientas para determinar con precisión los mecanismos de control de una vía y con ello saber qué sitios se deben sobreexpresar para aumentar el flujo y así la producción del metano con fines biotecnológicos.

Por otro lado, la cepa CdPA fue capaz de remover hasta el 100% del cadmio disuelto en el medio y también adquirió resistencia hacia el  $\text{Zn}^{2+}$  y el  $\text{Cu}^{2+}$ . Este resultado es de gran relevancia biotecnológica ya que esta es la primera evidencia de una arquea capaz de remover metales pesados. Más allá de la activación de la vía metanogénica con el  $\text{Cd}^{2+}$ , los mecanismos de resistencia que se estudiaron aquí, y que varían respecto al de otras arqueas, pueden ser utilizables en los biodigestores como herramientas para remediar las aguas contaminadas con metales pesados.

Los mecanismos que las células presentaron para adaptarse al  $\text{Cd}^{2+}$  involucran el aumento en: (i) la síntesis de metabolitos con grupo tiol; ii) de polifosfatos y (iii) la formación de biopelícula.

La cantidad de polyP acumulado en células CdPA con acetato fue 20 veces mayor que la cantidad de moléculas con grupos tiol, indicando que la acumulación de polyP es un mecanismo

importante para incrementar la resistencia a concentraciones elevadas de  $\text{Cd}^{2+}$ . Por su parte, la CoM-SH aumentó significativamente en células CdPA cultivadas con metanol por lo que se propone que tiene un papel similar al del glutatión como molécula quelante. Realizar la caracterización de estas vías metabólicas (síntesis de la CoM-SH, del polyP y de la biopelícula). Así como, determinar los coeficientes de control de flujo en ausencia y presencia de cadmio nos permitirá entender los mecanismos de regulación a nivel metabólico y genético de los procesos que confieren resistencia a los metales pesados.

La inducción de la síntesis de biopelícula frente a condiciones de estrés sugirió que la vía gluconeogénica debe estar muy activa en *M. acetivorans*, ya que la formación de macromoléculas se inicia a partir de moléculas sencillas como acetato o metanol.

De esta forma, estudiar más a fondo el metabolismo central del carbono, el fósforo y el azufre en *M. acetivorans*, así como determinar los pasos limitantes de las vías involucradas en la síntesis de compuestos con capacidad de quelar metales pesados (la CoM-SH, el polyP y la biopelícula), podría permitir realizar algunas modificaciones a nivel bioquímico y genético para incrementar o mantener constante la síntesis del biogás en presencia de agentes externos desfavorables.

Además, dada la capacidad de este microorganismo para remover metales pesados se puede proponer la generación de cepas de interés biotecnológico para su aplicación en los procesos de biorremediación, como organismos hiperacumuladores de metales pesados en condiciones adversas.

Actualmente, el uso del biogás como combustible alternativo es una realidad en muchos países, sin embargo, existen algunas limitantes que inhiben el proceso. Por este motivo se propone utilizar microorganismos como la cepa CdPA de *M. acetivorans* para la producción de energía a partir de desechos orgánicos y de aguas residuales.

## Referencias

- Abbanat, D. R., & Ferry, J. G. (1990). Synthesis of acetyl coenzyme A by carbon monoxide dehydrogenase complex from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. *J Bacteriol.*, *172* (12), 7145–7150.
- Aceti, D. J., & Ferry, J. G. (1988). Purification and characterization of acetate kinase from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. Evidence for regulation of synthesis. *J Biol Chem.*, *263* (30), 15444–15448.
- Afting, Hochheimer, & Thauer. (1998). Function of H<sub>2</sub>-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* in coenzyme F<sub>420</sub> reduction with H<sub>2</sub>. *Arch Microbiol.*, *169* (3), 206–210.
- Ahring, B. K., & Westermann, P. (1985). Sensitivity of thermophilic methanogenic bacteria to heavy metals. *Curr Microbiol.*, *12* (5), 273–276.
- Alber, B. E., & Ferry, J. G. (1994). A carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*. *Proc Natl Acad Sci USA.*, *91* (15), 6909–6913.
- Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere*, *91*(7), 869–881.
- Almárcegui, R. J., Navarro, C. A., Paradela, A., Albar, J. P., von Bernath, D., & Jerez, C. A. (2014). New copper resistance determinants in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*: a quantitative proteomic analysis. *J Proteome Res.*, *13* (2), 946–960.
- Almeida, W. I., Vieira, R. P., Cardoso, A. M., Silveira, C. B., Costa, R. G., Gonzalez, A. M., ... Martins, O. B. (2009). Archaeal and bacterial communities of heavy metal contaminated acidic waters from zinc mine residues in Sepetiba Bay. *Extremophiles*, *13* (2), 263–271.
- Altaş, L. (2009). Inhibitory effect of heavy metals on methane-producing anaerobic granular sludge. *J Hazard Mater.*, *162* (2–3), 1551–1556.
- Alvarez, S., & Jerez, C. a. (2004). Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol.*, *70* (9), 5177–5182.
- Andreeva, N., Ryazanova, L., Dmitriev, V., Kulakovskaya, T., & Kulaev, I. (2013). Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to toxic manganese concentration triggers changes in inorganic polyphosphates. *FEMS Yeast Res.*, *13* (5), 463–470.
- Avilés, C., Loza-Tavera, H., Terry, N., & Moreno-Sánchez, R. (2003). Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. *Arch Microbiol.*, *180* (1), 1–10.
- Baath, E. (1989). Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Wat Air Soil Pollut.*, *47* (3–4), 335–379.
- Bacenetti, J., Negri, M., Fiala, M., & González-García, S. (2013). Anaerobic digestion of different feedstocks: Impact on energetic and environmental balances of biogas process. *Sci Total Environ.*, *463–464*, 541–551.
- Baker-Austin, C., Dopson, M., Wexler, M., Sawers, R. G., & Bond, P. L. (2005). Molecular insight into extreme copper resistance in the extremophilic archaeon “*Ferroplasma acidarmanus*” Fer1. *Microbiology*, *151* (8), 2637–2646.
- Bhattacharya, S. (1995). Toxic effects of cadmium on methanogenic systems. *Water Res.*, *29* (10), 2339–2345.
- Biogás | Red Mexicana de Bioenergía. (2017). Rembio.org.mx. 24 abril 2017, de [http://rembio.org.mx/?page\\_id=643](http://rembio.org.mx/?page_id=643)

- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C. J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., ... Pfannkuche, O. (2000). A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, *407* (6804), 623–626.
- Brady, D., & Duncan, J. R. (1994). Binding of heavy metals by the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol.*, *16* (7), 633–638.
- Brown, M. R. W., Kornberg, A., Schwartz, A. W., Jones, M. E., Lipmann, F., Kulaev, I. S., ... Kuroda, A. (2008). The long and short of it – polyphosphate, PPK and bacterial survival. *Trends Biochem Sci.*, *33* (6), 284–290.
- Chandra, P., & Singh, D. P. (2014). Removal of Cr (VI) by a halotolerant bacterium *Halomonas sp.* CSB 5 isolated from sām̄bhar salt lake Rajasthan (India). *Cell Mol Biol.*, *60* (5), 64–72.
- Chen, W., Palmer, R. J., & Kuramitsu, H. K. (2002). Role of polyphosphate kinase in biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.*, *70* (8), 4708–4715.
- Colussi, I., Cortesi, A., Vedova, L. Della, Gallo, V., & Robles, F. K. C. (2009). Start-up procedures and analysis of heavy metals inhibition on methanogenic activity in EGSB reactor. *Bioresour Technol.*, *100* (24), 6290–6294.
- Daas, P. J., Hagen, W. R., Keltjens, J. T., & Vogels, G. D. (1994). Characterization and determination of the redox properties of the [2[4Fe-4S] ferredoxin from *Methanosarcina barkeri* strain MS. *FEBS Lett.*, *356* (2–3), 342–344.
- Das, D., Salgaonkar, B. B., Mani, K., & Braganca, J. M. (2014). Cadmium resistance in extremely halophilic archaeon *Haloferax* strain BBK2. *Chemosphere*, *112*, 385–392.
- Demirel, B., & Scherer, P. (2011). Trace element requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane. *Biomass & Bioenergy*, *35* (3), 992–998.
- Deng, Y., Xu, J., Liu, Y., & Mancl, K. (2014). Biogas as a sustainable energy source in China: Regional development strategy application and decision making. *Renew Sust Energ Rev.*, *35*, 294–303.
- Deppenmeier, U. (2002). The unique biochemistry of methanogenesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.*, *71*, 223–283.
- Deppenmeier, U., Lienard, T., & Gottschalk, G. (1999). Novel reactions involved in energy conservation by methanogenic archaea. *FEBS Letters*, *457* (3), 291–297.
- Devars S., Hernandez R., & Moreno-Sanchez R.. (1998). Enhanced heavy metal tolerance in two strains of photosynthetic *Euglena gracilis* by preexposure to mercury or cadmium. *Arch Environ Contam Toxicol.*, *34* (2), 128–135.
- DiMarco, A. A., Bobik, T. A., & Wolfe, R. S. (1990). Unusual coenzymes of methanogenesis. *Annu Rev Biochem.*, *59*, 355–394.
- Docampo, R., Jimenez, V., Lander, N., Li, Z.-H., & Niyogi, S. (2013). New insights into roles of acidocalcisomes and contractile vacuole complex in osmoregulation in protists. *Int Rev Cell Mol Biol.*, *305*, 69–113.
- Ehrlich, H. L. (1997). Microbes and metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *48* (6), 687–692.
- EPA. (2010). Methane and nitrous oxide emissions from natural sources. In *Environmental Protection Agency*. Washington, DC, USA.
- Ermiler, U., Grabarse, W., Shima, S., Goubeaud, M., & Thauer, R. K. (1997). Crystal structure of methyl-coenzyme M reductase: the key enzyme of biological methane formation. *Science*, *278* (5342), 1457–1462.
- Fagan, M. J., & Saier, M. H. (1994). P-type ATPases of eukaryotes and bacteria: Sequence analyses and construction of phylogenetic trees. *J Mol Evol.*, *38* (1), 57–99.



- Fang, H. H. P., & Hui, H. H. (1994). Effect of heavy metals on the methanogenic activity of starch-degrading granules. *Biotechnol Lett.*, *16* (10), 1091–1096.
- Feist, A. M., Scholten, J. C. M., Palsson, B. Ø., Brockman, F. J., & Ideker, T. (2006). Modeling methanogenesis with a genome-scale metabolic reconstruction of *Methanosarcina barkeri*. *Mol Syst Biol.*, *2* (1), 2006.0004.
- Fell, D. (1997). Understanding the Control of Metabolism. Portland Press, London. Portland Press Frontiers in metabolism 2.
- Feng, X. M., Karlsson, A., Svensson, B. H., & Bertilsson, S. (2010). Impact of trace element addition on biogas production from food industrial waste - linking process to microbial communities. *FEMS Microbiol Ecol.*, *74*(1), 226–240.
- Ferry, J. G. (1997). Enzymology of the fermentation of acetate to methane by *Methanosarcina thermophila*. *BioFactors*, *6* (1), 25–35.
- Ferry, J. G. (1999). Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. *FEMS Microbiol Rev.*, *23* (1), 13–38.
- Ferry, J. G., & Lessner, D. J. (2008). Methanogenesis in marine sediments. *Ann N Y Acad Sci.*, *1125*, 147–157.
- Fischer, R., Gärtner, P., Yeliseev, A., & Thauer, R. K. (1992). N5-methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase in methanogenic archaeobacteria is a membrane protein. *Arch Microbiol.*, *158* (3), 208–217.
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Rev. Microbiol.*, *8* (9), 623–633.
- Focardi, S., Pepi, M., Landi, G., Gasperini, S., Ruta, M., Di Biasio, P., & Focardi, S. E. (2012). Hexavalent chromium reduction by whole cells and cell free extract of the moderate halophilic bacterial strain *Halomonas sp.* TA-04. *Int Biodeter Biodegr.*, *66* (1), 63–70.
- Galagan, J. E., Nusbaum, C., Roy, A., Endrizzi, M. G., Macdonald, P., FitzHugh, W., ... Birren, B. (2002). The Genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome Res.*, *12* (4), 532–542.
- García-Contreras, R., Lira-Silva, E., Jasso-Chávez, R., Hernández-González, I. L., Maeda, T., Hashimoto, T., ... Moreno-Sánchez, R. (2013). Isolation and characterization of gallium resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Int J Med Microbiol.*, *303* (8), 574–582.
- García-García, J. D., Olin-Sandoval, V., Saavedra, E., Girard, L., Hernández, G., & Moreno-Sánchez, R. (2012). Sulfate uptake in photosynthetic *Euglena gracilis*. Mechanisms of regulation and contribution to cysteine homeostasis. *Biochim Biophys Acta*, *1820* (10), 1567–1575.
- Generarón Energía Eléctrica Limpia. (2017). Palestra Aguascalientes. 24 abril 2017, tomada de <http://www.palestraaguascalientes.com/generaran-energia-electrica-limpia/>
- Glass, J. B., & Orphan, V. J. (2012). Trace metal requirements for microbial enzymes involved in the production and consumption of methane and nitrous oxide. *Front Microbiol*, *3*(61), 1-20.
- Global Methane Initiative, GMI. . 21 Abril 2017, tomada de <http://www.globalmethane.org>
- Gomes, F. M., Carvalho, D. B., Peron, A. C., Saito, K., Miranda, K., & Machado, E. A. (2012). Inorganic polyphosphates are stored in spherites within the midgut of *Anticarsia gemmatalis* and play a role in copper detoxification. *J Insect Physiol.*, *58* (2), 211–219.
- Grillo-Puertas, M., Schurig-Briccio, L. A., Rodríguez-Montelongo, L., Rintoul, M. R., & Rapisarda, V. A. (2014). Copper tolerance mediated by polyphosphate degradation and low-affinity inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. *BMC Microbiology*, *14* (1), 72.

- Grillo-Puertas, M., Villegas, J. M., Rintoul, M. R., & Rapisarda, V. A. (2012). Polyphosphate degradation in stationary phase triggers biofilm formation via LuxS quorum sensing system in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 7 (11), e50368.
- Hagemeyer, C. H., Krer, M., Thauer, R. K., Warkentin, E., & Ermler, U. (2006). Insight into the mechanism of biological methanol activation based on the crystal structure of the methanol-cobalamin methyltransferase complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(50), 18917–22.
- Hajarnis, S. R., & Ranade, D. R. (1993). Revival of ammonia inhibited cultures of *Methanobacterium bryantii* and *Methanosarcina barkeri*. *J Ferment Bioeng.*, 76 (1), 70–72.
- Harris, D. R., Ward, D. E., Feasel, J. M., Lancaster, K. M., Murphy, R. D., Mallet, T. C., & Crane, E. J. (2005). Discovery and characterization of a Coenzyme A disulfide reductase from *Pyrococcus horikoshii*. Implications for this disulfide metabolism of anaerobic hyperthermophiles. *FEBS J.*, 272 (5), 1189–1200.
- Haydon, M. J., & Cobbett, C. S. (2007). Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytol.*, 174 (3), 499–506.
- Hedderich, R., & Whitman, W. B. (2006). Physiology and Biochemistry of the Methane-Producing Archaea. In *The Prokaryotes* (pp. 1050–1079). New York, NY: Springer New York.
- Hochheimer, A., Linder, D., Thauer, R. K., & Hedderich, R. (1996). The molybdenum formylmethanofuran dehydrogenase operon and the tungsten formylmethanofuran dehydrogenase operon from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Structures and transcriptional regulation. *Eur J Biochem.*, 242 (1), 156–162.
- Ince, B. K., & Ince, O. (2000). Changes to bacterial community make-up in a two-phase anaerobic digestion system. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 75 (6), 500–508.
- Ingram-Smith, C., Gorrell, A., Lawrence, S. H., Iyer, P., Smith, K., & Ferry, J. G. (2005). Characterization of the acetate binding pocket in the *Methanosarcina thermophila* acetate kinase. *J Bacteriol.*, 187 (7), 2386–2394.
- Jain, S. K., Gujral, G. S., Jha, N. K., & Vasudevan, P. (1992). Production of biogas from *Azolla pinnata* R.Br and *Lemna minor* L.: Effect of heavy metal contamination. *Bioresour Technol.*, 41 (3), 273–277.
- Jarrell, K. F., Saulnier, M., & Ley, A. (1987). Inhibition of methanogenesis in pure cultures by ammonia, fatty acids, and heavy metals, and protection against heavy metal toxicity by sewage sludge. *Can J Microbiol.*, 33 (6), 551–554.
- Jasso-Chávez, R., Apolinario, E. E., Sowers, K. R., & Ferry, J. G. (2013). MrpA functions in energy conversion during acetate-dependent growth of *Methanosarcina acetivorans*. *J Bacteriol.*, 195 (17), 3987–3994.
- Jasso-Chávez, R., Pacheco-Rosales, A., Lira-Silva, E., Gallardo-Pérez, J. C., García, N., & Moreno-Sánchez, R. (2010). Toxic effects of Cr(VI) and Cr(III) on energy metabolism of heterotrophic *Euglena gracilis*. *Aquat Toxicol.*, 100 (4), 329–338.
- Jasso-Chávez, R., Santiago-Martínez, M. G., Lira-Silva, E., Pineda, E., Zepeda-Rodríguez, A., Belmont-Díaz, J., ... Moreno-Sánchez, R. (2015). Air-Adapted *Methanosarcina acetivorans* shows high methane production and develops resistance against oxygen stress. *PLoS one*, 10 (2), e0117331.
- Jeong, T. Y., Chung, H. K., Yeom, S. H., & Choi, S. S. (2009). Analysis of methane production inhibition for treatment of sewage sludge containing sulfate using an anaerobic continuous degradation process. *Korean J Chem Eng.*, 26 (5), 1319–1322.
- Jobe, T. O., Sung, D.-Y., Akmakjian, G., Pham, A., Komives, E. A., Mendoza-Cózatl, D. G., & Schroeder, J. I. (2012). Feedback inhibition by thiols outranks glutathione depletion: a luciferase-

- based screen reveals glutathione-deficient  $\gamma$ -ECS and glutathione synthetase mutants impaired in cadmium-induced sulfate assimilation. *Plant J.*, 70 (5), 783–795.
- Karhadkar, P. P., Audic, J.-M., Faup, G. M., & Khanna, P. (1987). Sulfide and sulfate inhibition of methanogenesis. *Water Res.*, 21 (9), 1061–1066.
- Karri, S., Sierra-Alvarez, R., & Field, J. (2006). Toxicity of copper to acetoclastic and hydrogenotrophic activities of methanogens and sulfate reducers in anaerobic sludge. *Chemosphere*, 62 (1), 121–127.
- Kaur, A., Pan, M., Meislin, M., Facciotti, M. T., El-Gewely, R., & Baliga, N. S. (2006). A systems view of haloarchaeal strategies to withstand stress from transition metals. *Gen Res.*, 16 (7), 841–854.
- Keasling, J. D., & Hupf, G. A. (1996). Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. *Appl Environ. Microbiol.*, 62 (2), 743–746.
- Kida, K., Shigematsu, T., Kijima, J., Numaguchi, M., Mochinaga, Y., Abe, N., & Morimura, S. (2001). Influence of  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  on methanogenic activity and the amounts of coenzymes involved in methanogenesis. *J Biosci Bioeng.*, 91 (6), 590–595.
- Kim, B. K., Conway de Macario, E., Nölling, J., & Daniels, L. (1996). Isolation and characterization of a copper-resistant methanogen from a copper-mining soil sample. *Appl Environ Microbiol.*, 62 (7), 2629–2635.
- Kohler, P. R. A., & Metcalf, W. W. (2012). Genetic manipulation of *Methanosarcina* spp. *Front Microbiol.*, 3, 259.
- Kolaj-Robin, O., Russell, D., Hayes, K. A., Pembroke, J. T., & Soulimane, T. (2015). Cation Diffusion Facilitator family: Structure and function. *FEBS Letters*, 589 (12), 1283–1295.
- Kornberg, A., Rao, N. N., & Ault-Riché, D. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu Rev Biochem.*, 68 (1), 89–125.
- Kulaev, I., Vagabov, V., & Kulakovskaya, T. (1999). New aspects of inorganic polyphosphate metabolism and function. *J Biosci Bioeng.*, 88 (2), 111–129.
- Lapaglia, C., & Hartzell, P. L. (1997). Stress-induced production of biofilm in the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Appl Environ Microbiol.*, 63 (8), 3158–3163.
- Lattuati, A., Guezennec, J., Metzger, P., & Largeau, C. (1998). Lipids of *Thermococcus hydrothermalis*, an archaea isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Lipids*, 33 (3), 319–326.
- Lee, J. W., Kwon, K. K., Bahk, J. J., Lee, D. H., Lee, H. S., Kang, S. G., & Lee, J. H. (2016). Metagenomic analysis reveals the contribution of anaerobic methanotroph-1b in the oxidation of methane at the Ulleung Basin, East Sea of Korea. *J. Microbiol.*, 54 (12), 814–822.
- Li, C., & Fang, H. H. P. (2007). Inhibition of heavy metals on fermentative hydrogen production by granular sludge. *Chemosphere*, 67 (4), 668–673.
- Li, L., Li, Q., Rohlin, L., Kim, U., Salmon, K., Rejtar, T., ... Ferry, J. G. (2007). Quantitative proteomic and microarray analysis of the archaeon *Methanosarcina acetivorans* grown with acetate versus methanol. *J Proteome Res.*, 6 (2), 759–771.
- Li, Q., Li, L., Rejtar, T., Lessner, D. J., Karger, B. L., & Ferry, J. G. (2006). Electron transport in the pathway of acetate conversion to methane in the marine archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *J Bacteriol.*, 188(2), 702–710.
- Lin, C.-Y., & Chen, C.-C. (1999). Effect of heavy metals on the methanogenic UASB granule. *Water Res.*, 33 (2), 409–416.
- Lins, P., Reitschuler, C., & Illmer, P. (2014). *Methanosarcina* spp., the key to relieve the start-up of a thermophilic anaerobic digestion suffering from high acetic acid loads. *Bioresour Technol.*, 152, 347–354.

- Lira-Silva, E., Ramírez-Lima, I. S., Olín-Sandoval, V., García-García, J. D., García-Contreras, R., Moreno-Sánchez, R., & Jasso-Chávez, R. (2011). Removal, accumulation and resistance to chromium in heterotrophic *Euglena gracilis*. *J. Hazard Mater.*, *193*, 216–224.
- Lira-Silva, E., Santiago-Martínez, M. G., García-Contreras, R., Zepeda-Rodríguez, A., Marín-Hernández, A., Moreno-Sánchez, R., & Jasso-Chávez, R. (2013). Cd<sup>2+</sup> resistance mechanisms in *Methanosarcina acetivorans* involve the increase in the coenzyme M content and induction of biofilm synthesis. *Environ Microbiol Rep.*, *5* (6), 799–808.
- Lira-Silva, E., Santiago-Martínez, M. G., Hernández-Juárez, V., García-Contreras, R., Moreno-Sánchez, R., & Jasso-Chávez, R. (2012). Activation of methanogenesis by cadmium in the marine archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *PLoS One*, *7* (11), e48779.
- Liu, Y., & Whitman, W. B. (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic Archaea. *Ann NY Acad Sci.*, *1125* (1), 171–189.
- López-Bucio, J., Hernández-Madrigal, F., Cervantes, C., Ortiz-Castro, R., Carreón-Abud, Y., & Martínez-Trujillo, M. (2014). Phosphate relieves chromium toxicity in *Arabidopsis thaliana* plants by interfering with chromate uptake. *BioMetals*, *27* (2), 363–370.
- Lou, L. Q., Ye, Z. H., Lin, A. J., & Wong, M. H. (2010). Interaction of arsenic and phosphate on their uptake and accumulation in chinese Brake Fern. *Int J Phytoremediation.*, *12* (5), 487–502.
- Lundie, L. L., & Ferry, J. G. (1989). Activation of acetate by *Methanosarcina thermophila*. Purification and characterization of phosphotransacetylase. *J Biol Chem.*, *264* (31), 18392–18396.
- Lurie-Weinberger, M. N., & Gophna, U. (2015). Archaea in and on the human body: health implications and future directions. *PLoS Pathog* *11*(6), e1004833.
- Macauley, S. R., Zimmerman, S. A., Apolinario, E. E., Evilia, C., Hou, Y. M., Ferry, J. G., & Sowers, K. R. (2009). The archetype gamma-class carbonic anhydrase (Cam) contains iron when synthesized in vivo. *Biochemistry*, *48* (5), 817–819.
- Malki, L., Yanku, M., Borovok, I., Cohen, G., Mevarech, M., & Aharonowitz, Y. (2009). Identification and characterization of gshA, a gene encoding the glutamate-cysteine ligase in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *J Bacteriol.*, *191* (16), 5196–5204.
- Mangold, S., Potrykus, J., Björn, E., Lövgren, L., & Dopson, M. (2013). Extreme zinc tolerance in acidophilic microorganisms from the bacterial and archaeal domains. *Extremophiles*, *17* (1), 75–85.
- Martens, W., & Böhm, R. (2009). Overview of the ability of different treatment methods for liquid and solid manure to inactivate pathogens. *Bioresour Technol.*, *100* (22), 5374–5378.
- Martín-González, L., Colturato, L. F., Font, X., & Vicent, T. (2010). Anaerobic co-digestion of the organic fraction of municipal solid waste with FOG waste from a sewage treatment plant: Recovering a wasted methane potential and enhancing the biogas yield. *Waste Manag.*, *30* (10), 1854–1859.
- Maupin-Furlow, J., & Ferry, J. G. (1996). Characterization of the cdhD and cdhE genes encoding subunits of the corrinoid/iron-sulfur enzyme of the CO dehydrogenase complex from *Methanosarcina thermophila*. *J Bacteriol.*, *178* (2), 340–346.
- McCarthy, S., Ai, C., Wheaton, G., Tevatia, R., Eckrich, V., Kelly, R., & Blum, P. (2014). Role of an archaeal PitA transporter in the copper and arsenic resistance of *Metallosphaera sedula*, an extreme thermoacidophile. *J Bacteriol.*, *196* (20), 3562–3570.
- Mendoza-Cózatl, D., Loza-Tavera, H., Hernández-Navarro, A., & Moreno-Sánchez, R. (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol Rev.*, *29* (4), 653–671.

- Metcalfe, W. W., Zhang, J. K., Apolinario, E., Sowers, K. R., & Wolfe, R. S. (1997). A genetic system for Archaea of the genus *Methanosarcina*: liposome-mediated transformation and construction of shuttle vectors. *Proc Natl Acad Sci USA*, *94* (6), 2626–2631.
- Michalke, K., Wickenheiser, E. B., Mehring, M., Hirner, A. V., & Hensel, R. (2000). Production of volatile derivatives of metal(loid)s by microflora involved in anaerobic digestion of sewage sludge. *Appl Environ Microbiol.*, *66* (7), 2791–2796.
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Jasso-Chávez, R., Saavedra, E., & García-García, J. D. (2017). Biochemistry and physiology of heavy metal resistance and accumulation in *Euglena*. In *Adv Exp Med Biol.* (Vol. 979, pp. 91–121).
- Moreno-Sánchez, R., Saavedra, E., Rodríguez-Enríquez, S., and Olín-Sandoval, V. (2008). Metabolic control analysis: a tool for designing strategies to manipulate metabolic pathways. *J Biomed Biotechnol.*, 597913.
- Mori, K., Hatsu, M., Kimura, R., & Takamizawa, K. (2000). Effect of heavy metals on the growth of a methanogen in pure culture and coculture with a sulfate-reducing bacterium. *J Biosci Bioeng.*, *90* (3), 260–265.
- Mosey, F. E., & Fernandes, X. A. (1989). Patterns of hydrogen in biogas from the anaerobic digestion of milk-sugars. *Water Sci. Technol*, *21* (4–5), 187-196.
- Nieboer, E., & Richardson, D. H. S. (1980). The replacement of the nondescript term “heavy metals” by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ Pollut B*, *1* (1), 3–26.
- Nies, D. H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.*, *27* (2–3), 313–339.
- O’Flaherty, V., Lens, P., Leahy, B., & Colleran, E. (1998). Long-term competition between sulphate-reducing and methane-producing bacteria during full-scale anaerobic treatment of citric acid production wastewater. *Water Res.*, *32* (3), 815–825.
- Orphan, V. J., House, C. H., Hinrichs, K. U., McKeegan, K. D., & DeLong, E. F. (2002). Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proc Natl Acad Sci USA*, *99* (11), 7663–7668.
- Pal, R., & Rai, J. P. N. (2010). Phytochelatins: peptides involved in heavy metal detoxification. *Appl Biochem Biotechnol.*, *160* (3), 945–963.
- Park, C. B., Bega, A., Unlu, C., Chadderton, R. A., McKean, W. R., Kohl, P. M., ... Duran, M. (2010). Acetoclastic methanogens in an anaerobic digester could be susceptible to trace metal supplementation. *Water Sci Technol.*, *62* (12), 2905–2911.
- Park, H., Song, B., & Morel, F. M. M. (2007). Diversity of the cadmium-containing carbonic anhydrase in marine diatoms and natural waters. *Environ Microbiol.*, *9* (2), 403–413.
- Paulsen, I. T., & Saier Jr., M. H. (1997). A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J Membr Biol.*, *156* (2), 99–103.
- Producción de biogás, energía eléctrica y fertilizante a partir del nopal. (2017). Cofupro.org.mx. 24 abril 2017, de [http://www.cofupro.org.mx/cofupro/cofupro\\_web.php?idseccion=1910](http://www.cofupro.org.mx/cofupro/cofupro_web.php?idseccion=1910)
- Rademacher, A., Zakrzewski, M., Schlüter, A., Schönberg, M., Szczepanowski, R., Goesmann, A., ... Klocke, M. (2012). Characterization of microbial biofilms in a thermophilic biogas system by high-throughput metagenome sequencing. *FEMS Microbiol Ecol.*, *79*(3), 785–799.
- Remonsellez, F., Orell, A., & Jerez, C. A. (2006). Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism. *Microbiology*, *152*(1), 59–66.

- Rother, M., & Metcalf, W. W. (2004). Anaerobic growth of *Methanosarcina acetivorans* C2A on carbon monoxide: an unusual way of life for a methanogenic archaeon. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, *101*(48), 16929–34.
- Saavedra, E., Rodríguez-Enríquez, S., Quezada, H., Jasso-Chávez, R., & Moreno-Sánchez, R. (2011). 1.38 – Rational design of strategies based on metabolic control analysis. In *Comprehensive Biotechnology* (pp. 511–524).
- Sandana Mala, J. G., Sujatha, D., & Rose, C. (2015). Inducible chromate reductase exhibiting extracellular activity in *Bacillus methylotrophicus* for chromium bioremediation. *Microbiol Res.*, *170*, 235–241.
- Sarioglu, M., Akkoyun, S., & Bisgin, T. (2010). Inhibition effects of heavy metals (copper, nickel, zinc, lead) on anaerobic sludge. *Desalination Water Treat.*, *23* (1–3), 55–60.
- Sarkar, A., Sar, P., & Islam, E. (2016). Hexavalent chromium reduction by *Microbacterium oleivorans* A1: A possible mechanism of chromate -detoxification and -bioremediation. *Recent Pat Biotechnol.*, *9* (2), 116–129.
- SEISA. (2017). Seisa.com.mx. 24 abril 2017
- Scheller, S., Goenrich, M., Boecher, R., Thauer, R. K., & Jaun, B. (2010). The key nickel enzyme of methanogenesis catalyses the anaerobic oxidation of methane. *Nature*, *465* (7298), 606–608.
- Schlegel, K., Leone, V., Faraldo-Gómez, J. D., & Müller, V. (2012). Promiscuous archaeal ATP synthase concurrently coupled to Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> translocation. *Proc Natl Acad Sci USA*, *109* (3), 947–952.
- Schlegel, K., Welte, C., Deppenmeier, U., & Müller, V. (2012). Electron transport during acetoclastic methanogenesis by *Methanosarcina acetivorans* involves a sodium-translocating Rnf complex. *FEBS J.*, *279* (24), 4444 - 4452.
- Sillén, L. G., Martell, A. E., Högfeldt, E., & Perrin, D. D. (1971). Stability constants of metal-ion complexes. Supplement (pp. 179-656). Chemical Society.
- Simianu, M., Murakami, E., Brewer, J. M., & Ragsdale, S. W. (1998). Purification and properties of the heme- and iron-sulfur-containing heterodisulfide reductase from *Methanosarcina thermophila*. *Biochemistry*, *37* (28), 10027–10039.
- Singh-Wissmann, K., & Ferry, J. G. (1995). Transcriptional regulation of the phosphotransacetylase-encoding and acetate kinase-encoding genes (Pta and Ack) from *Methanosarcina thermophila*. *J Bacteriol.*, *177* (7), 1699–1702.
- Singh, R., Dong, H., Liu, D., Zhao, L., Marts, A. R., Farquhar, E., ... Briggs, B. R. (2015). Reduction of hexavalent chromium by the thermophilic methanogen *Methanothermobacter thermoautotrophicus*. *Geochim Cosmochim Acta*, *148*, 442–456.
- Slaughter, D. C., Macur, R. E., & Inskip, W. P. (2012). Inhibition of microbial arsenate reduction by phosphate. *Microbiol Res.*, *167* (3), 151–156.
- Sochor, J., Zitka, O., Hynek, D., Jilkova, E., Krejcová, L., Trnkova, L., ... Kizek, R. (2011). Bio-sensing of cadmium (II) ions using *Staphylococcus aureus*. *Sensors*, *11* (11), 10638–10663.
- Sowers, K. R. (1995). Methanogens: growth and identification. In F. T. Robb, K. R. Sowers, S. DasSharma, A. R. Place, H. J. Schreier, & E. M. Fleischmann (Eds.), *Archaea: a laboratory manual* (pp. 200–245). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sowers, K. R., Baron, S. F., & Ferry, J. G. (1984). *Methanosarcina acetivorans* sp. nov., an acetotrophic methane-producing bacterium isolated from marine sediments. *Appl Environ Microbiol.*, *47* (5), 971–978.

- Spada, S., Pembroke, T. J., & Wall, G. J. (2002). Isolation of a novel *Thermus thermophilus* metal efflux protein that improves *Escherichia coli* growth under stress conditions. *Extremophiles*, 6 (4), 301–308.
- Sprott, G. D., & Patel, G. B. (1986). Ammonia toxicity in pure cultures of methanogenic bacteria. *System Appl Microbiol.*, 7 (2–3), 358–363.
- Sterritt, R. M., & Lester, J. N. (1980). Interactions of heavy metals with bacteria. *Sci. Total Environ.*, 14 (1), 5–17.
- Suharti, S., Wang, M., de Vries, S., & Ferry, J. G. (2014). Characterization of the RnfB and RnfG subunits of the Rnf complex from the archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *PloS One*, 9 (5), e97966.
- Tanaka, Y., Tsumoto, K., Nakanishi, T., Yasutake, Y., Sakai, N., Yao, M., ... Kumagai, I. (2004). Structural implications for heavy metal-induced reversible assembly and aggregation of a protein: the case of *Pyrococcus horikoshii* CutA. *FEBS Lett.*, 556 (1–3), 167–174.
- Thauer, R. K. (1998). Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology*, (9), 2377–2406.
- Thauer, R. K., Kaster, A. K., Seedorf, H., Buckel, W., & Hedderich, R. (2008). Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat Rev Microbiol.*, 6 (8), 579–591.
- Triantafyllou, K., Chang, C., & Pimentel, M. (2014). Methanogens, methane and gastrointestinal motility. *J. Neurogastroenterol Motil*, 20 (1), 31–40.
- Tuo, Y., Cai, J., Zhu, D., Zhu, Y., Liu, G., Hua, Y., & He, J. (2014). Effect of Zn<sup>2+</sup> on the performances and methanogenic community shifts of UASB reactor during the treatment of Swine wastewater. *Water Air Soil Pollut.*, 225 (6), 1996.
- Utgikar, V. P., Tabak, H. H., Haines, J. R., & Govind, R. (2003). Quantification of toxic and inhibitory impact of copper and zinc on mixed cultures of sulfate-reducing bacteria. *Biotechnol. Bioeng.*, 82 (3), 306–312.
- Veiga, M. C., Jain, M. K., Wu, W., Hollingsworth, R. I., & Zeikus, J. G. (1997). Composition and role of extracellular polymers in methanogenic granules. *Appl Environ Microbiol.*, 63 (2), 403–407.
- Vera, M., Schippers, A., & Sand, W. (2013). Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation-part A. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 97 (17), 7529–7541.
- Vorholt, J. A., Vaupel, M., & Thauer, R. K. (1996). A polyferredoxin with eight [4Fe-4S] clusters as a subunit of molybdenum formylmethanofuran dehydrogenase from *Methanosarcina barkeri*. *Eur J Biochem.*, 236 (1), 309–317.
- Wang, M., Tomb, J. F., & Ferry, J. G. (2011). Electron transport in acetate-grown *Methanosarcina acetivorans*. *BMC Microbiol.*, 11 (1), 165.
- Wani, P. A., Khan, M. S., & Zaidi, A. (2012). Toxic effects of heavy metals on germination and physiological processes of plants. In *Toxicity of Heavy Metals to Legumes and Bioremediation* (pp. 45–66). Vienna: Springer Vienna.
- Welte, C., & Deppenmeier, U. (2014). Bioenergetics and anaerobic respiratory chains of acetate-utilizing methanogens. *Biochim Biophys Acta*, 1837 (7), 1130–1147.
- Welte, C., Kröninger, L., & Deppenmeier, U. (2014). Experimental evidence of an acetate transporter protein and characterization of acetate activation in acetate-utilizing methanogenesis of *Methanosarcina mazei*. *FEMS Microbiol Lett.*, 359 (2), 147–153.
- Whitman, W. B., & Wolfe, R. S. (1980). Presence of nickel in factor F<sub>430</sub> from *Methanobacterium bryantii*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 92 (4), 1196–1201.

- Wirth, R., Kovács, E., Maróti, G., Bagi, Z., Rákhely, G., Kovács, K. L., & Hu, K. (2012). Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnol Biofuels.*, *5*(1), 41-57.
- Williams, T. A., Foster, P. G., Cox, C. J., & Embley, T. M. (2013). An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. *Nature*, *504*, 231-236.
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc Natl Acad Sci USA*, *87* (12), 4576–4579.
- Yu, H. Q., & Fang, H. H. P. (2001). Inhibition by chromium and cadmium of anaerobic acidogenesis. *Water Sci Technol*, *43* (11), 267-274.
- Yue, Z. B., Yu, H. Q., & Wang, Z. L. (2007). Anaerobic digestion of cattail with rumen culture in the presence of heavy metals. *Bioresour Technol.*, *98* (4), 781–786.
- Zayed, G., & Winter, J. (2000). Inhibition of methane production from whey by heavy metals - protective effect of sulfide. *Appl Microbiol Biotechnol.*, *53* (6), 726–731.
- Zarafeta, D., Kissas, D., Sayer, C., Gudbergdottir, S. R., Ladoukakis, E., Isupov, M. N., ... Kollis, F. N. (2016). Discovery and characterization of a thermostable and highly halotolerant GH5 cellulase from an Icelandic hot spring isolate. *PloS One*, *11* (1), e0146454.
- Zhang, G. L., Yang, F. G., Zhao, Y. G., Zhao, W. J., Yang, J. L., & Gong, Z. T. (2005). Historical change of heavy metals in urban soils of Nanjing, China during the past 20 centuries. *Environ. Int.*, *31* (6), 913–919.
- Zhang, J. K., Pritchett, M. A., Lampe, D. J., Robertson, H. M., & Metcalf, W. W. (2000). *In vivo* transposon mutagenesis of the methanogenic archaeon *Methanosarcina acetivorans* C2A using a modified version of the insect mariner-family transposable element Himar1. *Proc Natl Acad Sci USA*, *97* (17), 9665–9670.
- Zhang, X. S., García-Contreras, R., Wood, T. K. (2007). YcfR (BhsA) influences *Escherichia coli* biofilm formation through stress response and surface hydrophobicity. *J. Bacteriol.*, *189* (8), 3051-3062.
- Zimmerman, S. A., Tomb, J.-F., & Ferry, J. G. (2010). Characterization of CamH from *Methanosarcina thermophila*, founding member of a subclass of the class of Carbonic Anhydrases. *J Bacteriol.*, *192* (5), 1353–1360.



## Anexos

### A. Artículos publicados

Los resultados mostrados en el capítulo 3, se publicaron en los siguientes artículos:

- **Lira-Silva E.**, Santiago-Martínez M.G., Hernández-Juárez V., García-Contreras R., Moreno-Sánchez R., Jasso-Chávez R. (2012). **Activation of methanogenesis by cadmium in the marine archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *PLoS One*, 7 (11):e48779. doi: 10.1371/journal.pone.0048779.**
- **Lira-Silva E.**, Santiago-Martínez M.G., García-Contreras R., Zepeda-Rodríguez A., Marín-Hernández A., Moreno-Sánchez R., Jasso-Chávez R. (2013). **Cd<sup>2+</sup> resistance mechanisms in *Methanosarcina acetivorans* involve the increase in the coenzyme M content and induction of biofilm synthesis. *Environ Microbiol Rep.* 5 (6):799-808. doi: 10.1111/1758-2229.12080.**

# Activation of Methanogenesis by Cadmium in the Marine Archaeon *Methanosarcina acetivorans*

Elizabeth Lira-Silva, M. Geovanni Santiago-Martínez, Viridiana Hernández-Juárez, Rodolfo García-Contreras, Rafael Moreno-Sánchez, Ricardo Jasso-Chávez\*

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Tlalpan, México D.F., México

## Abstract

*Methanosarcina acetivorans* was cultured in the presence of CdCl<sub>2</sub> to determine the metal effect on cell growth and biogas production. With methanol as substrate, cell growth and methane synthesis were not altered by cadmium, whereas with acetate, cadmium slightly increased both, growth and methane rate synthesis. In cultures metabolically active, incubations for short-term (minutes) with 10 μM total cadmium increased the methanogenesis rate by 6 and 9 folds in methanol- and acetate-grown cells, respectively. Cobalt and zinc but not copper or iron also activated the methane production rate. Methanogenic carbonic anhydrase and acetate kinase were directly activated by cadmium. Indeed, cells cultured in 100 μM total cadmium removed 41–69% of the heavy metal from the culture and accumulated 231–539 nmol Cd/mg cell protein. This is the first report showing that (i) Cd<sup>2+</sup> has an activating effect on methanogenesis, a biotechnological relevant process in the bio-fuels field; and (ii) a methanogenic archaea is able to remove a heavy metal from aquatic environments.

**Citation:** Lira-Silva E, Santiago-Martínez MG, Hernández-Juárez V, García-Contreras R, Moreno-Sánchez R, et al. (2012) Activation of Methanogenesis by Cadmium in the Marine Archaeon *Methanosarcina acetivorans*. PLoS ONE 7(11): e48779. doi:10.1371/journal.pone.0048779

**Editor:** Andy T. Y. Lau, Shantou University Medical College, China

**Received:** May 18, 2012; **Accepted:** October 1, 2012; **Published:** November 12, 2012

**Copyright:** © 2012 Lira-Silva et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The funding of the grants described in the manuscript (90619, 80534, 123636 and 156969 from CONACyT and # PICS08-S from ICyTDF, Mexico) were used for acquisition of lab materials, chemicals and small equipment. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** Co-author Rafael Moreno-Sánchez is a PLOS ONE Editorial Board member. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials. Also the authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: rjass\_cardiol@yahoo.com.mx

## Introduction

Methanogenesis is the pathway by which ion (H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>) gradients across the plasma membrane are generated to drive ATP synthesis, with the concomitant production of methane as an end product. Methanogens are strict anaerobes belonging to the *Archaea* domain, which can be found in a broad variety of environments such as anaerobic digesters of sewage treatment plants, landfills, rice paddies, lakes and in the sea sediments, among others [1]. Indeed, these organisms have an essential role in the global carbon cycle by transforming small carbon molecules such as methanol, methylamines, CO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>, formate, CO and acetate into methane. Because heavy metal pollution may develop in some of these habitats, methanogens may be exposed to this environmental stress with the consequent perturbation of the local ecology. Heavy metal pollution of water resources is now a widespread environmental and public health problem, as a result of their elevated toxicity, which may be exacerbated by their potential bio-magnification effect and accumulation throughout the ecological food webs.

Pollution of coastal zones by heavy metals such as Cd, Pb, Hg and Ni, is a major environmental problem in some regions of the world [2]. Once in the marine environment, these contaminants accumulate in sediments [3]. Cadmium ocean pollution and mobilization has increased exponentially up to 300 thousands per decade, where 40% of the total current pollution derives from anthropogenic activities [4]. In some coastal zones in the Gulf of Mexico, up to 2,550 μg L<sup>-1</sup> (22.6 μM) of cadmium has been found, a value far higher than permissible [5]. In other seas and

oceans around the world, cadmium concentrations up to 20.5 μg L<sup>-1</sup> and 18,400 μg g<sup>-1</sup> in waters and sediments, respectively, have been determined [4]. These cadmium pollution values highlight the importance of determining the toxicity of cadmium in organisms found in sediments, methanogens among them. Depending on the physicochemical environmental characteristics and microbial metabolism, heavy metal contaminants may be released from sediments back into the water. Under such situations, marine sediments may become a secondary source of pollution.

Most studies of microbial communities in the ocean have focused on bacterial diversity in marine sediments and the long-term impact brought about by heavy metals exposure [6]. There are few works about the toxic effect of heavy metals on methanogens in sludge [7] and laboratory strains [8,9]. Remarkably, it has been described that low concentrations of heavy metals are not toxic for methanogens in the sludge, but on the contrary they induce increased methane production [10]. This finding has not been further explored and hence the living components of the consortia affected by the metal have not been identified, and the biochemical mechanisms involved have not been elucidated. In the present work, the marine archaeon *Methanosarcina acetivorans* was used as a model to assess the effect of cadmium on methanogenesis.

## Materials and Methods

### Chemicals

Acetate kinase from *M. thermophila*, deoxyribonuclease I from bovine pancreas (DNase I), acetyl-CoA, coenzyme A, acetyl phosphate, ATP and NADH were purchased from Sigma Chem. (St. Louis, Mo, USA). Phosphoenolpyruvate, pyruvate kinase and NAD<sup>+</sup>-lactate dehydrogenase (both enzymes from rabbit muscle) were from ROCHE (Germany). Absolute methanol, acetate, and CdCl<sub>2</sub> were of analytical grade.

### Growth conditions

*Methanosarcina acetivorans* C2A strain, kindly provided by Prof. James G. Ferry (Pennsylvania State University, USA), was cultured under anoxic conditions in the regular high salt medium (HS-medium) described elsewhere [11]. Briefly, Milli Q water was placed into an anaerobic chamber (COY laboratory products, Grass Lake, Michigan, USA) filled up with 80% N<sub>2</sub>, 15% CO<sub>2</sub> and 5% H<sub>2</sub>. Then, the following salts were added, in g/L: NaCl, 25.4; NaHCO<sub>3</sub>, 3.8; KCl, 1.0; MgCl<sub>2</sub>, 11; CaCl<sub>2</sub>, 0.2; NH<sub>4</sub>Cl; 1.0 and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.27 and resazurin, 0.001% (w/v) as redox indicator. Vitamin and trace mineral solutions were both added at 1% (v/v) as reported by Sowers et al [12]. Medium was bubbled with the mix of gases describe above for 2–3 h. Next, 120 mM methanol or 100 mM acetate were added as carbon source, followed by 1 g cysteine-HCl (8.2 mM) and 0.25 g Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O (1.04 mM) to ensure complete chemical reduction of growth media. Final pH was 6.8–7.0. 50 mL of medium were poured into 100 mL serum-like bottles (Virmel, Mexico), sealed with a butyl rubber stopper (Virmel, Mexico) and secured with an aluminum crimp collar (Virmel, Mexico). Medium was autoclaved at 121°C for 30 min. After autoclaving a precipitate was formed in the culture media but disappeared after 24 h, approximately. Cultures were started by adding fresh cell inocula and further incubating at 37°C without shaking. Growth was determined by measuring changes in absorbance at 600 nm.

### Metabolites content determination

The concentration of the reduced cysteine and sulfide in the fresh medium was determined post column with DTNB (5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) by HPLC as described elsewhere [13]. Briefly, 1 mL of fresh medium was taken with a syringe from the anaerobic culture bottles and immediately filtered through a 0.45 µm (pore diameter) filter unit (Millex-HV, Millipore, Ireland) and injected (50 µL) into the HPLC apparatus. The concentration of thiol-groups was calculated by using the DTNB molar extinction coefficient of 13.6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Sulfide was also determined spectrophotometrically by the methylene blue formation as described by King and Morris [14] with some modifications: in 10 mL anaerobic bottles sealed with a butyl rubber stopper and secured with an aluminum crimp collar, 23.7 mM zinc acetate, 60 mM NaOH, 0.18 mM N,N-dimethyl-*p*-phenylenediamine (DMPD) dissolved in 5 N HCl and 0.1 mL of culture medium, or different amounts of sulfide, were added by using a syringe and mixed until homogeneity. Then, 2.8 mM FeCl<sub>3</sub> was added and incubated at room temperature for 30 min for color development (methylene blue formation). Final volume was 2.5 mL. Samples were measured at 670 nm under anoxic conditions in an anaerobic chamber. The sulfide content-absorbance relationship was linear up to 350 nmol.

Methane production and methanol were determined by gas chromatography (Shimadzu GC2010 apparatus), equipped with a capillary column HP-PLLOT/U of 30 m length, 0.32 mm I.D. and 10 µm film (Agilent, USA) and flame ionization detector. Methane

standard curve was carried out as reported by Sowers [12]. For determination of extracellular acetate, aliquots withdrawn from cell cultures with acetate were centrifuged. Samples of the cell-free supernatant were diluted with a buffer containing 50 mM Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid) at pH 7.5. The mixture reaction assay also contained 5 mM ATP, 2 mM phosphoenolpyruvate, 0.25 mM NADH, and acetate kinase, pyruvate kinase and lactate dehydrogenase, which were added in excess (>5 U, each) to ensure the complete phosphorylation of acetate coupled to NADH oxidation.

### 2.4 Cadmium exposure

To determine the effect of cadmium on growth, acetate and methanol cultures were carried out in the presence of different total CdCl<sub>2</sub> concentrations (0, 1, 10, 25, 50 and 100 µM) and the optical density was determined at 600 nm. Such range of cadmium concentrations has been reported to be toxic for a broad range of microorganisms from fresh [15] and marine waters [16].

To determine the effect of cadmium on methane biosynthesis, metabolically active cell cultures in the early stationary growth phase with acetate (at the 10–12 day of culture, with 8 mM of remaining acetate) or methanol (at the 3–4 day of culture, with 5 mM remaining methanol), respectively, were initially subjected to depletion of methane formed by gassing the culture bottles with sterile N<sub>2</sub>. Thereafter, 1, 10 or 100 µM total CdCl<sub>2</sub> or other heavy metals (Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup>) were added to the cultures and methane production was determined from the head space at different short times up to 12 min. For longer periods of methane synthesis (up to 60 min) in the presence of Cd<sup>2+</sup>, 20 mM acetate was further supplemented to the incubation medium.

### 2.5 Enzyme activity assays

Cell cultures of 750 mL grown on acetate were harvested under anoxic conditions in the early stationary phase by centrifuging at 3,000× g for 10 min and washed once with 4 volumes of a solution containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.02 mM ZnCl<sub>2</sub>. Then, the cell pellet was re-suspended in lysis buffer (0.1 M Na-phosphate, pH 8.0 plus some grains of DNase I), stirred strongly for 5 min and centrifuged at 70,000× g for 30 min. The supernatant (cytosolic fraction; yield 50–100 mg protein) was kept on ice and used immediately for enzyme activities determination. All activities (except for carbonic anhydrase) were determined in the direction of acetate degradation in 50 mM Na<sub>2</sub>-Hepes and 10 mM MgCl<sub>2</sub> buffer at pH 7.0 and 27±2°C, in the presence of different CdCl<sub>2</sub> concentrations. In all cases, the reaction assay was started by adding the enzyme (*i.e.* the cytosol-enriched fraction).

Acetate kinase (AK) activity was determined in cytosolic enriched-fractions of 50–75 µg protein in a reaction medium that also contained 5 mM ATP, 20 mM acetate, 0.2 mM NADH, 2 mM phosphoenol pyruvate and 10 U of both, pyruvate kinase and lactate dehydrogenase. One unit of enzyme (U) is the amount of active enzyme required to transform/produce 1 µmol of substrate/product in 1 min. Phosphotransacetylase (Pta) activity was determined as follows: 3–5 µg of cytosolic protein were incubated in the Hepes-Mg buffer with 5 mM acetyl-phosphate and 160 µM CoA; aliquots were withdrawn at different times (from 5 up to 60 s), mixed with 0.1 M phosphate buffer and 1 mM DTNB and the reaction monitored at 412 nm (representative traces are shown in figure S1).

CODH/acetylCoA synthase activity (CODH/AcCoAs) was determined anaerobically by mixing 10–25 µg protein with 80 µM

acetyl-CoA and measuring the release of CoA with DTNB at 412 nm. As several different enzymes may release CoA from acetyl-CoA, this activity was also specifically determined by measuring the CO-dependent reduction of methyl viologen as reported elsewhere [12]. Briefly, in an anaerobic sealed bottle the Hepes-Mg buffer +0.5 mM methyl viologen was saturated with CO by bubbling the gas for 30 min (reaction mixture); then, 1.2 mL of reaction mixture was poured into a sealed glass cuvette previously purged with CO. The reaction was started by adding 50 µg of protein and followed at 603 nm. As control of the CODH/AcCoAs activity, the cytosolic fraction was gently mixed with air for 10 min, with the remaining activity being lower than 53% (n = 2) of that determined with saturating CO or acetyl-CoA (representative trace is shown in figure S2). Also, 0.5 mM sodium cyanide inhibited the reduction of methyl viologen coupled to CO oxidation by 85±8% (n = 3) as reported previously for the enzyme from *M. thermophila* [17].

Carbonic anhydrase (CA) activity was determined by incubating 2.5–5 µg of cytosolic protein with 100 mM Na-bicarbonate in a sealed 10 mL bottle with rubber stopper. To detect the CO<sub>2</sub> formation, 5 µL of the head space was taken and injected at different times (0, 30, 60 and 120 s) in a gas chromatograph equipped with a Thermal Conductivity Detector. CO<sub>2</sub> formed in assay reaction buffer without enzyme and with boiled enzyme was subtracted from the CO<sub>2</sub> formed with enzyme (representative traces are shown in figures S3 and S4).

2.6 Cadmium removal and accumulation

Cells were harvested and washed as indicated above with 200 volumes of a solution containing 50 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> and 2 mM EGTA (TME buffer) at pH 7.5; the pellet was re-suspended in fresh buffer to give 5–10 mg protein/mL and frozen at -70°C until use. Aliquots of the cell suspension were digested with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+HNO<sub>3</sub> (1:3) for 2 h at 100°C and the intracellular cadmium content determined by atomic absorption spectrophotometry (Varian Spectra AA 640).

2.7 Ultrastructure analysis

Methanol-grown cells with or without 100 µM CdCl<sub>2</sub> were fixed by immersion in glutaraldehyde (3%, v/v, in phosphate buffer, pH 7.4), after removal from the culture medium, and dehydrated in graded ethanol. Samples of 1 mm<sup>2</sup> containing the cells were cut out in cross section with a diamond knife and embedded in 1:1 epoxy resin. To determine cadmium and sulfur localization inside the cells, atomic-resolution high angle annular dark-field scanning-transmission electron microscopy (HAADF-STEM) was used as reported previously [18].

The protein content was determined after cells were washed once with TME buffer by the Biuret method with bovine serum albumin as standard as described previously [13]. For the statistical analysis of the data, the Student's t-test or a two way ANOVA and Bonferroni post analyses were performed using the Graph Pad PRISM version 5.01 software.

Results and Discussion

Cadmium solubility and effect on cell growth

Because cysteine and sulfide present in the culture medium bind the cadmium added with high affinity, the soluble free Cd<sup>2+</sup> concentrations were estimated (see Table I) by using the program Chelator [19] and the following physico-chemical conditions. The concentration of the reduced cysteine and sulfide in the medium determined experimentally were for cysteine 1.7±0.03 mM and for sulfide 1.21±0.4 and 0.95±0.03 mM as determined by HPLC

Table 1. Methane production and cadmium accumulation in *M. acetivorans* cultured on acetate or methanol.

| Total [CdCl <sub>2</sub> ]<br>µM | Estimated Free<br>[Cd <sup>2+</sup> ] pM | mg of total protein/culture |          | Methane produced mmol/240 h<br>(acetate) or 96 h (methanol) |           | Cd removed and accumulated nmol/total<br>cell protein |                       | % of cadmium removed<br>240 h (acetate) or 96 h (methanol) |          |
|----------------------------------|--|-----------------------------|----------|---|-----------|---|-----------------------|--|----------|
|                                  |  | acetate                     | methanol | acetate   | methanol  | Acetate   | Methanol              | acetate  | Methanol |
| 0                                | 0  | 5.2±1.04                    | 10.2±3   | 4.5±0.3   | 4.1±0.13  | 0±0   | 0±0                   | 0±0  | 0±0      |
| 1                                | 2.1                                      | 5.8±0.4                     | 9.6±3.2  | 4.4±0.5   | 4.08±0.03 | 8.3±4.7   | 10.8±6                | 16±4 <sup>a</sup>  | 22±13    |
| 10                               | 21.4                                     | 5.6±0.1                     | 8.9±1.9  | 4.5±0.27  | 4.1±0.03  | 40±10   | 99±20                 | 8±2 <sup>c</sup>   | 30±23    |
| 25                               | 54                                       | 5.1±1.5                     | 7.9±1.5  | 4.6±0.2   | 4.3±0.1   | 475±109   | 459±220               | 38±9   | 36±18    |
| 50                               | 109                                      | 5.9±0.6                     | 9.6±3.8  | 4.6±0.2   | 4.1±0.03  | 1387±225  | 940±326 <sup>b</sup>  | 55±9   | 38±23    |
| 100                              | 226                                      | 6.4±0.1                     | 8.9±2.5  | 4.7±0.3   | 4.1±0.02  | 3453±1430 <sup>b</sup>                                | 2054±929 <sup>b</sup> | 69±35  | 41±20    |

Data shown were obtained from cell cultures at the end of the growth curve. Values are the mean ± SD of at least 4 cultures from different batches.

<sup>a</sup>: p<0.05 vs acetate-grown cells at any other concentration of cadmium;

<sup>b</sup>: p<0.05 vs methanol-grown cells at any other concentration of cadmium;

<sup>c</sup>: acetate-grown cells vs 25, 50 and 100 µM cadmium, using the Student's t-test.

doi:10.1371/journal.pone.0048779.t001

(DTNB) and spectrophotometrically (methylene blue), respectively (mean  $\pm$  SE,  $n=4$ ); the ionic strength = 0.77, pH = 7.0 and temperature = 36°C. The  $\log$  values of the equilibrium constants ( $K_{eq}$ ) for the association of the complexes were 13.4 and 20.13 for Cys-cadmium and Cys-Cd-Cys, and 6.1 for sulfide-cadmium [20].

Cells cultured on methanol showed similar growth either in the absence or presence of up to 100  $\mu\text{M}$  total  $\text{CdCl}_2$  (Fig. 1A and inset). With acetate, growth was slightly faster in cultures with 100  $\mu\text{M}$  cadmium during the exponential phase (Fig. 1B and inset). To undoubtedly establish that the turbidity increase induced by cadmium was indeed reporting cell growth in acetate cultures, the growth rate (GR) and the duplication time (DT) were determined by using the curve of methane production *vs* time and assuming that methane production is proportional to the number of living cells present in the culture. The duplication times were similar to those reported previously for *M. acetivorans* [11]. No significant differences in GR values ( $0.064 \pm 0.003$  versus  $0.0625 \pm 0.003 \text{ h}^{-1}$ ) and DT values ( $10 \pm 2.3 \text{ h}$  versus  $11 \pm 2.7 \text{ h}$ ) were found for cells cultured in methanol without or with 100  $\mu\text{M}$  total  $\text{Cd}^{2+}$ . In contrast, in acetate cultures the GR value was significantly higher in cultures with 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  ( $0.028 \pm 0.004$  versus  $0.030 \pm 0.006 \text{ h}^{-1}$ ;  $n=5$ ,  $P<0.05$ ). DT did not significantly change ( $26 \pm 3$  versus  $24 \pm 2 \text{ h}$ ;  $n=5$ ) for cells cultured without or with 100  $\mu\text{M}$  Cd, respectively (Fig. 1). Furthermore, two way ANOVA analyses on the global data showed that cadmium exerted a positive effect on the growth curve with acetate but not with methanol as carbon source (Figs. 1C and 1D).

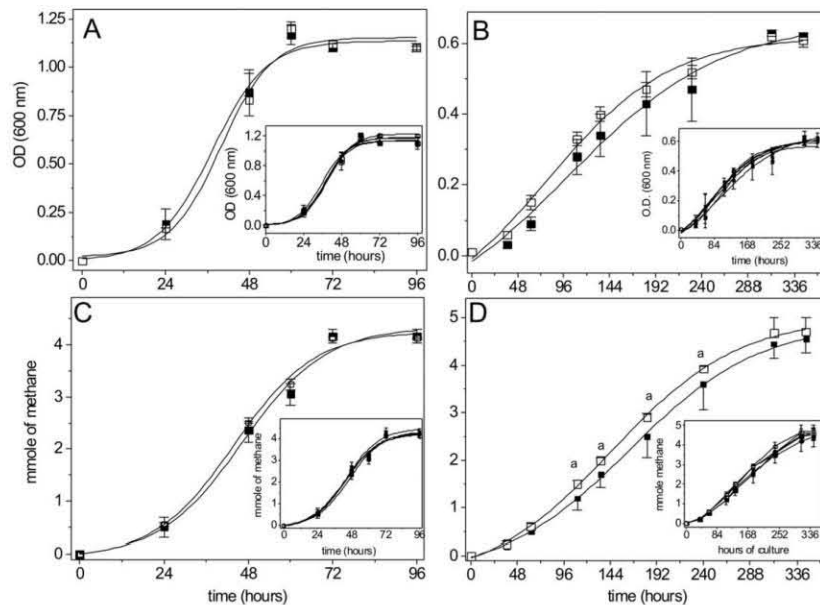
The rate of methane production in acetate cultures with 100  $\mu\text{M}$  total  $\text{CdCl}_2$  was slightly but significantly higher than in its

absence in the time-period from 110 up to 230 h of culture (Fig. 1D). It is worth noting that the methane yield, at the end of the growth curves (96 and 244 h for methanol and acetate, respectively), was the same under all conditions, because the total amount of carbon source added was identical (Table 1):  $4.1 \pm 0.13$  (control) and  $4.1 \pm 0.02$  mmol methane (+100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ ) for methanol and  $4.5 \pm 0.3$  (control) and  $4.7 \pm 0.3$  mmol methane (+100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ ) for acetate. On the other hand, when 500  $\mu\text{M}$  total  $\text{CdCl}_2$  was added to cultures with acetate or methanol as carbon source, no growth or methane synthesis were detected (data not shown) indicating that these high cadmium levels were indeed extremely toxic to the cells.

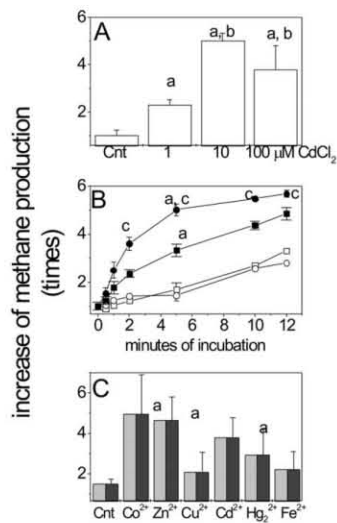
#### Effect of cadmium on methane synthesis

For short-term experiments, cultures of cells in the early stationary growth phase (10 days for acetate- and 4 days for methanol-grown cells) were incubated with  $\text{CdCl}_2$  at 25–27°C. The concentrations of acetate and methanol remaining in the cultures were  $8 \pm 3 \text{ mM}$  ( $400 \pm 150 \mu\text{mol}$  acetate;  $n=5$ ) and  $5 \pm 1 \text{ mM}$  ( $250 \pm 50 \mu\text{mol}$  methanol;  $n=5$ ), respectively. Under these conditions, cadmium exerted a remarkably stimulating effect on the synthesis of methane in control cells not previously exposed to  $\text{Cd}^{2+}$ ; the most potent activation was reached at 10  $\mu\text{M}$  total  $\text{CdCl}_2$  (Fig. 2A). Moreover, the rate of the methane production increased 9 and 6.5 fold for acetate- and methanol-grown cells, respectively, in 2 min (Fig. 2B).

After 10 min of incubation the methane produced, in the absence or presence of 10  $\mu\text{M}$  total  $\text{CdCl}_2$ , by stationary acetate-grown cells was  $18 \pm 3$  and  $26 \pm 4 \mu\text{mol}$  methane, and after 60 min



**Figure 1. Growth curves and methane synthesis of *M. acetivorans* cultured on methanol (A, C) or acetate (B, D), respectively, and in the absence (filled squares) or presence of 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  (open squares).** Values represent the mean  $\pm$  SD of at least 4 different cell batches. <sup>a</sup>:  $P<0.05$  vs control curve without cadmium using two way ANOVA. Inset; curves with 1 (filled circles), 10 (filled triangles), 25 (open squares) and 50 (open circles)  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ . doi:10.1371/journal.pone.0048779.g001



**Figure 2. Activation of methane synthesis by cadmium.** (A) 1, 10 and 100  $\mu\text{M}$  of  $\text{CdCl}_2$  were added and methane production was determined after 5 min in acetate-grown control cells. (B) Short-term methane synthesis in the absence (open symbols) or presence (filled symbols) of 10  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  in methanol- (■) and acetate-grown cells (●). These experiments were started after thoroughly purging the flasks and adding the indicated  $\text{CdCl}_2$  concentrations (time-point equal to zero). (C) Activation of methane synthesis by other heavy metals. Acetate-grown cells cultures were incubated for 5 min in the absence or presence of 100  $\mu\text{M}$  of the metals indicated. At  $t=0$  (before metal addition), the methane remaining in the bottle cultures was  $8.8 \pm 1.2$   $\mu\text{mol}$  methane *per* culture.  $P < 0.05$  using the Student's *t*-test for non-paired samples for <sup>a</sup> vs control (without cadmium or other metal ion); <sup>b</sup> vs cells exposed to 1  $\mu\text{M}$  cadmium; <sup>c</sup> vs methanol cultures exposed to cadmium. doi:10.1371/journal.pone.0048779.g002

was  $24 \pm 2$  and  $43 \pm 8$   $\mu\text{mol}$  methane, respectively (Fig. S5). Hence, the methane produced was the same regardless the carbon source concentration, sub-saturating or growth-limiting (8 mM acetate, Fig. 2B) for the 10 min experiments and saturating (20 mM acetate, Fig. S5) for the 60 min experiments.

Activation of methanogenesis was not exclusive for cadmium, since also 100  $\mu\text{M}$  of the essential trace metals  $\text{Co}^{2+}$  or  $\text{Zn}^{2+}$  had a similar effect, whereas  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{2+}$ , also essential trace metals, or  $\text{Hg}^{2+}$  were poor activators of the methane production (Fig. 2C).

These data suggested that the activation of methane production by cadmium was not due to the precipitation of sulfur that may be toxic for the cell, as copper, iron and mercury can also form complexes with sulfur; in fact, insoluble complexes were apparent with iron. A copper inhibitory effect was previously described for methanogenesis derived from anaerobic sludge digestion [10,21]. On this regard, a positive effect of pM concentrations cadmium on growth presumably due to activation of CA was reported for *Thalassiosira weissflogii*, a diatom that also comes from the marine habitat [22]. Interestingly, acetate-grown *M. acetivorans* cells have significant higher AK, Pta, CODH/AcCoAs and CA protein content than methanol-grown cells [23,24]. Hence, the influence of cadmium on enzymes activities from the upper part of the

aceticlastic pathway, which have not been previously determined in *M. acetivorans*, was here examined (Table 2).

AK activity was 10 fold lower (see legend to Table 2 for values) than that reported for the enzyme from *M. thermophila* [25]; the AK activity slightly increased (25–30%) by 10  $\mu\text{M}$  total cadmium. This cadmium activating effect is intriguing because no metal has been reported to be required for AK activity in *M. thermophila* [26]. Pta activity under our conditions was 15 times lower than that reported for the enzyme from *M. thermophila* [27], whereas the CODH/AcCoAs activity determined in the present work was 10 times higher than that reported for the enzyme from *M. thermophila* [17]. The last two enzymes were not activated by 0.01–10  $\mu\text{M}$  total  $\text{CdCl}_2$ , but they were rather partially inhibited (Table 2). With a novel strategy to determine CA activity which was based on measuring by gas chromatography the  $\text{CO}_2$  produced, the *M. acetivorans* CA showed a higher activity than that reported by semi-quantitative electrometric method at alkaline pH for the *M. thermophila* enzyme [28] and marked activation by 1–10  $\mu\text{M}$  total cadmium (Table 2).

*Methanosarcina* CA is promiscuous respect to the metal bound into its active centre, because the presence of zinc, cobalt and even iron has been reported for this enzyme in *M. thermophila* and *M. acetivorans* [29,30]. Indeed, the recombinant purified CA showed activity even with  $\text{Cd}^{2+}$  [31]; hence, cadmium might also be able to bind and activate CA *in vivo*. Thus, activation of CA and AK by cadmium may be involved in the higher methane production in acetate-grown cells. Another possible explanation for the stimulation of the methane production was that cadmium uncoupled the methanogenic pathway by collapsing the ion gradient across the plasma membrane. However, the total protein determined at the end of culture in cells grown with cadmium suggested that ATP content was not compromised. On the other hand, cadmium activation of methanogenesis suggested metal internalized into cells; hence, the cadmium removal from cultures by cells was determined.

#### Cadmium removal

Under our culture conditions, in which the cysteine and sulfide concentrations were high, the added micromolar  $\text{CdCl}_2$  concentrations yielded free  $\text{Cd}^{2+}$  concentrations in the pM range (Table 1). It is known that organic and inorganic sulfur may attenuate the toxicity of Cr(VI) in yeasts isolated from industrial wastes [32]. Hence, the low toxicity of cadmium in *M. acetivorans* may be due to the low free  $\text{Cd}^{2+}$  available in the medium. Nevertheless, cells surprisingly removed up to 70% and 40% of total added cadmium from the medium in the cultures with acetate or methanol, respectively (Table 1). In this regard, with 100  $\mu\text{M}$  added  $\text{CdCl}_2$ , an accumulation of 0.54 and 0.23  $\mu\text{mol}$  cadmium/mg cell protein (Table 1) was determined for acetate and methanol-grown cells, respectively, which were harvested after 10 or 4 days culture and washed once with an EGTA (*e.g.*, potent metal ion chelating agent)-containing buffer. The cell-free culture medium contained  $1.4 \pm 0.1$   $\mu\text{M}$  total cadmium. In turn,  $0.04 \pm 0.01$  and  $0.1 \pm 0.03$   $\mu\text{mol}$  total cadmium/mg cell protein were found in the supernatant after the EGTA-washing treatment in acetate- and methanol-grown cells, respectively (*i.e.*, adsorbed  $\text{Cd}^{2+}$  to the cell outer layers), revealing that most of the cadmium associated with the cells was indeed intra-cellularly trapped.

Due to the extremely low free  $\text{Cd}^{2+}$  concentration, it seems likely that the complexes formed between cadmium and sulfur compounds, and not the free  $\text{Cd}^{2+}$ , were the species that preferentially entered into cells (Table 1). To further demonstrate that cadmium was indeed inside the cells, methanol-grown cells cultured in 100  $\mu\text{M}$  total  $\text{CdCl}_2$  were prepared as previously

**Table 2.** Effect of cadmium on enzyme activities of the acetoclastic pathway upper part from *Methanosarcina acetivorans*.

| [CdCl <sub>2</sub> ] μM | Acetate kinase times | Phosphotranacetylase times | CODH/AcCoA synthase times |           | Carbonic anhydrase times |
|-------------------------|----------------------|----------------------------|---------------------------|-----------|--------------------------|
|                         |                      |                            | with Acetyl-CoA           | with CO   |                          |
| 0                       | 1                    | 1                          | 1                         | 1         | 1                        |
| 0.01                    | 1.38±0.27            | Not determined             | 1.0±0.1                   | 1.03±0.11 | 2.9±0.8 **               |
| 0.1                     | 1.35±0.18**          | Not determined             | 1.02±0.3                  | 0.66±0.21 | 4.9±3.2 *                |
| 1                       | 1.1±0.16             | 0.73±0.15                  | 0.98±0.18                 | 0.60±0.16 | 4.2±2.7 *                |
| 10                      | Not determined       | 0.77±0.17                  | 0.74±0.2                  | 0.5±0.16  | 1.7±0.8                  |
| 100                     | ND                   | 0.47±0.08                  | ND                        | ND        | ND                       |

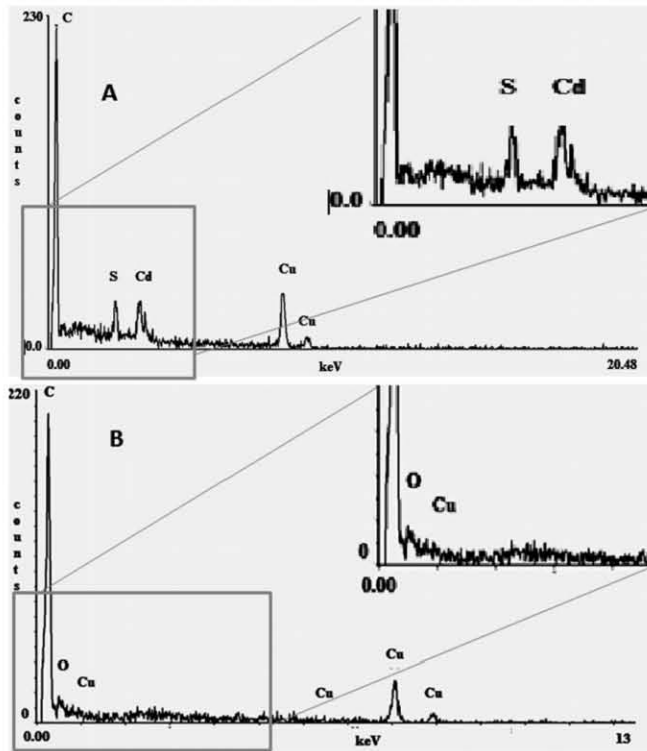
All activities were determined by using freshly prepared cytosolic fraction as described in the Methods section. Values are the mean ± SD of at least three independent preparations.

Control activities were for AK: 0.75±0.21 U/mg protein (n=4); for Pta: 1.48±0.8 U/mg protein (n=4); for CODH/AcCoA synthase with acetyl-CoA: 0.37 U±0.12 U/mg protein (n=5); and with CO: 0.68±0.11 U/mg protein (n=3); CA: 26±12 U/mg protein.

\*P<0.05 vs control for independent samples;

\*\*P<0.05 vs control for paired samples. ND: Not determined.

doi:10.1371/journal.pone.0048779.t002



**Figure 3. Identification of cadmium clusters in *M. acetivorans*.** Spectral analysis by HAADF-STEM from methanol-grown cells with 100 μM CdCl<sub>2</sub> (A) or without cadmium (B). C: carbon; O: oxygen; Cu: copper; S: sulfur; Cd: cadmium.  
doi:10.1371/journal.pone.0048779.g003



reported [18] for HAADF-STEM. Although the images were diffused (Fig. S6), high intracellular contents of electro-dense grains of cadmium and sulfur were definitively identified (Fig. 3). A similar accumulation profile has been reported for cobalt, where the complexes cobalt-chloride and cobalt-citrate are the forms that preferentially are retained in the granular sludge and affect methane production [33]. Such high capacity for cadmium removal in *M. acetivorans* suggests that this *Archaea* may have developed strategies to contend against heavy metals different to those reported for the eubacteria domain, which are mainly based on the extrusion of the metal by means of pumps that use ATP as motive force [34].

It has been documented that an excess of zinc, copper, or cobalt, all essential heavy metals, inhibit methanogenesis [9,31,35,36]. In contrast, cadmium seems to be less toxic for methanogenesis in the granular sludge [10], although the free metal concentration or the organic complexes formed were not described. In the present study the free  $Cd^{2+}$  concentration in the culture medium was estimated to be in the pM range. This suggested that *M. acetivorans* has very high affinity transporters for  $Cd^{2+}$  or that the metal ion may permeate the plasma membrane as a complex with the external cysteine and sulfur.

### Concluding remarks

Despite the very low concentration calculated of free  $Cd^{2+}$ , this non-essential heavy metal was able to activate a biological process, *i.e.*, methanogenesis in *M. acetivorans*, due in part to a direct activation of acetoclastic pathway enzymes. *M. acetivorans* removed and accumulated cadmium; hence, *M. acetivorans* may become a suitable model for studying the effect of heavy metals on marine methanogens and its mechanisms of heavy metal resistance in the *Archaea* domain. Moreover, further optimization of the enhanced methane production by cadmium, and other heavy metals, may place this process in the biotechnological leading frontier for generation of biogas.

### Supporting Information

**Figure S1 Activity of phosphotransacetylase from *M. acetivorans*.** An aliquot of the cytosolic fraction was incubated with the substrates acetyl-Pi and CoA in the absence (■) or presence of 0.1 (●), 1 (▲) or 10 (▼)  $\mu$ M total  $CdCl_2$ . In the absence of protein the CoA concentration remained constant (□). (TIF)

**Figure S2 CODH/AcCoAs complex activity from *M. acetivorans*;** representative traces of the activity by adding cytosolic fraction (containing the enzyme complex, ferredoxin and THMPT) and 80  $\mu$ M AcCoA. Representative trace with: 125 (□), 62 (x) and 25 (■)  $\mu$ g of cytosolic fraction without cadmium in the absence or presence of 0.01 (●), 0.1 (▲), 1 (▼) and 10  $\mu$ M total  $CdCl_2$  (◆). (TIF)

### References

- Ferry JG, Kestead KA (2007) Methanogenesis. In: *Archaea, Molecular and cellular biology* Ed. Ricardo Cavicchioli (ASM press), Washington, DC. USA. pp 100–123.
- Cesar A, Marin A, Marin-Guirao L, Vita R, Lloret J, et al (2009) Integrative ecotoxicological assessment of sediment in Portmán Bay (southeast Spain). *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 1832–1841.
- Gillan DC, Danis B, Pernet P, Joly G, Dubois P (2005) Structure of sediment-associated microbial communities along a heavy-metal contamination gradient in the marine environment. *Appl Environ Microbiol* 71: 679–690.
- Simpson WR (1981) A critical review of cadmium on marine environment. *Progr Oceanogr* 10: 1–70.
- Villanueva S, Alfonso V (1992) Heavy metals in the coastal zone from Gulf of Mexico and Mexican Caribbean: a review (Metales pesados en la zona costera

**Figure S3 Formation of  $CO_2$  by CA from *M. acetivorans*** in the absence (chromatogram A), or presence of 1  $\mu$ M  $CdCl_2$ . In chromatogram C, cytosolic fraction was previously heated. The different peaks shown represent consecutive sample injections at different times. It should be noted that y-scale is higher for chromatogram B. Under these conditions, CA activity was linear for at least 1 min (Fig. S4). Reverse reaction in turn, produced less reliable values by this method (not shown). (TIF)

**Figure S4 Activity of CA in the cytosolic fraction of *M. acetivorans*** in the absence (■) or presence of 0.01 (●), 0.1 (▲), 1 (▼) or 10  $\mu$ M total  $CdCl_2$  (◆). A representative data with heated cytosolic fraction in presence of 0.1  $\mu$ M  $CdCl_2$  is also shown (□). (TIF)

**Figure S5 Activation of methanogenesis by cadmium.** Cultures on acetate were purged by passing  $N_2$  for 5 min. Then, samples of the head space were withdrawn from the cultures at 0 and 5, 10, 20, 30 and 60 min of incubation with 0 (filled symbols) or 10  $\mu$ M  $CdCl_2$  (open symbols) for GC analysis. These experiments were started with the addition of 20 mM acetate. Values are the mean  $\pm$  SD of 3 independent cell preparations.  $P < 0.05$  using the Student's t-test for <sup>a</sup> vs control (without cadmium). (TIF)

**Figure S6 Intracellular cadmium clusters in *M. acetivorans*.** HAADF-STEM projection images of methanol-grown cells cultured in methanol in the absence (A) or in the presence of 100  $\mu$ M  $CdCl_2$  for 5 days (B). The image in B revealed cadmium grains along the cell (white spots). (TIF)

### Text S1 Methods and Results.

(DOCX)

### Acknowledgments

Authors thank Dr. Karla Carvajal-Aguilera for assistance in the statistical analysis. The authors also thank Patricia Bizarro Nevares (Academic technician) and Armando Zepeda Rodriguez (coordinator of the Laboratory of electron microscopy) from the Department of Cellular and Tissue Biology, University of Mexico for the preparation of the cell samples for the ultrastructure analysis, and to Physicist Roberto Hernández Reyes (Academic technician) for the electron microscopy X-ray analysis at the Physics Institute, University of Mexico.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RJC RMS. Performed the experiments: ELS MGSM VHJ RGC. Analyzed the data: RJC. Contributed reagents/materials/analysis tools: RJC. Wrote the paper: RJC RMS.

del Golfo de México y Caribe Mexicano: una revisión. *Red Rev Cient Amér Latin Carib Esp y Port* 8: 47–61 (Web page: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/HtmlRevRed.jsp?CveEntRev=370>. Accessed 2012 Oct 5).

- Toes AC, Finke N, Kuenen JG, Muyzer G (2008) Effects of deposition of heavy-metal-polluted harbor mud on microbial diversity and metal resistance in sandy marine sediments. *Arch Environ Contam Toxicol* 55: 372–385.
- Florencio L, Field JA, Lettinga G (1994) Importance of cobalt for individual trophic groups in an anaerobic methanol-degrading consortium. *Appl Environ Microbiol* 60: 227–234.
- Jarrell KF, Saulnier M, Ley A (1987) Inhibition of methanogenesis in pure cultures by ammonia, fatty acids, and heavy metals, and protection against heavy metal toxicity by sewage sludge. *Can J Microbiol* 33: 551–554.



9. Mori K, Hatsu M, Kimura R, Takamizawa K (2000) Effect of heavy metals on the growth of a methanogen in pure culture and co culture with a sulfate-reducing bacterium. *J Biosci Bioeng* 90: 260–265.
10. Altaş L (2009) Inhibitory effect of heavy metals on methane-producing anaerobic granular sludge. *J Hazard Mater* 162: 1551–1556.
11. Sowers KR, Baron SF, Ferry JG (1984) *Methanosarcina acetivorans* sp. nov., an acetotrophic methane-producing bacterium isolated from marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 47: 971–978.
12. Sowers KR (1995) Methanogens: growth and identification. In: *Archaea—A Laboratory Manual* Robb FT, Sowers KR, DasSharma S, Place AR, Schreier HJ, Fleischmann EM (eds.) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 200–245
13. Lira-Silva E, Ramirez-Lima IS, Olin-Sandoval V, Garcia-Garcia JD, Garcia-Contreras, et al (2011) Removal, accumulation and resistance to chromium in heterotrophic *Englena gracilis*. *J Hazard Mater* 193: 216–224.
14. King TE, Morris RO (1967) Determination of Acid-Labile Sulfide and Sulfhydryl Groups. *Methods Enzymol* 10: 634–641.
15. Madoni P, Romeo MG (2006) Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. *Environ Pollut* 141: 1–7.
16. Wang M, Wang WX (2011) Cadmium sensitivity, uptake, subcellular distribution and thiol induction in a marine diatom: Recovery from cadmium exposure. *Aquat Toxicol* 101: 387–395.
17. Abbanat DR, Ferry JG (1990) Synthesis of acetyl coenzyme A by carbon monoxide dehydrogenase complex from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. *J Bacteriol* 172: 7145–7150.
18. Mendoza-Cózad DG, Rodríguez-Zavala JS, Rodríguez-Enriquez S, Mendoza-Hernández G, Briones-Gallardo R, et al (2006) Phytochelatin-cadmium-sulfide high-molecular-mass complexes of *Englena gracilis*. *FEBS J* 273: 5703–5713
19. Schoenmakers THJM, Visser G, Flik G, Theuvsen APR (1992) Chelator: an improved method for computing metal ion concentrations in physiological solutions. *Biotech* 12: 870–879.
20. Sillen LG, Martell AE (1964) Stability constants of metal-ion complexes, The Chemical Society, Burlington House, London.
21. Hickey RF, Vanderwielen J, Switzenbaum MS (1989) The effect of heavy metals on methane production and hydrogen and carbon monoxide levels during batch anaerobic sludge digestion. *Wat Res* 23: 207–218.
22. Lane TW, Morel MM (2000) A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4627–4631.
23. Li L, Li Q, Rohlin L, Kim U, Salmon K, et al (2007) Quantitative proteomic and microarray analysis of the archaeon *Methanosarcina acetivorans* grown with acetate versus methanol. *J Proteom Res* 6: 759–771.
24. Rohlin L, Guneslus RP (2010) Carbon-dependent control of electron transfer and central carbon pathway genes for methane biosynthesis in the Archaeon, *Methanosarcina acetivorans* strain C2A. *BMC Microbiol* 10: 62.
25. Aceti DJ, Ferry JG (1988) Purification and characterization of acetate kinase from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. Evidence for regulation of synthesis. *J Biol Chem* 263: 15444–15448.
26. Ingram-Smith C, Gorrell A, Lawrence SH, Iyer P, Smith K, et al (2005) Characterization of the acetate binding pocket in the *Methanosarcina thermophila* acetate kinase. *J Bacteriol* 187: 2386–2394.
27. Lundie Jr LL, Ferry JG (1989) Activation of acetate by *Methanosarcina thermophila*. Purification and characterization of phosphotransacetylase. *J Biol Chem* 264: 18392–18396.
28. Alber BE, Ferry JG (1994) A carbonic anhydrase from *Methanosarcina thermophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6909–6913.
29. Innocenti A, Zimmerman S, Ferry JG, Scozzafava A, Supuran CT (2004) Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the zinc and cobalt gamma-class enzyme from the archaeon *Methanosarcina thermophila* with anions. *Bioorg Med Chem Lett* 21: 3327–3331.
30. Macauley SR, Zimmerman S, Apolinario EE, Evilia C, Hou YM, et al (2009) The archetype gamma-class carbonic anhydrase (Cam) contains iron when synthesized in vivo. *Biochem* 48: 817–819.
31. Tripp BC, Bell CB 3rd, Cruz F, Krebs C, Ferry JG (2004) A role for iron in an ancient carbonic anhydrase. *J Biol Chem* 279: 6683–6687.
32. Pepi M, Baldi F (1992) Modulation of chromium (VI) toxicity by organic and inorganic sulfur species in yeasts from industrial wastes. *Biomet* 5: 179–185.
33. Feroso FG, Bartacek J, Manzano R, van Leeuwen HP, Lens PNL (2010) Dosing of anaerobic granular sludge bioreactors with cobalt: Impact of cobalt retention on methanogenic activity. *Biores Technol* 101: 9429–9437.
34. Silver S, Misra TK, Laddaga RA (1989) DNA sequence analysis of bacterial toxic heavy metal resistances. *Biol Trace Elem Res* 21:145–163.
35. Karri S, Sierra-Alvarez R, Field JA (2006) Toxicity of copper to acetodlastic and hydrogenotrophic activities of methanogens and sulfate reducers in anaerobic sludge. *Chemosph* 62: 121–127.
36. Kim BK, Conway de Macario E, Nolling J, Daniels L (1996) Isolation and characterization of a copper-resistant methanogen from a copper-mining soil sample. *Appl Environ Microbiol* 62: 2629–2635.

## Supporting information Text S1

### Methods S1. Spectrophotometric determination of phosphotransacetylase activity

Phosphotransacetylase was determined measuring the remaining CoA as described in section 2.5. Figure S1 shows representative traces of cytosolic fraction with and without cadmium. Activity was linear for at least 30 s. CoA content in absence of enzyme remained constant.

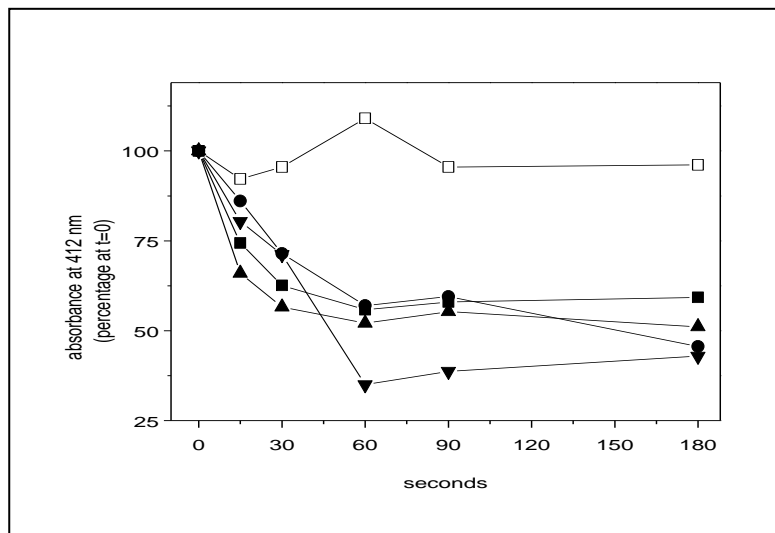


Figure S1. Activity of phosphotransacetylase from *M. acetivorans*. An aliquot of the cytosolic fraction was incubated with the substrates acetyl-Pi and CoA in the absence (▪) or presence of 0.1 (●), 1 (▲) or 10 (▼)  $\mu\text{M}$  total  $\text{CdCl}_2$ . In the absence of protein the CoA concentration remained constant (□).

### Methods S2. Spectrophotometric determination of CODH/AcCoA synthase activity

The reaction catalyzed by this enzyme complex involves three substrates, AcCoA, the electron acceptor oxidized ferredoxin and the methyl carrier molecule tetrahydromethanopterin (THMPT). In our experimental conditions we assumed that the isolated cytosolic fraction contains a non-limiting concentration of ferredoxin, because ferredoxin but not  $\text{F}_{420}$  is present in acetate-grown cells [1]. In the same sense, the content of THMPT is high as CoM is found in *M. barkeri* [2], suggesting that the addition of AcCoA may suffice to reliably determine the complex activity. Indeed, Fig. S2 shows representative traces of CODH/AcCoAs complex activity. Linearity could be determined accurately for up to 30 s and was dependent on the amount of protein contained in the cytosolic fraction added.

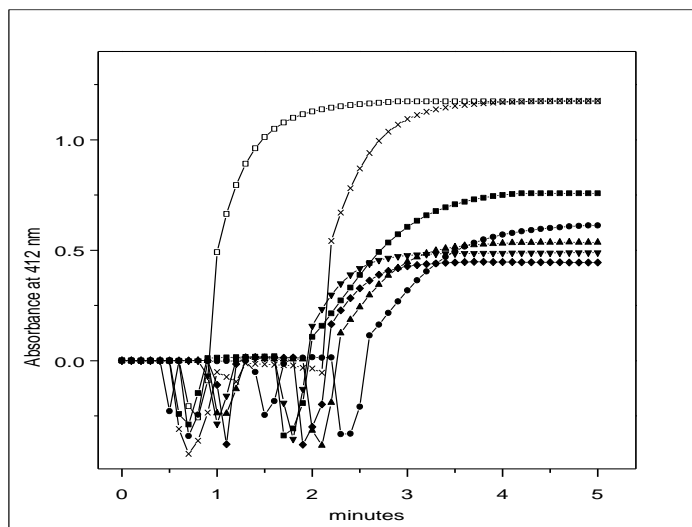


Figure S2. CODH/AcCoAs complex activity from *M. acetivorans*; representative traces of the activity by adding cytosolic fraction (containing the enzyme complex, ferredoxin and THMPT) and 80  $\mu\text{M}$  AcCoA. Representative trace with: 125 ( $\square$ ), 62 ( $\times$ ) and 25 ( $\blacksquare$ )  $\mu\text{g}$  of cytosolic fraction without cadmium in the absence or presence of 0.01 ( $\bullet$ ), 0.1 ( $\blacktriangle$ ), 1 ( $\blacktriangledown$ ) and 10  $\mu\text{M}$  total  $\text{CdCl}_2$  ( $\blacklozenge$ ).

### Methods S3. Determination of carbonic anhydrase by gas chromatography

Five  $\mu\text{L}$  of the head space were injected into the GC to determine the  $\text{CO}_2$  formed by CA activity (see section 2.5). The experimental conditions of the apparatus were: inlet temperature of  $150^\circ\text{C}$ , column temperature  $75^\circ\text{C}$  and TCD temperature of  $200^\circ\text{C}$ ; split of 16. The pressure was 75 kPa and column flow of 1.61 mL/min at a linear velocity of 31.5 cm/sec using helium at a makeup flow of 5 mL/min. The HP-PLOT/U column under these conditions is able to accurately separate  $\text{N}_2$  (retention time = 2.12 min),  $\text{CO}_2$  (retention time= 2.4 min) and water. Because water retention time is around 7 min, up to 4 consecutive injections may be carried out in the same run. Hence, the times to determine the activity of CA were 0, 30, 60 and 120 s. As shown in Fig. S3, chromatogram A, a clear increasing  $\text{CO}_2$  content was attained with time. Inset shows the total set of  $\text{N}_2$  peaks where  $\text{CO}_2$  is less visible; hence, a zoom was made for presentation.

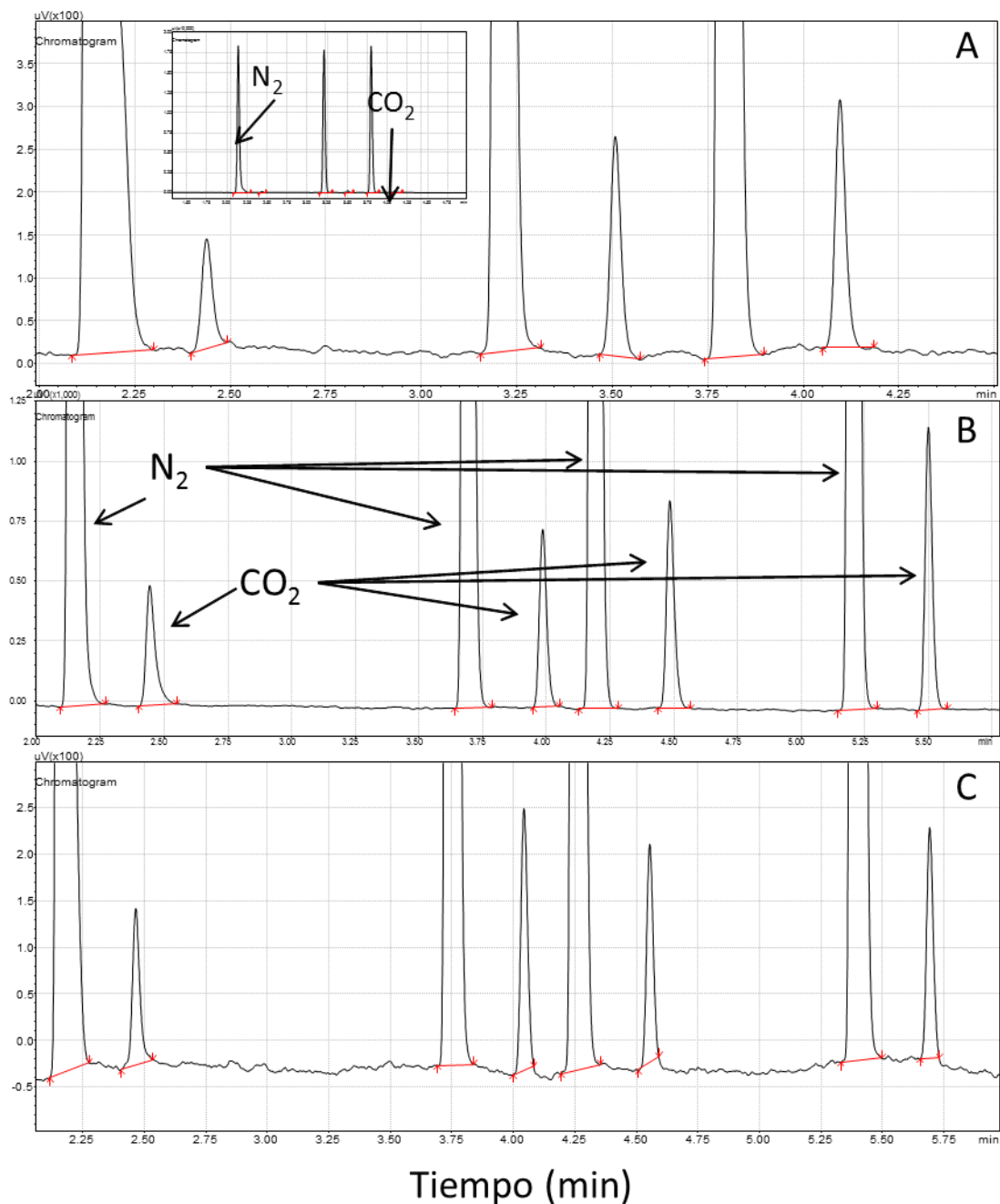


Figure S3. Formation of  $\text{CO}_2$  by CA from *M. acetivorans* in the absence (chromatogram A), or presence of  $1 \mu\text{M CdCl}_2$ . In chromatogram C, cytosolic fraction was previously heated. The different peaks shown represent consecutive sample injections at different times. It should be noted that y-scale is higher for chromatogram B. Under these conditions, CA activity was linear for at least 1 min (Fig. S4). Reverse reaction in turn, produced less reliable values by this method (not shown).

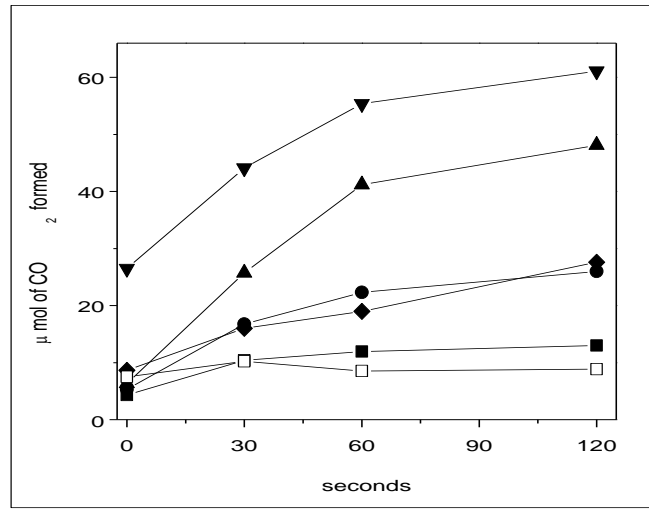


Figure S4. Activity of CA in the cytosolic fraction of *M. acetivorans* in the absence (■) or presence of 0.01 (●), 0.1 (▲), 1 (▼) or 10 μM total CdCl<sub>2</sub> (◆). A representative data with heated cytosolic fraction in presence of 0.1 μM CdCl<sub>2</sub> is also shown (□).

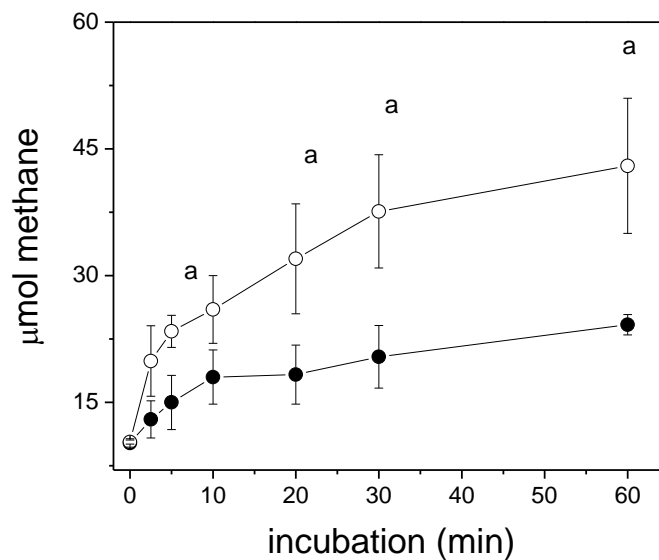


Figure S5. Activation of methanogenesis by cadmium. Cultures on acetate were purged by passing N<sub>2</sub> for 5 min. Then, samples of the head space were withdrawn from the cultures at 0 and 5, 10, 20, 30 and 60 min of incubation with 0 (filled symbols) or 10 μM CdCl<sub>2</sub> (open symbols) for GC analysis. These experiments were started with the addition of 20 mM acetate. Values are the mean ± SD of 3 independent cell preparations. P<0.05 using the Student's t-test for <sup>a</sup> vs control (without cadmium).

The area of CO<sub>2</sub> peaks increased when 1 μM CdCl<sub>2</sub> was present in the mix reaction as shown in chromatogram B. When the cytosolic fraction was heated for 10 min, no increase in the CO<sub>2</sub> content was observed (chromatogram C), indicating that indeed the protein CA was involved in the formation of CO<sub>2</sub>. The area of the CO<sub>2</sub> peaks was transformed to mole of CO<sub>2</sub> by using a standard curve made with 99.8 % (v/v) CO<sub>2</sub>.

Results S1. Activation of methanogenesis by cadmium. Cultures on acetate or methanol were purged and samples of 5 μL from the head space were withdrawn for GC analysis (Fig. S5). The split was adjusted to 25; hence, values obtained were higher than the detection limits and reliable.

#### Results S2. Identification of cadmium clusters in *M. acetivorans*

The white and dense grains are showing the cadmium accumulated into cells (Fig. S6). Interestingly, sulfur was also detected in these grains suggesting that molecules with thiol groups such as cysteine, sulfide and coenzyme M may be forming complexes with cadmium for its sequestration and inactivation.

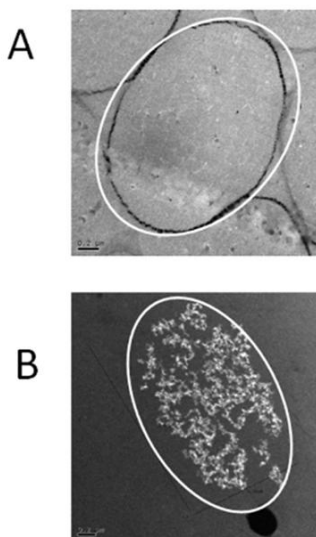


Figure S6. Intracellular cadmium clusters in *M. acetivorans*. HAADF-STEM projection images of methanol-grown cells cultured in methanol in the absence (A) or in the presence of 100 μM CdCl<sub>2</sub> for 5 days (B). The image in B revealed cadmium grains along the cell (white spots).

## Cd<sup>2+</sup> resistance mechanisms in *Methanosarcina acetivorans* involve the increase in the coenzyme M content and induction of biofilm synthesis

Elizabeth Lira-Silva,<sup>1</sup>  
M. Geovanni Santiago-Martínez,<sup>1</sup>  
Rodolfo García-Contreras,<sup>1</sup>  
Armando Zepeda-Rodríguez,<sup>2</sup>  
Alvaro Marín-Hernández,<sup>1</sup> Rafael Moreno-Sánchez<sup>1</sup>  
and Ricardo Jasso-Chávez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Mexico City, Mexico.

<sup>2</sup>Facultad de Medicina, UNAM, Mexico City, Mexico.

### Summary

To assess what defence mechanisms are triggered by Cd<sup>2+</sup> stress in *Methanosarcina acetivorans*, cells were cultured at different cadmium concentrations. In the presence of 100 µM CdCl<sub>2</sub>, the intracellular contents of cysteine, sulfide and coenzyme M increased, respectively, 8, 27 and 7 times versus control. Cells incubated for 24 h in medium with less cysteine and sulfide removed up to 80% of Cd<sup>2+</sup> added, whereas their cysteine and coenzyme M contents increased 160 and 84 times respectively. Cadmium accumulation (5.2 µmol/10–15 mg protein) resulted in an increase in methane synthesis of 4.5 times in cells grown on acetate. Total phosphate also increased under high (0.5 mM) Cd<sup>2+</sup> stress. On the other hand, cells preadapted to 54 µM CdCl<sub>2</sub> and further exposed to > 0.63 mM CdCl<sub>2</sub> developed the formation of a biofilm with an extracellular matrix constituted by carbohydrates, DNA and proteins. Biofilm cells were able to synthesize methane. The data suggested that increased intracellular contents of thiol molecules and total phosphate, and biofilm formation, are all involved in the cadmium resistance mechanisms in this marine archaeon.

### Introduction

Organisms respond to heavy metal toxicity through different biochemical mechanisms, such as decreased uptake, active expulsion, chelation and compartmentalization of

metal ions (Cervantes *et al.*, 2006; Haferburg and Kothe, 2007). Thus, control of uptake, trafficking and detoxification of heavy metals are important steps in the complex cellular mechanisms that deal with heavy metal toxicity and confer resistance. Chelators contribute to metal detoxification by buffering cytosolic metal ions. In plants, physiological metal chelators include thiol-containing compounds, such as cysteine (Cys), glutathione (GSH), phytochelatins (PCs) and metallothioneins, and organic acids and amino acids (Clemens, 2001).

Cadmium is a highly toxic non-essential heavy metal that has become a serious contaminant of soils and water bodies, mainly due to anthropogenic activity and inappropriate methods of disposal (Simpson, 1981). This metal strongly interacts with S, O, and N atoms in biomolecules (Sillen and Martell, 1964). A widespread mechanism for Cd<sup>2+</sup> detoxification in plants and yeast is based on the sequestration of Cd<sup>2+</sup> by PCs and the subsequent compartmentalization into the vacuole of the PCs-Cd<sup>2+</sup> complexes (Cobbett, 2000). Synthesis of PCs, and enhanced synthesis of their metabolic precursors Cys, γ-glutamylcysteine (γ-EC), GSH and sulfide (S<sup>2-</sup>), is a commonly used cellular response against Cd<sup>2+</sup> stress in higher plants, some yeast and algae (for review, see Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005). In the *Archaea* domain, progress has been made on the mechanisms of resistance to heavy metals at the gene expression level (Villafane *et al.*, 2011; Maezato *et al.*, 2012; Orell *et al.*, 2013), but studies on the characterization of the enzymatic activities and biochemical processes involved are scarce.

Some gene sequences encoding heavy metal-exporting proteins putatively involved in the efflux-mediated heavy metal resistance, and many P-type ATPases, have been found in archaeal genomes (Dopson *et al.*, 2003), although no activity of these proteins has been determined as yet. In contrast, activities of P-type Ag<sup>+</sup> and Cu<sup>2+</sup> ATPases (Mandal *et al.*, 2002) and the formation of biofilms constituted mainly by carbohydrates, DNA and proteins induced by Cr (VI) and Cu<sup>2+</sup> have been reported for the extremophile *Archaeoglobus fulgidus* (Lapaglia and Hartzell, 1997).

In acetoclastic methanogens, studies on Cu<sup>2+</sup> toxicity have been carried out for consortia in digesters or ecological niches (Karri *et al.*, 2006), and the formation of

Received 8 April, 2013; accepted 22 June, 2013. \*For correspondence. E-mail rjasso\_cardiol@yahoo.com.mx; Tel. (+52) 55 5573 2911; Fax (+52) 55 5573 0994.

biofilm induced by  $\text{Cu}^{2+}$  stress has been described (Droste *et al.*, 1990). Jarrell and colleagues (1987) reported that axenic cultures of different methanogens were sensitive to both  $\text{Cu}^{2+}$  (15–78  $\mu\text{M}$ ) and  $\text{Zn}^{2+}$  (15–150  $\mu\text{M}$ ), but resistant to  $\text{Ni}^{2+}$ . Protective effects to  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  were detected when incubations were carried out in sewage sludge compared with buffer, which was probably due to the sulphur content present in the former case, as reported for deep-sea hydrothermal vent archaea (Edgcomb *et al.*, 2004).

It is well established that methanogens require  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , Mo and even W at concentrations ranging from 10 nM to 100 nM, in addition to the common essential heavy metals  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  (Jarrell *et al.*, 1987). These metals are cofactors of the enzymes that constitute the methanogenic pathway. However, at higher concentrations, the essential heavy metal ions may become toxic for the cell. For instance, Altaş (2009) demonstrated in granular anaerobic sludge that  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  at 128 mg/l increase 20% and 100% the specific methane production rate, respectively, whereas at longer exposure times (60 h)  $\text{Cd}^{2+}$  decreased the methane production. These data suggest that the effects of heavy metals on biogas production are both direct and fast by interacting with enzymes, and indirect by altering protein content and gene transcription. Furthermore, the main problem for an optimal production of biogas in an anaerobic digester is the progressive accumulation of heavy metals derived from their slow removal (Cheng *et al.*, 2008). Studies determining the effect of heavy metals on each component of the living consortia in anaerobic digesters are scarce (Edgcomb *et al.*, 2004).

Although no genes encoding enzymes for synthesis of GSH,  $\gamma$ -EC or metallothioneins have been found in methanogens, external Cys and  $\text{S}^{2-}$  commonly used in biodigesters or culture media alleviate the toxicity of heavy metals. Moreover, *Methanosarcina sp.* can synthesize Cys *de novo* (Borup and Ferry, 2000), and the concentration of the thiol-containing coenzyme M (CoM-SH, 2-mercaptoethanesulfonate) essential for methanogenesis is high (14.8 mM) in *Methanococcus voltae*. The  $K_m$  value of the CoM-SH : methyltransferase in *Methanosarcina sp.* for CoM-SH is 0.25 mM (Saavedra *et al.*, 2011), indicating that, *in vivo*, this enzyme is saturated by this substrate, and that the remaining free CoM-SH may be useful to neutralize the free heavy metal ions into the cell.

We recently reported that in cultures of the marine methanogen *Methanosarcina acetivorans*, external reduced Cys and sulfide ameliorate the  $\text{Cd}^{2+}$  toxic effects, which rather stimulated methanogenesis in short-term experiments (Lira-Silva *et al.*, 2012). The cells were also able to remove and accumulate a significant fraction of the cadmium present in the medium. *Methanosarcina* species represent one of the two only genera able to produce

methane +  $\text{CO}_2$  from acetate degradation, providing approximately 75% of biologically generated methane in the biosphere. The study of the methanosarcinales metabolism and response against stressors seems relevant to have a more comprehensive view of their essential role in the biosphere carbon cycle. Therefore, to have a better understanding of the biochemical mechanisms conferring resistance against  $\text{Cd}^{2+}$  toxicity, in the present work the effects of the  $\text{Cd}^{2+}$  internalization in *M. acetivorans* were examined. These consisted in the induction of (i) an increase in the intracellular content of sulfide taken up from the culture medium, as well as in the content of molecules with thiol groups, specifically Cys and coenzyme M-SH; and (ii) the formation of biofilms.

## Results and discussion

### Effect of long-term $\text{Cd}^{2+}$ stress on the content of thiol-containing molecules

In a previous work, we demonstrated that *M. acetivorans* growth was not inhibited by 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , and that the intracellular metal accumulation activated some enzymes of methanogenesis (Lira-Silva *et al.*, 2012), suggesting that these *Archaea* cells have efficient resistance mechanisms against heavy metals. However, it was not determined why cells can resist such high  $\text{Cd}^{2+}$  stress. The exposure to  $\text{Cd}^{2+}$  induced a significant increase in the Cys and  $\text{S}^{2-}$  contents with no variation in CoM-SH with methanol as carbon source (Table 1). With acetate,  $\text{Cd}^{2+}$  induced significant increases in the CoM-SH and  $\text{S}^{2-}$  contents with no change in the intracellular Cys content (Table 1). Although the total thiol molecule content/ $\text{Cd}^{2+}$  accumulated ratios drastically decreased with increasing external cadmium concentrations, in methanol-grown cells the relatively high ratios (> 2) up to 50  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  allowed for complete binding of the metal ions, protecting the cells from their toxic effects, whereas in acetate-grown cells complete metal ion binding was found only at 10  $\mu\text{M}$  or lower  $\text{Cd}^{2+}$  concentrations used (Table 1).

### Effect of short-term $\text{Cd}^{2+}$ stress on the content of thiol molecules and $\text{Cd}^{2+}$ accumulation

To assess whether there was a mechanistic relationship between the thiol molecules synthesis and  $\text{Cd}^{2+}$  accumulation, *M. acetivorans* was incubated for 24 h under high-density cell suspensions (HDCS) in a medium in which cell duplication was negligible (see Appendix S1 in the supplementary material section for medium composition). Indeed, under such conditions, the protein content did not change after 24 h of incubation (Tables 2 and 3). In HDCS incubated with acetate, methane production was increased by 1–250  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  (Fig. 1), as reported previ-



**Table 1.** Changes in thiol molecules content in *M. acetivorans* cultured with acetate or methanol as carbon source and in the presence of different Cd<sup>2+</sup> concentrations.

| CdCl <sub>2</sub> μM | Methanol  |   |                                 | Acetate   |   |                                 |
|----------------------|---|---|---------------------------------|---|---|---------------------------------|
|                      | Thiol molecules <sup>a</sup>  | Cadmium accumulated <sup>b</sup><br>(% removal) | Thiol/Cd <sup>2+</sup><br>ratio | Thiol molecules <sup>a</sup>  | Cadmium accumulated <sup>b</sup><br>(% removal) | Thiol/Cd <sup>2+</sup><br>ratio |
|                      | nmol/culture  |   |                                 | nmol/culture  |   |                                 |
| 0                    | 47 ± 25 Cys<br>10 ± 12 CoM<br>120 ± 122 S <sup>2-</sup><br><b>177 ± 159 Total</b>         | 0 ± 0   | ∞                               | 1.25 ± 0.5 Cys<br>17 ± 20 CoM<br>22 ± 13 S <sup>2-</sup><br><b>40 ± 33 Total</b>      | 0 ± 0   | ∞                               |
| 1                    | 96 ± 46 Cys<br>19 ± 14 CoM<br>451 ± 249 S <sup>2-</sup><br><b>680 ± 309** Total</b>       | 11 ± 6 (22 ± 13)                                | 62                              | 3 ± 2 Cys<br>15 ± 8 CoM<br>71 ± 44 S <sup>2-</sup><br><b>89 ± 54 Total</b>            | 8 ± 5 (16 ± 4)                                  | 11                              |
| 10                   | 169 ± 78 Cys<br>15 ± 9 CoM<br>1842 ± 311 S <sup>2-</sup><br><b>2023 ± 457*** Total</b>    | 99 ± 20 (30 ± 23)                               | 20                              | 2 ± 1 Cys<br>39 ± 37 CoM<br>131 ± 100 S <sup>2-</sup><br><b>170 ± 140* Total</b>      | 40 ± 10 (8 ± 2)                                 | 4.2                             |
| 25                   | 316 ± 221 Cys<br>7 ± 1 CoM<br>3370 ± 711 S <sup>2-</sup><br><b>3693 ± 930*** Total</b>    | 459 ± 220 (36 ± 18)                             | 8                               | 6 ± 2 Cys<br>17 ± 20 CoM<br>164 ± 14 S <sup>2-</sup><br><b>187 ± 37*** Total</b>      | 475 ± 109 (38 ± 9)                              | 0.4                             |
| 50                   | 221 ± 115 Cys<br>6 ± 6 CoM<br>2741 ± 467 S <sup>2-</sup><br><b>2968 ± 626*** Total</b>    | 940 ± 326 (38 ± 23)                             | 3.1                             | 15 ± 14 Cys<br>71 ± 47 CoM<br>307 ± 129 S <sup>2-</sup><br><b>393 ± 199** Total</b>   | 1387 ± 225 (55 ± 9)                             | 0.3                             |
| 100                  | 294 ± 195 Cys<br>10 ± 7 CoM<br>2826 ± 1165 S <sup>2-</sup><br><b>3130 ± 1367*** Total</b> | 2054 ± 929 (41 ± 20)                            | 1.5                             | 9 ± 7 Cys<br>154 ± 70 CoM<br>1427 ± 1228 S <sup>2-</sup><br><b>1590 ± 1308* Total</b> | 3453 ± 1430 (69 ± 35)                           | 0.46                            |

a. Values shown for the sum of total thiol molecules (total) was given for the total content of cellular protein per culture. In acetate, the total cellular protein was 5.1–6.4 mg/culture, and in methanol was 8.9–10.2 mg/culture (Lira-Silva *et al.*, 2012).

b. In cells cultured and harvested at the stationary growth phase (8 and 14 days for methanol and acetate, respectively), the contents of thiol molecules in the absence of Cd<sup>2+</sup> were 4.6 ± 2.9 (Cys), 12 ± 6 (S<sup>2-</sup>) and 1.9 ± 1 (CoM) nmol/mg protein in methanol-grown cells, and 0.24 ± 0.11 (Cys), 4.2 ± 2.6 (S<sup>2-</sup>) and 3.3 ± 4 (CoM) nmol/mg protein in acetate-grown cells. Values of thiol metabolite are the mean ± SD of at least five independent preparations.

\*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.005 versus control cells without cadmium; Student *t*-test for non-paired samples.

Bold values show the sum of the independent values for Cys, CoM and S<sup>2-</sup> and they are represented as the total thiol group molecules.

ously (Lira-Silva *et al.*, 2012), whereas in HDCS incubated with methanol, methane production was not affected by Cd<sup>2+</sup> (Fig. 1). At 500 μM CdCl<sub>2</sub>, methanogenesis was inhibited by 80% in both acetate and methanol HDCS (Fig. 1). The HDCS medium, which contained lower concentrations of Cys and S<sup>2-</sup> (2.06 and 0.14 mM, respectively), allowed that, when adding 10–100 μM CdCl<sub>2</sub>, the free Cd<sup>2+</sup> concentrations were in the μM range (data not shown). In consequence, higher levels of accumulated Cd<sup>2+</sup> and thiol molecule contents were achieved in cells incubated in the HDCS medium (Tables 2 and 3). For instance, in the methanol HDCS with 500 μM CdCl<sub>2</sub>, the intracellular contents of Cys and CoM-SH increased by 161 and 6 times, whereas S<sup>2-</sup> increased 17 times, as compared with control cells incubated with no metal ion. In the acetate HDCS incubated with 500 μM, the intracellular contents of Cys, S<sup>2-</sup> and CoM-SH increased by 33, 24 and 84 times, respectively, with respect to control. These observations suggested that, in addition to Cys and S<sup>2-</sup>, CoM-SH is also enhanced by cells to bind and neutralize Cd<sup>2+</sup>. In this

regard, strong correlations between Cd<sup>2+</sup> accumulated and contents of CoM-SH and S<sup>2-</sup> were identified (Fig. 2), in which variation in the CoM-SH content was apparently more sensitive to intracellular Cd<sup>2+</sup> in acetate than in methanol HDCS (Fig. 2, inset). Moreover, 250 μM Cd<sup>2+</sup> in the medium was effectively removed by methanol and acetate HDCS (Tables 2 and 3). The intracellular contents of other essential heavy metals were not altered by the Cd<sup>2+</sup> stress in the acetate HDCS: the values for control and 250 μM CdCl<sub>2</sub> were in nmol metal/mg protein – 2.7–2.8 for Ni<sup>2+</sup>, 2.66–1.38 for Co<sup>2+</sup>, 7.8–8.4 for Fe<sup>3+</sup> and 1.9–2.3 for Zn<sup>2+</sup> (*n* = 2).

*Methanosarcina acetivorans* showed an ability to sense low free Cd<sup>2+</sup> concentrations, which in turn triggers a remarkable response involving the intracellular content of thiol-group molecules at short times (24 h). For instance, in acetate-grown cells at low (10 μM total Cd<sup>2+</sup> or 72 pM free Cd<sup>2+</sup>) and high concentrations (500 μM or 63 μM free Cd<sup>2+</sup>), 33% and 26% of Cd<sup>2+</sup> is removed, which is accompanied by increases of 3 and 20 times in S<sup>2-</sup>

**Table 2.** Changes in thiol molecules content and cadmium removal in high-density cell suspensions cultured in methanol and incubated in the presence of the indicated Cd<sup>2+</sup> concentrations.

| CdCl <sub>2</sub> μM | Methanol              |   |                                    |                              |
|----------------------|-----------------------|---|------------------------------------|------------------------------|
|                      | Protein<br>mg/culture | Total thiol molecules <sup>a</sup>  | Cadmium accumulated<br>(% removal) |                              |
|                      |                       |   | nmol/culture                       | Thiol/Cd <sup>2+</sup> ratio |
| 0                    | 13 ± 1.8              | 26 ± 16 Cys<br>71 ± 9 CoM<br>500 ± 72 S <sup>2-</sup><br><b>597 ± 97 Total</b>                  | 0 ± 0                              | ∞                            |
| 10                   | 11.8 ± 3              | 38 ± 33 Cys<br>5 ± 3 CoM<br>106 ± 5 S <sup>2-</sup><br><b>149 ± 42** Total</b>                  | 67 ± 72 (13.4%)                    | 2.2                          |
| 25                   | 12.2 ± 1.5            | 71 ± 34 Cys<br>7.4 ± 6 CoM<br>124 ± 120 S <sup>2-</sup><br><b>202 ± 160* Total</b>              | 483 ± 97 (38.6%)                   | 0.6                          |
| 50                   | 14 ± 2.2              | 152 ± 43 Cys<br>154 ± 12 CoM<br>1852 ± 635 S <sup>2-</sup><br><b>2158 ± 693* Total</b>          | 1144 ± 122 (45.7%)                 | 1.9                          |
| 100                  | 12.4 ± 1.1            | 691 ± 306 Cys<br>250 ± 97 CoM<br>4166 ± 1128 S <sup>2-</sup><br><b>5107 ± 1489** Total</b>      | 3869 ± 802 (77.4%)                 | 1.3                          |
| 250                  | 12.5 ± 0.6            | 1168 ± 151 Cys<br>524 ± 62 CoM<br>9268 ± 1550 S <sup>2-</sup><br><b>10960 ± 1763*** Total</b>   | 10290 ± 2415 (82.3%)               | 1.0                          |
| 500                  | 13.3 ± 1.4            | 4305 ± 824 Cys<br>610 ± 378 CoM<br>12572 ± 1276 S <sup>2-</sup><br><b>17487 ± 2480*** Total</b> | 18538 ± 1341 (74.1%)               | 0.9                          |

a. Values shown for the sum of total thiol molecules were given for the total content of protein per culture, as indicated in the Appendix S1. Individual contents in methanol-HDCS without cadmium after 24 h of exposition were (in nmol/mg protein) for Cys 2 ± 1.3, CoMSH 5.8 ± 0.6 and sulfide 38 ± 5.6. Values of each thiol metabolite are the mean ± SD of three independent preparations.

\**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.005 versus control cells without cadmium. Student *t*-test for non-paired samples.

Bold values show the sum of the independent values for Cys, CoM and S<sup>2-</sup> and they are represented as the total thiol group molecules.

content respectively (Table 3). The CoM-SH content also increases 4 and 251 times, respectively, with respect to control (Fig. 2A), in acetate cultures. Although methanol seems not to be a physiological substrate, the content of thiol molecules also changed with the variation in external Cd<sup>2+</sup> in these cultures. Although CoM-SH is essential for methane production (Di Marco *et al.*, 1990), the last observations indicated that the enhancement in the CoM-SH content induced by Cd<sup>2+</sup> was not required for methanogenesis by cells incubated with 0–250 μM external CdCl<sub>2</sub> (Fig. 2). Instead, the proportional increase in CoM-SH content with increasing Cd<sup>2+</sup> concentrations (cf. Fig. 2) suggested that this is part of the cellular mechanistic response to contend against Cd<sup>2+</sup> stress.

In theory, the thiol group/Cd<sup>2+</sup> ratios have to be at least 2 to ensure sequestration and inactivation of the metal ion (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005). The thiol molecules/Cd<sup>2+</sup> accumulated ratios close to 2 indicated that the enhanced total thiol molecule content developed by the HDCS

(Tables 2 and 3) was able to protect the cells from the free Cd<sup>2+</sup> toxic effects at 250 μM or lower concentrations of added CdCl<sub>2</sub>, whereas higher Cd<sup>2+</sup> concentrations were clearly toxic (Fig. 1).

On the other hand, other heavy metals tested at 500 μM showed that Cr(VI) and Zn<sup>2+</sup> increased the content of S<sup>2-</sup> up to 83 ± 14 nmol/mg protein (2.8 times) and 1192 ± 192 nmol/mg protein (39 times), respectively; Zn<sup>2+</sup> increased Cys content up to 11 ± 2 nmol/mg protein (2.5 times) and Cr(VI), Hg<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> increased the content of CoM-SH up to 15.4 ± 2 (2 times), 18 ± 2 (2.5 times) and 134 ± 28 nmol/mg protein (19 times) respectively. Interestingly, the accumulation of zinc also increased from 10 up to 310 ± 80 nmol/mg prot in control cells and 500 μM Zn<sup>2+</sup> respectively. All comparisons were made with respect to control cells in the absence of heavy metals added. Also, the production of methane increased 80% in HDCS incubated with Hg<sup>2+</sup>, whereas Cu<sup>2+</sup> and Cr(VI) decreased methane production by 20% with respect to the control.

**Table 3.** Changes in thiol molecules content and cadmium removal in high-density cell suspensions cultured in acetate and incubated in the presence of the indicated Cd<sup>2+</sup> concentrations.

| CdCl <sub>2</sub> μM | Acetate               |  |                                    |                              |
|----------------------|-----------------------|--|------------------------------------|------------------------------|
|                      | Protein<br>mg/culture | Total thiol molecules <sup>a</sup><br>nmol/culture   | Cadmium accumulated<br>(% removal) | Thiol/Cd <sup>2+</sup> ratio |
| 0                    | 9.3 ± 0.8             | 6.77 ± 2.2 Cys<br>23 ± 18 CoM<br>404 ± 84 S <sup>2-</sup><br><b>434 ± 112 Total</b>            | 0 ± 0                              | ∞                            |
| 10                   | 12.3 ± 1.7            | 1.7 ± 0.8 Cys<br>102 ± 33 CoM<br>1195 ± 111 S <sup>2-</sup><br><b>1300 ± 161* Total</b>        | 166 ± 130(33.2%)                   | 7.8                          |
| 25                   | 14.1 ± 1.1            | 14.5 ± 10 Cys<br>112 ± 42 CoM<br>1410 ± 571 S <sup>2-</sup><br><b>1537 ± 623*** Total</b>      | 625 ± 250(50%)                     | 2.4                          |
| 50                   | 8.4 ± 0.4             | 14 ± 8 Cys<br>292 ± 109 CoM<br>2178 ± 655 S <sup>2-</sup><br><b>2484 ± 772*** Total</b>        | 1134 ± 202 (45.3%)                 | 2.2                          |
| 100                  | 9.8 ± 1.8             | 12 ± 8.2 Cys<br>191 ± 44 CoM<br>3018 ± 1886 S <sup>2-</sup><br><b>3221 ± 1886*** Total</b>     | 2190 ± 824 (43.8%)                 | 1.5                          |
| 250                  | 8.5 ± 1.1             | 13.4 ± 4.4 Cys<br>1595 ± 652 CoM<br>7085 ± 2484 S <sup>2-</sup><br><b>8693 ± 3140*** Total</b> | 5262 ± 1160 (42%)                  | 1.6                          |
| 500                  | 11.5 ± 1.1            | 139 ± 77 Cys<br>5783 ± 1255 CoM<br>8273 ± 1293 S <sup>2-</sup><br><b>14195 ± 2625*** Total</b> | 6567 ± 1273 (26.2%)                | 2.2                          |

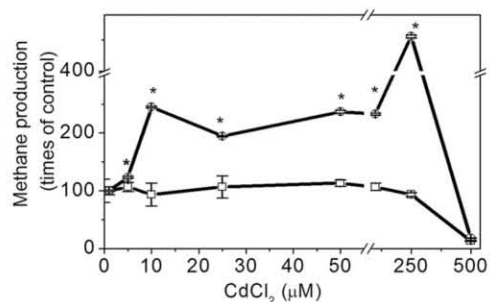
a. Values shown for the sum of total thiol molecules were given for the total content of protein per culture, as indicated in the Appendix S1. Individual contents in acetate-HDCS without cadmium were in nmol/mg protein for Cys 0.6 ± 0.2, CoMSH 3 ± 2.9 and sulfide 45 ± 9. Values of each thiol metabolite are the mean ± SD of at least five independent preparations.

\**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.005 versus control cells without cadmium. Student *t*-test for non-paired samples.

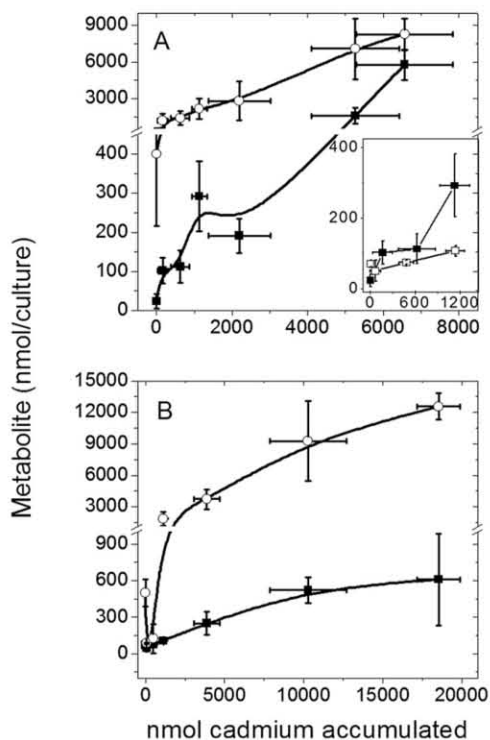
Bold values show the sum of the independent values for Cys, CoM and S<sup>2-</sup> and they are represented as the total thiol group molecules.

Zinc<sup>2+</sup> did not induce changes in methane production (data not shown). Then, judging by (i) the high contents of CoM-SH reached in the presence of Cd<sup>2+</sup> and (ii) the lower CoM-SH content attained under Ni<sup>2+</sup> deprivation (Pramanik and Kim, 2012), it can be proposed that CoM-SH levels represent a specific response to the presence of toxic levels of Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> (see above) and perhaps other heavy metals. In agreement with the proposal of CoM-SH as specific marker molecule for methanogens (Pramanik and Kim, 2012), the data of the present work also suggest the potential biotechnological application of *M. acetivorans* CoM-SH as biosensor of Cd<sup>2+</sup>, and perhaps Zn<sup>2+</sup>, levels in marine niches.

In assays performed *in vitro*, it was determined that 50 μmol of the Cys-Cd complex, incubated in HEPES buffer pH 8 plus 1 mM DTNB [5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)], released all Cys when 100 μmol of EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid) was added, in a process lasting 60 min. For 50 μmol CoMSH-Cd complex,



**Fig. 1.** Overproduction of methane induced by cadmium. High-density cell suspensions prepared from methanol- (squares) or acetate-grown cells (circles) were incubated with the indicated CdCl<sub>2</sub> concentrations for 24 h, and the methane production was determined. Values are the mean ± SD of at least five different preparations. \**P* < 0.005 versus control cells.



**Fig. 2.** Relationship of intracellular contents of CoM-SH and sulfide with  $\text{Cd}^{2+}$  accumulation. *Methanosarcina acetivorans* in HDCS condition was incubated for 24 h with (A) acetate or (B) methanol in the presence of different  $\text{CdCl}_2$  concentrations, and the accumulation of  $\text{Cd}^{2+}$  and the contents of CoM-SH (closed squares) and sulfide (open circles) were determined (values were taken from Tables 2 and 3). Inset: nmol of cadmium accumulated versus nmol of CoM-SH content in acetate-grown cells (filled squares) and methanol-grown cells (open squares).

the addition of 250  $\mu\text{mol}$  of EGTA was required for releasing all CoM-SH (data not shown). These results indicated that CoM-SH certainly bind  $\text{Cd}^{2+}$  with higher affinity than Cys.

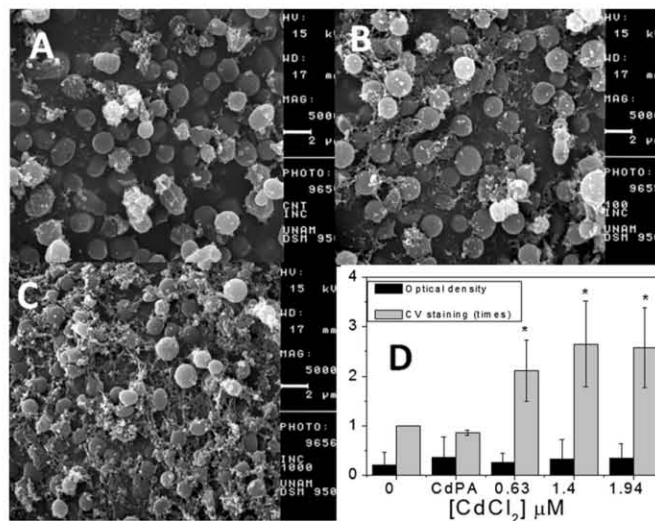
Up to date, there are no reports about the presence of heavy metal resistance mechanisms involving thiol molecules in methanogens or any other organism from the *Archaea* domain. Metabolites and enzymes related to the GSH metabolism are in general absent in *Archaea*, although gene sequences for GSH S-transferases have been identified in some halophilic archaea (Allocati *et al.*, 2012). In turn, it has been proposed that the thiol-containing coenzyme A has a role as antioxidant, and may serve as the functional equivalent to GSH in thermophilic and hyperthermophilic organisms (Hummel *et al.*, 2005). The data of the present work support the notion that the

increased synthesis of molecules with thiol groups is the most widespread biological mechanism to contend against intoxication by heavy metals. Indeed, bacteria (Sochor *et al.*, 2011), protists (Lira-Silva *et al.*, 2011), yeast, plants (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005; Peuke and Rennenberg, 2005) and mammals (Nzengue *et al.*, 2011) have the ability to increase the synthesis of Cys,  $\gamma$ -EC, GSH, PCs and metallothioneins to contend against heavy metal stress.

#### Effect of cadmium on the content of malate, citrate and orthophosphate (Pi)

As  $\text{Cd}^{2+}$  can be also bound with high affinity by organic acids such as malate and citrate as well as Pi in bacteria, protists and plants (Keasling and Hupf, 1996; Avilés *et al.*, 2003; Takenaka *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2012), in an attempt to explain the preservation of the cellular viability under extremely high  $\text{Cd}^{2+}$  stress, the contents of these molecules were determined in *M. acetivorans* (Table S1) and were lower than those of the thiol molecules. The malate content in the methanol HDCS after 24 h of incubation without cadmium and with 250  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  remained unchanged,  $0.65 \pm 0.3$  and  $0.82 \pm 0.5$  nmol/mg protein ( $n = 4$ ; mean  $\pm$  SD) respectively. In contrast, in the acetate HDCS without cadmium and with 500  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ , malate was  $1.24 \pm 0.3$  and  $2.1 \pm 0.5$  nmol/mg protein ( $n = 4$ ; mean  $\pm$  SD), indicating a 70% increase ( $P < 0.05$ ). In contrast, the citrate content did not change. In the HDCS with methanol or acetate, the citrate content was 0.1–0.17 and 0.2–0.27 nmol/mg protein respectively ( $n = 2$ ). However, these enhanced levels of malate (Table S1) were still well below those found for thiol molecules (Table 3). Hence, the modulation of the organic acids content, although increased by high  $\text{Cd}^{2+}$ , seems not to be an effective mechanism to contend against  $\text{Cd}^{2+}$  toxicity.

Cell disruption with PCA (Perchloric acid) induces the breakdown of polyphosphate (de Jager and Heyns, 1998). Thus, under these conditions, the total phosphate (Pi + PPI + polyphosphates) is determined. In the methanol HDCS condition, where extracellular Pi added was 0.66 mM, no significant changes in total phosphate between control ( $55 \pm 14$  nmol/mg protein) and 250  $\mu\text{M}$  Cd-exposed cells ( $73 \pm 40$  nmol/mg protein) were found, whereas in the acetate HDCS the total phosphate was  $104 \pm 50$  nmol/mg protein ( $n = 3$ ) in control cells and  $127 \pm 21$  nmol/mg protein ( $n = 3$ ) in cells exposed to 500  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ . However, the intracellular content of total phosphate *per* culture was high in HDCS incubated with 500  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ , reaching values greater than 3  $\mu\text{mol}$ , for both methanol- and acetate-grown cells (Table S1). Considering that Pi may form complexes with  $\text{Cd}^{2+}$  with slightly lower affinity than sulfide, the enhanced level of total phosphate may suffice to fully bind and neutralize the accumulated



**Fig. 3.** Synthesis of a biofilm matrix induced by Cd<sup>2+</sup> in *M. acetivorans*. Samples were prepared for and analysed by scanning electron microscope, as described in the Methods section. Extracellular matrix was absent in methanol-grown cells in the absence of Cd<sup>2+</sup> (A), whereas increased synthesis of biofilm was slightly apparent in 54 μM CdPA cells (B) and well-defined in 54 μM CdPA cells, and further exposed to 1.4 mM CdCl<sub>2</sub> (C). Micrographs are shown at 5000×, bar = 2 μm. (D) Biofilm formation determined by crystal violet staining in control-grown cells and in CdPA cells cultured at the indicated high CdCl<sub>2</sub> concentrations. \**P* < 0.05 versus CdPA cells with no cadmium.

Cd<sup>2+</sup>, as also reported for *Escherichia coli* (Keasling and Hupf, 1996).

Interestingly, in the regular culture medium where Pi added was 5 mM, the total intracellular phosphate content at the stationary growth phase (14 days) increased significantly in acetate-grown cells, from 120 ± 20 nmol/mg protein in control cells up to 670 ± 300 nmol/mg protein in cultures with 100 μM CdCl<sub>2</sub> (*n* = 4; mean ± SD; *P* < 0.05). Similar to the HDCS condition, in the methanol-grown cells in regular cultures, the total phosphate content did not change by exposure to Cd<sup>2+</sup> (96 ± 11 and 112 ± 26 nmol/mg protein for control and 100 μM CdCl<sub>2</sub>-exposed cells (*n* = 4; mean ± SD). A similar profile for intracellular malate was found in cells harvested at the stationary growth phase. In methanol-grown cells, malate did not change by Cd<sup>2+</sup> exposure (2.3 ± 0.9 and 1.3 ± 0.3 nmol/mg protein, for control and 100 μM CdCl<sub>2</sub>-exposed cells respectively). However, in acetate-grown cells, intracellular malate changed fivefold from 2.6 ± 0.5 in control cells up to 13.5 ± 7 malate/mg protein in 100 μM CdCl<sub>2</sub>-exposed cells (*n* = 3; *P* < 0.05). These data suggested that the variable content of heavy metal chelating molecules depends on the carbon source and culture conditions used.

#### Enhanced Cd<sup>2+</sup> resistance

Methanol-grown cells continuously exposed to 54 μM CdCl<sub>2</sub> for 3.5 months (approximately 270 generations), by transferring cells to fresh medium every 7 days, allowed for further culturing in the presence of higher concentrations of Cd<sup>2+</sup> (from 0.63 up to 2.5 mM CdCl<sub>2</sub>), which are extremely

toxic for control cells (data not shown). Thus, these Cd<sup>2+</sup>-preadapted cells (CdPA cells) presumably developed mechanisms that enabled them to deal with the severe Cd<sup>2+</sup> stress. Indeed, significant methane production was still synthesized at very high Cd<sup>2+</sup> concentrations, indicating active cell metabolism (Fig. S2). Moreover, cultures with high Cd<sup>2+</sup> formed cell agglomerates at the bottom of the culture bottles; these cell aggregates were metabolically active.

We hypothesized that the aggregates were biofilms since its formation is triggered by different types of stress, including exposure to heavy metals in both eubacteria and archaea (Harrison *et al.*, 2007) (Fig. S3). To assess our hypothesis, a structural analysis by scanning electron microscopy was initially used. The data showed that control cultures contained only planktonic cells (Fig. 3A), and CdPA cells did not develop an extracellular matrix (Fig. 3B), whereas CdPA cells further exposed to 1.4 mM CdCl<sub>2</sub> synthesized an extracellular matrix to which cells were attached (Fig. 3C). To further demonstrate the ability of CdPA cells to form biofilm induced by high Cd<sup>2+</sup>, crystal violet staining of microtiter plates was performed. In this assay, cell adherence to the plate surface as a consequence of biofilm formation brings about increased dye staining. As expected, increased staining was attained in wells with CdPA cells incubated with high Cd<sup>2+</sup> (Fig. 3D).

The content of protein (31–38 mg protein culture<sup>-1</sup>) did not change between control and CdPA cells exposed to 0.63 or 1.4 mM CdCl<sub>2</sub>. Non-soluble carbohydrates were significantly different between control-grown cells with 0.18 ± 0.15 mg (culture)<sup>-1</sup> and CdPA cells further exposed

to 1.4 mM CdCl<sub>2</sub> with 1.44 ± 0.57 mg (culture)<sup>-1</sup> (n = 7; mean ± SD; P < 0.001), i.e. there was an eight times higher carbohydrates content in CdPA cells, plus 1.4 mM CdCl<sub>2</sub>. In turn, homogenized biofilm exposed to DNase I revealed that DNA is an important component of the biofilm matrix; by comparison, planktonic control cells exposed to DNase I did not reveal the presence of extracellular DNA (Fig. S4). Indeed, the DNA content was 60–80% higher in the cultures exposed to 0.63 and 1.4 mM CdCl<sub>2</sub>, with respect to control-grown cells (data not shown). In addition, the total cellular dry weight per culture was also higher in cultures with high cadmium, with respect to control (Table S2).

Cultures forming the biofilm were able to remove Cd<sup>2+</sup> from the medium at a higher extent: 85 ± 18% removal (n = 3) equivalent to 71 ± 20 μmol Cd<sup>2+</sup>/60 ml culture at 1.4 mM CdCl<sub>2</sub> (initial culture content: 85.8 ± 6 μmol total cadmium) or 2.7 ± 1.7 μmol Cd/mg protein in biofilm cells versus 9.6 ± 3.6 μmol Cd/60 ml in the free-cells medium (non-accumulated). The amount of cadmium in the biofilm cell dry weight reached up to 10% (Table S2). Moreover, HAADF-STEM (high angle annular dark-field scanning-transmission electron microscopy) analysis showed high contents of electro-dense grains of cadmium and sulphur in the intracellular milieu as well as outside the cells, trapped throughout the biofilm structural components (Fig. S5). No electro-dense grains of cadmium and sulphur were detected inside of control cells (Fig. S6), although acidocalcisomes (polyphosphate granules) were apparent, as previously reported for methanosarcinales (Scherer and Bochem, 1983). Biofilm cells grown in the presence of Cd<sup>2+</sup> showed larger acidocalcisomes than control cells (Fig. S6), suggesting that in *M. acetivorans* polyphosphates may have a protective role, as source of Pi and/or as chelators, to contend against heavy metals (Orell *et al.*, 2012).

The content of thiol molecules in the biofilm was also higher than in planktonic (control) cells grown in the absence of Cd<sup>2+</sup>: Cys, CoM-SH and S<sup>2-</sup> contents were 14 ± 2, 190 ± 37 and 2300 ± 1000 nmol/mg protein (n = 3), respectively, in biofilms formed in the presence of 1.4 mM CdCl<sub>2</sub>; for control cells the values were 0.1 ± 0.05 (n = 3), 3 ± 1 (n = 3) and 150 ± 5 (n = 3) nmol/mg protein respectively. As methane production remained unperturbed (Fig. 1), these data suggested that CoM-SH plays the dual function of promoting methanogenesis and sequestering the metal ion.

The ability of archaeal organisms to synthesize biofilm as a mechanism able to contend against metal toxicity has been described for the acidophilic *Ferroplasma acidarmanus* Fer1 (Baker-Austin *et al.*, 2010), and the hyperthermophiles *A. fulgidus* and *Sulfolobus sp* (Lapaglia and Hartzell, 1997; Koerdt *et al.*, 2010). Methanogens are also able to synthesize biofilms. However, this cellular process has not been determined in axenic cultures but

only in consortia or communities. Moreover, there is no evidence that heavy metals may induce the biofilm formation in *M. acetivorans* (Droste *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 2009). The present work shows for the first time that the marine *M. acetivorans* is able to perform, after a period of preadaptation, the biofilm synthesis under high Cd<sup>2+</sup> stress (Fig. 3). This biofilm was mainly constituted by DNA, carbohydrates and proteins, components usually found in biofilms made by other different microorganisms (Harrison *et al.*, 2007). Indeed, the composition and role of extracellular polymers in methanogenic granules have been described in *Methanobacterium formicicum* and *Methanosarcina mazei* grown under nitrogen or phosphorous deprivation; in these cases, the biofilms were constituted mainly by pentoses, hexoses, amino sugars and glucosamine, and polypeptides (Veiga *et al.*, 1997). Other heavy metals and stressors remain to be tested for induction of biofilm formation. In addition, the formation of biofilm in *M. acetivorans* brought about two clear beneficial effects: (i) the accumulation and removal of high amounts of Cd<sup>2+</sup> from the medium which it is well established for other heavy metals (Flemming and Wingender, 2010), and (ii) the non-interrupted synthesis of methane.

*Methanosarcina acetivorans* planktonic cells also showed high efficiency in Cd<sup>2+</sup> removal, which in turn correlated with the increase in the CoM-SH content. This unexpected ability of *M. acetivorans* to remove toxic metal ions from the medium, even at concentrations as high as 800 μM free cadmium (2.5 mM total CdCl<sub>2</sub>), and intracellularly accumulate it, in a process mediated by increased contents of thiol molecules and phosphates, resembles that shown by plants, protists and yeast, in which high amounts of Cd<sup>2+</sup> can be accumulated by potentially bioremediating processes, such as the increased synthesis of molecules with thiol groups like GSH and PCs (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005; Olguín and Sánchez-Galván, 2011).

The understanding of the molecular mechanisms involved in the cellular resistance in methanogens against Cd<sup>2+</sup> stress may eventually facilitate the biotechnological use of these microorganisms for bioremediation of heavy metal-polluted ecosystems and for enhanced methane production. Data shown here suggest that coenzyme M synthesis pathway and gluconeogenesis (as provider of precursors for macromolecules syntheses) are targets of study for improving the degree of resistance against heavy metals toxicity.

#### Acknowledgements

This work was partially supported by grant nos. 156969 (RJC), 80534 and 123636 (RMS) from CONACyT, Mexico, and No. PICS08-5 (RMS, RJC) from ICyTDF, Mexico, and CONACyT Ph. D. fellowship to ELS. The authors also thank



Patricia Bizarro Nevares from the laboratory of electron microscopy, Department of Cellular and Tissue Biology, Faculty of Medicine, University of Mexico, for the preparation of the cell samples for the ultra-structure analysis, and the Institute of Physics, University of Mexico, for the electron microscopy X-ray analyses.

## References

- Allocati, N., Federici, L., Masulli, M., and Di Ilio, C. (2012) Distribution of glutathione transferases in gram-positive bacteria and *Archaea*. *Biochimie* **94**: 588–596.
- Altaş, L. (2009) Inhibitory effect of heavy metals on methane-producing anaerobic granular sludge. *J Hazard Mater* **162**: 1551–1556.
- Avilés, C., Loza-Tavera, H., Terry, N., and Moreno-Sánchez, R. (2003) Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. *Arch Microbiol* **180**: 1–10.
- Baker-Austin, C., Potrykus, J., Wexler, M., Bond, P.L., and Dopson, M. (2010) Biofilm development in the extremely acidophilic archaeon *Ferroplasma acidarmanus* Fer1. *Extremophiles* **14**: 485–491.
- Borup, B., and Ferry, J.G. (2000) O-Acetylserine sulphydrylase from *Methanosarcina thermophila*. *J Bacteriol* **182**: 45–50.
- Cervantes, C., Espino-Saldaña, A.E., Acevedo-Aguilar, F., León-Rodríguez, I.L., Rivera-Cano, M.E., Avila-Rodríguez, M., et al. (2006) Microbial interactions with heavy metals. *Rev Latinoam Microbiol* **48**: 203–210.
- Cheng, Y., Cheng, J.J., and Creamer, K.S. (2008) Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresour Technol* **99**: 4044–4064.
- Clemens, S. (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**: 475–486.
- Cobbett, C.S. (2000) Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol* **123**: 825–832.
- Di Marco, A., Bobik, T.A., and Wolfe, R.S. (1990) Unusual coenzymes of methanogenesis. *Annu Rev Biochem* **59**: 355–394.
- Dopson, M., Baker-Austin, C., Koppineedi, P.R., and Bond, P.L. (2003) Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology* **149**: 1959–1970.
- Droste, R.L., Andras, E., and Kennedy, K.J. (1990) Initial biofilm formation of acetoclastic methanogenic bacteria. *Biofouling* **2**: 191–210.
- Edgcomb, V.P., Molyneaux, S.J., Saito, M.A., Lloyd, K., Böer, S., Wirsén, C.O., et al. (2004) Sulfide ameliorates metal toxicity for deep-sea hydrothermal vent *archaea*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2551–2555.
- Flemming, H.C., and Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**: 623–633.
- Haferburg, G., and Kothe, E. (2007) Microbes and metals: interactions in the environment. *J Basic Microbiol* **47**: 453–456.
- Harrison, J.J., Ceri, H., and Turner, R.J. (2007) Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol* **5**: 928–938.
- Hummel, C.S., Lancaster, K.M., and Crane, 3rd, E.J. (2005) Determination of coenzyme A levels in *Pyrococcus furiosus* and other *Archaea*: implications for a general role for coenzyme A in thermophiles. *FEMS Microbiol Lett* **252**: 229–234.
- de Jager, H.-J., and Heyns, A.M. (1998) Kinetics of acid-catalyzed hydrolysis of a polyphosphate in water. *J Phys Chem A* **102**: 2838–2841.
- Jarrell, K.F., Saulnier, M., and Ley, A. (1987) Inhibition of methanogenesis in pure cultures by ammonia, fatty acids, and heavy metals, and protection against heavy metal toxicity by sewage sludge. *Can J Microbiol* **33**: 551–554.
- Karri, S., Sierra-Alvarez, R., and Field, J.A. (2006) Toxicity of copper to acetoclastic and hydrogenotrophic activities of methanogens and sulfate reducers in anaerobic sludge. *Chemosphere* **62**: 121–127.
- Keasling, J.D., and Hupf, G.A. (1996) Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **62**: 743–746.
- Koerdts, A., Gödeke, J., Berger, J., Thormann, K.M., and Albers, S.V. (2010) Crenarchaeal biofilm formation under extreme conditions. *PLoS ONE* **24**: 5e14104.
- Lapaglia, C., and Hartzell, P.L. (1997) Stress-induced production of biofilm in the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Appl Environ Microbiol* **6**: 3158–3163.
- Lira-Silva, E., Santiago-Martínez, M.G., Hernández-Juarez, V.E., García-Contreras, R., Moreno-Sánchez, R., and Jasso-Chávez, R. (2012) Activation of methanogenesis by cadmium in the marine archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *PLoS ONE* **7**: e48779.
- Lira-Silva, E., Ramírez-Lima, I.S., Olín-Sandoval, V., García-García, J.D., García-Contreras, R., Moreno-Sánchez, R., and Jasso-Chávez, R. (2011) Removal, accumulation and resistance to chromium in heterotrophic *Euglena gracilis*. *J Hazard Mater* **193**: 216–224.
- Maezato, Y., Johnson, T., McCarthy, S., Dana, K., and Blum, P. (2012) Metal resistance and lithoautotrophy in the extreme thermoacidophile *Metallosphaera sedula*. *J Bacteriol* **194**: 6856–6863.
- Mandal, A.K., Cheung, W.D., and Argüello, J.M. (2002) Characterization of a thermophilic P-type Ag<sup>+</sup>/Cu<sup>+</sup>-ATPase from the extremophile *Archaeoglobus fulgidus*. *J Biol Chem* **277**: 7201–7208.
- Mendoza-Cózatl, D., Loza-Tavera, H., Hernández-Navarro, A., and Moreno-Sánchez, R. (2005) Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 653–671.
- Nzengue, Y., Candéas, S.M., Sauvaigo, S., Douki, T., Favier, A., Rachidi, W., and Guiraud, P. (2011) The toxicity redox mechanisms of cadmium alone or together with copper and zinc homeostasis alteration: its redox biomarkers. *J Trace Elem Med Biol* **25**: 171–180.
- Olgúin, E.J., and Sánchez-Galván, G. (2011) Phyco-remediation: current challenges and applications. In *Comprehensive Biotechnology*, 2nd edn. Moo young, M., Butler, M., Moreira, A., Grodzinski, B., Cui, Z.F., Agathos, S. et al. (eds). Amsterdam, the Netherlands: Elsevier, pp. 215–222.
- Orell, A., Remonsellez, F., Arancibia, R., and Jerez, C.A. (2013) Molecular characterization of copper and cadmium resistance determinants in the biomining thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*. *Archaea* **2013**: 289236.
- Orell, A., Navarro, C.A., Rivero, M., Aguilar, J.S., and Jerez,

- C.A. (2012) Inorganic polyphosphates in extremophiles and their possible functions. *Extremophiles* **16**: 573–583.
- Peuke, A.D., and Rennenberg, H. (2005) Phytoremediation. *EMBO Rep* **6**: 497–501.
- Pramanik, P., and Kim, P.J. (2012) Effect of limited nickel availability on methane emission from EDTA treated soils: coenzyme M an alternative biomarker for methanogens. *Chemosphere* **90**: 873–876.
- Saavedra, E., Rodríguez-Enríquez, S., Quezada, H., Jasso-Chávez, R., and Moreno-Sánchez, R. (2011) Rational design of strategies based on metabolic control analysis. In *Comprehensive Biotechnology*, 2nd Edition, vol. 1, Moo-Young, M. (ed.). Amsterdam, the Netherlands: Elsevier, pp. 511–524.
- Scherer, P.A., and Bochem, H.P. (1983) Ultrastructural investigation of 12 *Methanosarcinae* and related species grown on methanol for occurrence of polyphosphate like inclusions. *Can J Microbiol* **29**: 1190–1199.
- Sillen, L.G., and Martell, A.E. (1964) *Stability Constants of Metal-Ion Complexes*. London, UK: The Chemical Society, Burlington House.
- Simpson, W.R. (1981) A critical review of cadmium on marine environment. *Prog Oceanogr* **10**: 1–70.
- Sochor, J., Zitka, O., Hynek, D., Jilkova, E., Krejčova, L., Trnkova, L., et al. (2011) Bio-sensing of cadmium (II) ions using *Staphylococcus aureus*. *Sensors (Basel)* **11**: 10638–10663.
- Takenaka, C., Kobayashi, M., and Kanaya, S. (2009) Accumulation of cadmium and zinc in *Evodiopanax innovans*. *Environ Geochem Health* **31**: 609–615.
- Veiga, M.C., Jain, M.K., Wu, W., Hollingsworth, R.I., and Zeikus, J.G. (1997) Composition and role of extracellular polymers in methanogenic granules. *Appl Environ Microbiol* **63**: 403–407.
- Villafane, A., Voskoboinik, Y., Ruhl, I., Sannino, D., Maezato, Y., Blum, P., and Bini, E. (2011) CopR of *Sulfolobus solfataricus* represents a novel class of archaeal-specific copper-responsive activators of transcription. *Microbiology* **157**: 2808–2817.
- Zhang, L., Keller, J., and Yuan, Z. (2009) Inhibition of sulfate-reducing and methanogenic activities of anaerobic sewer biofilms by ferric iron dosing. *Water Res* **43**: 4123–4132.
- Zhu, H., Guo, J., Chen, M., Feng, G., and Yao, Q. (2012) *Burkholderia dabaoshanensis* sp. nov., a heavy-metal-tolerant bacteria isolated from Dabaoshan mining area soil in China. *PLoS ONE* **7**: e50225.
- Fig. S1.** Representative chromatograms from HPLC of (A) a mixture of 7.5 nmol each of cysteine, coenzyme M and sulfide from commercial sources. Numbers represent the retention times in minutes. (B) and (C) show chromatograms from acid extracts (0.5–0.75 mg cell protein) of methanol and acetate HDGS cells, respectively, with 0 (black) or 0.63 mM CdCl<sub>2</sub> (red). It is noted that a significant fraction of sulfide is lost in the acid extracts; therefore, sulfide was quantified by the methylene blue method (see Appendix S1).
- Fig. S2.** Methane production of CdPA methanol-grown cells cultured in 0 (squares), 0.054 (226 pM free, circles), 0.63 (12.9 μM free up triangles), 1.4 (78.4 μM free; down triangles), 1.94 (339 μM free; diamonds) or 2.5 mM CdCl<sub>2</sub> (835 μM free; cross). Values are the mean ± SD of three different batches. \**P* > 0.005 versus control without cadmium.
- Fig. S3.** Cell aggregates formation induced by cadmium in cultures of *M. acetivorans* with methanol. Representative images of cultures with different concentrations of CdCl<sub>2</sub>. It is noted that control cultures without cadmium did not show any cell aggregates, whereas cultures of Cd<sup>2+</sup>-preadapted cells with 1.4 and 1.94 mM CdCl<sub>2</sub> showed a metabolically active aggregate.
- Fig. S4.** Effect of DNase I on the turbidity of 1 mg protein extracted from control cells (blue) and biofilm (black). For comparison, homogenized biofilm without DNase I is shown (red).
- Fig. S5.** Intracellular and extracellular cadmium clusters in *M. acetivorans* cultures. Atomic-resolution HAADF-STEM images of Cd<sup>2+</sup>-preadapted cells cultured in the presence of 1.4 mM CdCl<sub>2</sub> for 18 days revealed white spots localized inside (A) and outside along the biofilm (C). Regions enclosed in the white circle were analysed, and cadmium-sulphur grains were detected (B, D). Y-axis units are given in counts from 0 up to 1800. X-axis units are given in keV from 0 up to 20.48. The Cu<sup>2+</sup> detected derived from the grid in which samples were fixed.
- Fig. S6.** Atomic resolution HAADF-STEM images from cells cultured in the absence of cadmium for 18 days revealed no dense clusters (A) of cadmium-sulphur. Well-defined dense grains, acidocalcisomes were detected (white region enclosed in a square) (B) and in preadapted cells further exposed to 1.4 mM CdCl<sub>2</sub> acidocalcisomes shown larger (C).
- Table S1.** Content of malate, citrate and total phosphate in *M. acetivorans* in the absence or presence of Cd<sup>2+</sup> in the culture medium.
- Table S2.** Dry weight and Cd<sup>2+</sup> removal in biofilms.
- Appendix S1.** Supplementary materials.

### Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:



Supporting information. Experimental procedures

### *Chemicals*

Cysteine hydrochloride, coenzyme M, DNAase I from bovine pancreas, NAD<sup>+</sup>-malate dehydrogenase from porcine heart, N, N dimethyl p-phenylendiamine dihydrochloride (DMPD) and NAD<sup>+</sup> were purchased from Sigma Chem. Co. (St. Louis, Mo, USA). Citrate lyase from *K. pneumoniae* was from ROCHE (Germany). Standard solutions of cadmium, iron, zinc, cobalt and nickel for atomic absorption spectrophotometry were from Aldrich (Steinheim, Germany). Absolute methanol, sodium acetate, Na<sub>2</sub>S•9 H<sub>2</sub>O, CdCl<sub>2</sub>•2.5 H<sub>2</sub>O, HgCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>•7 H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>•5 H<sub>2</sub>O and K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> were of analytical grade.

### *Growth conditions*

*Methanosarcina acetivorans* C2A strain, kindly provided by Prof. James G. Ferry (Pennsylvania State University, USA) was cultured under anoxic conditions in the regular high salt medium (HS-medium) with 100 mM of acetate or methanol as carbon source. Final concentrations for Cys, S<sup>2-</sup> and inorganic orthophosphate (Pi) were 8, 1 and 5 mM, respectively (Lira-Silva *et al.*, 2012). Fifty mL of medium were poured in 100 mL serum-like bottles (Virmel, Mexico), sealed with a butyl rubber stopper (Virmel, Mexico) and secured with an aluminum crimp collar (Virmel, Mexico). The bottles with HS-medium were autoclaved at 121°C for 30 min. Experimental cultures were started by adding 10 mL fresh cell inocula and further incubating at 37°C without shaking. Hence, 60 mL of culture were considered. Growth was determined by measuring methane production and changes in absorbance at 600 nm.

### *Cadmium exposure*

To determine the effect of cadmium on thiol-molecules content, acetate and methanol cultures were carried out at different CdCl<sub>2</sub> concentrations (0, 1, 10, 25, 50 and 100 µM). The cells were harvested and washed with a buffer containing 50 mM Tris, 20 mM MgCl<sub>2</sub> and 2 mM EGTA (ethylene glycol tetra acetic acid) at pH 7.5 (TME buffer) by centrifugation as reported previously (Lira-Silva *et al.*, 2012) and kept at -72°C until use.

To determine the effect of Cd<sup>2+</sup> on thiol-molecules content and the cadmium accumulation in short-term experiments, 3 liter cultures with acetate or methanol were grown up to stationary

phase (14 and 6 days, respectively) and harvested and washed with TME buffer. High density cell suspensions (HDCS) were prepared as follows: cells (10-15 mg protein) were suspended in 50 mL of modified HS medium with lower contents of sodium, Pi and carbon source (to avoid cell duplication), and Cys and sulfide (to increase the free  $\text{Cd}^{2+}$  concentration): 200 mM NaCl (50% less), 0.66 mM Pi (86% less) 25 mM acetate or methanol (75% less), 2 mM Cys (75% less), 0.12 mM  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (90% less). Hence, HDCS were incubated for 24 h in the presence of 0-500  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ . To determine the effect of other heavy metals on thiol-molecules content and methane synthesis, a unique concentration of 500  $\mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and Cr (VI) were tested on HDCS growth on methanol. Thereafter, cells were harvested, washed and kept at  $-72^\circ\text{C}$  for 24 h maximum (to avoid thiol-molecules degradation) and further used for determinations of thiol-molecules content and cadmium accumulation, except for sulfide content which was carried out in freshly samples as described below. Methane production was used as a physiological process reflecting cell viability.

#### *Metabolites content*

Washed frozen concentrated cells (5-10 mg of protein/1 mL) were thawed at  $4^\circ\text{C}$  and lysated by adding 3% (v/v) cold perchloric acid (PCA). Samples were centrifuged at 14,000 rpm for 2 min at  $4^\circ\text{C}$ . Acidic samples reduced with sodium borohydride ( $\text{NaBH}_4$ ) were injected in a HPLC apparatus and the changes in the intracellular contents of Cys, CoM-SH and sulfide ( $\text{S}^{2-}$ ) were determined post column with DTNB (5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) as reported by Lira-Silva *et al.* (2011, 2012). The concentration of thiol-groups was calculated by using the DTNB molar extinction coefficient of  $13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Representative chromatograms of a mixture of commercial Cys, CoM-SH and  $\text{S}^{2-}$  (Fig. S1A) and acidic cell extracts (Figs. S1B and S1C) are shown in the supplementary material section.

During the development of the present study, it was observed that the storage of cells at  $-70^\circ\text{C}$  for 7 days and further cell rupture with perchloric acid resulted in loss of  $\text{S}^{2-}$  content by 20 and 50%, respectively, with no apparent lost of Cys and CoM-SH (data not shown). Hence,  $\text{S}^{2-}$  was also determined spectrophotometrically by the method of methylene blue formation as described previously by Lira-Silva *et al.* (2012) (see supplementary material section). Intracellular contents of malate, citrate and orthophosphate were determined following pre-established techniques (Lira-Silva *et al.*, 2011; LeBel *et al.*, 1978; Marín-Hernández *et al.*, 2006).

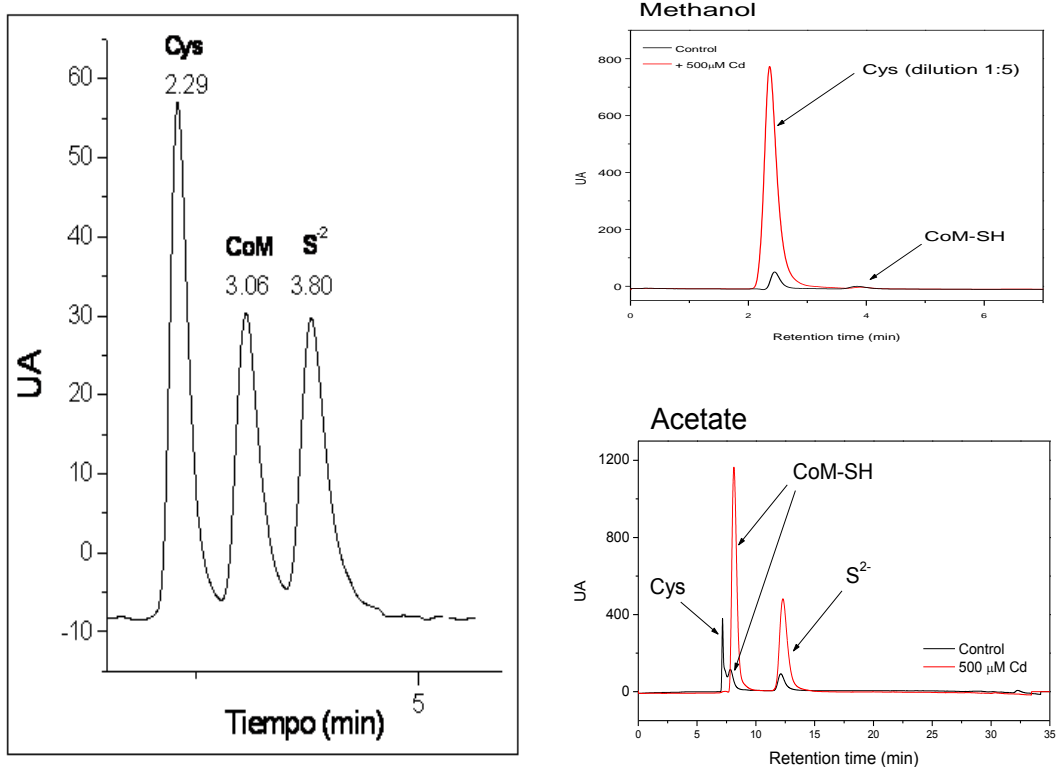


Figure S1. Representative chromatograms from HPLC of (A) a mixture of 7.5 nmol each of cysteine, coenzyme M and sulfide from commercial sources. Numbers represent the retention times in minutes. (B) and (C) show chromatograms from acid extracts (0.5-0.75 mg cell protein) of methanol- and acetate-HDCS cells, respectively, with 0 (black) or 0.63 mM CdCl<sub>2</sub> (red). It is noted that a significant fraction of sulfide is lost in the acid extracts; therefore, sulfide was quantified by the methylene blue method (see Methods section).

Methane production was determined by gas chromatography (Shimadzu GC2010 apparatus) equipped with a capillary column HP-PLOT/U of 30 m length, 0.32 mm I.D. and 10 μm film (Agilent, USA), and flame ionization detector. The protein content was determined by the Biuret method after cells were washed once with TME buffer, using bovine serum albumin as standard as described previously (Lira-Silva *et al.*, 2012).

#### *Cadmium removal and accumulation*

Cells were harvested and washed as indicated in the section 2.3 with 4 volumes of TME buffer; the pellet was re-suspended in fresh buffer to give 5-10 mg protein/mL and frozen at -70°C until use. Thawed aliquots of the cell suspensions were digested with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + HNO<sub>3</sub> (1:3)

for 24 h at 100°C and the intracellular contents of Cd, Fe, Zn, Ni and Co were determined by atomic absorption spectrophotometry (Varian Spectra AA 640).

*Chemical characterization of extracellular polymeric substances (EPS) and cellular ultra-structure*

Methanol-grown cells were cultured in the presence of 54  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  for 15 consecutive sub-cultures (3.5 months approximately), transferring a cell aliquot to fresh medium every 7 days. These  $\text{Cd}^{2+}$ -pre-adapted cells (CdPA cells) were then further cultured in the presence of 0.63, 1.4, 1.94 or 2.5 mM  $\text{CdCl}_2$ . Production of methane was used as the reliable indicator of cell growth and viability (Sowers, 1995) because the most common determination of the optical density was flawed by the turbidity brought about by the presence of high  $\text{Cd}^{2+}$ .

An agglomeration of cells developed after 5 days of culture on the bottom of the bottle. This agglomerate was separated from the planktonic cells by decantation. The agglomerate was fixed by adding 2.5% (v/v) glutaraldehyde in TME buffer for its posterior preparation for electron microscopy as reported previously (Lira-Silva *et al.*, 2012). In addition, biofilm formation was determined by the crystal violet staining method as reported elsewhere (Zhang *et al.*, 2007). Briefly, control and CdPA cells were cultured with fresh medium in 96-well polystyrene plates in the absence and presence of different cadmium concentration for 3 days. Thereafter, 0.1 % (w/v) crystal violet was added and incubated for 20 min; two washing steps with TME buffer were carried out, and finally a third washing step with absolute ethanol to solubilize all extracellular dye was made; hence, the optical density of the crystal violet retained by the cells was recorded at 595 nm.

To determine cadmium and sulfur localization inside and outside the cells, atomic-resolution high angle annular dark-field scanning-transmission electron microscopy (HAADF-STEM) was used. For STEM, the fixed cells with glutaraldehyde were post-fixed with 1% osmium tetroxide in TME for 2 h; samples were prepared as reported elsewhere (Gonzalez-del Pliego *et al.*, 2001).

In parallel, a second sample of biofilm was resuspended in TME buffer and homogenized by sonication of 3 pulses of 15 s each with 1 min resting with a sonifier equipped with a 2 mm diameter tip (Branson, Connecticut, USA) at 50% of maximal output. The biochemical composition of the biofilm was determined by colorimetric methods and compared with control

cultures without cadmium. For the non-soluble carbohydrate content the phenol-sulfuric method modified by Jasso-Chávez *et al.* (2010) was used (details are given in supplementary material section). Because it was not known what kind of sugars were predominantly present in the biofilm, the standard curve were carried out by using from 25 up to 200 µg of different sugars (glucose, trehalose, sucrose and rhamnose); however, no significant differences were attained with the different sugars used (data not shown).

To determine the presence of DNA as a component of the biofilm and taking advantage that the homogenized biofilm was disaggregated when DNase I was added (not shown), the homogenized biofilm was poured into a quartz cuvette containing TME buffer and incubated in the presence of DNase I; the decrease in the optical density due to DNA breakdown was followed at 540 nm. Still another fraction of the biofilm was used for determination of both, molecules with thiol groups and cadmium as described above.

## Supplementary Material

### Thiol-containing molecules

For the determination of the content of thiol-group molecules, the HPLC apparatus was used as indicated in the Methods section. The buffer used as mobile phase was 0.1 M phosphate pH 5.0 at a flow rate of 0.5 mL/min. Under these conditions, the retention times for commercial metabolites were 2.29 min for Cys, 3.06 min for CoM-SH and 3.8 min for S<sup>2-</sup>. Extracts from cells grown on methanol or acetate without or with 500 µM CdCl<sub>2</sub> showed essentially the same retention times for the three thiol-containing molecules (Fig. S1). Routinely at the end of the chromatography, the remaining organic matter was removed from the column by washing with 100% acetonitrile and then with water for 5 and 10 minutes each time.

### Determination of intracellular sulfide

This method was completely reliable when fresh harvested cells were used. Briefly, 23.7 mM zinc acetate, 60 mM NaOH, 0.18 mM DMPD dissolved in 5 N HCl and 0.1 mL of cells freshly harvested (1.5-2 mg protein), were poured into 10 mL anaerobic bottles sealed with a butyl rubber stopper and secured with an aluminum crimp collar by using a syringe and mixed until homogeneity. Hence, 2.8 mM FeCl<sub>3</sub> was added and the mixture incubated at room temperature

for 30 min for color development (methylene blue formation); longer incubation times did not yield further dye formation. Final volume was 2.5 mL. Samples were measured at 670 nm under anoxic conditions in an anaerobic chamber (COY laboratory products, Michigan, USA). The  $S^{2-}$  content-absorbance relationship was linear up to 350 nmol  $S^{2-}$ .

#### Non-soluble carbohydrate quantification

Briefly, an aliquot of the homogenized biofilm was boiled in a water bath for 15 min in the presence of 1% (w/v) SDS and further centrifuged at 14,000 rpm and 4°C. The pellet was resuspended and washed in 0.1% SDS and centrifuged again. Non-soluble carbohydrates contained in the pellet were hydrolyzed with 0.1 N NaOH. Hence, an aliquot was mixed with 2 parts of 5% phenol (w/v) and 4 parts of concentrated sulfuric acid and mixed vigorously until homogenization was evident. The mixture was incubated for 30 min in the dark, and absorbance was measured at 490 nm against a blank without sugar.

#### Biofilm metabolism

The synthesis of the biofilm by *M. acetivorans* was only achieved by cells that were cultured consecutively in the presence of  $Cd^{2+}$  for 3.5 months. Shorter pre-adaptation times were not systematically tested. The growth kinetics of these pre-adapted cells and their methane production were essentially identical to those of control cells. For instance, control,  $Cd^{2+}$ -preadapted (CdPA cells), and CdPA cells further cultured with up to 1.4 mM  $CdCl_2$ , and cultured with methanol, produced a total of  $25.7 \pm 1$  mmol methane/culture, whereas CdPA cells cultured with 1.94 and 2.5 mM  $CdCl_2$  (conditions under which biofilm formation takes place) showed significantly lower methane production. This last observation indicated that the cells in the biofilm were still metabolically functional despite the presence of elevated concentrations of  $Cd^{2+}$  (Fig. S2).

The dry weight determined in control cells was lower than that of CdPA cells cultured with 1.4 mM  $CdCl_2$ , suggesting that the carbon derived from methanol metabolism was used for biofilm formation (Fig. S3). Indeed, protein and non-soluble carbohydrates (see section 3.2 of Results for details) increased in cells cultured with cadmium that developed the biofilm. DNA was also an important component of the biofilm (Fig. S4), providing structural stability as reported for bacteria (Fleming and Windgenger, 2010).

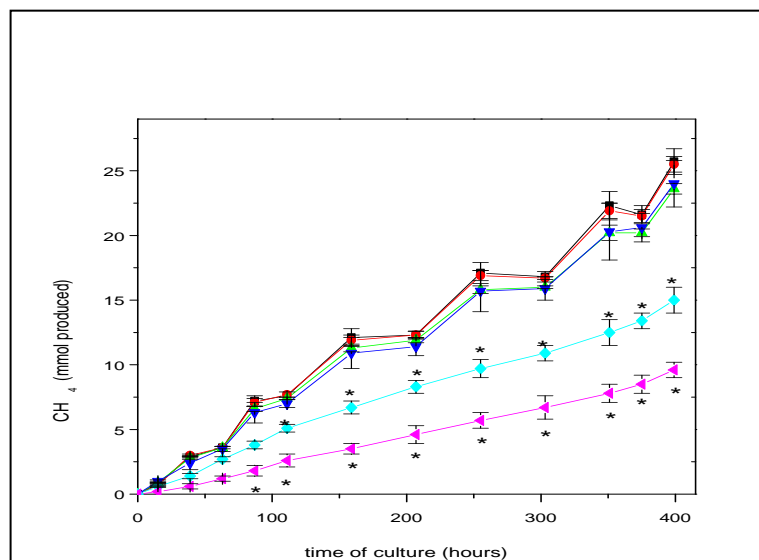


Figure S2. Methane production of CdPA methanol-grown cells cultured in 0 (squares), 0.054 (226 pM free, circles), 0.63 (12.9  $\mu$ M free up triangles), 1.4 (78.4  $\mu$ M free; down triangles), 1.94 (339  $\mu$ M free; diamonds) or 2.5 mM CdCl<sub>2</sub> (835  $\mu$ M free; cross). Values are the mean  $\pm$  SD of three different batches. \* P>0.005 vs control without cadmium.

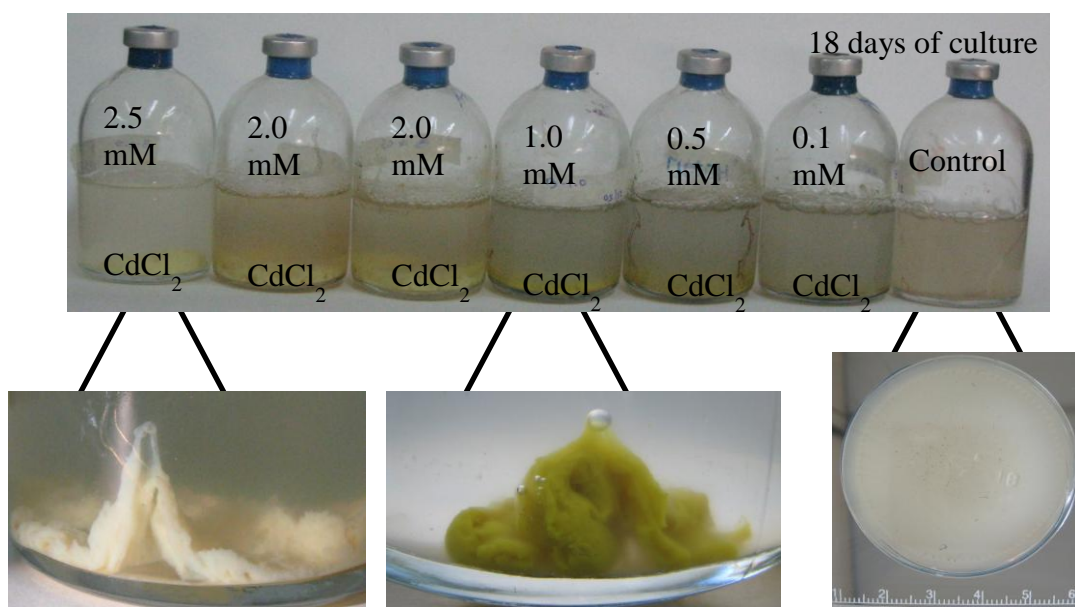


Figure S3. Cell aggregates formation induced by cadmium in cultures of *M. acetivorans* with methanol. Representative images of cultures with different concentrations of CdCl<sub>2</sub>. It is noted that control cultures without cadmium did not show any cell aggregates, whereas cultures of Cd<sup>2+</sup>-preadapted cells with 1.4 and 1.94 mM CdCl<sub>2</sub> showed a metabolically active aggregate.

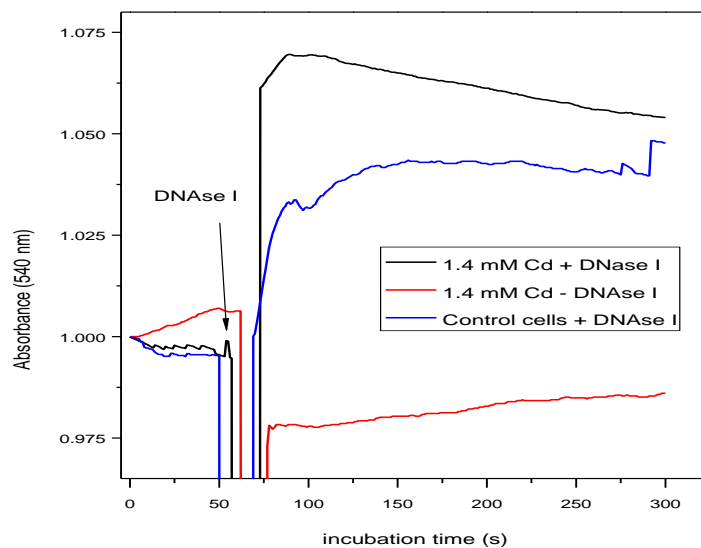


Figure S4. Effect of DNAase I on the turbidity of 1 mg protein extracted from control cells (blue) and biofilm (black). For comparison, homogenized biofilm without DNase I is shown (red).

#### STEM analysis sample preparation

To determine cadmium and sulfur localization inside and outside the cells, atomic-resolution high angle annular dark-field scanning-transmission electron microscopy (HAADF-STEM) was used. For STEM, the fixed cells with glutaraldehyde were post-fixed with 1% osmium tetroxide in TME for 2 h, and then rinsed three times with the same buffer. Each cell sample was placed in a filtration system with a 13 mm polycarbonate membrane of 0.6  $\mu\text{m}$  diameter pore (Whatman, Kent UK) and dehydrated with increasing concentrations of ethanol. Each membrane was recovered and dried in a critical point dryer apparatus (Polaron E5000, West Sussex, UK) with carbon dioxide. The samples were mounted on aluminum stubs on carbon double-side sticker and covered with 10 nm ionized gold film using coater system equipment (Polaron 11-HD). Finally, the samples were analyzed by scanning electron microscope (Zeiss DSM-950, Oberkochen, Germany) with secondary electrons accelerated at 15 kV.



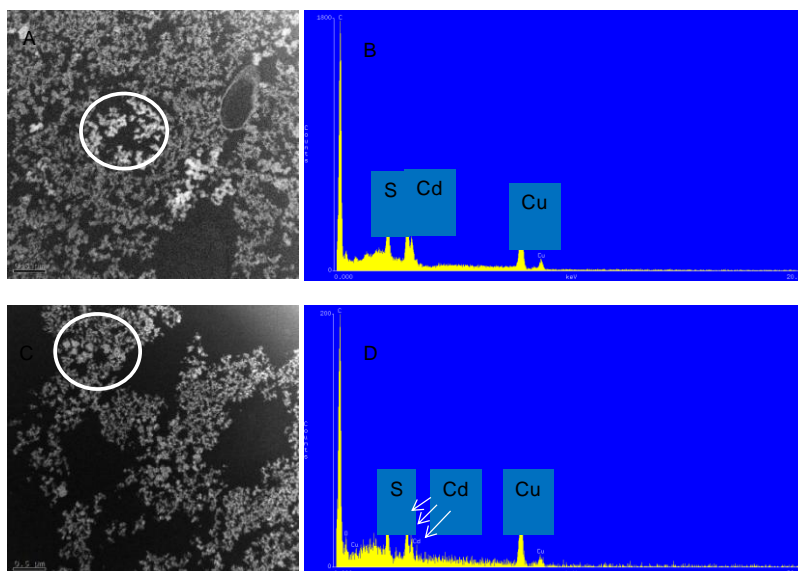


Figure S5. Intracellular and extracellular cadmium clusters in *M. acetivorans* cultures. Atomic-resolution HAADF-STEM images of  $\text{Cd}^{2+}$  preadapted cells cultured in the presence of 1.4 mM  $\text{CdCl}_2$  for 18 days revealed white spots localized inside (A) and outside along the biofilm (C). Regions enclosed in the white circle were analyzed and cadmium-sulfur grains were detected (B, D). Y-axis units are given in counts from 0 up to 1800. X-axis units are given in keV from 0 up to 20.48. The  $\text{Cu}^{2+}$  detected derived from the grid in which samples were fixed.

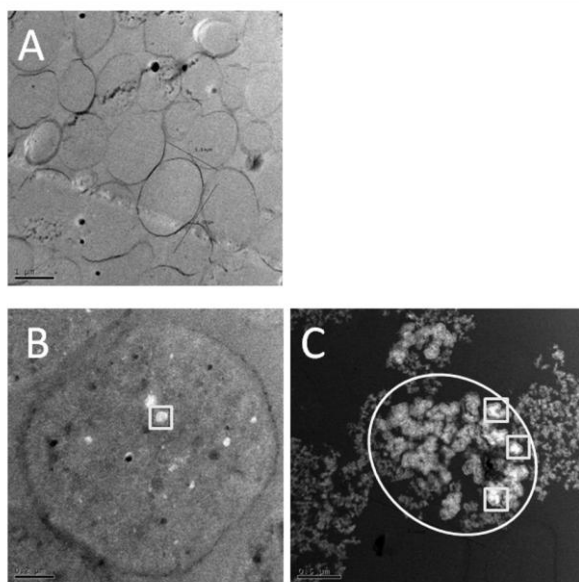


Figure S6. Atomic-resolution HAADF-STEM images from cells cultured in the absence of cadmium for 18 days revealed no dense clusters (A) of cadmium-sulfur. Well defined dense grains, acidocalcisomes were detected (white region enclosed in a square) (B) and in pre-adapted cells further exposed to 1.4 mM  $\text{CdCl}_2$  acidocalcisomes shown larger (C).

Table 1. Content of malate, citrate and total phosphate in *M. acetivorans* in the absence or presence of Cd<sup>2+</sup> in the culture medium

| [CdCl <sub>2</sub> ]<br>μM | acetate          |           |                      |                |                      | methanol       |           |                    |                |                   |
|----------------------------|------------------|-----------|----------------------|----------------|----------------------|----------------|-----------|--------------------|----------------|-------------------|
|                            | HDCS             |           | Growth curves        |                |                      | HDCS           |           | Growth curves      |                |                   |
|                            | Mal              | Cit       | Total phosphate      | Mal            | Total phosphate      | Mal            | Cit       | Total phosphate    | Mal            | Total phosphate   |
| <b>0</b>                   | 45 ± 12<br>(3)   | 37<br>(1) | 2900±1500<br>(3)     | 23 ± 4<br>(3)  | 1100 ± 190<br>(4)    | 40 ± 15<br>(4) | 47<br>(1) | 3220 ± 1110<br>(3) | 33 ± 15<br>(3) | 1320 ± 137<br>(4) |
| <b>100</b>                 | ND               | ND        | ND                   | 46 ± 18<br>(3) | 2625 ± 796<br>(4) ** | ND             | ND        | ND                 | 17 ± 3<br>(3)  | 1430 ± 230<br>(4) |
| <b>250</b>                 | 38 ± 25<br>(3)   | 41<br>(1) | 1750±<br>1000<br>(3) | ND             | ND                   | 50 ± 3<br>(4)  | 55<br>(2) | 3945 ± 1510<br>(3) | ND             | ND                |
| <b>500</b>                 | 73 ± 13*<br>(3)* | 43<br>(2) | 3723± 520<br>(3)     | ND             | ND                   | 24 ± 6 (4)     | 55<br>(1) | 3430 ± 330<br>(3)  | ND             | ND                |

Values are given as nmol/culture and represent the mean ± SD. The values shown between parentheses represent the number of independent experiments assayed. \* P<0.05; \*\* P<0.01 vs control without cadmium.

Mal, malate; Cit, citrate; ND, not determined.

Table S2. Dry weight and Cd<sup>2+</sup> removal in biofilms

| <b>[CdCl<sub>2</sub>] mM</b> | <b>Dry weight/culture (mg)</b> | <b>% Cd in DW</b> |
|------------------------------|--------------------------------|-------------------|
| <b>0</b>                     | 68 ± 3                         | ---               |
| <b>0.1</b>                   | 75 ± 12                        | 1                 |
| <b>0.63</b>                  | 79 ± 14                        | 5.7               |
| <b>1.4</b>                   | 84 ± 7 *                       | 8.4               |
| <b>1.94</b>                  | 96 ± 11 *                      | 10.2              |

Values are the mean ± SD of 3 independent experiments. \* P < 0.05 vs control cells without cadmium.

## B. Otras publicaciones

Durante el posgrado participé en algunos proyectos de investigación relacionados con los mecanismos de resistencia a diferentes tipos de estrés, de los cuales se publicaron los siguientes artículos:

- García-Contreras, R., **Lira-Silva, E.**, Jasso-Chávez, R., Hernández-González, I. L., Maeda, T., Hashimoto, T., & Moreno-Sánchez, R. (2013). Isolation and characterization of gallium resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Int. J Med Microbiol.*, 303(8), 574-582.
- Santiago-Martínez MG, **Lira-Silva E.**, Encalada R, Pineda E, Gallardo-Pérez JC, Zepeda-Rodríguez A, Moreno-Sánchez R, Saavedra E & Jasso-Chávez R. (2015). Cadmium removal by *Euglena gracilis* is enhanced under anaerobic growth conditions. *J Hazard Mater.*, 288:104-112. En este trabajo se agradece al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al CONACyT (268871). Se anexa hoja de agradecimientos.
- Jasso-Chávez R, Santiago-Martínez MG, **Lira-Silva E.**, Pineda E, Zepeda-Rodríguez A, Belmont-Díaz J, Encalada R, Saavedra E & Moreno-Sánchez R. (2015). Air-adapted *Methanosarcina acetivorans* shows high methane production and develops resistance against oxygen stress. *PLoS One*. 10(2):e0117331.
- Santiago-Martínez M.G., Encalada R., **Lira-Silva E.**, Pineda E., Gallardo-Pérez J.C., Reyes-García M.A., Saavedra E., Moreno-Sánchez R., Marín-Hernández A., Jasso-Chávez R. (2016). The nutritional status of *Methanosarcina acetivorans* regulates glycogen metabolism and gluconeogenesis and glycolysis fluxes. *FEBS J.*, 283(10), 1979-1999. doi: 10.1111/febs.13717. En este trabajo se agradece al PDCB, a la UNAM y al CONACyT (268871). Se anexa hoja de agradecimientos.



## Isolation and characterization of gallium resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants



Rodolfo García-Contreras<sup>a,\*</sup>, Elizabeth Lira-Silva<sup>a</sup>, Ricardo Jasso-Chávez<sup>a</sup>,  
Ismael L. Hernández-González<sup>b</sup>, Toshinari Maeda<sup>c</sup>, Takahiro Hashimoto<sup>c</sup>,  
Fred C. Boogerd<sup>d</sup>, Lili Sheng<sup>e,f</sup>, Thomas K. Wood<sup>e</sup>, Rafael Moreno-Sánchez<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry, National Institute of Cardiology, Mexico, D.F., Mexico

<sup>b</sup> Department of Genetic Engineering, CINVESTAV, Irapuato, Guanajuato, Mexico

<sup>c</sup> Department of Biological Functions and Engineering, Kyushu Institute of Technology, Kitakyushu, Japan

<sup>d</sup> Department of Molecular Cell Physiology, VU University, Amsterdam, The Netherlands

<sup>e</sup> Department of Chemical Engineering, Pennsylvania State University, University Park, PA, USA

<sup>f</sup> State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai, China

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 February 2013

Received in revised form 9 May 2013

Accepted 29 July 2013

#### Keywords:

*Pseudomonas aeruginosa*

Gallium

Resistance

HitAB permease

Pyocyanin

### ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* PA14 cells resistant to the novel antimicrobial gallium nitrate (Ga) were developed using transposon mutagenesis and by selecting spontaneous mutants. The mutants showing the highest growth in the presence of Ga were selected for further characterization. These mutants showed 4- to 12-fold higher Ga minimal inhibitory growth concentrations and a greater than 8-fold increase in the minimum biofilm eliminating Ga concentration. Both types of mutants produced Ga resistant biofilms whereas the formation of wild-type biofilms was strongly inhibited by Ga. The gene interrupted in the transposon mutant was *hitA*, which encodes a periplasmic iron binding protein that delivers Fe<sup>3+</sup> to the HitB iron permease; complementation of the mutant with the *hitA* gene restored the Ga sensitivity. This *hitA* mutant showed a 14-fold decrease in Ga internalization versus the wild-type strain, indicating that the HitAB system is also involved in the Ga uptake. Ga uptake in the spontaneous mutant was also lower, although no mutations were found in the *hitAB* genes. Instead, this mutant harbored 64 non-silent mutations in several genes including those of the phenazine pyocyanin biosynthesis. The spontaneous mutant produced 2-fold higher pyocyanin basal levels than the wild-type; the addition of this phenazine to wild-type cultures protected them from the Ga bacteriostatic effect. The present data indicate that mutations affecting Ga transport and probably pyocyanin biosynthesis enable cells to develop resistance to Ga.

© 2013 Elsevier GmbH. All rights reserved.

### Introduction

*Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic pathogen that causes infections with high mortality rate in individuals with severe burns, cancer, AIDS, immunosuppression or cystic fibrosis (Mutlu and Wunderink, 2006; Kerr and Snelling, 2009; Mahar et al., 2010; Lambert et al., 2011), is responsible for a plethora of infections, like those associated with ventilator-associated pneumonia, urinary and peritoneal dialysis, catheter infections, bacterial keratitis, otitis, burns, and wound and lung infections (Macé et al., 2008). It is therefore one of the main agents responsible for nosocomial

infections (Hidron et al., 2008; Jones et al., 2009; Zhanel et al., 2010). In addition, it exhibits intrinsically high resistance to antimicrobials (Lambert, 2002; Poole, 2002) and develops fast antibiotic resistance (Poole, 2011). Recently, we demonstrated that *P. aeruginosa* can also acquire resistance to virulence inhibitors (Maeda et al., 2011), which were supposed to be impervious to resistance (Bjarnsholt et al., 2010; Rasko and Sperandio, 2010). In addition, there has been a notorious increase in multidrug resistant clinical strains (Paterson, 2006; Kerr and Snelling, 2009), and there are several pan-resistant strains treatable only with colistin. However, colistin is highly nephrotoxic and resistance against it has also been found in clinical and laboratory *P. aeruginosa* strains (Poole, 2011). Hence, it is expected that clinical, pan-resistant strains sensitive to colistin will eventually become resistant to colistin (Poole, 2011).

Therefore, it is relevant to develop novel anti-pseudomonal therapies. As an alternative to the utilization of current antibiotics, new approaches have been proposed such as (i) phage therapy (Wright et al., 2009); (ii) virulence inhibitors, including those

\* Corresponding author at: Department of Biochemistry, National Institute of Cardiology, Juan Badiano #1 Col. Sección XVI, Del. Tlalpan, C.P. 14080 México, D.F., Mexico, Tel.: +52 5556848625.

E-mail addresses: [garrod13420@cardiologia.org.mx](mailto:garrod13420@cardiologia.org.mx), [rgarc@bq.unam.mx](mailto:rgarc@bq.unam.mx) (R. García-Contreras).



## Cadmium removal by *Euglena gracilis* is enhanced under anaerobic growth conditions



M. Geovanni Santiago-Martínez<sup>a</sup>, Elizabeth Lira-Silva<sup>a</sup>, Rusely Encalada<sup>a</sup>, Erika Pineda<sup>a</sup>, Juan Carlos Gallardo-Pérez<sup>a</sup>, Armando Zepeda-Rodríguez<sup>b</sup>, Rafael Moreno-Sánchez<sup>a</sup>, Emma Saavedra<sup>a</sup>, Ricardo Jasso-Chávez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Mexico

<sup>b</sup> Facultad de Medicina, UNAM, Mexico City, Mexico

### HIGHLIGHTS

- The protist *Euglena gracilis* had the ability to grow and remove large amounts of Cd<sup>2+</sup> under anaerobic conditions.
- High biomass was attained by combination of glycolytic and mitochondrial carbon sources.
- Routes of degradation of glucose, glutamate and malate under anaerobic conditions in *E. gracilis* are described.
- Biosorption was the main mechanism of Cd<sup>2+</sup> removal in anaerobiosis, whereas the Cd<sup>2+</sup> intracellularly accumulated was inactivated by thiol-molecules and polyphosphate.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 October 2014

Received in revised form 5 February 2015

Accepted 9 February 2015

Available online 11 February 2015

#### Keywords:

Anaerobic metabolism  
Biomass production  
Heavy metal toxicity  
Cadmium pollution  
Biosorption

### ABSTRACT

The facultative protist *Euglena gracilis*, a heavy metal hyper-accumulator, was grown under photoheterotrophic and extreme conditions (acidic pH, anaerobiosis and with Cd<sup>2+</sup>) and biochemically characterized. High biomass ( $8.5 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>) was reached after 10 days of culture. Under anaerobiosis, photosynthetic activity built up a microaerophilic environment of 0.7% O<sub>2</sub>, which was sufficient to allow mitochondrial respiratory activity: glutamate and malate were fully consumed, whereas 25–33% of the added glucose was consumed. In anaerobic cells, photosynthesis but not respiration was activated by Cd<sup>2+</sup> which induced higher oxidative stress. Malondialdehyde (MDA) levels were 20 times lower in control cells under anaerobiosis than in aerobiosis, although Cd<sup>2+</sup> induced a higher MDA production. Cd<sup>2+</sup> stress induced increased contents of chelating thiols (cysteine, glutathione and phytochelatin) and polyphosphate. Biosorption (90%) and intracellular accumulation (30%) were the mechanisms by which anaerobic cells removed Cd<sup>2+</sup> from medium, which was 36% higher versus aerobic cells. The present study indicated that *E. gracilis* has the ability to remove Cd<sup>2+</sup> under anaerobic conditions, which might be advantageous for metal removal in sediments from polluted water bodies or bioreactors, where the O<sub>2</sub> concentration is particularly low.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Microalgae have been used to remove or bio-transform residual nutrients and pollutants such as heavy metals from wastewater or sediments [1–4]. Industrial wastewater treatment for selective removal of heavy metal ions, including Pb(II), Hg(II), Cd(II), Ni(II),

V(IV,V), Cr(III,VI), Cu(II) and Zn(II), uses various modern types of ion exchange resins [5]. However, for an efficient clearance of wastewaters, it is required to remove both organic matter and heavy metals, which accumulate in the sludge of bioreactors operating under aerobic or anaerobic conditions [6]. Heavy metal removal by microalgae has attracted attention because they also have the ability to remove both CO<sub>2</sub> and organic waste [3,7]. Then, to develop efficient treatments of wastewaters or polluted sediments by bioremediation, microorganisms able to grow in the presence and absence of O<sub>2</sub> and with a broad metabolic plasticity are required.

The flagellate protist algae-like *Euglena gracilis* is a cosmopolitan organism able to grow under heterotrophic, photosynthetic

\* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano # 1, Sección XVI, Tlalpan, México D.F. 14080, Mexico. Tel.: +52 55 55732911; fax: +52 55 5573 0994.

E-mail address: [rjasso.cardiol@yahoo.com.mx](mailto:rjasso.cardiol@yahoo.com.mx) (R. Jasso-Chávez).

PolyP and its associated enzymes are essential for some structural functions, in bioenergetics and notably, stress responses [63]. Therefore, to our knowledge, this is the first report documenting a protist able to accumulate polyP in response to Cd<sup>2+</sup> stress under aerobic conditions (cf. Table 2). Gene sequence databases show the presence of genes encoding polyP kinase-1 (PPK1) in only a limited number of photosynthetic, non-photosynthetic and symbiotic eukaryotes [64]. No sequences related to PPK1 or polyP phosphatase (PPX) in the *Euglena* EST database (<http://verdi.kobic.re.kr>) were found. However, preliminary PCR analysis, using primers designed for archaeal sequences of the genes coding for PPK1 and PPX, amplified fragments using *E. gracilis* DNA as template; the resulting amplicons were of the same size (130 bp) to those obtained with archaeal DNA (data not shown). These results suggested that the free living protist *E. gracilis* has the genetic and enzymatic machinery to carry out the synthesis/degradation of polyP. Identification of the complete genes for sequencing and further cloning, and enzyme characterization is currently under research in our lab.

## 5. Conclusions

High biomass was achieved when photosynthetic *E. gracilis* was grown with glycolytic and oxidative substrates under either aerobic or anaerobic conditions and even in the presence of Cd<sup>2+</sup>. Cadmium removal in the anaerobic medium was mainly by biosorption (90% total Cd<sup>2+</sup> removal) and was higher than that by aerobic cells. The present data support the proposal of *E. gracilis* as suitable bioremediator of Cd<sup>2+</sup> in anaerobic environments (sediments or sludge).

## Acknowledgements

This work was partially supported by grants Nos. 156969 (RJC), 80534 and 123636 (RMS) from CONACyT, Mexico and No. PICS08-5 (RMS, RJC) from ICyTDF, Mexico; and CONACyT Ph.D. fellowships to MGSM (474917) and ELS (268871) from The Ph.D. Program in Biomedical Sciences (PDCB, UNAM). The authors also thank Patricia Bizarro Nevares and Francisco Pasos Nájera (Laboratory of Electron Microscopy, Department of Cellular and Tissue Biology, Faculty of Medicine, UNAM) for the preparation of the cell samples and the process and digitalization of the images, respectively; and Physicist Roberto Hernandez Reyes (Institute of Physics, UNAM) for the ultra-structure analysis.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.027>.

## References

- J. de la Notie, A. Bassères, Biotreatment of anaerobically digested swine manure with microalgae, *Biol. Waste* 29 (1989) 17–31.
- E.J. Olguín, Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes, *Biotechnol. Adv.* 22 (2003) 81–91.
- K.Y. Park, B.R. Lim, K. Lee, Growth of microalgae in diluted process water of the animal wastewater treatment plant, *Water Sci. Technol.* 59 (2009) 2111–2116.
- E.W. Wilde, J.R. Benemann, Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae, *Biotechnol. Adv.* 11 (1993) 781–812.
- A. Dabrowski, Z. Hubicki, P. Podkošcielny, E. Robens, Selective removal of the heavy metal ions from waters and industrial wastewaters by ion-exchange method, *Chemosphere* 56 (2004) 91–106.
- B.A. Butler, Effect of imposed anaerobic conditions on metals release from acid-mine drainage contaminated streambed sediments, *Water Res.* 45 (2011) 328–336.
- H.F. Jin, B.R. Lim, K. Lee, Influence of nitrate feeding on carbon dioxide fixation by microalgae, *J. Environ. Sci. Health A Toxic Hazard. Subst. Environ. Eng.* 41 (2006) 2813–2824.
- R. Moreno-Sánchez, R. Covián, R. Jasso-Chávez, S. Rodríguez-Enríquez, F. Pacheco-Moisés, M.E. Torres-Márquez, Oxidative phosphorylation supported by an alternative respiratory pathway in mitochondria from *Euglena*, *Biochim. Biophys. Acta* 1457 (2000) 200–210.
- R. Jasso-Chávez, R. Moreno-Sánchez, Cytosol-mitochondria transfer of reducing equivalents by a lactate shuttle in heterotrophic *Euglena*, *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 4942–4951.
- J.S. Rodríguez-Zavala, M.A. Ortiz-Cruz, R. Moreno-Sánchez, Characterization of an aldehyde dehydrogenase from *Euglena gracilis*, *J. Eukaryot. Microbiol.* 53 (2006) 36–42.
- R. Jasso-Chávez, A. Pacheco-Rosales, E. Lira-Silva, J.C. Gallardo-Pérez, N. García, R. Moreno-Sánchez, Toxic effects of Cr(VI) and Cr(III) on energy metabolism of heterotrophic *Euglena gracilis*, *Aquat. Toxicol.* 100 (2010) 329–338.
- C. Avilés, H. Loza-Tavera, N. Terry, R. Moreno-Sánchez, Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*, *Arch. Microbiol.* 180 (2003) 1–10.
- E. Lira-Silva, I.S. Ramírez-Lima, V. Olin-Sandoval, J.D. García-García, R. García-Contreras, R. Moreno-Sánchez, R. Jasso-Chávez, Removal, accumulation and resistance to chromium in heterotrophic *Euglena gracilis*, *J. Hazard. Mater.* 193 (2011) 216–224.
- V. Albergoni, E. Piccini, O. Coppellotti, Response to heavy metals in organisms-I. Excretion and accumulation of physiological and non physiological metals in *Euglena gracilis*, *Comp. Biochem. Physiol. C* 67C (1980) 121–127.
- S. Devars, C. Avilés, C. Cervantes, R. Moreno-Sánchez, Mercury uptake and removal by *Euglena gracilis*, *Arch. Microbiol.* 174 (2000) 175–180.
- M. Einicker-Lamas, G.A. Mezian, T.B. Fernandes, F.L. Silva, F. Guerra, K. Miranda, M. Attias, M.M. Oliveira, *Euglena gracilis* as a model for the study of Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> toxicity and accumulation in eukaryotic cells, *Environ. Pollut.* 120 (2002) 779–786.
- D. Mendoza-Cozatl, S. Devars, H. Loza-Tavera, R. Moreno-Sánchez, Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*, *Physiol. Plant.* 115 (2002) 276–283.
- D.G. Mendoza-Cózatl, E. Rangel-González, R. Moreno-Sánchez, Simultaneous Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, and Pb<sup>2+</sup> uptake and accumulation by photosynthetic *Euglena gracilis*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51 (2006) 521–528.
- N. Ishii, S. Uchida, Removal of technetium from solution by algal flagellate *Euglena gracilis*, *J. Environ. Qual.* 35 (2006) 2017–2020.
- J.D. García-García, J.S. Rodríguez-Zavala, R. Jasso-Chávez, D. Mendoza-Cozatl, R. Moreno-Sánchez, Chromium uptake, retention and reduction in photosynthetic *Euglena gracilis*, *Arch. Microbiol.* 191 (2009) 431–440.
- D.G. Mendoza-Cózatl, J.S. Rodríguez-Zavala, S. Rodríguez-Enríquez, G. Mendoza-Hernandez, R. Briones-Gallardo, R. Moreno-Sánchez, Phytochelatin-cadmium-sulfide high-molecular-mass complexes of *Euglena gracilis*, *FEBS J.* 273 (2006) 5703–5713.
- F. Remonsellez, A. Orell, C.A. Jerez, Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism, *Microbiology* 152 (2006) 59–66.
- E. Lira-Silva, M.G. Santiago-Martínez, R. García-Contreras, A. Zepeda-Rodríguez, A. Marín-Hernández, R. Moreno-Sánchez, R. Jasso-Chávez, Cd<sup>2+</sup> resistance mechanisms in *Methanosarcina acetivorans* involve the increase in the coenzyme M content and induction of biofilm synthesis, *Environ. Microbiol. Rep.* 5 (2013) 799–808.
- H. Inui, K. Miyatake, Y. Nakano, S. Kitaoka, The physiological role of oxygen-sensitive pyruvate dehydrogenase in mitochondrial fatty acid synthesis in *Euglena gracilis*, *Arch. Biochem. Biophys.* 237 (1985) 423–429.
- N.A. Castro-Guerrero, R. Jasso-Chávez, R. Moreno-Sánchez, Physiological role of rhodoquinone in *Euglena gracilis* mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* 1710 (2005) 113–121.
- W.-T. Liu, T. Mino, K. Nakamura, T. Matsuo, Glycogen accumulating population and its anaerobic substrate uptake in anaerobic-aerobic activated sludge without biological phosphorus removal, *Water Res.* 30 (1996) 75–82.
- R. Moreno-Sánchez, J.C. Raya, Preparation of coupled mitochondria from *Euglena* by sonication, *Plant Sci.* 48 (1987) 151–157.
- R. Jasso-Chávez, M.G. Santiago-Martínez, E. Lira-Silva, E. Pineda, A. Zepeda-Rodríguez, J. Belmont-Díaz, R. Encalada, E. Saavedra, R. Moreno-Sánchez, Air-adapted *Methanosarcina acetivorans* shows high methane production and develops resistance against oxygen stress, *PLoS One* (2014), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0117331> (in press).
- A. Marín-Hernández, J.C. Gallardo-Pérez, S. Rodríguez-Enríquez, R. Encalada, R. Moreno-Sánchez, E. Saavedra, Modeling cancer glycolysis, *Biochim. Biophys. Acta* 1807 (2011) 755–767.
- E. Lira-Silva, M.G. Santiago-Martínez, V. Hernández-Juárez, R. García-Contreras, R. Moreno-Sánchez, R. Jasso-Chávez, Activation of methanogenesis by cadmium in the marine archaeon *Methanosarcina acetivorans*, *PLoS One* 7 (2012) e48779.
- D.I. Arnon, Copper enzymes in isolated chloroplasts, *Plant Physiol.* 24 (1949) 1–15.
- S. Rodríguez-Enríquez, A. Marín-Hernández, J.C. Gallardo-Pérez, R. Moreno-Sánchez, Kinetics of transport and phosphorylation of glucose in cancer cells, *J. Cell Physiol.* 221 (2009) 552–559.
- T.J. Schoenmakers, G.J. Visser, G. Flik, A.P. Theuvsen, Chelator: an improved method for computing metal ion concentrations in physiological solutions, *Biotechnology* 12 (1992) 870–879.

RESEARCH ARTICLE

# Air-Adapted *Methanosarcina acetivorans* Shows High Methane Production and Develops Resistance against Oxygen Stress

Ricardo Jasso-Chávez<sup>1\*</sup>, M. Geovanni Santiago-Martínez<sup>1</sup>, Elizabeth Lira-Silva<sup>1</sup>, Erika Pineda<sup>1</sup>, Armando Zepeda-Rodríguez<sup>2</sup>, Javier Belmont-Díaz<sup>1</sup>, Rusely Encalada<sup>1</sup>, Emma Saavedra<sup>1</sup>, Rafael Moreno-Sánchez<sup>1</sup>

**1** Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico, **2** Facultad de Medicina, UNAM, Mexico City, Mexico

\* [rjass\\_cardiol@yahoo.com.mx](mailto:rjass_cardiol@yahoo.com.mx)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Jasso-Chávez R, Santiago-Martínez MG, Lira-Silva E, Pineda E, Zepeda-Rodríguez A, Belmont-Díaz J, et al. (2015) Air-Adapted *Methanosarcina acetivorans* Shows High Methane Production and Develops Resistance against Oxygen Stress. PLoS ONE 10(2): e0117331. doi:10.1371/journal.pone.0117331

**Academic Editor:** Stephan Neil Witt, Louisiana State University Health Sciences Center, UNITED STATES

**Received:** September 16, 2014

**Accepted:** December 22, 2014

**Published:** February 23, 2015

**Copyright:** © 2015 Jasso-Chávez et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was partially supported by grants Nos. 156969 (RJC), 178638 (ES) and 80534 and 123636 (RMS) from CONACyT, Mexico and No. PICS08-5 (RMS, RJC) from ICyTDF, Mexico. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

*Methanosarcina acetivorans*, considered a strict anaerobic archaeon, was cultured in the presence of 0.4–1% O<sub>2</sub> (atmospheric) for at least 6 months to generate air-adapted cells; further, the biochemical mechanisms developed to deal with O<sub>2</sub> were characterized. Methane production and protein content, as indicators of cell growth, did not change in air-adapted cells respect to cells cultured under anoxia (control cells). In contrast, growth and methane production significantly decreased in control cells exposed for the first time to O<sub>2</sub>. Production of reactive oxygen species was 50 times lower in air-adapted cells versus control cells, suggesting enhanced anti-oxidant mechanisms that attenuated the O<sub>2</sub> toxicity. In this regard, (i) the transcripts and activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase significantly increased; and (ii) the thiol-molecules (cysteine + coenzyme M-SH + sulfide) and polyphosphate contents were respectively 2 and 5 times higher in air-adapted cells versus anaerobic-control cells. Long-term cultures (18 days) of air-adapted cells exposed to 2% O<sub>2</sub> exhibited the ability to form biofilms. These data indicate that *M. acetivorans* develops multiple mechanisms to contend with O<sub>2</sub> and the associated oxidative stress, as also suggested by genome analyses for some methanogens.

## Introduction

The reactive oxygen species (ROS) are toxic for most cells because they induce (i) oxidation of polysaccharides and polyunsaturated fatty acids, as well as amino acid residues, particularly of sulfhydryl groups in proteins; (ii) loss of metals in metalloproteins; and (iii) DNA mutations, among many others [1]. Aerobic microorganisms have developed multiple strategies to handle ROS stress including: (i) enzymes that scavenge ROS such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidases (PXs); (ii) protein repair mechanisms such as the thioredoxin system; (iii) DNA damage repair enzymes such as RecA; and (iv) anti-oxidant metabolites such as glutathione, α-tocopherol, carotenes, ascorbate, and trypanothione, which are able to directly inactivate ROS [1–4].



## The nutritional status of *Methanosarcina acetivorans* regulates glycogen metabolism and gluconeogenesis and glycolysis fluxes

Michel Geovanni Santiago-Martínez, Rusely Encalada, Elizabeth Lira-Silva, Erika Pineda, Juan Carlos Gallardo-Pérez, Marco Antonio Reyes-García, Emma Saavedra, Rafael Moreno-Sánchez, Alvaro Marín-Hernández and Ricardo Jasso-Chávez

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México DF, México

### Keywords

carbohydrate metabolism; metabolic regulation; methanogenesis; transcriptional regulation

### Correspondence

A. Marín-Hernández or R. Jasso-Chávez, Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano #1, Sección XVI, Tlalpan, México DF 14080, Mexico  
Tel: +52 55 5573 2911  
Fax: +52 55 5573 0994  
E-mails: marinhernandez@yahoo.com.mx; rjassocho@gmail.com

(Received 1 November 2015, revised 10 March 2016, accepted 17 March 2016)

doi:10.1111/febs.13717

Gluconeogenesis is an essential pathway in methanogens because they are unable to use exogenous hexoses as carbon source for cell growth. With the aim of understanding the regulatory mechanisms of central carbon metabolism in *Methanosarcina acetivorans*, the present study investigated gene expression, the activities and metabolic regulation of key enzymes, metabolite contents and fluxes of gluconeogenesis, as well as glycolysis and glycogen synthesis/degradation pathways. Cells were grown with methanol as a carbon source. Key enzymes were kinetically characterized at physiological pH/temperature. Active consumption of methanol during exponential cell growth correlated with significant methanogenesis, gluconeogenic flux and steady glycogen synthesis. After methanol exhaustion, cells reached the stationary growth phase, which correlated with the rise in glycogen consumption and glycolytic flux, decreased methanogenesis, negligible acetate production and an absence of gluconeogenesis. Elevated activities of carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthetase complex and pyruvate: ferredoxin oxidoreductase suggested the generation of acetyl-CoA and pyruvate for glycogen synthesis. In the early stationary growth phase, the transcript contents and activities of pyruvate phosphate dikinase, fructose 1,6-bisphosphatase and glycogen synthase decreased, whereas those of glycogen phosphorylase, ADP-phosphofructokinase and pyruvate kinase increased. Therefore, glycogen and gluconeogenic metabolites were synthesized when an external carbon source was provided. Once such a carbon source became depleted, glycolysis and methanogenesis fed by glycogen degradation provided the ATP supply. Weak inhibition of key enzymes by metabolites suggested that the pathways evaluated were mainly transcriptionally regulated. Because glycogen metabolism and glycolysis/gluconeogenesis are not present in all methanogens, the overall data suggest that glycogen storage might represent an environmental advantage for methanosarcinales when carbon sources are scarce. Also, the understanding of the central carbohydrate metabolism in methanosarcinales may help to optimize methane production.

### Abbreviations

1,3BPG, 1,3-bisphosphoglycerate; 2PG, 2-phosphoglycerate; 3PG, 3-phosphoglycerate; AcK, acetate kinase; ALDO, fructose 1,6-bisphosphate aldolase; CODH/ACS, carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthetase complex; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; *Eh*, recombinant enzyme of *Entamoeba histolytica*; EMP, Embden–Meyerhoff–Parnas; ENO, enolase; Erythro4P, erythrose 4-phosphate; Fru1,6BP, fructose 1,6-bisphosphate; Fru6P, fructose 6-phosphate; FruBPase, fructose 1,6-bisphosphatase; G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; G6PDH, glucose 6-phosphate dehydrogenase; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GAPN, nonphosphorylating GAPDH; GAPOR, glyceraldehyde 3-phosphate: ferredoxin oxidoreductase; Glc1P, glucose 1-phosphate; Glc6P, glucose 6-phosphate; GYP, glycogen phosphorylase; GYS, glycogen synthase; HK, hexokinase; HPI, hexose 6-phosphate isomerase; PEP, phosphoenolpyruvate; PEPS, phosphoenolpyruvate synthase; PFK1, phosphofructokinase 1; PFOR, pyruvate: ferredoxin oxidoreductase; PGAM, 3-phosphoglycerate mutase; PGK, 3-phosphoglycerate kinase; PGM, phosphoglucomutase; PPDK, pyruvate orthophosphate dikinase; Pta, phosphotransacetylase; PYK, pyruvate kinase; TPI, triosephosphate isomerase; UGPase, UDP-glucose pyrophosphorylase;  $\alpha$ GPDH,  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase.

(2–2.3 mg of protein) incubated in HKE-Na buffer, pH 7, with 3.5 mM ATP, 2.5 mM ADP, 4 mM AMP, 15 mM MgCl<sub>2</sub> and 10 IU L-lactate dehydrogenase (Sigma), starting the reaction by adding 4 mM 3PG and monitoring NADH oxidation [49]. The gluconeogenic *ex vivo* flux was determined in the cell homogenates (2–2.3 mg of protein) incubated in HKE-Na buffer with 5.7 mM ATP and 3.5 AMP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Na-arsenate and 2 IU G6PDH (Sigma), starting the reaction by adding 5 mM DHAP and monitoring NADPH production.

For protein determination, the Biuret method was used. Briefly, cell samples were incubated with 10% (w/v) trichloroacetic acid at 4 °C for 2 h and centrifuged at 14 462 g in a bench centrifuge. After pellet resuspension by vortexing, protein was determined as reported previously [22].

### Acknowledgements

This research was partially supported by grants Nos. 156969 (RJC), 180322 (AMH), 178638 (ES) and 239930 (RMS) from CONACyT-Mexico and No. PICS08-5 (RMS, RJC) from ICyTDF, Mexico. Support was also provided by CONACyT PhD fellowships to MGSM (280295) and ELS (268871) from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

### Author contributions

RJC, AMH and RMS planned the experiments. MGSM, RE, ELS, EP, JCGP and MARG performed the experiments. RJC, MGSM, AMH, ES and RMS analyzed the data. RJC, AMH, ES and RMS wrote the paper.

### References

- 1 Fukuda W, Fukui T, Atomi H & Imanaka T (2004) First characterization of an archaeal GTP-dependent phosphoenolpyruvate carboxykinase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J Bacteriol* **186**, 4620–4627.
- 2 Tjaden B, Plagens A, Dörr C, Siebers B & Hensel R (2006) Phosphoenolpyruvate synthetase and pyruvate, phosphate dikinase of *Thermoproteus tenax*: key pieces in the puzzle of archaeal carbohydrate metabolism. *Mol Microbiol* **60**, 287–298.
- 3 Verhees CH, Kengen SW, Tuininga JE, Schut GJ, Adams MW, De Vos WM & Van Der Oost J (2003) The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *Biochem J* **375**, 231–246.
- 4 Galagan JE, Nusbaum C, Roy A, Endrizzi MG, Macdonald P, Fitz Hugh W, Calvo S, Engels R, Smirnov S, Atnoor D *et al.* (2002) The genome of *Methanosarcina acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genom Res* **12**, 532–542.
- 5 Sakai S, Takaki Y, Shimamura S, Sekine M, Tajima T, Kosugi H, Ichikawa N, Tasumi E, Hiraki AT, Shimizu A *et al.* (2011) Genome sequence of a mesophilic hydrogenotrophic methanogen *Methanocella paludicola*, the first cultivated representative of the Order Methanocellales. *PLoS One* **6**, e22898.
- 6 Simpson PG & Whitman WB (1993) Anabolic pathways in methanogens. In *Methanogenesis Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics* (Ferry JG, ed.), pp. 445–472. Chapman and Hall, London.
- 7 Kenealy WR & Zeikus JG (1982) One-carbon metabolism in methanogens: evidence for synthesis of a two-carbon cellular intermediate and unification of catabolism and anabolism in *Methanosarcina barkeri*. *J Bacteriol* **151**, 932–941.
- 8 Abbanat DR & Ferry JG (1990) Synthesis of acetyl coenzyme A by carbon monoxide dehydrogenase complex from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. *J Bacteriol* **172**, 7145–7150.
- 9 Furdul C & Ragsdale SW (2000) The role of pyruvate ferredoxin oxidoreductase in pyruvate synthesis during autotrophic growth by the Wood-Ljungdahl pathway. *J Biol Chem* **275**, 28494–28499.
- 10 Bock AK, Kunow J, Glasemacher J & Schönheit P (1996) Catalytic properties, molecular composition and sequence alignments of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from the methanogenic archaeon *Methanosarcina barkeri* (strain Fusaro). *Eur J Biochem* **237**, 35–44.
- 11 Hutchins AM, Holden JF & Adams MW (2001) Phosphoenolpyruvate synthetase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol* **183**, 709–715.
- 12 Bräsen C, Esser D, Rauch B & Siebers B (2014) Carbohydrate metabolism in archaea: current insights into unusual enzymes and pathways and their regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* **78**, 89–175.
- 13 Murray PA & Zinder SH (1987) Polysaccharide reserve material in the acetotrophic methanogen *Methanosarcina thermophila* strain TM-I: accumulation and mobilization. *Arch Microbiol* **147**, 109–116.
- 14 Pellerin P, Gruson B, Prensier G, Albagnac G & Debeire P (1987) Glycogen in *Methanotrix*. *Arch Microbiol* **146**, 377–381.
- 15 Yu JP, Ladapo J & Whitman WB (1994) Pathway of glycogen metabolism in *Methanococcus marispladis*. *J Bacteriol* **176**, 325–332.
- 16 Maitra PK, Bhosale SB, Kshirsagar DC, Yeole TY & Shanbhag AN (2001) Metabolite and enzyme profiles of glycogen metabolism in *Methanococcoides methylutens*. *FEMS Microbiol Lett* **198**, 23–29.
- 17 Verhees CH, Tuininga JE, Kengen SW, Stams AJ, van der Oost J & de Vos WM (2001) ADP-Dependent

### C. Abreviaciones

|  |  |                                     |   |
|--|--|-------------------------------------|---|
| <b>acetil-CoA</b>  | acetil-coenzima A  | <b>Coenzima F<sub>420</sub></b>     | 8-hidroxi-5-deazaflavina  |
| <b>Ack</b>   | acetato cinasa   | <b>CoM-SH</b>                       | 2-mercaptoetanosulfonato o coenzima M   |
| <b>ADN</b>   | ácido desoxirribonucleico  | <b>CoM-S-S-CoB</b>                  | heterodisulfuro   |
| <b>Ag<sup>1+</sup></b>   | ión plata  | <b>CONACyT</b>                      | Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología  |
| <b>Al<sup>3+</sup></b>   | ión aluminio   | <b>Cr<sup>3+</sup></b>              | ión cromo (III)   |
| <b>As</b>  | arsénico   | <b>Cr<sup>6+</sup></b>              | ión cromo (VI)  |
| <b>AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>                            | ión arsenato   | <b>Cr</b>                           | cromo   |
| <b>ATP</b>   | adenosín trifosfato  | <b>CrO<sub>4</sub><sup>-2</sup></b> | ión cromato   |
| <b>Ba<sup>2+</sup></b>   | ión bario  | <b>CRX</b>                          | proteína de respuesta extracelular al cobre en <i>Methanobacterium bryantii</i> |
| <b>Bi</b>  | bismuto  | <b>Cu</b>                           | cobre   |
| <b>CA</b>  | anhidrasa carbónica  | <b>Cu<sup>1+</sup></b>              | ión cobre (I)   |
| <b>Ca<sup>2+</sup></b>   | ión calcio   | <b>Cu<sup>2+</sup></b>              | ión cobre (II)  |
| <b>Cd<sup>2+</sup></b>   | ión cadmio   | <b>Cys</b>                          | cisteína  |
| <b>CdCl<sub>2</sub></b>  | cloruro de cadmio  | <b>Cyt c</b>                        | citocromo c   |
| <b>CDF</b>   | proteínas facilitadoras de cationes  | <b>DMPD</b>                         | N, N dimethyl p-phenylendiamine dihydrochloride                                 |
| <b>CdPA</b>  | Cadmium Preadapted Cells o cultivos preadaptados a 54 μM Cd <sup>2+</sup>                            | <b>EPA</b>                          | Environmental Protection Agency   |
| <b>CdPA-Cd<sup>2+</sup> 1<sup>er</sup> P</b>                   | cultivos CdPA que se les dejó de suministrar el Cd <sup>2+</sup> por primera vez desde su adaptación | <b>EPS</b>                          | sustancias poliméricas extracelulares   |
| <b>CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>PO<sub>3</sub><sup>2-</sup></b> | acetil-fosfato   | <b>Factor III</b>                   | 5-hidroxibenzimidazolil-cobamida  |
| <b>CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup></b>                           | acetato  | <b>Fd</b>                           | ferredoxina   |
| <b>CH<sub>3</sub>COONa 3H<sub>2</sub>O</b>                     | acetato de sodio trihidratado  | <b>Fd<sub>ox</sub></b>              | ferredoxina oxidada   |
| <b>CH<sub>3</sub>COSCoA</b>                                    | acetil-CoA   | <b>Fd<sub>red</sub></b>             | ferredoxina reducida  |
| <b>CH<sub>3</sub>-S-CoM</b>                                    | metil-CoM  | <b>Fe</b>                           | hierro  |
| <b>CH<sub>3</sub>-THSPT</b>                                    | metil-tetrahidrosarcinopterina   | <b>Fe<sup>3+</sup></b>              | ión hierro (III)  |
| <b>CH<sub>4</sub></b>  | metano   | <b>FID</b>                          | detector de ionización de flama   |
| <b>Cit</b>   | citrato  | <b>FQ</b>                           | fitoquelatinas  |
| <b>Cnt + 1<sup>er</sup> P Cd<sup>2+</sup></b>                  | cultivos control con una primera exposición al Cd <sup>2+</sup>                                      | <b>GC</b>                           | cromatografía de gases  |
| <b>Cnt</b>   | cultivos control o sin cadmio  | <b>GMI</b>                          | Global Methane Initiative   |
| <b>CO</b>  | monóxido de carbono  | <b>GSH</b>                          | glutación   |
| <b>Co</b>  | cobalto  | <b>H<sup>+</sup></b>                | protón  |
| <b>CO<sub>2</sub></b>  | dióxido de carbono   | <b>H<sub>2</sub></b>                | hidrógeno   |
| <b>Co<sup>2+</sup></b>   | ión cobalto  | <b>H<sub>2</sub>S</b>               | sulfuro de hidrógeno  |
| <b>CoA-SH</b>  | coenzima A   | <b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>  | ácido sulfúrico   |
| <b>CoB-SH</b>  | 7-mercapto heptanoil-L-treonina fosfato o coenzima B   | <b>H<sub>4</sub>SPT o THSPT</b>     | 5,6,7,8-tetrahidrosarcinopterina  |
| <b>CODH/AcS</b>  | complejo monóxido de carbono deshidrogenasa /acetil-CoA sintasa                                      | <b>HAADF-STEM</b>                   | High Angle Annular Dark-Field Scanning Transmission Electron Microscopy         |
|  |  | <b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>  | ión bicarbonato   |

|   |   |   |  |
|---|---|---|--|
| <b>HDCS</b>   | High Density Cell Suspensions   | <b>ND</b>   | no determinado   |
| <b>Hdr</b>  | heterodisulfuro reductasa   | <b>Ni</b>   | níquel   |
| <b>Hg<sup>2+</sup></b>  | ión mercurio (II)   | <b>O<sub>2</sub></b>                                  | oxígeno  |
| <b>Hg</b>   | mercurio  | <b>PCA</b>  | ácido perclórico   |
| <b>HNO<sub>3</sub></b>  | ácido nítrico   | <b>[PO<sub>4</sub>12MoO<sub>3</sub>]<sup>3-</sup></b> | ión fosfomolibdato   |
| <b>HPLC</b>   | High Performance Liquid Chromatography                                    | <b>Pb</b>   | plomo  |
| <b>HS</b>   | medio High Salt   | <b>Pb<sup>2+</sup></b>                                | ión plomo  |
| <b>IC<sub>50</sub></b>  | concentración que inhibe al 50% de la población                           | <b>PCR</b>  | reacción en cadena de la polimerasa  |
| <b>IPTG</b>   | isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido                                      | <b>Pfu</b>  | <i>Pyrococcus furiosus</i>   |
| <b>K<sup>+</sup></b>  | ión potasio   | <b>Pi</b>   | fosfato inorgánico   |
| <b>K<sub>m</sub></b>  | constante de Michaelis-Menten   | <b>Pit</b>  | sistema de transporte de fosfato   |
| <b>La<sup>2+</sup></b>  | ión lantano (II)  | <b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>                    | ión fosfato  |
| <b>Mal</b>  | malato  | <b>polyP</b>  | polifosfato  |
| <b>Ma-Rnf</b>   | complejo homólogo al Rnf de bacteria <i>Rhodobacter nitrogen fixation</i> | <b>PPi</b>  | pirofosfato  |
| <b>Mcr</b>  | metil-CoM reductasa   | <b>PPK</b>  | polifosfato cinasa   |
| <b>metol</b>  | 4-Methylaminophenol sulfate   | <b>PPX</b>  | exopolifosfatasa   |
| <b>MFR</b>  | 2-aminometilfurano o metanofurano   | <b>Pta</b>  | fosfotransacetilasa  |
| <b>Mg<sup>2+</sup></b>  | ión magnesio  | <b>S<sup>2-</sup></b>                                 | ión sulfuro  |
| <b>MGD</b>  | molibdopterina guanina dinucleótido                                       | <b>Sb</b>   | antimonio  |
| <b>Mn</b>   | manganeso   | <b>SD</b>   | desviación estándar  |
| <b>Mo</b>   | molibdeno   | <b>SDS</b>  | dodecilsulfato de sodio  |
| <b>MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>   | ión molibdato   | <b>Se</b>   | selenio  |
| <b>MP</b>   | metanofenazina  | <b>SEISA</b>  | Sistemas de Energía Ininterrumpida SA DE CV  |
| <b>MPH<sub>2</sub></b>  | metanofenazina reducida   | <b>-SH</b>  | molécula con grupo tiol  |
| <b>Mrp</b>  | antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>                              | <b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>                    | ión sulfato  |
| <b>Mtr</b>  | metil tetrahidrosarcinapterina:coenzima M metiltransferasa                | <b>Sr<sup>2+</sup></b>                                | ión estroncio  |
| <b>(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 4H<sub>2</sub>O</b> | heptamolibdato de amonio  | <b>TCD</b>  | detector de conductividad térmica  |
| <b>N<sub>2</sub></b>  | nitrógeno   | <b>Te</b>   | telurio  |
| <b>Na<sup>+</sup></b>   | ión sodio   | <b>THMPT</b>  | tetrahidrometanopterina  |
| <b>NaBH<sub>4</sub></b>   | borohidruro de sodio  | <b>TME</b>  | buffer con 50 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl <sub>2</sub> y 2 mM EGTA a pH 7.2                     |
| <b>NADH</b>   | nicotinamida adenina dinucleótido reducido                                | <b>t<sub>R</sub></b>                                  | tiempo de retención  |
| <b>NADP</b>   | nicotinamida adenina dinucleótido fosfato                                 | <b>Trp(SH)<sub>2</sub></b>                            | triptanotión   |
| <b>NaHSO<sub>3</sub></b>  | bisulfito de sodio  | <b>U</b>  | enzima activa requerida para transformar o producir 1 mmol de sustrato o producto en 1 min |
|   |   | <b>V<sub>max</sub></b>                                | velocidad máxima   |
|   |   | <b>W</b>  | tungsteno  |
|   |   | <b>Zn</b>   | zinc   |
|   |   | <b>Zn<sup>2+</sup></b>                                | ión zinc   |
|   |   | <b>γ-EC</b>   | γ-glutamilcisteína   |