

2. INTRODUCCIÓ GENERAL

2.1. Els arqueobacteris

La vida existeix des de fa 3500 milions d'anys, tot i així els primers animals van començar a evolucionar fa només 680 milions d'anys. Abans només hi havia microorganismes. Els microorganismes són majoritàriament unicel·lulars i es divideixen en bacteris i protists. Les cèl·lules dels protists són com les dels animals, plantes i fongs en el sentit que tenen un nucli que conté el DNA estructurat en cromosomes lineals, un citoesquelet intern i un sistema d'endomembranes, és a dir són eucariotes. Els bacteris, en canvi, tenen cromosomes consistents en molècules circulars de DNA enllaçades directament a la membrana plasmàtica i no tenen ni sistema endomembranari ni esquelet intern.

El registre fòssil mostra que els bacteris van originar-se fa 3500 milions d'anys, però que els primers eucariotes, els protists, no van aparèixer fins molt més tard, ara fa uns 1700 milions d'anys.

Hi ha dos regnes de bacteris, els eubacteris i els arqueobacteris. Les membranes de la cèl·lula bacteriana estan formades per lípids i proteïnes. Els lípids dels eubacteris consisteixen en molècules de glicerol unides a molècules orgàniques de cadena llarga mitjançant enllaços ester. A la membrana lipídica arqueobacteriana la molècula de glicerol en canvi està unida amb enllaços tipus èter a cadenes orgàniques isoprenoides; aquesta estructura ha estat explicada (Cavalier-Smith, 1992; De Rosa, 1996) com una possibilitat evolutiva de supervivència i adaptació a condicions àcides extremes. L'inusual estabilitat intrínseca dels lípids arqueobacterians obre noves vies en el camp de la bioelectrònica de pel·lícules lipídiques estables, ja que han sofert selecció natural durant milers de milions d'anys en condicions extremes de temperatura, pH i força iònica (De Rosa *et al*, 1994). De manera similar (De Rosa,

1996) aquests lípids podrien representar un material a tenir en compte per a la construcció d'una nova generació de liposomes estables i membranes artificials d'interès tecnològic (De Rosa *et al*, 1994; De Rosa, 1996).

Els arqueobacteris representen la tercera línia en l'evolució al costat dels procariotes (eubacteris) i dels eucariotes (König, 1988). Aquesta afirmació es basa principalment en les comparacions de les seqüències del RNA ribosòmic que han permès elaborar un arbre filogenètic arqueobacterià (Woese, 1987) i dels éssers vius (Woese, 1992)(**figura 2.1**). Les principals característiques distintives dels arqueobacteris són, segons Smith (1988):

- (i) la possessió de lípids amb enllaços èter
- (ii) l'absència d'àcid muràmic encara que hi hagi paret
- (iii) una composició diferencial de nucleòtids i de la seqüència al rRNA 16S
- (iv) una estructura distintiva de la RNA polimerasa i
- (v) un espectre inusual de coenzims.

La major part d'espècies d'arqueobacteris s'agrupen en tres grups que viuen en ambients extrems (Konig *et al* , 1989; Kates, 1997):

a) Arqueobacteris halòfils extrems, que viuen a llocs saturats de sal o pròxims a la saturació, per exemple en mars interiors, com el Mar Mort, llacs salats o alcalins.

b) Arqueobacteris metanògens, viuen en ambients anaerobis com aiguamolls, rumen d'herbívors, aigües residuals o pantans.

c) Arqueobacteris termòfils extrems i termoacidòfils localitzats a llocs amb temperatures elevades i a temperatures elevades i baix pH alhora, respectivament, com fonts termals o bé sòls volcànics.

Segons König *et al* (1989) n'hi ha dos grups més: els arqueobacteris sulfatoreductors i els arqueobacteris sense paret cel·lular, amb un gènere descrit per cadascun.

Tot i això recentment s'han detectat arqueobacteris en concentracions elevades a mostres de bacterioplàncton de l'Oceà Pacífic, l'Antàrtida i Alaska, que mostren que estan amplament repartits al biota global (Fuhrmann *et al*, 1992).

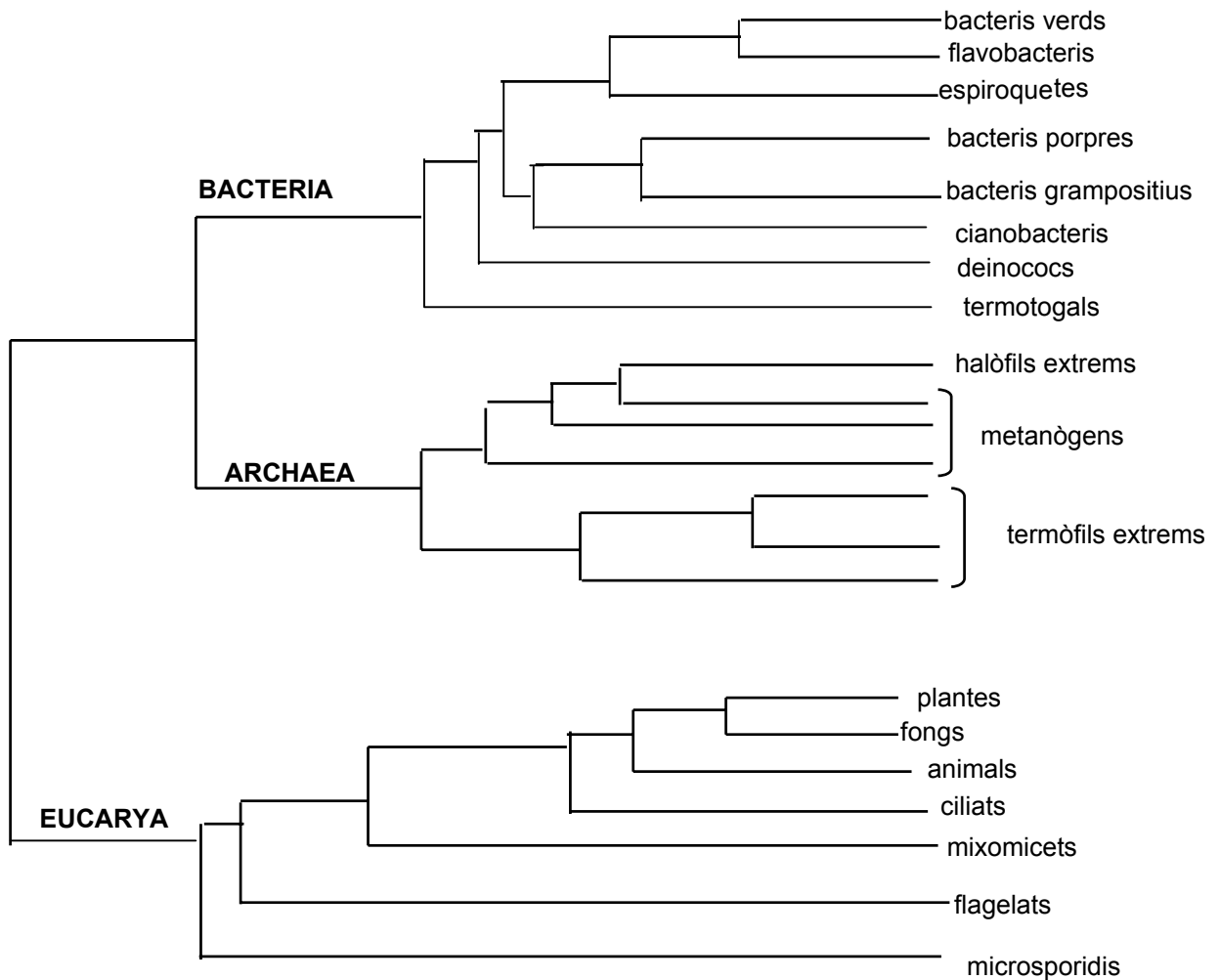


Figura 2.1. Arbre filogenètic dels éssers vius basat en la seqüenciació de la subunitat 16S del RNA r (Woese, 1992).

2.2. Lípids arqueobacterians

En els arqueobacteris, l'enllaç èter, la naturalesa isoprenoid de les cadenes alifàtiques i la quiralitat del glicerol poden ser considerades rellevants filogenèticament (Gambacorta *et al*, 1994). La composició de la porció lipídica de la seva membrana o "core" lipídic i les dels fosfolípids i glicolípidis permeten distingir entre els tres grups d'*Archaea* (Kates, 1997). La porció lipídica, del tipus dialquilglicerolèter, està constituïda majoritàriament per difitanilgliceroldièter ($C_{20}C_{20}$ -archaeol) i altres variants com C_{20},C_{25}^- , C_{25},C_{25}^- , archaeols macrocíclics C_{40} , hidroxilats, o dímers com el dibifitanildigliceroltetraèter (**figures 5.3 a 5.11**).

L'estructura característica dels lípids arqueobacterians permet la seva utilització com a biomarcadors en mostres ambientals i geoquímiques (Chappe *et al*, 1982; Volkman i Maxwell, 1986; Kates, 1997), per exemple s'han descrit en halites terciàries i en sediments marins antics (Teixidor, 1996), en dipòsits evaporítics recents (Teixidor *et al*, 1993), en sediments de conques anòxiques hipersalines (Pease *et al*, 1992), en sediments marins i lacustres (Schouten *et al*, 1998) i en aigua marina, el que permet establir la presència d'arqueobacteris planctònics (Hoefs *et al*, 1997).

Segons Oremland *et al* (1989) els compostos orgànics formats a la biosfera s'emmagatzemen primer en els organismes vivents, després són descomposats i transferits als oceans i a l'atmosfera o enterrats en els sediments. Els compostos orgànics sedimentaris són atacats per microorganismes (inclosos els metanògens) i si les condicions ambientals ho permeten pot quedar metà atrapat a la matriu sedimentària. Així, l'activitat metanogènica que té lloc durant la diagènesi de sediments recents pot arribar a constituir un dipòsit de gas natural explotable comercialment. La naturalesa específica de la matèria orgànica enterrada als sediments reflecteix tant els tipus d'organismes com les condicions paleoambientals presents durant la deposició inicial. Alguns compostos orgànics seran atacats microbialment durant la diagènesi i es convertiran en noves molècules, afegint un compost característic

a la matèria orgànica sedimentària. A mesura que els sediments passen a capes més profundes i es litifiquen al llarg dels períodes geològics, l'activitat bacteriana baixa significativament.

L'estructura molecular bàsica i l'estereoquímica de molts lípids queden marcadament ben preservades al llarg del temps geològic, mantenint l'empremta bioquímica de la seva font original. Abans del descobriment d'isoprenoids en els lípids arqueobacterians, s'havien detectat diversos tipus d'hidrocarburs isoprenoides tant en sediments antics com recents, en roques sedimentàries i en el petroli (Albaigés, 1980). Es coneixia que compostos com el pristà i el fità es trobaven tant en mostres sedimentàries com al petroli, tot i que es creia que derivaven només de la cadena de fitol de la clorofil·la a en forma majoritària, i en menor proporció (Volkman i Maxwell, 1986) de la clorofil·la b, la bacterioclorofil·la a, tocoferols α i γ i pigments carotenoides, i per tant es consideraven biomarcadors d'organismes fotosintètics. El descobriment de cadenes de fitol als lípids arqueobacterians van questionar el fet que els biomarcadors isoprenoides derivessin únicament de fonts fotosintètiques. Així mateix, el fet que el pristà i el fità es trobessin en roques de l'Arcaè (més de 2.700 milions d'anys), on es creu que encara no existia la fotosíntesi, i en ambients deposicionals extrems on poden excloure's tots els organismes llevat dels arqueobacteris, va donar evidències que certs biomarcadors isoprenoides tenien origen arqueobacterià. Als anys 70, a principis d'aquest descobriment, les contribucions bacterianes d'isoprenoids a sediments es consideraven limitades a ambients hipersalins, com el Mar Mort i llacs o estuaris àrids. A mesura que s'ha evolucionat en el coneixement i elucidació de l'estereoquímica dels lípids trobats en els diferents grups d'arqueobacteris i els trobats en sediments, s'han anat coneixent biomarcadors provinents de cadascun dels grups.

2.3. Els bacteris metanògens

Els bacteris metanògens són un grup gran i divers d'arqueobacteris, les seves característiques comunes són que formen grans quantitats de metà com a principal producte del seu metabolisme energètic i són anaerobis estrictes (Whitman *et al*, 1992), són abundants en hàbitats on els acceptors d'electrons com oxigen, nitrat, ferro(III) i sulfat són limitants. La majoria viuen en pH pròxims a la neutralitat i poden trobar-se en temperatures que van des de 0°C a superiors a 100°C. Així es donen en pantans, maresmes, camps d'arròs, aigües residuals, tracte digestiu d'herbívoros, sediments marins i zones geotermals.

El primer científic que va parar esment en la producció de gas combustible en pantans i maresmes fou Alessandro Volta. Els seus experiments i cartes, que daten dels anys 1770s, van despertar gran interès a l'època i van portar la comunitat científica a estudiar la formació biològica de metà (Wolfe, 1993). Tot i així, no hi va haver evidències certeres de què la formació del metà en aquests hàbitats era un procés microbià fins gairebé un segle després; el 1876, Hoppe-Seyler va demostrar que el fang residual produïa metà quan s'hi posava acetat, aquest mateix autor va mostrar un any més tard que els cultius d'enriquiment convertien el substrat en quantitats equimoleculares de metà i diòxid de carboni (Ferry, 1993).

La producció de metà com a producte catabòlic majoritari és una característica omnipresent i distintiva dels metanògens ja que es dona únicament en aquests microorganismes. Els bacteris metanògens es poden dividir en tres tipus segons les seves vies catabòliques: reductors de CO₂, metilotròfics i acetilàstics. Les dues terceres parts del metà produït ho són per aquest darrer grup. Els metanògens acetilàstics trenquen l'acetat, oxidant el grup carboxil a CO₂ i reduïnt el grup metil a metà. Tot i així només hi ha dues espècies de metanògens que metabolitzin acetat (Jetten *et al*, 1992): *Methanosarcina*, forma cocs o unions d'ells, és generalista i pot metabolitzar també altres substrats (per exemple H₂ i CO₂), i té baixa afinitat per l'acetat; l'altra espècie, *Methanotrix*, forma bacils allargats com filaments, i és especialista ja que només metabolitza acetat com a font de carboni.

Els metanògens presenten enzims amb cofactors inusuals (Jones et al, 1987) com ara el coenzim M, coenzim F_{420} , coenzim F_{430} , metanopterí i metanofurà, essencials per a la síntesi de metà. Alguns d'aquests, com el coenzim F_{420} i el coenzim M, poden servir com a biomarcadors (Dolfing i Mulder, 1985). El coenzim F_{420} es troba gairebé de forma exclusiva en metanògens, en estat oxidat emet una fluorescència blau-verda. Aquest fet permet identificar bacteris metanògens al microscopi òptic de fluorescència en base a la seva morfologia cel·lular i diferenciar-los de bacteris no metanogènics, ja sigui en cultius purs o mixtos, gràcies a l'autofluorescència blau-verda que presenten aquests bacteris en ser excitats amb llum ultraviolada de longitud d'ona de 420 nm (Mink i Dugan, 1977 in Vila, 1993). Els beneficis energètics de les seves reaccions metabòliques poden veure's a la **Taula 2.2**. on s'observa l'alliberament important d'energia donat el valor negatiu de l'increment d'energia lliure.

En la **present tesi** s'han obtingut **cultius d'enriquiment de bacteris metanògens** utilitzant com a inòcul fang procedent de la digestió anaeròbia de l'Estació Depuradora d'Aigües Residuals de Manresa i procedent de tapets microbians de *Phormidium Valderianum* de les Salines de la Trinitat (Delta de l'Ebre).

La Estació Depuradora d'Aigües Residuals (EDAR) de Manresa va entrar en funcionament el novembre de 1985 i té com a funció el tractament de les aigües residuals domèstiques i industrials que s'aboquen a les clavegueres de Manresa i Sant Joan de Vilatorrada. La capacitat de la planta és de 200.000 habitants equivalents. La concentració de DBO_5 a l'entrada és d'uns 200 mg/l i la concentració de sòlids en suspensió d'uns 300 mg/l (Mollet, 1991). A la sortida la DBO_5 és com a màxim de 20 mg/l i la concentració de sòlids en suspensió també de 20 mg/l com a màxim. L'EDAR de Manresa fa un tractament per a la línia d'aigües (consistent en un pretractament, tractament primari, tractament biològic i desinfecció) i un tractament a la línia de fangs (consistent en un espessiment, digestió anaeròbia i assecat). En la digestió anaeròbia els fangs es bombegen cap al digestor. En aquest procés es genera un

gas amb una composició d'un 65-70% de CH₄ i un 25-30% de CO₂. La temperatura de la digestió és de 35°C i els fangs tenen un temps de residència de 21 dies. El pH és aproximadament 7.2. El fang s'agita i es mescla dins del digestor injectant gas de digestió. Cadascun dels dos digestors és un tanc de formigó armat hermètic de 20 m de diàmetre, 8 m d'alçada útil i 2550 m³ de volum unitari. Per tal de mantenir la temperatura del procés es recirculen fangs del digestor cap a dues calderes, que tenen un cremador dual i poden funcionar tant amb el gas de digestió com amb gas-oil, i dos bescanviadors de calor. Un sistema de bombes d'aigua calenta i una regulació de les calderes permet mantenir els 35°C de temperatura. Es pot extreure un volum diari de gas digestor de 42000 Nm³/ dia i és emmagatzemat en tres gasòmetres de 85 m³ de capacitat a una pressió de 2,8 kg/cm² (Mollet,1991).

Els tapissos microbians són ecosistemes complexos formats per comunitats estratificades de microorganismes que presenten una gran diversitat d'espècies bacterianes. Hi ha tres factors que permeten el desenvolupament d'un tapís microbià: Una elevada salinitat o alcalinitat (aigües hipersalines o alcalines), dessecacions periòdiques (en el litoral marí i en llacs poc profunds) o elevades temperatures (fonts termals). En les Salines de la Trinitat (Delta de l'Ebre) els tapissos microbians tenen lloc des de 50 a més de 300 g/l de salinitat. Els de menys salinitat estan formats per una làmina superficial de *Phormidium valderianum*, *Beggiatoa sp.* i bacteris filamentosos heterotròfics. Les comunitats que formen el tapís es disposen estratificades, de manera que realitzant perfils amb minielèctrodes redox, de sulfur d'hidrogen i de pH, així com d'abundància o absència de fluorescència a 420 nm s'ha determinat a quina profunditat hi ha metanogènesi, i és a aquesta profunditat d'on s'agafen les mostres per a fer cultius d'enriquiment de bacteris metanògens a partir de l'ecosistema (Vila, 1993).

Taula 2.2. Reaccions i canvis d'energia lliure estàndard per a la metanogènesi ^a (Whitman *et al*, 1992)

Reacció	$\Delta G^{0'}$ (kJ/mol metà)
$4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	- 135,6
4 formiat $\rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$	- 130,1
4 2-propanol + $\text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 4 \text{CH}_3\text{COCH}_3 + 2\text{H}_2\text{O}$	- 36,5 ^b
2 etanol + $\text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{acetat}^c$	- 116,3
metanol + $\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	- 112,5
4 $\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$	- 104,9
4 metilamina + $2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{NH}_4^+$	- 75,0
2 dimetilamina + $2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{NH}_4^+$	- 73,2
4 trimetilamina + $6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 9 \text{CH}_4 + 3 \text{CO}_2 + 4 \text{NH}_4^+$	- 74,3
2 dimetilsulfur + $2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{S}$	- 73,8
<u>acetat $\rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$</u>	<u>- 31,0</u>

^a Els canvis d'energia lliure estàndard són calculats a partir de les energies de formació de les espècies iòniques més abundants a pH neutre. Així "CO₂" és HCO₃⁻ + H⁺, i formiat és HCOO⁻ + H⁺.

^b També són utilitzats altres alcohols secundaris com el 2-butanol, 1,3-butandiol, i ciclopentanol.

^c Altres alcohols primaris utilitzats són l'1-propanol i l'1-butanol.

2.4. Els bacteris metanògens i la biodegradació de compostos orgànics

La metanogènesi biològica juga un paper important al cicle del carboni a la Terra ja que és el pas final del flux del carboni a molts hàbitats anaerobis. El metà format o bé pot servir com a font d'energia i de carboni als bacteris metanotròfics aerobis o bé va a l'atmosfera on juga un paper important a l'efecte hivernacle i com a participant a moltes reaccions de la química atmosfèrica. La metanogènesi també té moltes aplicacions pràctiques. El tractament anaerobi de deixalles orgàniques ha estat utilitzat en plantes de tractament de residus des de fa gairebé un segle.

Els bacteris metanògens, tot i la seva diversitat filogenètica, poden utilitzar un nombre reduït de compostos com a font de carboni, normalment amb un o dos àtoms de carboni (Whitman *et al*, 1992; Zinder, 1993). Tot i això s'ha descrit la degradació de compostos orgànics més llargs en ambients metanogènics, degut al flux de carboni entre diferents grups de microorganismes, anomenats en conjunt **consorci metanogènic**. En el present treball s'estudia la degradació per part de cultius enriquits de bacteris metanògens procedents d'un digester anaerobi de la depuradora d'aigües residuals de Manresa. El flux de carboni en els digestors anaerobis ha estat estudiat (Zinder, 1993); els polímers són trencats mitjançant enzims hidrolítics fins monòmers i oligòmers solubles els quals són posteriorment fermentats a àcids grassos i H_2 . Els àcids grassos més llargs que l'acetat són oxidats a acetat, H_2 i CO_2 (en el cas del propionat). Com a resultat d'aquestes reaccions els substrats originals són transformats en substrats primaris per a la metanogènesi: H_2 i CO_2 , format i acetat. Els bacteris que intervenen en aquestes transformacions són els anaerobis fermentadors, els acidogènics productors d' H_2 , els metanògens consumidors d' H_2 i els metanògens aceticlàstics (**figura 2.2**).

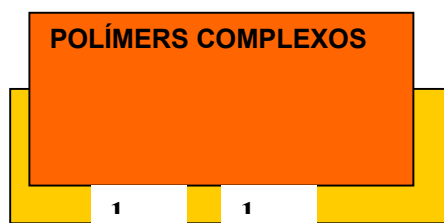


Figura 2.2. Flux de carboni en un digester anaerobi (Zinder, 1993). Microorganismes involucrats **1.** anaerobis fermentadors; **2.** acetògens productors d'hidrogen; **3.** metanògens consumidors d'hidrogen. **4.** metanògens aceticlàstics.

