

## **DISEÑO DE MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN DE COMBUSTIBLES (1981)**

El metabolismo de bacterias y ciano-bacterias puede ser dirigido para la producción de Amoníaco e Hidrógeno a escala industrial

Arq. NORBERTO MEYER  
Ing. NORBERTO KOTLIK

Frente a la denominada "crisis petrolera" las distintas alternativas tendientes a superarla, permiten percibir un futuro energético optimista.

Sin embargo, esa variedad de posibilidades, así como la alta tecnología involucrada, dificultan en países como el nuestro, se encaren investigaciones significativas.

La intención del presente ensayo es indicar un subconjunto de aquellas alternativas, que se caracteriza por el uso de tecnologías sencillas, inversiones razonables y aplicación a escala industrial.

Concretamente, se pretende señalar a investigadores e industriales, algunas posibilidades de producir hidrógeno por medios biológicos.

Para ello, este ensayo se iniciará recordando el rol del combustible, algunas características de la energía solar y la relación entre ambos.

Luego se señalarán las principales propiedades del hidrógeno en cuanto energía almacenada químicamente.

Por último se especificarán posibilidades de dirigir el metabolismo de microorganismos al efecto de la producción de ese combustible.

El rol de la energía se enfatiza al considerar que todo trabajo o cambio requiere su intervención.

Incluso, hasta el manejo de información, un bit por ejemplo, equivale aproximadamente a un cambio de entropía termodinámica de  $10^{-23}$  julios por grado K.

Para cada aplicación, el hombre necesita la energía en una forma

específica que, a menudo, difiere de la forma disponible en la naturaleza.

La industrialización creciente de los países en vías de desarrollo, la construcción prioritaria de centrales hídricas y nucleares para la producción de electricidad, etc., permiten prever, a mediano plazo, una escasez importante de una de las formas de energía: el combustible.

La superación de esa problemática exige la continuidad de las actuales investigaciones y desarrollos, para producir combustibles o "petróleo" mediante métodos y técnicas no tradicionales.

Puede afirmarse, sin lugar a dudas, que el aprovechamiento de la radiación solar será sustancialmente incrementado en cuanto su participación en la producción de energía.

La fluctuación natural de la disponibilidad de energía solar sobre la superficie terrestre exige, en la mayoría de los casos, algún tipo de almacenamiento.

Esta circunstancia y la ya referida escasez de combustibles, indica el enorme interés de poder económicamente almacenar la energía solar en forma de combustible.

Por ejemplo, una central helioenergética podría transformar la radiación solar en energía química, almacenar ésta y utilizar luego este combustible, ya sea para producir electricidad, o para destinarlo a otros usos, tales como la alimentación de redes de distribución de gas y su utilización como insumo de la industria química.

Existen diversos procesos fotoquímicos, termoquímicos y biológicos, que pueden ser utilizados para transformar la energía solar en combustibles.

Por ejemplo, concentrando la luz solar para calentar el vapor de agua hasta unos 2500°C, éste se descompone espontáneamente en hidrógenos y oxígeno.

O sea que, en principio, a partir de dos recursos ampliamente disponibles, energía solar y agua, se obtendría hidrógeno, combustible de calidad y materia prima muy requerida por la industria.

El hidrógeno, al quemarse con oxígeno, libera 34.000 Kcal, por Kg. obteniéndose agua como subproducto de la combustión; siendo oportuno recordar que existen medios que permiten el manejo del hidrógeno con una elevada seguridad, similar al del manejo de la nafta.

En cuanto a su almacenamiento, se puede hacer a presión, licuándolo, por adsorción en hidruros metálicos, tales como los de titanio-hierro y en forma de hidruros moleculares, tales como los hidrocarburos y los compuestos nitrogenados (por ejemplo las naftas y el amoníaco, respectivamente).

Algunos microorganismos tienen la facultad de fijar nitrógeno, componente del amoníaco.

El primer paso de ese proceso de fijación consiste, precisamente, en la síntesis de amoníaco, el que, sin ser estrictamente un combustible, es un excelente portador de hidrógeno.

En consecuencia, interesa conocer en qué medida sería posible obtener, a nivel industrial hidrógeno mediante procesos biológicos.

Los únicos microorganismos capaces de fijar así el nitrógeno son algunas bacterias y cianobacterias.

A estas últimas pertenecen las algas azul-verdosas.

Para la producción del amoníaco algunas algas requieren de nitratos ( $\text{NO}_3$ ) como materia prima, la cual puede ser provista en forma de ácido nítrico agregada directamente al cultivo de algas.

La reducción del nitrato a amoníaco es un proceso fotosintético que se realiza en presencia de las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa.

Las principales ventajas de este mecanismo metabólico son: que la energía requerida es aportada principalmente por la radiación solar, y que el proceso se realiza en presencia de oxígeno molecular.

Existen también otras algas (verde azuladas) que son capaces de fijar directamente el nitrógeno atmosférico.

Todas las bacterias y cianobacterias fijadoras de nitrógeno molecular parecen compartir, a ese efecto, el mismo mecanismo, consistente en la síntesis del amoníaco, la cual se realizará con la ayuda de una enzima (proteína con capacidad catalítica), denominada nitrogenasa.

La nitrogenasa sólo permanece activa en total ausencia de oxígeno, por lo que las cianobacterias que viven en un medio aeróbico, han desarrollado un mecanismo de protección.

Dentro del medio celular, la enzima se encuentra protegida dentro de células especializadas, denominadas heterocistos y que conforman un medio anóxico.

Este hecho es importante, en cuanto las cianobacterias realizan una fotosíntesis aeróbica.

En el proceso fotosintético se producen glúcidos, los que donan a la nitrogenasa los electrones para reducir una de las dos partes de que consta la enzima.

A su vez esta parte reacciona con el adenosintrifosfato (ATP), y

que aporta la energía requerida para la síntesis, reduciéndose el segundo componente enzimático.

Por último, el sistema captura los núcleos de hidrógeno y reduce el nitrógeno para la síntesis propiamente dicha del amoníaco.

Ya en una etapa posterior, el amoníaco continúa en el proceso bioquímico, reaccionando con el glutamato para formar glutamina, de donde el nitrógeno puede pasar a otros componentes de la célula.

Como se ha visto, existen dos mecanismos biológicos, completamente distintos, que son utilizados para la producción de amoníaco y que, eventualmente, podrían aprovecharse a nivel industrial: 'a síntesis de amoníaco a partir de nitratos y la fijación de nitrógeno molecular.

En ambos casos sería deseable lograr que, los organismos sinteticen un excedente de amoníaco, excretándolo al medio de cultivo.

Normalmente, la síntesis de determinado producto se interrumpe automáticamente cuando la célula dispone de las cantidades requeridas por el metabolismo.

A este efecto, los organismos disponen de diversos mecanismos de control.

Por ejemplo, un probable mecanismo de control, propio de los organismos fijadores de nitrógeno molecular, consiste en la autorregulación por retroalimentación.

Al parecer, según este mecanismo, la existencia de un elevado porcentaje de nitrógeno fijado dentro de la célula inhibe la producción de glutaminsintetasa, la enzima que cataliza la transformación de glutamato en glutamina.

A su vez, el nivel de glutaminsintetasa controlaría la expresión del gen que codifica para la síntesis de la nitrogenasa.

Como para la industria es justamente de interés la producción de un exceso de amoníaco, se hace necesario anular este u otros mecanismos de regulación.

Una de las posibilidades más interesantes de lograr esto, consiste en el cultivo de las cianobacterias en un medio escaso en nitrógeno.

En este caso, el proceso de síntesis de amoníaco se interrumpe en el punto en que la nitrogenasa trata de reducir el nitrógeno.

La enzima, al no poder entregar electrones al nitrógeno (ahora inexistente), se los cede a los protones (núcleos de hidrógeno) formando hidrógeno molecular que es librado a la atmósfera.

Cabe agregar que el nitrógeno no puede ser eliminado totalmente del

medio por cuanto cada aminoácido incluye al menos un átomo de nitrógeno.

La alternativa para obviar el mecanismo de control, consiste en "diseñar" el organismo para incrementar la producción del metabolito deseado.

Para esto, uno de los posibles procedimientos consiste en el cultivo selectivo de las cepas que poseen en mayor grado la característica deseada.

El otro proceso, que eventualmente arrojaría resultados mucho más espectaculares, consiste en la aplicación de técnicas de ingeniería genética.

Mediante esas técnicas es posible, dentro de límites, la modificación dirigida de la dotación genética de un organismo.

Toda la información genética de un organismo se encuentra dentro de cada una de sus células constituyentes.

El material genético está formado por dos cadenas de moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN), las que conforman la llamada "doble hélice".

El mensaje inscripto en cada cadena está constituido por un "alfabeto" de cuatro "letras": los nucleótidos C (citocina), G (guanina), A (adenina) y T (Timina).

Las "palabras" del código genético están dadas por los distintos tripletes que pueden formar los nucleótidos.

Por ejemplo, son codones individuales los tripletas CCC, CCG, CCA, CCT, CGC, CGG, CGA, CGT, y así sucesivamente.

Dada determinada secuencia nucleotídica en una de las ramas de doble hélice, la otra rama es complementaria.

Esta complementariedad se debe a que los nucleótidos de una cadena se encuentran vinculados uno a uno a los de la segunda cadena, de modo tal que siempre C se opone a G, y A se opone a T.

Cuando una célula se multiplica, cada una de las nuevas células formadas se lleva consigo una copia del material genético.

Para la replicación, la doble cadena se separa en dos unidades, donde cada una de éstas vuelve a formar una doble cadena.

Cada uno de los conjuntos estructurales de codones que codifican la síntesis de determinadas proteínas (incluida la nitrogenasa), es un gen.

El mecanismo de la síntesis comienza con la transcripción de la

secuencia de nucleótidos de ADN, a una secuencia complementaria de ácido ribonucleico mensajero (ARNm).

La diferencia entre las secuencias del ADN y del ARNm reside en que en este último, el uracilo, reemplaza a la timina.

Finalmente, el ARNm dirige la síntesis de las proteínas requeridas por la célula.

La traducción del ARNm para la formación de proteínas implica la lectura sucesiva de los codones por otro ácido nucleico, el ARN de transferencia, el cual determina finalmente la selección del aminoácido especificado por cada codón.

Estos aminoácidos se unen en cadena en correspondencia a la secuencia de los codones del ADN y finalmente se pliegan quedando conformada la proteína.

Todas las proteínas están constituidas aproximadamente por unos veinte aminoácidos.

Los codones son notablemente más de veinte, explicándose esto por cuanto la naturaleza es redundante, codificando varios codones para el mismo aminoácido.

Asimismo, algunos codones específicos señalan el comienzo y terminación de cada gen individual.

Lo significativo de esto, es que las posibilidades de expresión del microorganismo están completamente determinadas por la secuencia de nucleótidos del ADN.

Existen algunas posibilidades de dirigir el mecanismo bioquímico, controlando el medio de cultivo del organismo.

Como ya se dijo, un medio de cultivo exento de nitrógeno, en el cual se desarrollan ciertas cianobacterias, interrumpe la expresión del mecanismo de represión de síntesis de la nitrogenasa, la cual, al no poder vincular el nitrógeno al hidrógeno, libera este último al medio ambiente.

Ya se han obtenido mutaciones de *Azobacter*, que no solo fijan nitrógeno en presencia de abonos nitrogenados, sino que llegan a excretar amoníaco.

Existen razones para suponer que también pueden encontrarse cepas mutantes entre las cianobacterias.

Existen técnicas sencillas que permiten el cultivo y la consecuente selección genética de las cepas que maximizan la producción de los metabolitos deseados.

Por ejemplo, la nitrogenasa reduce el acetileno a etileno, cuya existencia se determina fácilmente por cromatografía.

En otras palabras, a mayor producción de etileno, mayor actividad de la nitrogenasa.

Disponiendo de células con una dotación genética que dirige la síntesis del sistema heterocisto-nitrogenasa, sería interesante aislar esa unidad genética y transferirla a otras células de la misma especie.

Se obtendría así células con una multiplicidad de unidades genéticas idénticas, con lo que se incrementaría proporcionalmente la capacidad de síntesis del metabolito deseado.

Las técnicas disponibles a ese efecto son básicamente dos.

Uno de los modos consiste en utilizar plásmidos bacterianos, pequeñas unidades anulares de ADN que comparten la célula conjuntamente con el material genético principal.

Se dispone de una gran variedad de endonucleasas de restricción, enzimas capaces de cortar las cadenas de ADN por lugares específicos.

Si se corta el material genético por dos sitios de igual secuencia de nucleótidos, se separa un fragmento de ADN capaz de unirse a un plásmido cortado en un sitio de iguales características.

Se obtiene así un plásmido híbrido capaz de replicarse en forma autónoma y que codifica para la proteína deseada.

No es difícil volver a introducir el nuevo plásmido en células bacterianas donde, en ciertos casos, puede coexistir en forma múltiple.

Estas células dan lugar al clon, una colonia de células genéticas idénticas, con capacidad de sintetizar el metabolito deseado.

Otro modo de aumentar la información genética de una célula, se logra utilizando, como vehículos, a virus capaces de crecer en bacterias.

En el caso de utilizarse esta técnica, se selecciona un bacteriófago con el cual se infecta las bacterias que poseen los genes de interés.

En algunos casos, el ADN del fago se une al ADN bacteriano en las proximidades de los genes deseados, los que pueden pasar a formar parte de la dotación genética de los descendientes virósicos.

Cuando estos nuevos fagos infectan a otras bacterias, pueden transmitirle los genes de interés.

Estas y otras técnicas que son del dominio de la ingeniería genética, se realizan habitualmente en diversos laboratorios de todo el mundo.

Como ya se ha visto, una vez que se ha logrado que una cepa bacteriana sea capaz de sintetizar determinado metabolito, es necesario lograr la expresión continua del gen o genes involucrados.

Para la industria, el caso de mayor interés es aquél en que el producto deseado es excretado al medio ambiente, donde puede ser recolectado.

Dicho de otro modo, interesa especialmente este caso en que la bacteria desperdicia su energía para sintetizar un producto que no le es útil, pero sí de provecho para el hombre.

Ya se señaló que ello sucede, efectivamente, en el caso de microorganismos con defectos del mecanismo de control metabólico.

En consecuencia, corresponde seleccionar cepas mutantes de "máxima ineficacia" en cuanto al control y que produzcan al máximo los productos deseados.

Las técnicas indicadas, así como otras auxiliares, se encuentran notablemente desarrolladas y son relativamente fáciles de aplicar, no requiriendo instalaciones costosas ni maquinaria importante.

Las técnicas de ingeniería genética son aplicables a los organismos fijadores de nitrógeno y, más aún, ya se han transferido con éxito los genes que participan en la fijación del nitrógeno de la bacteria "*Klebsiella Pneumoniae*" a la bacteria "*Escherichia coli*".

Si bien resta por resolver el difícil problema de proteger la nitrogenasa del oxígeno, el logro señalado es indicativo de lo que ya es posible realizar.

Se estima que quizás resulte más fructífero estudiar las posibilidades de modificar la dotación genética de los organismos fijadores de nitrógeno a partir de nitratos.

Como ya se indicó, en este caso la presencia del oxígeno no afecta a las enzimas intervinientes.

Se ha señalado que, dentro de la problemática energética global, los combustibles probablemente seguirán ocupando un rol muy significativo, y que si bien su participación porcentual podrá disminuir, no sucederá lo mismo en cuanto a valores absolutos.

Otro tema tratado es el de la energía solar, habiéndose establecido que su aprovechamiento implica necesariamente el almacenamiento.

Luego, se indicaron las ventajas que representaría la posibilidad de transformar la energía solar en energía química, es decir, combustibles, quedando aquella almacenada en este nuevo estado.

Por último, se describieron algunas posibilidades de producción



de combustible que difieren significativamente del concepto habitual de biomasa.

Resumidamente, esas alternativas son dos:

- Producción de combustible mediante algas fijadoras de nitrógeno a partir de nitratos.

Si bien la energía utilizada es principalmente la solar y que, además, el mecanismo es insensible a la presencia del oxígeno, es necesario disponer de una fuente económica de nitratos.

Se estima posible aumentar la fijación de nitrógeno mediante la técnica de selección de cepas y la aplicación de técnicas de ingeniería genética.

Una aplicación industrial sería cultivar el alga, el cual, reducido a partículas y en presencia de nitrato, fotorreduce éste a amoníaco con la concomitancia del agua como reductor.

- Producción de combustible mediante algas fijadoras de nitrógeno molecular.

En este caso es una ventaja la posibilidad de utilizar directamente el nitrógeno atmosférico.

En cambio, el organismo debe aportar grandes cantidades de energía en forma de ATP.

Si bien se estima que merece investigarse, las dificultades de incrementar artificialmente la producción de nitrogenasa junto con un sistema de protección del oxígeno, haría más recomendable la búsqueda y selección de cepas mutantes de máxima producción del metabolito deseado.

Utilizando estas especies caben dos posibilidades de desarrollo a nivel industrial.

Una de ellas consiste en la selección de cepas que producen un máximo de amoníaco, excretándolo al medio de cultivo, de donde se obtendrá por filtración.

En este caso, se debería reducir al mínimo la producción competitiva de hidrógeno, posibilitando así el cultivo a cielo abierto.

La otra posibilidad consiste en buscar una combinación de microorganismos y contenido de nitrógeno del medio de cultivo, que maximice la producción de hidrógeno, debiendo resolverse el problema de la recolección de éste.

A las posibilidades señaladas, que no son exhaustivas, cabe agregar otras, por ejemplo, el cultivo de bacterias excretoras de amoníaco en sustratos sólidos de bajo costo.

Toda esta temática se relaciona directamente con el interés de la simbiosis vegetales-bacterias fijadoras de nitrógeno, campo en el cual pueden esperarse interesantes avances, recomendándose su seguimiento por parte de los investigadores interesados en el tema aquí tratado.

Esta interdisciplinariedad irá incluso más allá, ya que las industrias químicas tradicionales podrán integrar cada vez más estas "micro-fábricas" biológicas a sus plantas de producción, y, a la inversa, otras industrias, tales como las de alimentación y de bebidas alcohólicas, podrán participar en la producción de energía.

Es interesante señalar la existencia de industrias que en la actualidad producen antibióticos, solventes, ácidos orgánicos, aminoácidos, enzimas, vitaminas, polímeros, etc., con la intervención de microorganismos; y que técnicas tradicionales de selección de cepas mutantes han permitido un incremento de hasta 300 veces la síntesis del producto deseado.

Por todo esto corresponde destacar que la presente temática ya no se limita a meras especulaciones teóricas, sino que las investigaciones básicas y aplicadas ya se encuentran adelantadas siendo alta la probabilidad de ir prontamente, en nuestro país, de la investigación al desarrollo y de éste a la producción de combustible, mediante estos procesos biológicos.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- BRILL, Winston J., **Fijación biológica de nitrógeno**, de: Investigación y Ciencia, N° 8, Barcelona, mayo, 1977.
- BURDON, Kenneth y WILLIAMS, Robert, **Microbiología**, Centro Regional de Ayuda Técnica, Agencia para el Desarrollo Internacional, México (A.I.D.), Buenos Aires, 1971 (1968).
- DUMON, Roger, **Energie solaire et stockage d'energie**, Masson, Paris, 1978.
- GILBERT, Walter y VILLA-KOMAROPP, Lydia, **Proteínas útiles obtenidas a partir de bacterias recombinantes**, de Investigación y Ciencia, N° 45, Barcelona, junio, 1980.
- LOSADA, Manuel, **Los distintos tipos de fotosíntesis y su regulación**, de Investigación y Ciencia, N° 7, Barcelona, abril, 1977.
- MARTIN, J. F., **Diseño racional de microorganismos con fines industriales**, de Investigación y Ciencia, N° 41, Barcelona, febrero, 1980.  
Véase también en esta misma revista.
- MEYER, Norberto y KOTLIK, Norberto, **Energía solar y síntesis de combustibles**.
- SCHULZE, Werner, Chernie, Cari Habel Verlag, Darmstadt, 1973.
- VINCENT, J. M. Manual práctico de rizobiología, Editorial Hemisferio Sur, S.R.L., Buenos AT66, 1975 (1970).