

Estudi de la influència del formiat en el desenvolupament de *Clostridium  
ljungdahlii* i *Clostridium autoethanogenum*

---

Estudiant: Ester Cantos Parra

Grau en Biotecnologia

Correu electrònic: eska\_48@hotmail.com

Tutor: Lluís Bañeras Vives

Empresa / institució: Universitat de Girona

Vistiplau tutor:

Nom del tutor: Lluís Bañeras Vives

Empresa / institució: Universitat de Girona

Correu(s) electrònic(s): lluis.banyeras@udg.edu

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

## ÍNDEX

<b>RESUM, RESUMEN, SUMMARY</b> .....	3
<b>1. Introducció</b> .....	6
1.1 Fixació del carboni en acetògens.....	6
1.2 Etapes del creixement dels clostridis.....	8
1.3 Interès de l'estudi del formiat.....	9
1.4 Selecció de les espècies que s'han estudiat.....	9
<b>2. Objectius</b> .....	11
<b>3. Materials i mètodes</b> .....	12
3.1 Bacteris utilitzats i condicions del medi i del cultiu.....	12
3.2 Experiment preliminar.....	12
3.3 Experiment central.....	13
3.4 Mètodes analítics.....	14
3.4.1 Quantificació de formiat.....	14
3.4.2 Quantificació d'àcids i alcohols.....	14
3.4.3 Anàlisi de gasos.....	14
3.5 Determinació de variables del creixement .....	15
3.6 Anàlisi de l'expressió genètica de les espècies en presència de formiat .....	15
3.6.1 Extracció de RNA.....	15
3.6.2 Tractament amb DNases.....	15
3.6.3 Síntesi de cDNA.....	16
3.6.4 Patrons dels gens <i>gyr</i> i <i>fnt</i> per la RT-qPCR.....	16
3.6.5 RT-qPCR.....	16
<b>4. Resultats i discussió</b> .....	18
4.1 Efectes sobre la fase estacionària.....	18
4.2 Efectes sobre la fase exponencial.....	21
4.3 Anàlisi de l'expressió de <i>gyr</i> i <i>fnt</i> .....	27
<b>5. Criteris ètics i de sostenibilitat del treball</b> .....	30
<b>6. Conclusions</b> .....	31
<b>7. Bibliografia</b> .....	32

## Resum

Setanta anys. Aquests són els anys aproximats en els que es creu que els combustibles fòssils s'acabaran, tot i que la variabilitat de la velocitat a la que es consumeixen fa que aquesta no sigui una xifra exacta. 70 anys per trobar, explorar i definir-ne alternatives, ja que constitueixen una part molt important de l'economia global i d'una manera o altra formen part del dia a dia de la majoria de la població. Tot i que s'estan prioritzant polítiques que promouen la reducció del seu ús, com l'ús del transport públic, la utilització de cotxes elèctrics... el problema s'aplaça però no desapareixerà. A més, la combustió dels combustibles fòssils emet gasos contaminants, com per exemple el diòxid de carboni, que en grans quantitats contribueix a l'efecte hivernacle. També els òxids de nitrogen que causen la pluja àcida, i el monòxid de carboni i els hidrocarburs que provoquen problemes respiratoris i cutanis.

Una de les alternatives als combustibles fòssils són els biocombustibles com els alcohols. Existeixen determinats bacteris que poden utilitzar el gas de síntesi o *syngas*, una barreja d'hidrogen, monòxid de carboni i diòxid de carboni, com a font de carboni i poder reductor per la producció d'alcohols. Els bacteris acetògens són anaerobis obligats capaços de créixer amb carboni inorgànic com a única font de poder reductor i de carboni mitjançant la ruta metabòlica Wood-Ljungdahl (WLP). Un dels intermediaris produïts en aquesta ruta és el formiat, en la que s'acaba formant una molècula d'acetil-CoA que és transformada a àcids i alcohols, a expenses de grans quantitats de poder reductor. Per això es va plantejar la hipòtesi d'afegir formiat com un compost de carboni ja reduït, per augmentar la producció d'alcohols.

En aquest treball s'estudia l'efecte del formiat en la producció d'àcids i alcohols de dues espècies de bacteris acetògens, *Clostridium ljungdahlii* i *Clostridium autoethanogenum*, durant la seva fase estacionària. També se n'estudia l'expressió genètica d'un transportador de formiat durant la fase de creixement, ja que es creu que aquest pot funcionar com una bomba d'expulsió regulant la quantitat de formiat intracel·lular, per evitar-ne efectes de toxicitat.

Així, s'ha pogut comprovar que l'addició del formiat a la fase estacionària dels bacteris no té efectes significatius en la seva producció d'alcohols, i que en la seva addició al principi de la fase exponencial és consumit ràpidament però tampoc en millora la producció d'alcohols.

## Resumen

Setenta años. Setenta son los años aproximados durante los cuales se estima que los combustibles fósiles se extinguirán, aunque la variabilidad de la velocidad a la que se consumen hace que no sea posible decir que es una cifra exacta. 70 años para descubrir, explorar y definirles alternativas, teniendo en cuenta que constituyen una parte muy importante de la economía global y que de una manera u otra forman parte del día a día de la mayoría de la población. Se están priorizando políticas que promueven la reducción de su uso, como la utilización del transporte público, la utilización de coches eléctricos... pero aunque el problema se aplaza, no desaparecerá. Además, los combustibles fósiles emiten gases contaminantes como por ejemplo el dióxido de carbono, que en grandes cantidades contribuye al efecto invernadero. También los óxidos de nitrógeno a la lluvia ácida, y el monóxido de carbono y los hidrocarburos provocan problemas respiratorios y cutáneos.

Una alternativa a los combustibles fósiles son los biocombustibles como los alcoholes. Existen determinadas bacterias capaces de utilizar el gas de síntesis o *syngas*, una mezcla de hidrógeno y monóxido y dióxido de carbono, como fuente de carbono y poder reductor para la producción de alcoholes. Las bacterias acetogénicas son anaerobios obligados capaces de crecer con carbono inorgánico como única fuente de poder reductor i carbono mediante la vía Wood-Ljungdahl (WLP). El formiato es uno de los intermediarios generados en esta vía, en la se termina obteniendo una molécula de acetil-CoA que puede ser transformada en ácidos y alcoholes, mediante un coste elevado de poder reductor. Por este motivo se planteó la posibilidad de añadir formiato como compuesto ya reducido, para aumentar la producción de alcoholes.

En el presente trabajo se estudia el efecto de la adición de formiato en la producción de ácidos y alcoholes de dos especies de bacterias acetogénicas, *Clostridium ljungdahlii* y *Clostridium autoethanogenum*, durante su fase estacionaria. También se estudia la expresión genética de un transportador de formiato que poseen, debido a que se cree que este puede actuar como bomba de expulsión de formiato para regular su nivel intracelular, para evitar efectos de toxicidad.

De este modo, se ha podido comprobar que la adición de formiato durante la fase estacionaria de las bacterias no tiene efectos significativos en su producción de alcoholes, y que la adición de formiato al principio de su fase estacionaria hace que se consuma rápidamente pero tampoco mejora la producción de alcoholes.

## Summary

Seventy years. These are approximately the years in which it is believed that fossil fuels will run out, although the variability of the rate at which they are consumed makes it difficult to say an exact number. Seventy years to look for, explore and define alternatives, since they constitute a very important part of everyday life for the majority of population. Despite the fact that prioritizing policies are promoted, such as using public transport, electric cars... the problem is only postponed but not deleted. Moreover, fossil fuels combustion emit pollutant gases, as carbon dioxide, which in huge quantities contributes to greenhouse effect; nitrogen oxides that contribute to acid rain; and carbon monoxide and hydrocarbons that cause skin and respiratory problems.

One alternative to fossil fuels are biofuels. There are some bacteria able to use syngas, a mix of primarily hydrogen, carbon monoxide and carbon dioxide, as a hydrogen and reducing power source for alcohols production. Acetogenic bacteria are obligate anaerobes capable of growing with inorganic carbon as the unique carbon and reducing power source through the Wood-Ljungdahl pathway (WLP). Formate is a metabolite produced in this way, in which an acetyl-CoA molecule is transformed into acids and alcohols, at the expense of huge quantities of reducing power. For this reason, formate was presented as an already reduced carbon compound to help in the increase of alcohols production.

This work studies the effect of formate addition in acid and alcohol production of two bacterial species, *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum*, during their stationary phase. It has been also studied the genetic expression of a formate transporter during the growing phase, because it is thought that it can work as an efflux pump, regulating formate intracellular level in order to avoid its toxicity.

Thus, it has been concluded that formate addition at stationary phase of bacteria does not have any effect on their alcohol production, and also that bacteria presented a rapid consume of formate when it was added at the beginning of the exponential growth phase, but not an enhancement of their productivity.

## 1. Introducció

Actualment i des d'un temps enrere, s'està prenent consciència que el model energètic actual basat en els combustibles fòssils aviat s'acabarà. Les principals conseqüències són l'esgotament de les seves reserves i la seva conseqüent variació de preu i restriccions [1]. És per això que en els últims anys s'està donant importància al desenvolupament de fonts alternatives per a l'obtenció de biocombustibles. Els biocombustibles poden tenir procedències molt diverses, i per això es divideixen en tres categories: els de primera generació, els de segona generació i els de tercera generació. Els biocombustibles de primera generació provenen de la transformació biològica de matèries primeres alimentàries, com el midó, el blat de moro, el sucre, olis vegetals o greixos animals. Tot i que són rendibles, aquests generen problemes de seguretat alimentària en països en vies de desenvolupament i també fan que augmenti la competència amb la producció d'aliments, elevant-ne el preu. D'altra banda, els biocombustibles de segona generació utilitzen la conversió de matèries primeres no alimentàries com la lignina i la cel·lulosa. Finalment, es poden trobar els biocombustibles de tercera generació. Aquests utilitzen residus orgànics, agrícoles, de la silvicultura, i també residus sòlids municipals com a matèries primeres [2].

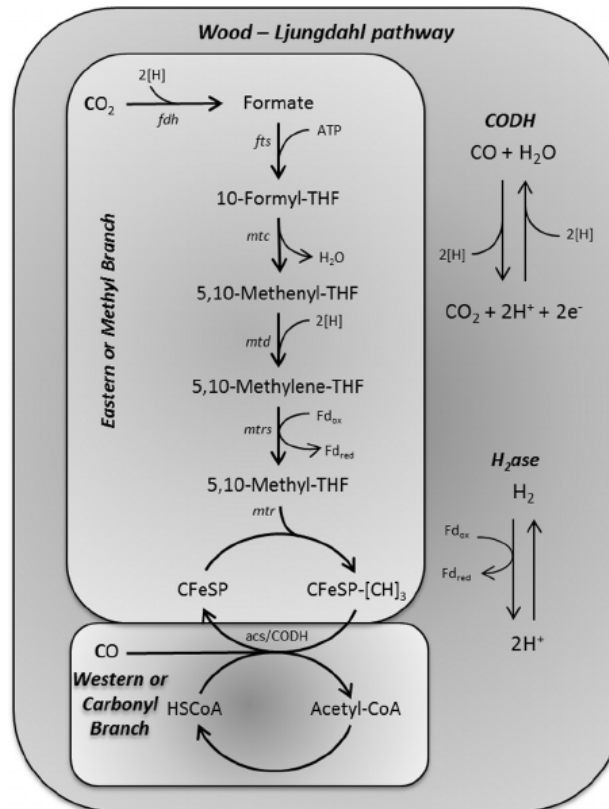
En els biocombustibles de tercera generació tots els diferents tipus de residus passen per un pas previ de gasificació. D'aquest procés se'n deriva el gas de síntesi o *syngas*, una barreja principalment de CO, CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>. Alguns bacteris són capaços d'utilitzar aquests compostos gasosos com a substrats per fermentar-los i produir-ne àcids orgànics i alcohols. Aquests bacteris són coneguts com acetògens [3].

### 1.1 Fixació del carboni en acetògens

Els acetògens són bacteris anaerobis que utilitzen una ruta metabòlica anomenada ruta de l'acetil-CoA o de Wood-Ljungdahl (WLP) per a la reducció de CO<sub>2</sub> a acetil-CoA, la conservació d'energia i la producció de biomassa cel·lular. El seu metabolisme fermentatiu produeix principalment àcid acètic, però alguns d'ells sota certes condicions són capaços de produir concentracions significatives d'alcohols. La majoria de bacteris capaços de produir alcohols pertanyen a la classe *Clostridia*. Aquests alcohols (principalment etanol i butanol, però també alcohols de cadena llarga), són els que tenen interès per la producció industrial de biocombustibles alternatius.

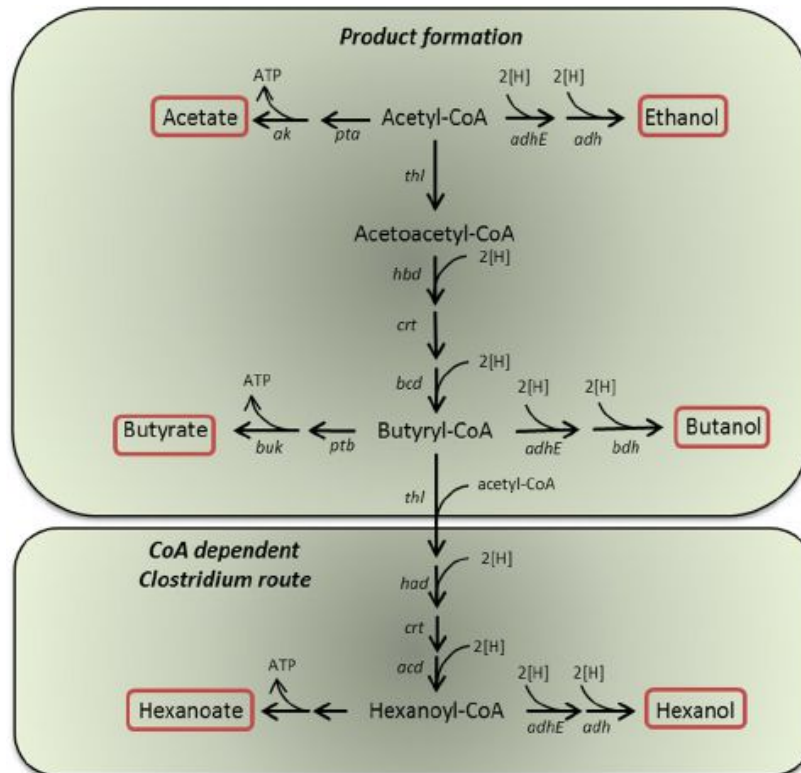
La WLP és una ruta metabòlica de fixació del carboni irreversible i no cíclica que només té lloc en condicions estrictament anaeròbies. Es compon de dues branques principals, la branca metil i la branca carbonil (Fig. 1). En la branca metil una molècula de CO<sub>2</sub> és reduïda a un grup metil a través d'un seguit de reaccions, utilitzant 6 electrons. A la branca carbonil s'incorpora una molècula de monòxid de carboni que és condensada amb el grup metil format a l'altra branca i un coenzim A (CoA), per formar una molècula d'acetil-CoA. La WLP, com totes les rutes anabòliques, és una ruta que requereix grans quantitats de poder reductor, i en aquest

cas, la seva obtenció està lligada a l'oxidació de l'H<sub>2</sub> a través de la hidrogenasa (H<sub>2</sub>ase o H<sub>2</sub>/hidrogenasa) o a l'oxidació de CO per l'activitat de la CO deshidrogenasa (CODH).



**Fig. 1.** Esquema de la via de l'acetil-CoA o via de Wood-Ljungdahl (WLP). Les abreviacions dels enzims corresponen a: *fdh*, formiat deshidrogenasa; *fts*, formil-THF sintasa; *mtc*, metenil-THF ciclohidrolasa; *mtd*, metilè-THF deshidrogenasa; *mtrs*, metilè-THF reductasa; *mtr*, metil transferasa; *acs*, acetil-CoA sintasa; *CODH*, CO deshidrogenasa; i *H<sub>2</sub>ase*, hidrogenasa [4].

L'acetil-CoA és un metabòlit intermediari que depenent dels requeriments cel·lulars pot seguir diferents itineraris. Aquest metabòlit pot ser oxidat a àcids (acetat i butirat) i reduït a alcohols (etanol i butanol), però en alguns casos també es poden produir àcids i alcohols de cadena més llarga, a través de la ruta depenent de CoA de *Clostridium* (Fig. 2), a expenses de poder reductor. Durant la producció d'àcids es forma una molècula d'ATP, i a la branca metil de la WLP se'n consumeix una molècula per a l'activació del formiat, resultant així en un balanç energètic net en forma d'ATP. També és possible que aquesta molècula d'acetil-CoA sigui destinada a requeriments estructurals de la cèl·lula. [4].



**Fig. 2.** Esquema de la via reductiva de l'acetil-CoA i la ruta dependent de CoA de *Clostridium*. Els compostos encerclats en vermell són els compostos resultants (els àcids i alcohols). Les abreviacions dels enzims corresponen a: *ak*, acetat quinasa; *pta*, fosfotransacetilasa; *adh*, alcohol deshidrogenasa; *adhE*, aldehyd/alcohol deshidrogenasa; *thl*, tiolasa; *hbd*, 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa; *crt*, crotonasa; *bcd*, butiril-CoA deshidrogenasa; *ptb*, fosfotransbutirilasa; *buk*, butirat quinasa; *bdh*, butanol deshidrogenasa; *had*, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa; i *acd*, acil-CoA deshidrogenasa [4].

## 1.2 Etapes del creixement dels clostridis

El creixement dels clostridis carboxidotròfics (bacteris que fixen el carboni de l'oxidació del CO a través d'un metabolisme no cíclic) es sol dividir en tres fases: la fase de creixement exponencial, l'estacionària i la d'esporelació. Generalment, la producció d'àcids orgànics i alcohols anteriorment descrita té lloc en dues fases metabòliques diferenciades: l'acidogènesi (producció d'àcids orgànics), que coincideix amb la fase de creixement exponencial, i la solventogènesi (producció d'alcohols) que va lligada a la fase estacionària.

Així, quan els bacteris es troben en condicions favorables per créixer entren en fase exponencial i té lloc la producció d'àcids, amb la consegüent generació d'ATP. Un cop cessen aquestes condicions favorables, ja sigui per acidificació del medi, toxicitat dels productes o limitacions de substrat, els bacteris entren en fase estacionària i és quan comença la producció d'alcohols a partir de l'acetil-CoA.

La fase d'esporelació, durant la qual es formen endòspores resistents a les altes temperatures i condicions extremes, és la menys estudiada de totes. Té lloc després de la solventogènesi



durant la fase estacionària tardana, tot i que alguns estudis plantegen que les dues poden ocórrer conjuntament [4]. Aquesta fase s'ha estudiat molt en el gènere *Bacillus*, i tot i que s'està descobrint que en comparteix molts factors de regulació amb el gènere *Clostridium*, en aquest últim encara s'ha d'entendre en profunditat [5].

### 1.3 Interès de l'estudi del formiat

L'interès dels bacteris acetògens per la generació de biocombustibles i productes d'alt valor afegit ha portat a buscar alternatives per augmentar el seu rendiment.

L'obtenció de formiat a partir d'una molècula de CO<sub>2</sub> és una de les reaccions més costoses de la WLP des d'un punt de vista energètic. Una de les alternatives que s'han explorat des de poc és l'addició de formiat als bacteris com un compost de carboni ja reduït, per així augmentar la disponibilitat de poder reductor i reduir la demanda d'H<sub>2</sub> i CO per part de l'enzim formiat deshidrogenasa (fdh) [6] (Fig. 1). Aquest formiat pot ser obtingut a partir de diverses fonts com la biomassa [7]. Es creu que aquest excés de poder reductor podria ser utilitzat per augmentar la producció d'alcohols. D'aquesta manera, tot i que la producció del *syngas* ja és un procés poc costós i aquest prové de productes residuals, es podria augmentar el rendiment del procés al estar disminuint la quantitat necessària de CO<sub>2</sub> i en conseqüència de CO per l'activitat dels bacteris [3]. És a dir, amb la mateixa quantitat de substrat s'obtindria més producte, economitant encara més el procés.

### 1.4 Selecció de les espècies que s'han estudiat

En aquest projecte es va treballar amb les espècies *Clostridium ljungdahlii* i *Clostridium autoethanogenum*. Totes dues han estat utilitzades en nombrosos estudis sobre la millora de la seva eficiència per produir àcids i alcohols a partir del *syngas* [8,9]. Fins a dia d'avui s'han realitzat estudis sobre l'efecte de l'addició de formiat amb *C. ljungdahlii* però no amb *C. autoethanogenum* [6], i aquesta ha estat a l'inici del seu creixement i no a la fase estacionària.

És important tenir en compte la toxicitat del formiat, ja que aquest pot difondre dins la cèl·lula i impedir-ne el creixement i la producció. Per evitar un excés d'aquest compost i disminuir-ne la toxicitat, la cèl·lula pot utilitzar transportadors de formiat que treballen com a bombes d'expulsió per regular-ne la difusió. Per aquest motiu, les espècies escollides haurien de tenir almenys un gen codificant per una d'aquestes bombes. En estudis previs es va observar que tan *Clostridium carboxidivorans* com *Clostridium ljungdahlii* contenen gens codificants per transportadors de formiat [6]. També s'havia observat anteriorment que *Clostridium ljungdahlii* no s'inhibia durant la seva fase de creixement en presència de concentracions de formiat inferiors als 50 mM a pH 6, mentre que al mateix pH *Clostridium carboxidivorans* no creixia en presència de concentracions de formiat superiors als 10 mM [6].

Així, es va escollir *C. ljungdahlii* perquè és el que presentava una tolerància més elevada al formiat. D'altra banda, *C. autoethanogenum* es va escollir perquè les dues espècies comparteixen el 99 % del genoma. A més, es va descobrir que el transportador de

formiat/nitrit (FNT) de *C. ljungdahlii* (WP\_013240353) té una homologia del 97 % en *C. autoethanogenum*, fet que condueix a pensar que també presentarà una elevada tolerància a aquest compost. Per tant, seria convenient realitzar-ne també un anàlisi a nivell d'expressió, per determinar a través de l'activitat del gen *fnt* si l'addició de formiat afecta a l'activitat de la cèl·lula.

## 2. Objectius

The main purposes of this research are:

1. To evaluate the impact of formate addition at the stationary phase of *C. autoethanogenum* and *C. ljungdahlii* on its productivity.
2. To describe the effect of formate and formate/nitrite addition on *C. autoethanogenum* and *C. ljungdahlii* growth.
3. To analyse the expression levels of a gene related with formate of *C. autoethanogenum* and *C. ljungdahlii* after its addition.

### 3. Materials i mètodes

#### 3.1 Bacteris utilitzats i condicions del medi i del cultiu

Les soques de *C. ljungdahlii* PETC (DSM 13528) i *C. autoethanogenum* (DSM 10061) provenien de la col·lecció de DSMZ ([www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)). El medi de cultiu utilitzat és el medi mineral ATCC 1754 [10] modificat. Es diferencia per: la presència de fonts de carboni (la presència de fructosa, extracte de llevat i  $\text{NaHCO}_3$ ); i la concentració final d'àcid 2-(N-morfolino)etanosulfònic (MES) a una concentració de 100 mM, que es va utilitzar com a tampó de pH. Es va utilitzar resazurina a una concentració final d'1 mg/L com a indicador de condicions anaeròbiques, i el pH inicial es va ajustar a 6,00 amb NaOH. Aquest medi líquid es va preparar i distribuir anaeròbiamment en ampolles de 125 ml, addicionant-ne 25 ml de medi, gasejant-les amb  $\text{N}_2$  i autoclavant-les 15 minuts a 121 °C.

Es van realitzar inoculacions setmanals del 4% dels cultius en medi mineral fresc per mantenir-los actius. Totes les manipulacions i inoculacions es van realitzar dins una cambra anaeròbica (Coy Lab Products, Michigan, EEUU). Després d'aquestes transferències setmanals també es gasejaven els cultius amb *syngas* sintètic d'una barreja de 32 % de  $\text{CO}$ , 32 % d' $\text{H}_2$ , 28 % de  $\text{N}_2$  i 8 % de  $\text{CO}_2$  d'alta puresa (Praxair Technology, Ltd, Espanya) durant un minut i deixant una sobrepressió de 100 kPa. Aquests cultius es mantenien en agitació de 100 rpm a 37 °C en un incubador Stuart SI500 (Bibby Scientific Limited, OSA, Anglaterra).

#### 3.2 Experiment preliminar

Es van utilitzar cultius mare de *C. ljungdahlii* i *C. autoethanogenum* com a inòculs per començar l'experiment en batch per estudiar l'efecte de l'addició de formiat a la seva fase estacionària. Es va fer un inòcul del 10% en cultius en fase de creixement en 12 tubs anaeròbics de 25 ml per *C. autoethanogenum* i 18 per *C. ljungdahlii*, que contenien 6 ml de medi ATCC 1754 modificat. En tots els tubs es va utilitzar el mateix cultiu mare per tal d'evitar possibles biaixos en els resultats deguts a diferències entre inòculs. Els tubs es van gasejar amb la barreja de *syngas* durant 1 minut i es van incubar sota una sobrepressió de 100k Pa.

Es va mesurar la seva absorbància a 600 nm. Els tubs es van incubar horitzontalment per facilitar la transferència de massa gas-líquid, en agitació de 100 rpm i a 25 °C. Per tal de monitoritzar-ne el creixement es va mesurar la seva absorbància a 600 nm cada 48 h aproximadament utilitzant un espectrofotòmetre CE1021 (CECIL, Cambridge, Anglaterra), i gasejant els cultius amb *syngas*, seguint sempre el mateix protocol, per assegurar que no es quedaven sense substrat.

Es van preparar dues solucions stock de formiat de sodi a una concentració de 143 mM i 1,43 M, que es van utilitzar per fer les addicions. El seu pH es va ajustar a 6,04, es van escalfar i gasejar amb  $\text{N}_2$  per eliminar-ne l'oxigen, filtrar a través de filtres de nylon de porus de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore, Alemanya), i encapsular en ampolles tractades sense presència d'oxigen dins la

cambrà anaeròbica. El formiat es va afegir en dues addicions als mateixos tubs, una a les 186,5 h (al principi de la fase estacionària) i la segona a les 304,5 h (enmig de la fase estacionària). Durant la primera addició en *C. autoethanogenum*, es van testar les concentracions finals de: 0,39, 1,47, 3,89, 4,73 i 6,89 mM; i en *C. ljungdahlii* les concentracions finals de: 0,39, 1,47, 3,89, 4,73, 6,89, 10,37, 14,69 i 25,49 mM. En la segona addició en *C. autoethanogenum*, es van testar les concentracions finals de: 2,7, 11,09, 15,05, 19,01 i 26,93 mM; i en *C. ljungdahlii* les concentracions finals de: 0,72, 2,7, 8,66, 12,64, 19,01, 26,93, 34,89 i 46,73 mM. Es van fer duplicats de cada concentració. A dos dels tubs de cada una de les espècies no se'ls va afegir formiat en cap moment per poder utilitzar-los com a controls. Es van utilitzar 9 tubs amb 6 ml de medi de cultiu com a controls abiòtics en les diferents concentracions de formiat provades.

Es van recollir mostres per a la quantificació de formiat i per la determinació d'àcids orgànics (acetat) i alcohols (etanol) abans de la primera addició de formiat (a les 190 h, només per àcids i alcohols), a mitja fase estacionària (307,5 h) i al final de l'experiment (401,5 h). Les de quantificació de formiat es van guardar directament a -20 °C, i les segones es van filtrar amb filtres de nylon i també guardar a -20 °C. El pH es va mesurar en mostres inicials i mostres recollides abans de la primera addició de formiat (190 h), utilitzant un pH-metre BASIC 20 (Crison, Espanya).

### 3.3 Experiment central

Es van utilitzar cultius mare de *C. ljungdahlii* i *C. autoethanogenum* com a inòculs per dur a terme l'estudi dels efectes de l'addició de formiat i nitrit a l'inici de la fase exponencial, tant a nivell de producció com a nivell genètic. En aquest cas es van inocular 6 ampolles de vidre d'1 L que contenien 500 ml de medi ATCC 1754 modificat amb un 6 % de l'inòcul mare, es van gasejar amb la barreja de *syngas* a una sobrepressió de 100 kPa, i es van incubar en agitació de 100 rpm a 25 °C.

Un cop els cultius van entrar en fase exponencial es van tractar de diferent manera: un es va deixar com a control, a un altre se li va afegir solució de formiat a una concentració final de 5,61 mM, i a l'últim se li va afegir solució de formiat i solució de nitrit (a partir de nitrit de sodi) a una concentració final de 5,61 mM dels dos components. Es van anar extraient mostres gasoses per analitzar-ne la composició, i mostres líquides per mesurar-ne la densitat òptica, el pH, quantificar-ne el formiat i analitzar la composició d'àcids i alcohols periòdicament. També es van extreure 100 ml de cada cultiu just abans de l'addició dels compostos i al final de l'experiment, es van centrifugar 5 min a 6.000 xg i a 4 °C i es van emmagatzemar a -80 °C per tal de posteriorment extreure'n el RNA i analitzar-ne l'expressió de diferents gens.

### 3.4 Mètodes analítics

#### 3.4.1 Quantificació de formiat

Per a la determinació de la concentració de formiat es va dur a terme un protocol de quantificació colorimètrica [11]. Aquestes mesures d'espectrofotometria es van realitzar amb un espectrofotòmetre UV-2501 (PC) (Shimadzu Corporation, Japó).

### 3.4.2 Quantificació d'àcids i alcohols

L'anàlisi de la concentració d'àcids i alcohols es va realitzar per cromatografia líquida utilitzant un segon canal d'un cromatògraf de gasos 7890A (Agilent Technologies, Espanya), i les mostres guardades es van preparar en vials de vidre i van ser emmagatzemades a 4 °C fins just abans del moment de la mesura.

### 3.4.3 Anàlisi de gasos

L'extracció de mostres de gas va permetre avaluar el consum dels diferents components del *syngas* durant el transcurs de l'experiment després de l'addició dels compostos. Aquestes es van analitzar per cromatografia de gasos utilitzant un cromatògraf de gasos Agilent 7890A (Agilent Technologies, Espanya). Com que el nitrogen és un gas inert que les espècies amb les que es va treballar no consumeixen ni produeixen, es va considerar que la seva quantitat i la seva pressió parcial es van mantenir constants durant l'experiment, i la seva pressió parcial a les ampolles (0,56 atm) es va prendre com a referència per calcular els paràmetres necessaris per deduir el consum o producció de CO, CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>. Les possibles pèrdues de pressió i quantitat basal d'oxigen que podria haver entrat es van estimar i compensar tenint en compte la fracció molar del nitrogen donada pel cromatògraf i la composició atmosfèrica de l'aire (21 % O<sub>2</sub> i 79 % N<sub>2</sub>).

Per obtenir l'acumulació de monòxid i diòxid de carboni es va calcular la diferència entre la quantitat de carboni en forma del compost present en el líquid i el gas en el moment de presa de la mostra, i el carboni en forma del compost en fase gasosa i fase líquida que hi hauria si no hi hagués hagut consum o producció; i se'n va anar sumant la seva acumulació en el temps. Per deduir la quantitat de carboni destinada al creixement i manteniment de cèl·lules, es van utilitzar les acumulacions de carboni en forma dels diferents compostos, la del carboni en forma de formiat (calculat com els mmols assolits amb la seva addició, ja que la seva acumulació va resultar mínima), i el carboni produït en forma d'àcids i alcohols, per realitzar el balanç de carboni, d'acord amb l'Eq. (1):

$$\Delta\text{CO} + \Delta\text{CO}_2 + \Delta\text{formiat} = \Delta(\text{àcids} + \text{alcohols}) + \Delta\text{Cèl·lules i manteniment} \quad (1)$$

### 3.5 Determinació de variables de creixement

Per últim, les lectures d'absorbància transformades en logaritme natural ( $\ln A_t$ ) es van utilitzar per realitzar-ne la regressió lineal a intervals de temps ( $t$ ) i estimar-ne la taxa de creixement ( $\mu$ , h<sup>-1</sup>), d'acord amb l'Eq. (2):

$$\ln A_t = \ln A_{\text{inicial}} + \mu \cdot t \quad (2)$$

### 3.6 Anàlisi de l'expressió genètica de les espècies en presència de formiat

Per tal d'analitzar l'ús del formiat per part de les dues espècies, es va realitzar una RT-qPCR per quantificar el nivell de l'expressió d'un gen constitutiu (*gyrA*) i un gen implicat en el transport de formiat (*fnt*, formate/nitrite transporter) per poder-los comparar. Per a això, però, abans es van haver de dur a terme una sèrie de protocols addicionals que es detallen a continuació.

### 3.6.1 Extracció de RNA

Les mostres reservades a -80°C per a l'extracció de RNA es van utilitzar per realitzar el protocol d'aïllament d'ARN amb TRIzol (Thermo Fisher Scientific, EEUU) amb algunes optimitzacions, sent el procediment realitzat el següent:

1. Descongelar el pellet de cèl·lules i resuspendre'l en 200 µl del reactiu Max Bacterial Enhancement prèviament escalfat i barrejar bé mitjançant pipeteig. Incubar els tubs a 95 °C durant 5 min.
2. Afegir 1 ml de Trizol en el lisat i barrejar bé. Incubar a Ta ambient durant 5 min.
3. Afegir 0,2 ml de cloroform fred i barrejar el tub vigorosament amb la mà durant 15 segons. Incubar a Ta ambient durant 15 min.
4. Centrifugar les mostres a 12.000 xg durant 15 min a 4 °C. Transferir el sobrenedant (una fase aquosa d'uns 400 µl que conté l'RNA) en un tub nou.
5. Afegir 0,5 ml d'isopropanol al 100 % fred a la fase aquosa per precipitar el RNA i barrejar el contingut del tub per inversió. Incubar a -20 °C tota la nit.
6. Centrifugar a 15.000 xg durant 10 min a 4 °C i treure el sobrenedant curosament sense destorbar el pellet d'RNA.
7. Resuspendre el pellet amb 1 ml d'etanol al 75 % i barrejar bé vortejant.
8. Centrifugar a 7.500 xg durant 5 min a 4 °C, descartar el sobrenedant i assecar el pellet a l'aire durant 15 min.
9. Resuspendre el pellet en 50 µl d'aigua *RNase free* pipetejant amunt i avall.

### 3.6.2 Tractament amb DNases

Es va confirmar la presència de RNA amb el protocol Qubit® RNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, EEUU), i les mostres es van tractar segons el procés descrit en el kit RTS DNase™ Kit (MO BIO Laboratories, EEUU) per tal d'eliminar qualsevol resta d'ADN que poguessin contenir i que no interessava que fos present.

Per comprovar-ho es va realitzar una PCR de comprovació amb els primers 27F/1492R del gen 16S rRNA, per confirmar que efectivament cap mostra amplificava el fragment i que per tant no contenia DNA. Les condicions de PCR es van dur a terme amb les concentracions finals d'1X del tampó, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM de dNTPs, 0,4 µM de cada primer i 0,15 U de polimerasa Taq. El programa de la PCR es va fer en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, EEUU) i va començar amb un primer pas de desnaturalització de 5 min a 94 °C seguit per 35 cicles de 94°C durant 30 s, 55 °C durant 45 s i 72 °C durant 1 min i 45 s. Una vegada acabats els 35 cicles es va fer una extensió final a 72 °C durant 7 min.

### 3.6.3 Síntesi de cDNA

La síntesi de cDNA a partir del producte obtingut a l'anterior apartat es va dur a terme seguint les instruccions del protocol SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Thermo Fisher Scientific, EEUU).

### 3.6.4 Patrons dels gens *gyr* i *fnt* per la RT-qPCR

Per quantificar la concentració dels gens a les mostres problemes es necessitava una referència. El gen de referència que es va utilitzar va ser *gyrA*, un gen constitutiu que es va utilitzar com a indicador de l'estat del cultiu, ja que està involucrat en funcions bàsiques de la cèl·lula com el metabolisme de nucleòtids. Es va escollir aquest gen constitutiu precisament, perquè és un dels tres gens de referència de *C. ljungdahlii* amb una expressió més estable [12]. Per obtenir aquesta referència s'havien d'obtenir concentracions conegudes dels gens per fer-ne dilucions i poder realitzar una recta patró de cada un. Per a això primer es va clonar cadascun dels gens en un vector segons el TOPO TA Cloning<sup>R</sup> Kit for Sequencing (Thermo Fisher Scientific, EEUU) seguint les instruccions de fàbrica. Per comprovar si els clons eren positius pel gen d'interès es va realitzar una PCR M13 amb els primers M13-F20/M13R. Les condicions d'aquesta PCR es van dur a terme amb les concentracions finals d'1X del tampó, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,44 μM de cada primer i 0,12 U de polimerasa Taq. El programa de la PCR es va fer en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, EEUU) i va començar amb un primer pas de desnaturalització de 4 min a 94 °C seguit per 35 cicles de 94°C durant 30 s, 55 °C durant 45 s i 72 °C durant 90 s. Una vegada acabats els 35 cicles es va fer una extensió final a 72 °C durant 10 min.

Un cop obtingut un clon positiu per cada gen es va extreure el vector on hi havia el gen d'interès clonat mitjançant el GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Aquest vector obtingut es va linealitzar amb l'enzim de restricció NotI, seguint les instruccions del protocol FastDigest NotI (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Una vegada obtingut el plasmidi amb el gen linealitzat, es va calcular la concentració exacta de DNA amb el NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, EEUU) i partint d'una concentració de  $0,5 \cdot 10^{10}$  ng/μl de cada gen, es van realitzar les dilucions de la recta patró per la RT-qPCR.

### 3.6.5 RT-qPCR

Per últim, es va realitzar la RT-qPCR de les mostres per analitzar-ne l'expressió quantitativament, utilitzant el LightCycler® 96 Real-Time PCR System (Roche, Alemanya). La mix utilitzada va ser la mateixa pels dos gens analitzats, una concentració final de SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, EEUU) d'1X, amb 0,6 μM per cada un dels primers utilitzats. El programa també va ser el mateix i consistia en una preincubació de 95 °C durant 600 s, seguit per 40 cicles d'amplificació de dos passos: 95 °C durant 15 s i 60 °C durant 60 s. El programa l'acabava un pas final de fusions que consistia en 95 °C durant 10 s, 65 °C durant 60 s i 97 °C durant 1 s.



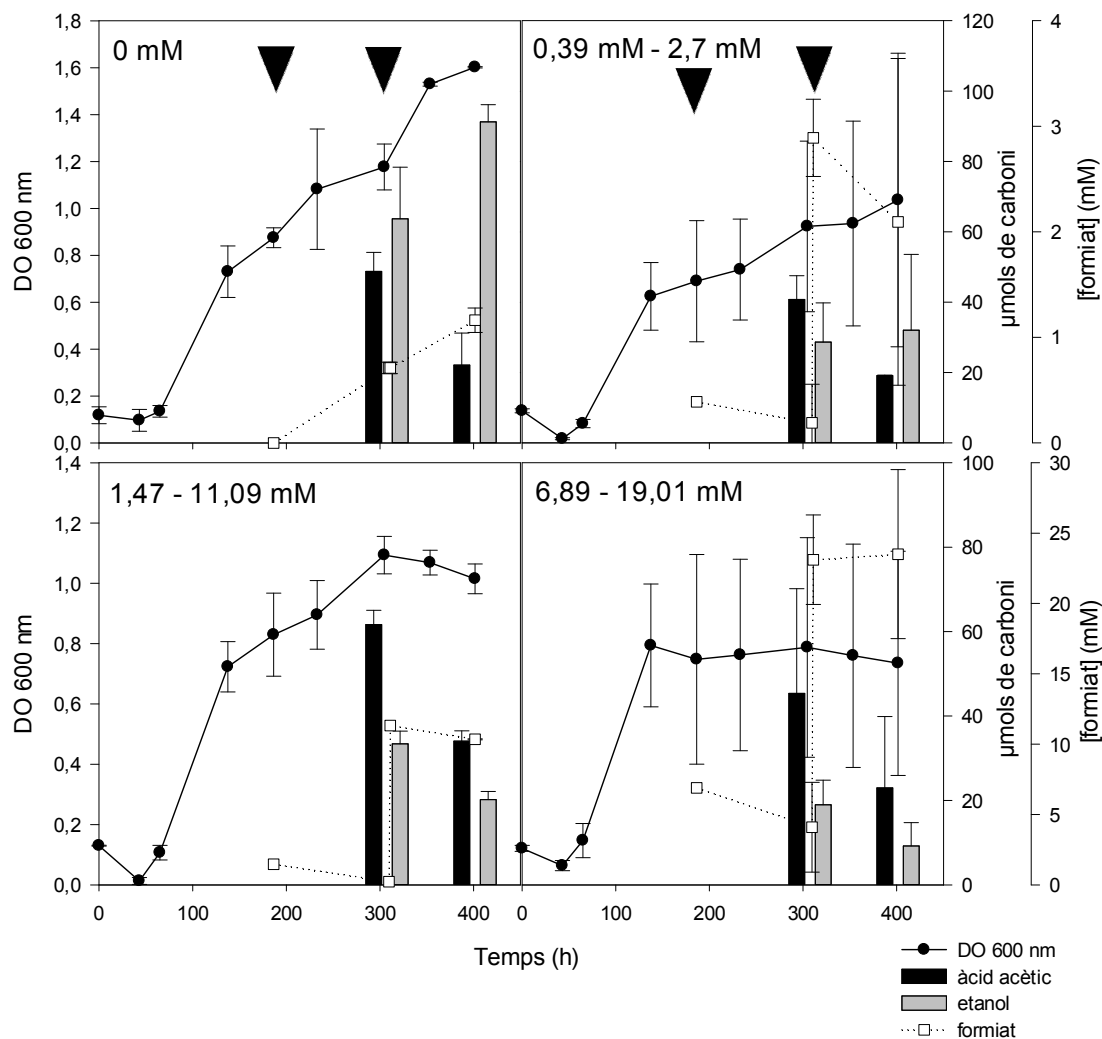
En la RT-qPCR del gen *gyr* es va obtenir una eficiència del 90 % i un  $r^2$  d'1, i en la del gen *fnt* es va obtenir una eficiència del 95 % i un  $r^2$  d'1.

## 4. Resultats i discussió

### 4.1 Efectes sobre la fase estacionària

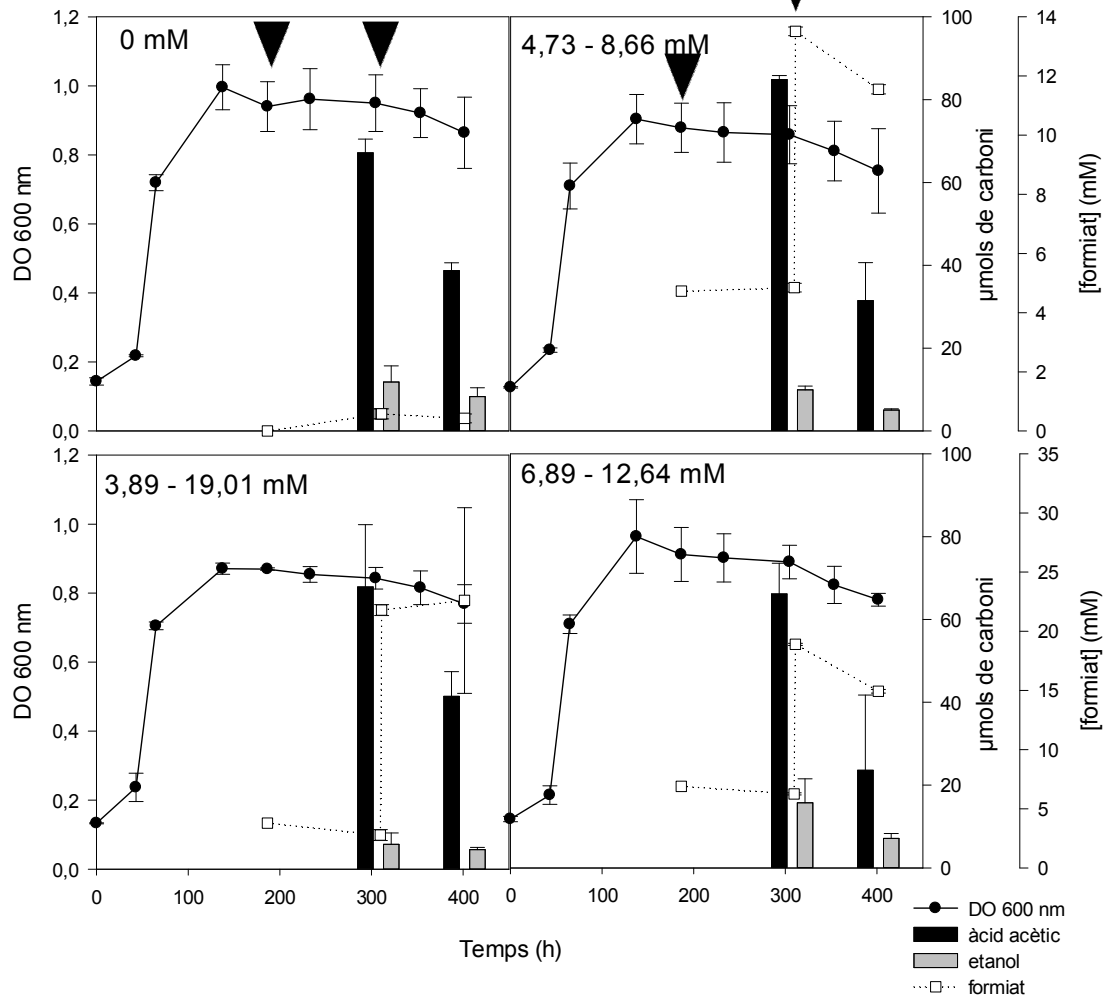
#### Creixement, consum i producció en presència de formiat

El creixement de les dues espècies va mostrar les mateixes fases (Figs. 3 i 4): una fase de latència de 65 i 43 h per *C. autoethanogenum* i *C. ljungdahlii* respectivament, una fase de creixement exponencial fins les 137,5 h en totes dues, i una fase estacionària que va acabar a les 401,5 h també en totes dues espècies. S'han escollit per representar els cultius amb les concentracions de formiat afegides representatives de cada espècie, però tots van seguir el mateix patró de consum, creixement i producció.



**Fig. 3.** Creixement, producció i consum de formiat (mitjanes i SD, n=2) al llarg de l'experiment de diversos dels cultius de *C. autoethanogenum* a diferents concentracions de formiat afegides. Els triangles negres invertits apunten els moments de les dues addicions de formiat (186,5 h i

304,5 h). Els títols informen de la concentració afegida en la primera addició (esquerra) i la segona (dreta) a cada duplicat, excepte el control, al qual no es va afegir formiat en cap moment.



**Fig. 4.** Creixement, producció i consum de formiat (mitjanes i SD, n=2) al llarg de l'experiment de diversos dels cultius de *C. ljungdahlii* a diferents concentracions de formiat afegides. Els triangles negres invertits apunten els moments de les dues addicions de formiat (186,5 h i 304,5 h). Els títols informen de la concentració afegida en la primera addició (esquerra) i la segona (dreta) a cada duplicat, excepte el control, al qual no es va afegir formiat en cap moment.

En referència al pH, en el cas de *C. autoethanogenum* aquest va disminuir des de 6,17 a l'inici de l'experiment fins a un valor mig de  $5,36 \pm 0,52$  a les 190 h, just abans de la primera addició de formiat. En *C. ljungdahlii*, el pH a l'inici de l'experiment va resultar de 5,90, i de  $5,13 \pm 0,34$  abans d'afegir el formiat per primera vegada. Aquesta disminució concorda amb l'habitual disminució del pH del medi a causa de l'acidogènesi, al final de la qual els bacteris comencen a produir alcohols per contrarestar aquesta acidificació i entren en fase de solventogènesi. Amb més mesures de pH, com per exemple d'abans de la segona addició o del final de l'experiment, s'hauria pogut confirmar que tot i haver-se acidificat el medi amb l'addició del compost, al final del període el pH s'hauria acabat mantenint perquè els bacteris es trobaven en fase estacionària, i per tant de solventogènesi.

La mitjana de la taxa màxima de creixement durant la fase de creixement exponencial de *C. ljungdahlii* era de  $0,023 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$ , lleugerament inferior a la de *C. autoethanogenum*, de

0,029 ± 0,008 h<sup>-1</sup>, fet que confirma que arribar abans a la fase estacionària no té per què estar relacionat amb presentar una taxa de creixement superior. Aquests valors obtinguts per les taxes màximes de creixement dels bacteris són inferiors als reportats anteriorment en estudis on també es va avaluar l'efecte de l'addició de formiat en *C. ljungdahlii* (0,063 h<sup>-1</sup>), afegit a l'inici de l'experiment [6]. Els valors màxims de DO<sub>600</sub> de *C. ljungdahlii* durant la fase exponencial es trobaven al voltant d'1,04, i els de *C. autoethanogenum* entorn els 0,94.

La producció d'àcid acètic i etanol, així com el consum de formiat, es van mesurar 116,5 h després de la primera addició de formiat i a les 94 h després de la segona (Figs. 3 i 4). Cap de les concentracions de formiat afegides durant la fase estacionària va resultar perjudicial per al manteniment dels cultius i cap va experimentar una variació dràstica de la seva densitat òptica. Després de les addicions de formiat a concentracions baixes (del rang 0,39-3,89 mM) en *C. autoethanogenum* va augmentar lleugerament el seu creixement, al igual que el tractament control on 0 mM de formiat es va afegir.

Els cultius control de *C. autoethanogenum* van créixer pronunciadament i durant tot l'experiment, sense entrar en fase estacionària, presentant les quantitats més elevades d'etanol (63,8 i 91,3 μmols de carboni) i unes quantitats d'àcid acètic de 48,8 i 22,2 μmols de carboni. Aquesta característica del seu creixement fa pensar que és possible que l'addició de formiat al final de la fase exponencial propiciï l'entrada de *C. autoethanogenum* en fase estacionària. En canvi, el cultius control de *C. ljungdahlii* contenien 11,9 i 8,3 μmols de carboni en forma d'etanol, i 67,2 i 38,7 μmols de carboni en forma d'àcid acètic.

En referència a la resta de cultius de *C. autoethanogenum*, el rang de producció d'etanol es troba entre els 5 i els 32 μmols de carboni, i el d'àcid acètic entre els 61,6 i 71,1 μmols de carboni, sense seguir cap evolució proporcional o correlacionada amb la concentració de formiat afegida (Prova de Kruskal-Wallis, n = 24, p > 0,05). Els tractaments amb més μmols de carboni en forma d'etanol totals (33,4 i 32,1) són als quals se'ls havia afegit formiat a una concentració final d'1,47 mM a la primera addició i 2,70 mM a la segona, respectivament. Les quantitats més altes d'àcid acètic (61,6 i 45,4 μmols de carboni) es van observar als cultius amb formiat a 1,47 i 6,89 mM afegit durant la primera addició, respectivament. Aquests dos cultius són els que alhora van presentar un consum de formiat major (del 84,5 % i 40,35 %). Aquest consum va desaparèixer als 19,01 mM de formiat afegits, la concentració més alta estudiada en aquesta espècie i aquest experiment.

La resta de cultius de *C. ljungdahlii* a part del control contenien quantitats molt baixes d'etanol en comparació amb l'altra espècie, entre els 0 i els 16 μmols de carboni. Referent a l'àcid acètic, aquest es va observar en unes quantitats dins el rang d'entre 23 i 81 μmols de carboni, sense seguir cap evolució sistemàtica amb la concentració de formiat afegida (Prova de Kruskal-Wallis, n = 36, p > 0,05), sent-ne el cultiu amb més quantitat (84,8 μmols de carboni) al que s'havia afegit formiat a una concentració de 4,73 mM a la primera addició. La concentració de formiat es va mantenir gairebé invariable en els tubs on s'havia afegit a 4,73 mM o a concentracions més baixes, i aquest va ser consumit pels cultius als quals es va afegir a una concentració d'entre 6,89 mM a la primera i 46,73 mM a la segona addició. En el cas d'aquesta espècie el consum de formiat va augmentar a mesura que ho feia la seva quantitat afegida, assolint-ne el major valor (45,5 %) en els duplicats als que s'havia afegit a una concentració

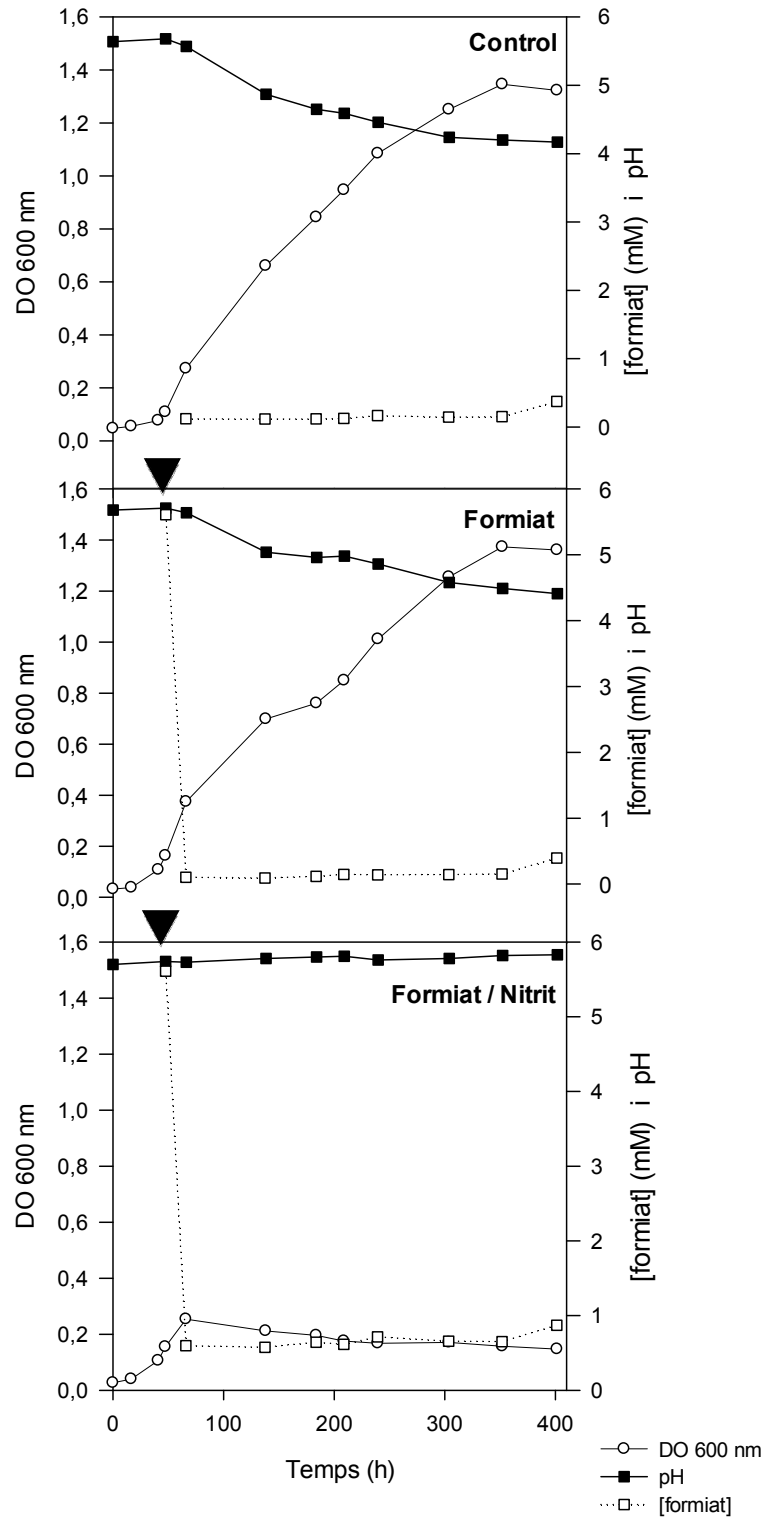
major, de 46,73 mM a la segona addició. Els cultius en els quals no es va produir consum de formiat són als que s'havia afegit a una concentració final de 14,69 i 25,49 mM, però a la resta de cultius amb concentracions superiors hi va haver consum. L'etanol i l'àcid acètic inicials que contenien els cultius abans de la primera addició de formiat era de 130,1 i 492,5  $\mu$ mol de carboni respectivament.

Així, les quantitats màximes d'etanol produïdes per cada espècie eren les dels cultius sense formiat afegit, per tant el formiat afegit a l'inici i durant la fase estacionària de *C. ljungdahlii* i *C. autoethanogenum* no deriva en la producció de quantitats més elevades d'alcohol, i tampoc d'àcid acètic; contràriament al que s'havia observat per *C. ljungdahlii* al mateix pH quan el formiat es va afegir en concentracions baixes (2,18-5,45 mM) a l'inici de l'experiment [6]. Probablement, a l'estar en fase estacionària en el moment de l'addició del formiat, els cultius ja havien entrat en fase de solventogènesi, i per tant a produir alcohols. En aquesta etapa, la cèl·lula utilitza el NADH com a font d'agents reductors per produir etanol a partir de l'acetil-CoA generat a la WLP [4]. Amb l'addició de formiat com a font d'agents reductors addicional es podria haver esperat que la cèl·lula produís més quantitat d'alcohols o si més no més ràpid, ja que s'estalviaria l'oxidació prèvia del CO amb aquesta aportació extra d'equivalents reductors, però no va resultar el cas.

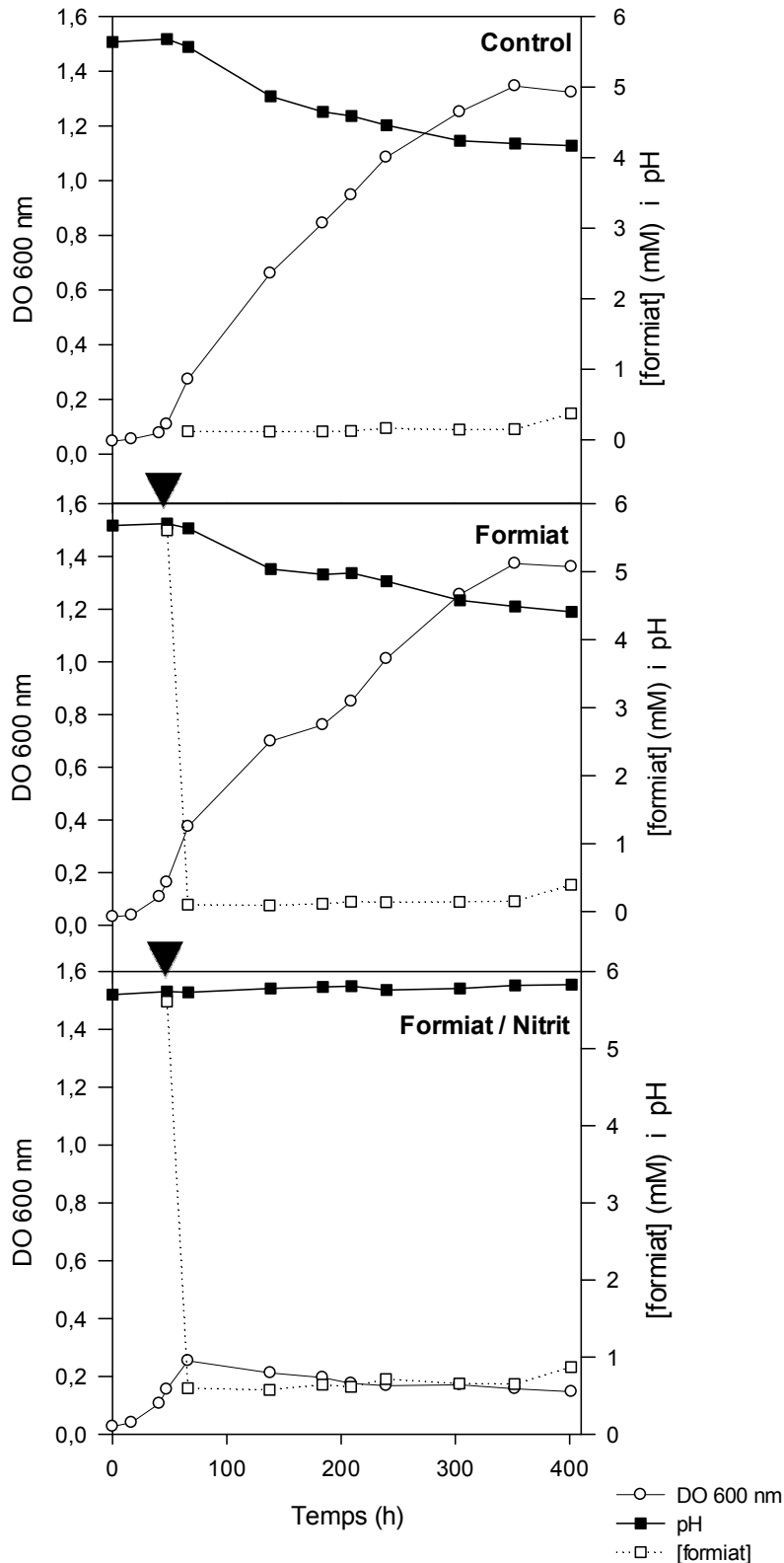
## 4.2 Efectes sobre la fase exponencial

### Creixement, consum i producció en presència de formiat

En aquest cas es va començar tenint una concentració de formiat de 5,61 mM als cultius als que se'ls va afegir a les 47,5 h en *C. ljungdahlii* i a les 94,75 h en *C. autoethanogenum*, i en el cas dels cultius on es va afegir junt amb el nitrit a 5,61 mM també. En *C. ljungdahlii*, els cultius control i el de tractament amb formiat van mostrar una evolució molt semblant de les tres variables. Es va produir una disminució clara del pH entre les 67 i les 240 h, de 5,6 a 4,5 aproximadament, quan els cultius es trobaven en plena fase exponencial (Figs. 5 i 6). La concentració de formiat va disminuir molt ràpidament en els dos cultius de les dues espècies. La concentració del cultiu tractat amb formiat de *C. autoethanogenum* va variar de 5,61 mM a 0,4 mM en 43 h, i la concentració de *C. ljungdahlii* ho va fer de 5,61 mM al voltant de 0,12 mM en 18 h. Després d'aquest primer valor recollit posterior a l'addició, la concentració de formiat es va mantenir entorn aquest mateix valor durant tot l'experiment, excepte al final d'aquest (a les 401,5 h), on tots els quatre cultius havien iniciat la fase estacionària i augmentat la concentració de formiat fins al voltant dels 0,36-0,39 mM.



**Fig. 5.** Evolució del creixement, el pH i la concentració de formiat dels cultius de *C. autoethanogenum* al llarg de l'experiment. El títol de cada gràfic indica el tractament que es va aplicar a cada cultiu. Els triangles invertits negres apunten el moment de l'addició dels compostos (94,75 h), a la concentració final de 5,61 mM. En el cas de la concentració de formiat, la primera mesura es va prendre a les 137,25 h.

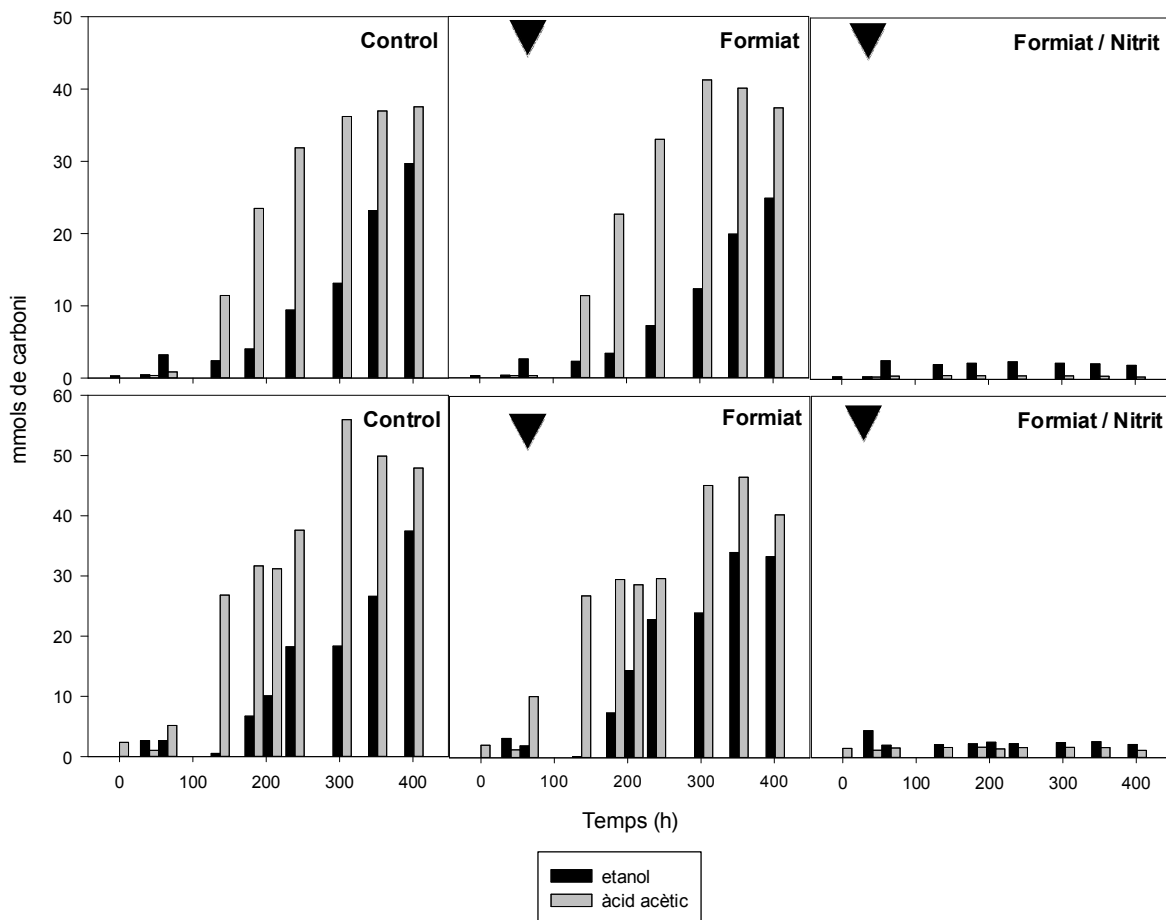


**Fig. 6.** Evolució del creixement, el pH i la concentració de formiat dels cultius de *C. ljungdahlii* al llarg de l'experiment. El títol de cada gràfic indica el tractament que es va aplicar a cada cultiu. El triangle invertit negre apunta el moment de l'addició dels compostos (47,5 h), a la concentració final de 5,61 mM. En el cas de la concentració de formiat, la primera mesura es va prendre a les 65,75 h. En el cas del tractament amb formiat i nitrit afegits, els resultats van

ser molt diferents a la resta de condicions per totes dues espècies. A nivell visual això ja es podia observar: mentre que la resta de cultius tenien una aparença blanc-tèrbola, els cultius d'aquest tractament van presentar un color rosat des de les 24 hores després de la seva addició fins al final de l'experiment. En *C. autoethanogenum* el cultiu va experimentar un lleuger augment de la seva  $DO_{600}$ , però aquesta es va mantenir al voltant de les 0,13-0,14 ua després d'afegir els compostos fins al final de l'experiment, sense créixer més. Oposadament als altres dos tractaments, el medi es va basificar, augmentant el seu pH a partir de les 95 h, en comptes de disminuir, fins arribar a un valor de 5,88. La concentració de formiat va seguir una evolució similar als altres cultius, tot i que en valors més elevats. Aquesta concentració de formiat també va disminuir just després d'afegir els compostos, però en aquest cas des de 5,61 mM fins a 0,8-0,9 mM, mantenint-se en aquests últims valors fins al final de l'experiment. En el mateix tractament de *C. ljungdahlii*, tot i que el cultiu va començar creixent, després de l'addició dels compostos la seva densitat òptica va disminuir per acabar-se mantenint també a valors baixos del voltant de 0,15-0,17 ua. Tot i experimentar una disminució cap a les 240 h de l'experiment, de manera general el pH també va augmentar en aquest cas, i la concentració de formiat també va disminuir gairebé immediatament després d'afegir els compostos, acabant al voltant dels 0,87 mM, molt semblants als de *C. autoethanogenum*.

Per tal d'avaluar la producció d'àcids i alcohols se n'ha representat la quantitat total de carboni en forma del compost de cada cultiu al llarg de l'experiment (Fig. 7). Tant l'etanol com l'àcid acètic presents al cultiu control i al tractat amb formiat de *C. ljungdahlii* van seguir una evolució semblant, augmentant regularment fins assolir unes quantitats també similars, arribant a un màxim de 37,45 i 47,92 mmols de C en forma d'etanol i àcid acètic respectivament en el cas del control, i al màxim de 33,38 i 40,35 mmols de C en forma d'etanol i àcid acètic en el tractament amb formiat afegit. Els resultats del tractament amb formiat i nitrit afegits van tenir una producció gairebé nul·la, sense superar en cap moment els 1,7 mmols de carboni en forma d'àcid acètic i els 4,5 mmols en forma d'etanol.



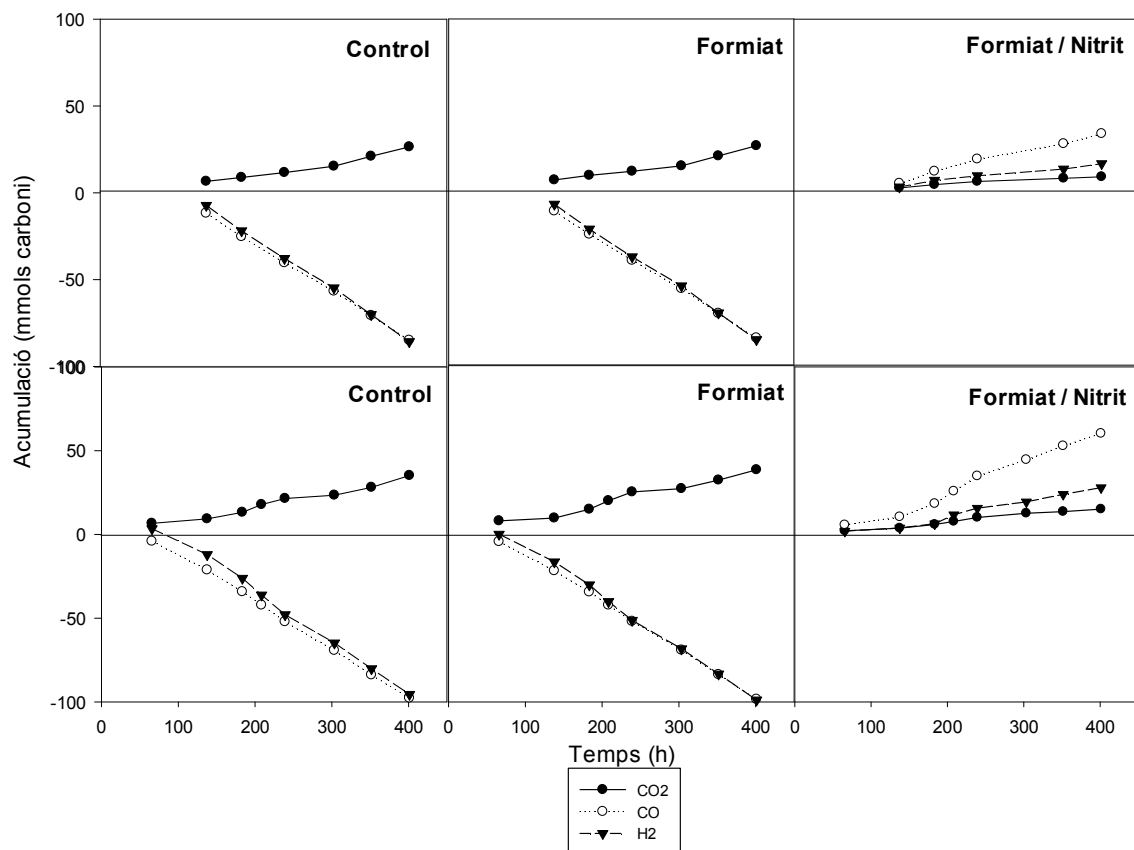


**Fig. 7.** Quantitat de carboni total en forma d'etanol i d'àcid acètic (mmols) present durant l'experiment, generat pels cultius de *C. autoethanogenum* (superior) i *C. ljungdahlii* (inferior). El títol de cada gràfic indica el tractament que es va aplicar a cada cultiu. Els triangles invertits negres mostren quan es van afegir els compostos (94,75 h per *C. autoethanogenum* i 47,5 h per *C. ljungdahlii*).

La quantitat dels compostos presents als cultius control i amb formiat afegit de *C. autoethanogenum* també va augmentar gradualment i va resultar lleugerament inferior a la del mateix en *C. ljungdahlii*, sent les màximes els 29,7 i els 37,6 mmols de C en forma d'etanol i àcid acètic respectivament, en el cultiu control, i els 24,9 i els 41,2 mmols de C en forma d'etanol i àcid acètic, respectivament, en el cultiu amb formiat afegit. De la mateixa manera que *C. ljungdahlii*, el cultiu tractat amb formiat i nitrit de *C. autoethanogenum* va presentar unes quantitats molt baixes en comparació amb els altres cultius, sent les màximes d'àcid acètic i etanol 0,5 i 2,6 mmols de carboni, respectivament. Aquest comportament dels dos cultius tractats amb formiat i nitrit, que no van presentar creixement ni producció però sí consum de formiat, fa pensar que els bacteris podrien haver utilitzat el formiat en alguna via de desintoxicació, perquè la presència conjunta dels dos compostos podria haver causat una situació d'estrès per les cèl·lules.

Encara que les quantitats d'alcohols generades en presència de formiat afegit en aquest estudi són molt semblants a les generades en els cultius control, aquestes quantitats produïdes amb formiat addicional són superiors a les reportades en un altre estudi de l'efecte de l'addició del formiat a una concentració molt similar (5,45 mM) i al mateix pH, on aquest s'havia afegit just al començament de l'experiment [6]. Tot i així, no és possible afirmar que aquesta diferència sigui a causa d'haver afegit el formiat just abans de la fase exponencial i no a l'inici de l'experiment, ja que en aquest treball es va realitzar a 25 °C, i l'experiment citat es va dur a terme a 35 °C.

Tant en *C. ljungdahlii* com en *C. autoethanogenum*, hi va haver un consum del CO i l'H<sub>2</sub> i una producció de CO<sub>2</sub> en els cultius control i els tractats amb formiat afegit (Fig. 8). El consum de CO i H<sub>2</sub>, sobretot en *C. autoethanogenum*, va ser una mica més pronunciat que la producció del CO<sub>2</sub>. En canvi, els resultats obtinguts dels cultius de les dues espècies tractades amb formiat i nitrit van mostrar una acumulació de tots tres components.



**Fig. 8.** Acumulació dels diferents components del *syngas* (mmols de carboni) al llarg de l'experiment en els cultius de *C. autoethanogenum* (superior) i *C. ljungdahlii* (inferior). El títol de cada gràfic indica el tractament aplicat a cada cultiu.

La hidrogenasa (H<sub>2</sub>/hidrogenasa), enzim de la WLP, utilitza l'hidrogen com a substrat per a l'obtenció del poder reductor necessari en algunes de les etapes d'aquesta ruta. La seva activitat s'ha vist inhibida per la presència de CO en baixes concentracions en espècies com *C. carboxidivorans* [13] i *Acetobacterium woodii* [14]. Aquest patró, però, no es segueix en totes

les espècies de clostridis carboxidotròfics, i en aquest estudi per exemple, s'ha observat que *C. autoethanogenum* i *C. ljungdahlii* són capaços d'utilitzar indistintament el CO i l'H<sub>2</sub> com a fonts de poder reductor, sense mostrar inhibició de l'activitat hidrogenasa de l'H<sub>2</sub>/hidrogenasa. Aquesta desinhibició de la hidrogenasa no es pot atribuir a l'excés de poder reductor disponible per la presència de formiat afegit, perquè el perfil de consum del tractament control i el de formiat de cada espècie eren molt similars entre ells. Això fa pensar que la causa en siguin les pròpies diferències entre les soques de clostridis carboxidotròfics [4]. En *C. ljungdahlii*, per exemple, s'ha descrit la funció de diverses hidrogenases quan el bacteri utilitza els components del *syngas* com a substrats i no se n'ha descrit cap tipus d'inhibició a causa de la presència de CO [14].

En referència al balanç de carboni, aquest es va realitzar pels cultius control i els tractats amb formiat, però als tractats amb formiat i nitrit no se'ls va aplicar perquè no havien mostrat creixement i per tant no hagués tingut sentit. En *C. autoethanogenum*, la quantitat de carboni destinada al creixement i manteniment en el cultiu control va resultar de 9,08 mmols (el 10,7 % del carboni consumit), i la del cultiu tractat amb formiat va ser de 2,34 mmols (2,7 % del carboni consumit). Seguint el mateix patró, en *C. ljungdahlii*, es van destinar 23,34 mmols de carboni (23,9 % del carboni consumit) per al creixement i manteniment en el cultiu control, i 11,34 mmols (11,3 % del carboni consumit) en el cultiu tractat amb formiat. Aquestes quantitats són molt semblants entre els cultius de cada espècie, per tant es podria considerar que en els dos cultius cadascuna va dedicar gairebé el mateix carboni al creixement i manteniment. Abans d'obtenir aquests resultats, es podria haver pensat que la quantitat invertida per les cèl·lules en el seu creixement i manteniment seria superior en els cultius tractats amb formiat que als control, ja que afegir un compost addicional (el formiat) pot induir una situació d'estrès per les cèl·lules a la que no estan habituades. Tot i això, la quantitat de formiat afegida, al ser una concentració que es troba dins el rang de les que no resulten tòxiques per les cèl·lules [6], és possible que no els hagués provocat un impacte tan important a nivell metabòlic com per canviar-ne les proporcions de carboni invertit en cada activitat.

### 4.3 Anàlisi de l'expressió de *gyr* i *fnt*

La RT-qPCR es va realitzar per dues mostres de cada cultiu, una de l'inici de la fase exponencial (de les 53 h en el cas de *C. ljungdahlii*, i de les 94 h en el cas de *C. autoethanogenum*) abans d'afegir els compostos, i una del final de l'experiment, presa a les 401,5 h en totes dues espècies (Taula 1).

**Taula 1.** Concentració (nº còpies/ $\mu$ l) dels gens *gyr* i *fnt* al principi de la fase exponencial abans de l'addició dels compostos (inicial), i al final de la fase exponencial (final), en els diferents tractaments dels dos bacteris. També es mostra la ràtio del gen *fnt* respecte el *gyr*. Es mostra la mitjana i la desviació estàndard (SD) dels duplicats de cada mostra.

Bacteri	Mostra	Tractament	Nº còpies <i>gyr</i> / $\mu$ l	SD	Nº còpies <i>fnt</i> / $\mu$ l	SD	Ràtio <i>fnt</i> / <i>gyr</i>
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	inicial	Control	3,17E+05	1,43E+04	3,61E+05	6,02E+03	1,14
	inicial	Formiat	3,90E+05	6,46E+04	8,15E+05	4,61E+04	2,09
	inicial	Formiat i nitrit	2,50E+06	8,05E+04	5,41E+06	5,41E+04	2,16
	final	Control	2,82E+05	3,63E+03	1,17E+05	9,76E+03	0,42
	final	Formiat	1,00E+06	1,29E+04	1,08E+06	2,20E+05	1,08
	final	Formiat i nitrit	1,82E+06	1,11E+05	3,15E+06	7,35E+04	1,73
<i>Clostridium autoethanogenum</i>	inicial	Control	7,71E+05	2,98E+04	1,90E+06	3,16E+04	2,46
	inicial	Formiat	3,86E+05	2,11E+04	9,30E+05	1,55E+04	2,41
	inicial	Formiat i nitrit	3,15E+05	1,42E+04	5,23E+05	3,48E+03	1,66
	final	Control	3,41E+06	5,44E+05	3,47E+06	1,16E+05	1,02
	final	Formiat	3,74E+06	6,02E+04	3,89E+06	1,04E+05	1,04
	final	Formiat i nitrit	9,03E+05	4,36E+04	5,23E+06	2,62E+05	5,80

Per totes dues espècies, en el cas dels cultius control i el de formiat afegit la ràtio gen transportador/gen constitutiu havia disminuït al final de l'experiment respecte el seu valor a l'inici de la fase exponencial. En el cas del cultiu de *C. autoethanogenum* tractat amb formiat i nitrit va passar el contrari, aquesta ràtio era major al final de la fase exponencial que al seu inici, abans de l'addició dels dos compostos. Es pot considerar que els valors d'aquestes ràtios són fiables perquè la seva variabilitat entre mostres inicials de cada espècie es va mantenir entre les seves mostres finals. És a dir, les ràtios de les mostres inicials del tractament de formiat i el de formiat i nitrit afegits de *C. ljungdahlii* eren més semblants entre elles que amb el tractament control, i aquesta diferència es va mantenir entre les ràtios de les seves mostres finals. Aquesta variabilitat també es va mantenir entre les mostres de *C. autoethanogenum*.

A nivell genètic doncs, amb aquest experiment no es pot afirmar que el *fnt* estigui implicat en el procés de regulació de la difusió del formiat addicional a la cèl·lula. Per confirmar-ho en futures investigacions s'hauria d'analitzar l'expressió d'aquest a les 24 hores o poc més després d'haver afegit el formiat. D'aquesta manera, si hi hagués una sobreexpressió del gen segur que es detectaria, ja que en el cas d'aquest experiment aquest va ser segurament el

problema, que quan es va recollir la mostra final, si hi havia hagut una sobreexpressió del gen ja no en quedaven signes. De totes maneres, sí que es va observar un lleuger augment de la ràtio *fnt/gyr* en el cultiu de *C. autoethanogenum* tractat amb formiat i nitrit. Això permet deduir que probablement sí que hi va haver sobreexpressió del gen i la ràtio en va augmentar just després de l'addició del formiat, però una vegada aquest va ser consumit l'expressió del gen va tornar al nivell basal. En aquest cultiu la sobreexpressió es devia haver mantingut més temps a causa de l'estrès provocat amb l'addició dels dos compostos.

Per últim, es va voler analitzar l'efecte del nitrit per estudiar-ne la utilitat com a potenciador de l'ús de formiat. Al ser el gen estudiat un transportador de formiat/nitrit, es va pensar que potser a l'afegir nitrit al medi el transportador es comportaria com una bomba d'expulsió de nitrit de la cèl·lula, mantenint el formiat al seu interior (on s'utilitzaria com a font addicional d'agents reductors) per mantenir l'equilibri dels compostos i del pH dins i fora de la cèl·lula. Aquest no va ser el cas, ja que afegint nitrit al medi no es va ajudar a les cèl·lules a incorporar formiat al seu interior, sinó que aquest va resultar ser tòxic per les cèl·lules, impeding-ne el creixement, entrada a l'acidogènesi, i per tant producció d'alcohols. De fet, tot i no haver estudiat profundament el gen *fnt* en aquest estudi en les espècies amb les que es va treballar, en altres treballs s'ha comprovat que l'anió té certa toxicitat per la cèl·lula, i que s'ha de mantenir a concentracions intracel·lulars molt baixes perquè no afecti a la família de canals FNT [14]. Per això i vists els resultats, es pot afirmar que no resulta d'interès utilitzar el nitrit per augmentar la producció d'alcohols en les condicions analitzades.

## **5. Criteris ètics i de sostenibilitat del treball**

El context mateix del treball s'emmarca dins l'àrea de bioremediació, perquè té la intenció de potenciar i ajudar a desenvolupar la capacitat de les espècies tractades per reduir la presència de contaminants importants del medi (CO i CO<sub>2</sub>), que contribueixen a l'efecte hivernacle i són perjudicials per la salut, i alhora generar alcohols per a la producció de biocombustibles.

Durant tot el treball experimental també es va intentar desenvolupar-lo en un entorn en condicions el màxim de sostenibles, utilitzant material reutilitzable sempre que era possible, utilitzant només el material fungible necessari i aprofitant els cicles dels termocicladors de PCR per no fer-ne més dels necessaris, per exemple.

## 6. Conclusions

The conclusions obtained with this work are:

1. The addition of formate as an additional electron donor did not prove successful to increase alcohol productivity of *C. autoethanogenum* and *C. ljungdahlii* grown on syngas.
2. At the tested conditions, the addition of nitrite, putatively cotransported with formate in transport channels, had a strong inhibition effect on growth of both strains.
3. Both strains exhibited a concomitant use of H<sub>2</sub> and CO, probably decreasing the suspected effect of formate due to an excess of available reducing power. Consumption of formic acid at the exponential phase is likely occurring as a detoxification process in both strains.

## 7. Bibliografia

1. Demirbas, A. (2007). Progress and recent trends in biofuels. *Progress in energy and combustion science*, 33(1), 1-18. doi:10.1016/j.pecs.2006.06.001
2. Dragone, G., Fernandes, B. D., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A. (2010). Third generation biofuels from microalgae. Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology, 2, 1355-1366. Recuperat de <http://hdl.handle.net/1822/16807>
3. Mohammadi, M., Najafpour, G. D., Younesi, H., Lahijani, P., Uzir, M. H., & Mohamed, A. R. (2011). Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(9), 4255-4273. doi:10.1016/j.rser.2011.07.124
4. Ramió-Pujol, S., Ganigué, R., Bañeras, L., & Colprim, J. (2015). How can alcohol production be improved in carboxydrotrophic clostridia? *Process Biochemistry*, 50(7), 1047-1055. doi:10.1016/j.procbio.2015.03.019
5. Talukdar, P. K., Olguín-Araneda, V., Alnoman, M., Paredes-Sabja, D., & Sarker, M. R. (2015). Updates on the sporulation process in *Clostridium* species. *Research in microbiology*, 166(4), 225-235. doi:10.1016/j.resmic.2014.12.001
6. Ramió-Pujol, S., Ganigué, R., Bañeras, L., & Colprim, J. (2015). Impact of formate on the growth and productivity of *Clostridium ljungdahlii* PETC and *Clostridium carboxidivorans* P7 grown on syngas. *International Microbiology*, 17(4), 195-204. doi: 10.2436/20.1501.01.222
7. Bar-Even, A. (2016). Formate assimilation: The metabolic architecture of natural and synthetic pathways. *Biochemistry*, 55(28), 3851-3863. doi:10.1021/acs.biochem.6b00495
8. Abubackar, H. N., Veiga, M. C., & Kennes, C. (2015). Carbon monoxide fermentation to ethanol by *Clostridium autoethanogenum* in a bioreactor with no accumulation of acetic acid. *Bioresource technology*, 186, 122-127. doi:10.1016/j.biortech.2015.02.113
9. Cotter, J. L., Chinn, M. S., & Grunden, A. M. (2009). Influence of process parameters on growth of *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* on synthesis gas. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(5), 281-288. doi:10.1016/j.enzmictec.2008.11.002
10. Tanner, R. S., Miller, L. M., & Yang, D. (1993). *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an acetogenic species in clostridial rRNA homology group I. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43(2), 232-236. doi: 10.1099/00207713-43-2-232



11. Sleat, R., & Mah, R. A. (1984). Quantitative method for colorimetric determination of formate in fermentation media. *Applied and environmental microbiology*, 47(4), 884. Recuperat de <http://aem.asm.org/content/47/4/884.full.pdf>
12. Liu, J., Tan, Y., Yang, X., Chen, X., & Li, F. (2013). Evaluation of *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528 reference genes in gene expression studies by qRT-PCR. *Journal of bioscience and bioengineering*, 116(4), 460-464. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.04.011
13. Ramió-Pujol, S., Ganigué, R., Bañeras, L., & Colprim, J. (2015). Incubation at 25 C prevents acid crash and enhances alcohol production in *Clostridium carboxidivorans* P7. *Bioresource technology*, 192, 296-303. doi:10.1016/j.biortech.2015.05.077
14. Ragsdale, S. W., & Ljungdahl, L. G. (1984). Hydrogenase from *Acetobacterium woodii*. *Archives of microbiology*, 139(4), 361-365. doi: 10.1007/BF00408380
15. Köpke, M., Held, C., Hujer, S., Liesegang, H., Wiezer, A., Wollherr, A., & Dürre, P. (2010). *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(29), 13087–13092. <http://doi.org/10.1073/pnas.1004716107>
16. Lü, W., Du, J., Schwarzer, N. J., Wacker, T., Andrade, S. L., & Einsle, O. (2013). The formate/nitrite transporter family of anion channels. *Biological chemistry*, 394(6), 715-727. doi: 10.1515/hsz-2012-0339