

Títol del treball:

Ensayos de producción de hidrogeno con proteobacterias.

Estudiant: Lorena Gómez Calvo

Grau en Biotecnología

Correu electrònic: loreninha794@gmail.com

Tutor: Lluís Bañeras Vives

Empresa / institució: Universitat de Girona, Facultat de Ciències.

Vistiplau tutor:

Nom del tutor: Lluís Bañeras Vives

Nom del cotutor*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

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

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

*A quen está e a quen xa non,
á familia
ós amigos
a Eli
e a Barcelona*

Grazas por todo.

ÍNDICE

Resumen	2
Abstract	3
Resum	4
1 Introducción	5
1.1 Bioproducción de H ₂	5
1.2 Producción de hidrógeno por bacterias púrpuras no del azufre (PNS)	7
2 Objectives	9
3 Materiales y metodología	10
3.1 Proteobacterias y condiciones de cultivo	10
3.2 Determinación de la producción de H ₂	10
3.3 Cálculos para la expresión de los valores medidos de gas en mM.	12
3.4 Extracciones de DNA y PCR	13
3.5 Consideraciones éticas y de sostenibilidad	13
4 Resultados y Discusión	15
4.1 Análisis de la bioproducción de H ₂ mediante cromatografía de gases	15
4.2 Bioproducción de H ₂ con períodos de luz y oscuridad	19
4.3 Estudio preliminar de la filogenia de proteobacterias	22
5 Conclusions	25
6 Bibliografía	26

RESUMEN

Uno de los grandes retos de las próximas décadas es encontrar fuentes energéticas renovables que puedan sustituir la extrema dependencia de los combustibles fósiles. Hasta el momento, buena parte de las fuentes energéticas nacen de algún tipo de tratamiento o conversión de combustibles fósiles, lo que sigue contribuyendo a la contaminación medioambiental. Por esto, en los últimos años ha aumentado el interés sobre el hidrógeno (H_2) como fuente de energía.

El hidrógeno es el elemento más abundante del universo, dado que el 90% de la materia está constituida por él. Aun así, el hidrógeno como tal no existe aislado en la naturaleza, por lo que tiene que ser generado, requiriendo una alta inversión energética. Por este motivo, paulatinamente, la industria ha empezado a apostar por la bioproducción de hidrógeno como fuente de energía.

Existen diferentes formas de producir hidrógeno mediante microorganismos, siendo la más eficaz la fotofermentación mediante bacterias fotosintéticas no del azufre (PNS). Estas bacterias crecen en condiciones anaeróbicas y bajo exposición a luz, y pueden emplear diferentes sustratos como fuente de carbono y nitrógeno. Además, presentan un metabolismo flexible y variado, destacando la participación de la enzima nitrogenasa durante la producción anaeróbica de hidrógeno.

En este proyecto se ha comprobado la producción de hidrógeno de tres cepas de proteobacterias (*Rhodobacter sp*, *Rhodopseudomonas sp.* y *Rhodopseudomonas pseudopalustris*) mediante dos metodologías, cromatografía de gases y monitorización de la producción usando un sensor de hidrógeno. Mediante la primera aproximación, se ha estudiado el efecto del nitrógeno sobre la enzima nitrogenasa y la producción de hidrógeno. Los resultados demostraron que, bajo una atmósfera saturada de nitrógeno, la síntesis directa de hidrógeno se ve inhibida. Mientras que, en una atmósfera sin presencia de nitrógeno, se observa producción de hidrógeno por estas bacterias.

Por otro lado, con el uso del sensor de hidrógeno, se ha podido demostrar que el efecto del nitrógeno inhibe la actividad de la nitrogenasa y que estas bacterias tienen la capacidad de producir hidrógeno tanto con luz como sin ella. Las diferentes concentraciones de hidrógeno alcanzadas por cada bacteria indican que cada cepa necesita unas condiciones de producción específicas para alcanzar un rendimiento eficiente.

ABSTRACT

One of the biggest challenges of the upcoming decades is to find renewable energy sources that can replace the extreme dependence on fossil fuels. So far, most energy sources are born of some kind of treatment or conversion of fossil fuels, which continues to contribute to environmental pollution. For this reason, in recent years has increased interest on hydrogen (H₂) as power source.

Hydrogen is the most abundant element of the universe, due to the 90% of the matter is constituted by it. Even though, hydrogen does not exist isolated in nature by itself and it has to be generated. These processes require a high energy investment, for this reason the industry has gradually started to bet on the bioproduction of hydrogen as energy source.

There are different ways of producing hydrogen by using microorganisms, but the most effective one is photofermentation mediated by photosynthetic non-sulfur bacteria. These bacteria grow in anaerobic conditions and under exposure to light, and can use different substrates as a source of carbon and nitrogen. In addition, they present a flexible and varied metabolism, emphasizing the participation of the enzyme nitrogenase during the anaerobic production of hydrogen.

In the present study hydrogen production mediated by three proteobacteria strains has been verified (*Rhodobacter* sp, *Rhodopseudomonas* sp. and *Rhodopseudomonas pseudopalustris*) using two different analytical methods, gas chromatography and monitoring the production with a hydrogen sensor. Using the first approx., the effects of nitrogen in the nitrogenase activity and hydrogen production has been studied. The obtained results demonstrated that under a nitrogen saturated atmosphere, direct hydrogen synthesis was inhibited. While, in absence of nitrogen hydrogen production is observed by these bacteria.

On the other hand, with the use of hydrogen sensor, we demonstrated that nitrogen's effect inhibits the nitrogenase activity and that these bacteria have the ability to produce hydrogen with light and without it. The different hydrogen concentrations achieved by each bacterium indicate that each strain needs specific production conditions to accomplish an efficient performance.

RESUM

Un dels grans reptes de les pròximes dècades és trobar fonts d'energia renovable que puguin substituir l'extrema dependència dels combustibles fòssils. Fins ara, moltes fonts d'energia neixen d'algun tipus de tractament o conversió dels combustibles fòssils, que continua contribuint a la contaminació ambiental. Per aquest motiu, en els darrers anys, ha augmentat l'interès per l'hidrogen (H₂) com font d'energia.

L'hidrogen és l'element més abundant de l'univers donat que, el 90% de la matèria està constituïda per ell. Tot i així, l'hidrogen com a tal no existeix aïllat a la natura, així que ha de ser generat, requerint una alta inversió d'energia. És per això que la indústria, gradualment, ha començat a apostar per la bioproducció d'hidrogen com a font d'energia.

Hi ha diferents maneres de produir hidrogen mitjançant microorganismes, essent la fotofermentació mitjançada per bacteris fotosintètics no del sobre la més eficaç. Aquests bacteris creixen en condicions anaeròbiques i sota l'exposició a la llum, i poden utilitzar diferents substrats com a font de carboni i nitrogen. A més, aquests bacteris presenten un metabolisme flexible i variat, destacant la participació de l'enzim nitrogenasa durant la producció anaeròbica de l'hidrogen.

En aquest projecte s'ha comprovat la producció d'hidrogen mitjançada per tres soques de proteobacteris (*Rhodobacter* sp, *Rhodopseudomonas* sp. i *Rhodopseudomonas pseudopalustris*) emprant dos metodologies, cromatografia de gasos i monitorització de la producció amb un sensor d'hidrogen. Mitjançant la primera aproximació s'ha estudiat l'efecte del nitrogen sobre l'enzim nitrogenasa i la producció d'hidrogen. Els resultats demostraven que, sota una atmosfera saturada de nitrogen, la síntesi directe d'hidrogen es veia inhibida. Mentre que, en una atmosfera sense presència de nitrogen, se observa producció d'hidrogen per aquests bacteris.

D'altra banda, amb l'ús del sensor d'hidrogen, s'ha demostrat que l'efecte de nitrogen inhibeix l'activitat de la nitrogenasa i que aquests bacteris tenen la capacitat de produir hidrogen amb llum i sense ella. Les concentracions diferents d'hidrogen observades per cada bacteri indiquen que cada soca necessita condicions específiques de producció per aconseguir unes majors eficiències.

1 INTRODUCCIÓN

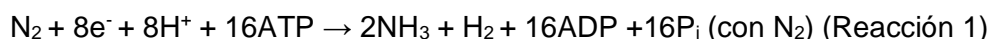
La población mundial se encuentra en la urgente situación de encontrar nuevas fuentes renovables de energía para mitigar el cambio climático, causado por el efecto invernadero de los gases que se acumulan en la atmósfera, así como para disminuir el consumo de combustibles fósiles (Sakurai, Masukawa, Kitashima, & Inoue, 2013).

El hidrógeno (H₂) es universalmente aceptado como fuente de energía segura, ecológica y renovable que no contribuye al efecto invernadero. Es el único combustible libre de carbono, ya que su oxidación produce agua (H₂O) que puede volver a ser transformada en H₂ (Azwar, Hussain, & Abdul-Wahab, 2014) y es altamente energético (122 KJ/g), siendo hasta 2.75 veces más potente que los combustibles a partir de hidrocarburos (Singh & Wahid, 2015). Actualmente la mayor parte del H₂ se obtiene de la hidrólisis del agua y de la gasificación del carbón (Azwar, Hussain, & Abdul-Wahab, 2014). Como muchos de estos procesos aún dependen del uso de combustibles fósiles, (Wu, Lu, Lin, Chen, & Lee, 2012) y requieren una gran inversión energética, recientemente se ha comenzado a apostar por la bioproducción de H₂.

1.1 BIOPRODUCCIÓN DE H₂

La producción fotobiológica de H₂ es un prometedor método de desarrollo de energía renovable (Wu et al., 2012). La fotofermentación y la fermentación oscura son los principales procesos utilizados por los microorganismos para la producción de H₂, aunque sí es cierto que existen otros métodos, como la biofotólisis, que presentan un menor rendimiento (Azwar, Hussain, & Abdul-Wahab, 2014).

El proceso de fotoproducción de H₂ se divide principalmente en tres tipos: la fotólisis del agua por bacterias fotosintéticas mediante hidrogenación bidireccional, la fijación de nitrógeno (N₂) por cianobacterias y la fijación de nitrógeno por bacterias fotosintéticas no oxigénicas (Wu et al., 2012). Es este último proceso anaeróbico el que presenta un mayor interés, donde, concretamente se destaca la producción de H₂ mediada por las bacterias fotofermentadoras púrpuras no del azufre (*purple non sulfur bacteria* - PNS). Durante este proceso, la enzima más relevante es la nitrogenasa, atribuyéndose casi por completo la producción de H₂ a la acción de esta enzima. En ambientes anaeróbicos y saturados de nitrógeno (N₂), la nitrogenasa fija el N₂ produciendo amoníaco (NH₃) (Reacción 1), con una producción residual de H₂ (Koku, Erolu, Gunduz, Yucel, & Turker, 2002).



Sin embargo, en un ambiente anaeróbico con limitación de nitrógeno y en condiciones de luz, la nitrogenasa contribuye a la formación de H₂ de forma no específica (Reacción 2).



Ambos procesos, tienen lugar favorablemente bajo iluminación, donde la nitrogenasa presenta una mayor actividad (Akkerman, Janssen, Rocha, & Wij, 2002), lo que del mismo modo favorece al metabolismo fotoheterótrofo de estas bacterias, convirtiendo substratos orgánicos como ácidos grasos en H₂ y dióxido de carbono (CO₂) (Azwar et al., 2014).

En cambio, es durante la fermentación oscura cuando tiene lugar la conversión de compuestos orgánicos a hidrógeno sin la necesidad de luz. Se lleva a cabo en ausencia de oxígeno (O₂) y es importante el papel de la enzima hidrogenasa (Azwar et al., 2014), ya que el H₂ actúa como inhibidor de su propia síntesis (Levin, Pitt, & Love, 2004). Este proceso tiene lugar en varias etapas complejas. La primera etapa incluye la hidrólisis enzimática de compuestos orgánicos complejos (carbohidratos, proteínas y lípidos) en compuestos simples solubles en agua (azúcares, aminoácidos y ácidos grasos). Y en la segunda se obtienen ácidos grasos volátiles, H₂ y CO₂ (Azwar, Hussain, & Abdul-Wahab, 2014).

Los principales problemas del uso de la fermentación oscura es su baja producción de H₂, ya que por 1 mol de glucosa se obtiene 3,96 mol de H₂ (Sağır, Yucel, & Hallenbeck, 2018), además de la síntesis, al mismo tiempo, de ácidos orgánicos (p.ej. metano, acetato y propionato) y CO₂ (Singh & Wahid, 2015), mientras que la fotofermentación da una vida útil a estos ácidos orgánicos (Azwar et al., 2014).

Por lo tanto, la mejor solución para obtener una mayor producción de H₂ es realizar los dos procesos antes mencionados (fotofermentación y fermentación oscura; Figura 1) de forma secuencial, esperando un incremento de la producción de 4 a 12 moles de H₂ por cada mol de hexosa. (Azwar et al., 2014). De esta forma las bacterias fotosintéticas aprovecharían la materia orgánica producida durante la fermentación oscura para la producción de H₂ y CO₂ (Singh & Wahid, 2015).

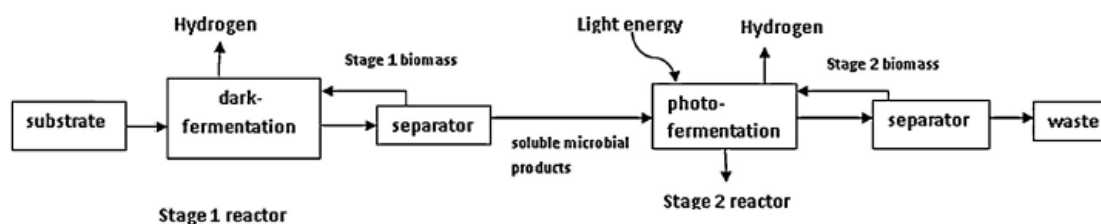


Figura 1: Esquema de la producción de H₂ en una secuencia de ciclos de fotofermentación y de fermentación oscura (Singht et al., 2015).

1.2 PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO POR BACTERIAS PÚRPURAS NO DEL AZUFRE (PNS)

Las bacterias púrpuras no del azufre (fotosintéticas no oxigénicas), como se ha comentado anteriormente, son un grupo de proteobacterias que emplean sustancias orgánicas como dadoras de electrones, H_2 y sulfuros, pero nunca azufre (S_2) elemental. La mayoría son anaeróbicas y tienden a vivir en ambientes acuáticos con bajos niveles de sulfuros. Dentro de las PNS se encuentra el grupo de las α -proteobacterias. Estas bacterias crecen en condiciones anaeróbicas y bajo exposición a la luz. Al ser bacterias fotosintéticas presentan diferentes pigmentos (carotenoides, bacterioclorofila, etc.) que les dan coloraciones características como rojo, verde y marrón (Dworking M. 2006). Su metabolismo es variado y flexible (Figura 2) aunque su modo de crecimiento preferido es el fotoorganoheterótrofo (Koku et al., 2002).

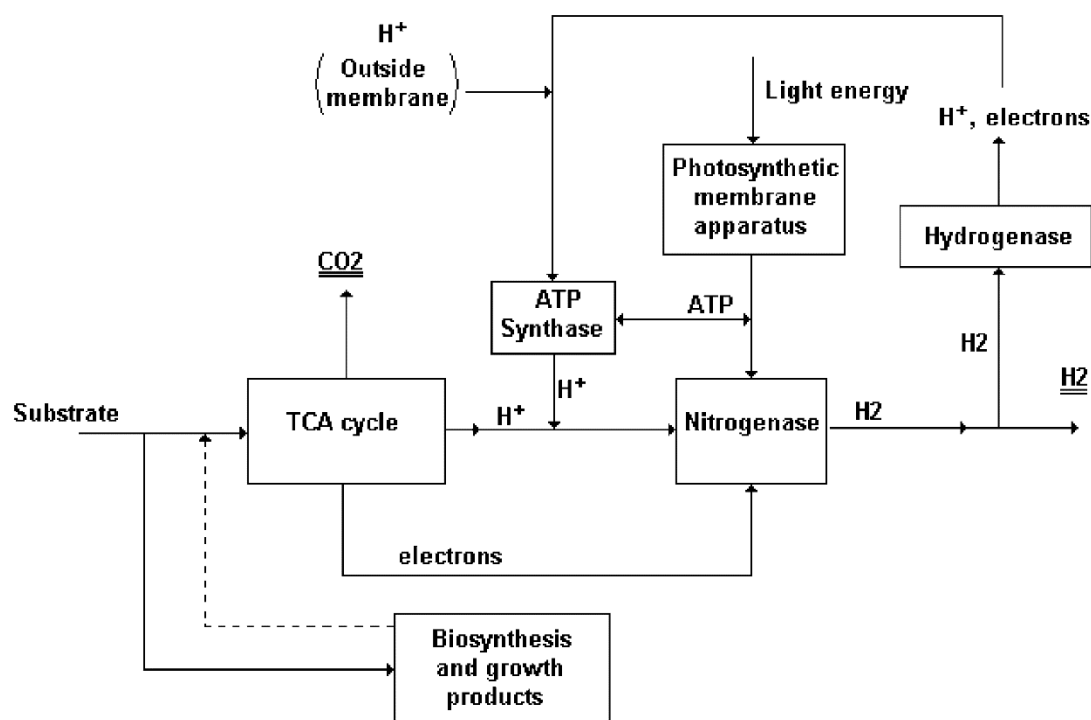


Figura 2: Esquema de las principales rutas metabólicas implicadas en la síntesis de H_2 en bacterias PNS (Koku Harum et al., 2002)

Los principales géneros dentro de las α -proteobacterias fotosintéticas son: *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* y *Rhodobacter*, los cuales al igual que *Rhodocyclus* (β -proteobacteria) son los grupos de bacterias PNS que mayor interés presentan en cuanto a la bioproducción de H_2 (Dworking M. 2006). Estas proteobacterias, que se encuentran dentro de las familias *Rhodobacteraceae* y *Bradyrhizobiaceae*, emplean diferentes ácidos orgánicos y carbohidratos como dadores de electrones para producir H_2 , siendo lactato y malato los más energéticos en el caso de *Rhodobacter sp.* (Koku et al., 2002).

A parte de las bacterias PNS, también son conocidos otros microorganismos con capacidad de producir hidrógeno, siendo los más importantes las cianobacterias y las bacterias fermentadoras como *Clostridium* sp. Las cianobacterias son capaces de producir hidrógeno mediante la bio-fotólisis del agua (Kothari, Vaughn, & Garcia-Pichel, 2013). Este proceso, pero, presenta una baja eficiencia de conversión de los fotones cuando hay poca luz (Nagarajan, Lee, Kondo, & Chang, 2017). Por otro lado, bacterias fermentadoras como *Clostridium butyricum* (fermentador anaeróbico estricto) pueden generar hidrógeno mediante fermentación oscura, aunque con un alto requerimiento de sustrato orgánico. Además, estas bacterias son muy poco tolerantes al oxígeno y a los cambios en el pH, lo que las hace difíciles de cultivar (Sanusi, Kadir, Jahim, & Anuar, 2009).

Así, los resultados más prometedores para la producción de hidrógeno mediada por microorganismos se han obtenido con las bacterias PNS fotofermentadoras comentadas anteriormente. Esto las hace buenas candidatas para ser ampliamente estudiadas y ser protagonistas de diferentes plantas piloto para la producción eficiente de biohidrógeno usando diferentes sustratos y condiciones.

Des del grupo de Ecología Microbiana Molecular (gEMM), en el que se engloba este trabajo, se pretende aplicar el conocimiento adquirido sobre estas bacterias para que puedan ser usadas para la producción de H₂ mediante electrosíntesis. Estudios anteriores del grupo demostraron que *Rhodobacter capsulatus*, al igual que *Rhodobacter* sp., emplea la corriente eléctrica de un cátodo como fuente de electrones para la síntesis de hidrógeno, llegando a producir 18.87 mmols H₂ L⁻¹ d⁻¹. Además, en este estudio, se creó un consorcio sintrófico entre *Rhodobacter* sp. y *Clostridium* sp. en el cual la segunda reducía CO₂ a ácidos orgánicos y alcoholes gracias al H₂ producido por *Rhodobacter* (Puig et al., 2017). Teniendo esto en cuenta, se espera sacar provecho del metabolismo fotoautotrófico que pueden desempeñar estas bacterias, para facilitar la producción autónoma y sostenible del H₂.

2 OBJECTIVES

In this work we specifically aimed to:

- evaluate hydrogen production in different alpha and beta-Proteobacteria, such as different strains of *Rhodobacteraceae*, *Bradyrhizobiaceae* and *Rhodocyclaceae*, incubated in batch reactors
- provide the group of Molecular Microbial Ecology with the basic tools to know better different hydrogen producing bacteria strains and to study the hydrogen production as an intermediate of the autotrophic CO₂ conversion into biofuels during electrosynthesis.

3 MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1 PROTEOBACTERIAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Para el desarrollo de este estudio se han usado seis especies bacterianas. *Rhodopseudomonas pseudopalustris* DSM 123, *Rhodocyclus tenuis* DSM 112, *Rhodobacter* sp. DSM 5864 y *Rhodobacter capsulatus* DSM 152 las cuales se obtuvieron de DSMZ (<https://dsmz.de/>). Además, se usaron dos aislados de muestras de un sistema bioelectroquímico desnitrificante identificadas como aislados C2T108.3 y C1S119.2 (Vilar-Sanz et al., 2018). Se eligieron estas cepas debido a que en anteriores experimentos de voltametría cíclica se detectó un elevado potencial para la producción de hidrógeno.

Todas ellas fueron cultivadas en medio DSM 27, el cual se usó también como medio sólido, añadiendo $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de agar (Merck®). Los cultivos sólidos se conservaron en una jarra hermética de vidrio. Las condiciones anaeróbicas se obtuvieron con un sobre AnaeroGen (Oxoid). Todos los cultivos se mantuvieron en un incubador (Sanyo, MIR-253) a 25°C y con luz constante. Todas las manipulaciones se llevaron a cabo en condiciones estrictamente anaeróbicas en una cámara de anaerobios (Coy laboratory products. Inc.).

3.2 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE H_2

Para determinar la capacidad de formación de hidrógeno mediada por estas bacterias se han usado dos aproximaciones. Para ambas aproximaciones se han medido las concentraciones de H_2 producidas durante el crecimiento de las bacterias en presencia de luz. Las bacterias usadas fueron *Rhodopseudomonas pseudopalustris* DSM 123, *Rhodobacter* sp. DSM 5864 y el aislado C1S119.2.

Para la primera aproximación, se midió la producción de H_2 analizando la composición del gas usando un cromatógrafo de gases 490 MicroGC (Agilent Technologies). Los cultivos bacterianos se prepararon en botellas de 100 mL con un volumen total de cultivo de 50 mL, dejando así una cámara de gas del mismo volumen. Para cada bacteria se prepararon tres réplicas (Figura 3). Los cultivos fueron sometidos a diferentes condiciones de producción. En un primer caso, las condiciones de cultivo fueron las mismas que para el crecimiento mientras que en otro, se modificó el medio DMS 27 eliminando todas las sales de amonio y reemplazando el acetato amónico por acetato sódico ($0,53 \text{ g/L}$ concentración final). En este segundo caso, para el mantenimiento de las condiciones anaeróbicas se sustituyó el N_2 usado para desgasificar el medio por helio (He). Se tomaron muestras de la fase gas a intervalos de tiempos distintos (24, 72 y 144 horas después del inóculo). Posteriormente al análisis se añadió N_2 o He como fuera conveniente durante unos 10 segundos a la cámara gas. Para el

control del crecimiento bacteriano se midió la absorbancia a 600nm (Espectrofotómetro – Cecil CE-1021).



Figura 3: Ejemplos de algunos de los cultivos utilizados para la cuantificación de H₂ mediante cromatografía de gases. De delante hacia atrás; Aislado C1S119.2, *Rhodospseudomonas pseudopalustris* DSM123 con control y *Rhodobacter* sp. DSM 5864.

La segunda aproximación requería del montaje de un sistema que permitiera mantener las condiciones adecuadas de crecimiento para cada bacteria y asegurar la monitorización de la síntesis de H₂ (ver Figura 4). El volumen final de cultivo fue de aproximadamente 30 mL sin dejar cámara de gas. Para el mantenimiento de la temperatura (que en este caso fue de 30°C) se usó un baño junto a un controlador de temperatura (PolyScience, Model 911) así como una lámpara con una bombilla de 21 W de potencia. Se midieron las concentraciones de H₂ en la fase líquida de cada uno de los cultivos usando un sensor de hidrógeno (H₂ microsensor – Unisense). En este caso también se usó medio DMS 27 modificado, eliminando las sales de amonio, la cisteína y la resazurina. Además, se sustituyó el acetato amónico por acetato sódico (1 g/L concentración final). Las condiciones anaeróbicas del medio se mantuvieron usando He. Las concentraciones de H₂ se midieron durante periodos de tiempo diferentes según la producción observada de cada cepa, alternando estadios con y sin iluminación.

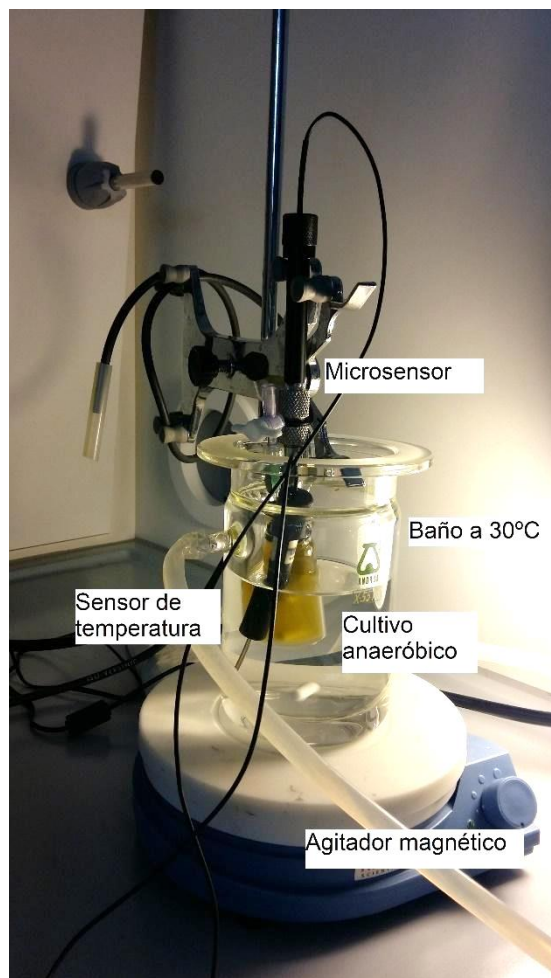


Figura 4: Esquema del montaje para el monitoreo de la producción de H_2 con biosensor.

3.3 CÁLCULOS PARA LA EXPRESIÓN DE LOS VALORES MEDIDOS DE GAS EN MM.

Los valores obtenidos durante la primera aproximación, en %, se pasaron a mmol/L de la siguiente manera:

Se normalizaron los porcentajes obtenidos para cada uno de los gases mediante la ecuación 1, siendo V_x el volumen en % correspondiente a cada gas y V_t la suma total en % de gases medidos por cada réplica.

$$N_x = \frac{V_x}{V_t} \times 100 \text{ (Ecuación 1)}$$

Se empleó la ecuación de estado de los gases para calcular el número de mmoles de hidrógeno y nitrógeno en la fase gas (ecuación 2), siendo $V_g = 0,05$ L, $R = 0,082$ atm·L/mol·K y $T = 298,15$ K.

$$N_g = \frac{P \times V_g \times \frac{N_x\%}{100}}{R \times T} \times 1000 \text{ (Ecuación 2)}$$

Del mismo modo, se empleó la Ley de los gases de Henry para calcular las respectivas concentraciones de los gases en la fase líquida (ecuación 3), siendo $V_l = 0,05$ L y las constantes de Henry a 25°C, 0,00078 mol/ atm·L para el H₂ y 0,00061 mol/atm·L para el N₂.

$$Nl = Kh \times P \times \frac{Nx}{100} \times Vl \times 1000 \text{ (Ecuación 3)}$$

Los valores en mmol resultantes de las Ecuaciones 2 y 3 se sumaron y se dividieron por el volumen en la cámara de gas, 0,05 L, para representar los valores en mM.

3.4 EXTRACCIONES DE DNA Y PCR

La extracción del DNA de todos los cultivos usados en este estudio se realizó empleando el reactivo Chelex® con las especificaciones detalladas por el fabricante. La calidad del DNA extraído se comprobó mediante su cuantificación en Nanodrop 1000 spectrophotometer (ThermoScientific). Mediante PCR convencional se amplificó un fragmento del gen 16S rRNA usando los primer 27-F y 1492-R y AmpliTaq® 360 DNA Polimerasa (Applied Biosystems™) en un volumen final de reacción de 60µL. Los pasos esenciales de la técnica se realizaron a las temperaturas habituales (55°C de temperatura de anillamiento). Para visualizar los resultados obtenidos se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1,5% usando la fuente de corriente Power Pac 300 (Bio-Rad). El marcador de peso molecular usado fue GeneRuler™ 100bp DNA ladder Plus (ThermoScientific), escogido teniendo en cuenta la medida del fragmento esperado (aproximadamente 1400 pb). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz ultravioleta. Las imágenes se capturaron con una cámara Jenoptik ProgRes C10 (Jenoptik).

3.5 CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE SOSTENIBILIDAD

Aunque si es cierto que los biocombustibles proporcionan una fuente de energía limpia, existen diferentes críticas en cuanto al empleo de grandes áreas agrícolas y productos alimentarios para su obtención. Una alternativa sostenible es la producción de estos biocombustibles mediante microorganismos, siendo un ejemplo de esto la producción de hidrógeno mediante microalgas y bacterias. El hidrógeno podría ser el sustituto clave a los carburantes actuales al no producir ningún tipo de residuo contaminante, pero para esto grandes inversiones en investigación y grandes plantas de producción serían necesarias. El uso de bacterias que pueden reutilizar residuos orgánicos y energía solar para producir estas fuentes de energía, e incluso hacerlo de forma autotrófica, abre un nuevo horizonte en la búsqueda de la producción eficiente y ecológica de energía. De este modo, se pretende obtener los mayores rangos de producción posibles sin la necesidad de manipular genéticamente estos microorganismos, dándoles las condiciones de producción más adecuadas, lo que sería poco rentable económicamente ya que la producción de hidrógeno

sería muy baja, por lo que el principal problema ético reside en el uso de microorganismos transgénicos para producir esta energía, cuya mejora genética puede acabar atentando contra la salud humana y el equilibrio medioambiental.

En cuanto al desarrollo en el laboratorio, durante este estudio se han tomado las medidas debidas para minimizar el número de residuos producidos, tanto contaminantes como materiales para así reducir el impacto sobre el medio ambiente y la salud. Estas medidas consisten en gestionar correctamente el material de laboratorio, reciclar y desechar correctamente los residuos generados y en cuanto al cultivo de las cepas estudiadas, mantener las condiciones anaeróbicas y estériles que estas necesitan. En todo caso se ha tenido en cuenta mantener la vida útil de aquellos materiales que la tengan y reducir el consumo de materiales plásticos.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS DE LA BIOPRODUCCIÓN DE H₂ MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES

En este primer experimento se ha evaluado el efecto de la presencia de nitrógeno sobre la producción de hidrógeno durante el crecimiento de *Rhodopseudomonas pseudopalustris* DSM 123, *Rhodobacter* sp. DSM 5864 y el aislado C1S119.2. Estas tres bacterias fueron escogidas basándonos en su buen rendimiento según estudios anteriores (Vilar-Sanz et al., 2018; Puig et al., 2017). Se prepararon tres réplicas de cada uno de los cultivos y se analizó la composición de los gases contenidos en la fase gas durante 150 horas de incubación. Como control se usó medio DSM27 sin inocular dónde se añadió una mezcla de gases (8% CO₂, 32% CO, 32% H₂ y 28% N₂) en la cámara de gas.

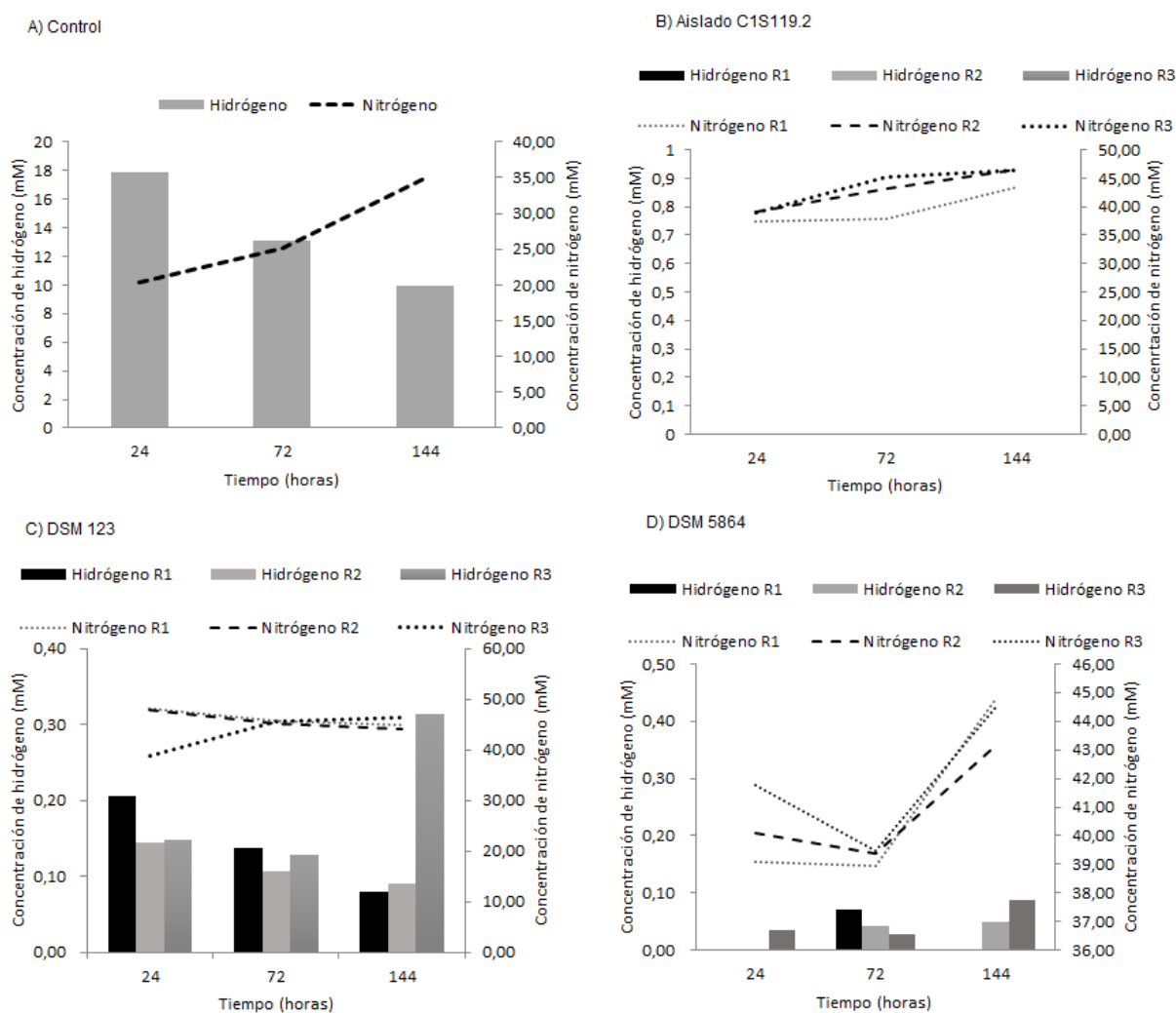


Figura 5: Producción de hidrógeno por proteobacterias bajo altas concentraciones de nitrógeno durante 24, 72 y 144h. Los resultados muestran los valores, normalizados y en mM, de H₂ (barras) y N₂ (líneas). Se muestran los datos recogidos para cada réplica, R1, R2 y R3. A) control (medio DSM27 sin inóculo). B) Aislado C1S119.2 C) *Rhodobacter* sp DSM 5864. y D) *Rhodopseudomonas pseudopalustris* DSM123.

Como se puede ver en la Figura 5A, la disminución de la concentración de H_2 va acompañada de un aumento compensatorio de la concentración de N_2 , que se fue añadiendo después de cada toma de muestra (24 y 72 horas) para controlar la sobrepresión generada durante el procedimiento experimental. Esto demuestra que no existe una pérdida de gas en las botellas, por tanto, los resultados obtenidos validan la hipótesis de que bajo altas concentraciones de nitrógeno la nitrogenasa, tiene una mayor tendencia a fijar nitrógeno para producir amoníaco y no se estimula la síntesis de hidrógeno (ver Reacciones 1 y 2 de la Introducción).

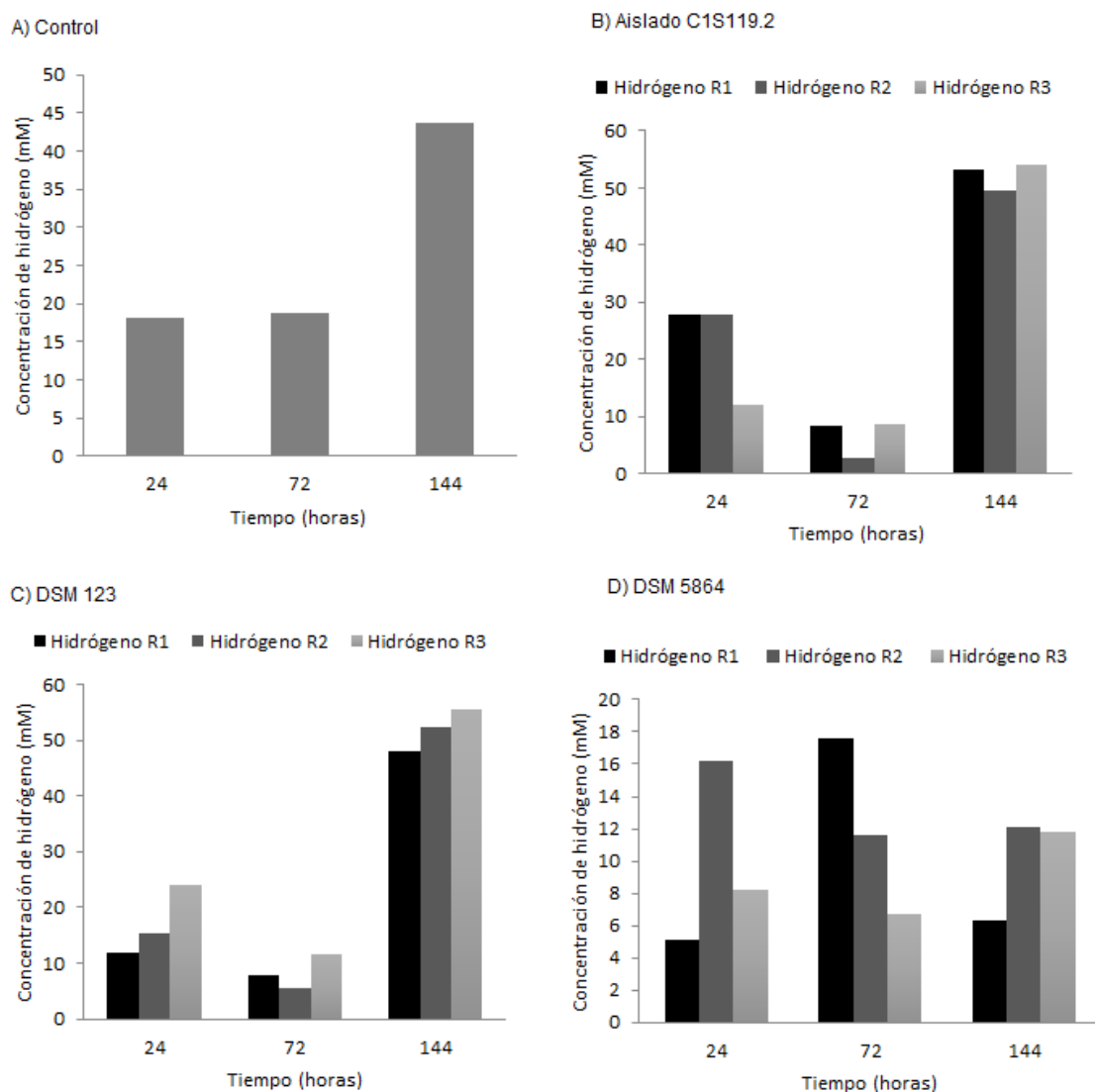


Figura 6: Producción de hidrógeno por proteobacterias bajo una atmósfera de helio, y medio DSM 27 sin cloruro de amonio y acetato de amonio durante, 24, 72 y 144h. Los resultados muestran los valores, normalizados y en mM, de H_2 recogidos para las tres réplicas de cada cultivo, R1, R2 y R3. Composición de la cámara gas en A) control (medio DSM27 sin inóculo). B) Aislado C1S119.2 C) *Rhodobacter* sp DSM 5864. y D) *Rhodospseudomonas pseudopalustris* DSM123.

Por otro lado, como se puede ver en la Figura 6, cuando el N_2 es sustituido por He, las concentraciones medidas de H_2 son mayores a las que se representan en la Figura 5. Las

concentraciones de H₂ que se detectan en el control (Figura 6A) deberían corresponderse con los porcentajes del gas que constituye la mezcla de gases usada (8% CO₂, 32% CO, 32% H₂ y 28% N₂). Sin embargo, los valores obtenidos a las 144h, siendo el porcentaje de H₂ detectado superior al introducido al inicio del estudio (58,38%), hacen poner en duda los resultados de este experimento. Si bien podría ser posible un error experimental durante la toma de muestra, los resultados no demuestran una posible contaminación atmosférica, ya que el H₂ en la atmósfera es inferior al 1% y los valores de O₂ y N₂ calculados son muy bajos, 2,55% y 19,27%, respectivamente. Al final del experimento, el control presentaba mayor turbidez, por lo que se asume contaminación microbiana, ya sea de alguna de las cepas usadas u otra desconocida. La presencia de bacterias no identificadas en el control podría ser la causante del aumento de la concentración de H₂, pudiendo encontrarse también en los otros cultivos. En cuanto a las Figuras 6B-D, se observó un descenso de la concentración de H₂ en todos los cultivos a las 72h y un aumento de este valor a las 144h, pudiendo deberse estas variaciones al consumo y producción por parte de las bacterias. Como se desconoce el momento de la contaminación, los resultados alcanzados durante esta experiencia no son considerados válidos, ya que no se puede valorar si el H₂ es realmente producido por las cepas PNS estudiadas o algún otro tipo de bacteria contaminante.

Estos experimentos se llevaron a cabo durante la fase de crecimiento, lo que se observó con un aumento de la absorbancia durante el tiempo experimental. Se detectaron pequeñas diferencias entre las bacterias usadas. Mientras *Rhodobacter sp* DSM 5864 y *Rhodopseudomonas pseudopalustris* DSM123 crecieron de manera similar, el aislado C1S119.2 alcanzó una densidad óptica (D.O.) menor que la obtenida para los dos primeros (Figuras 7 y 8). Es posible que la temperatura a la que se han cultivado las bacterias (25°C) esté afectando a su crecimiento, ya que como se ha demostrado en estudios anteriores, *Rhodobacter sp.* y *Rhodopseudomonas sp.* crecen mejor y presentan un mayor rango de producción a un rango de temperaturas de entre 30 y 35°C (Carlozzi & Lambardi, 2009) (Kobayashi, Yoshimune, Komoriya, & Kohno, 2011).

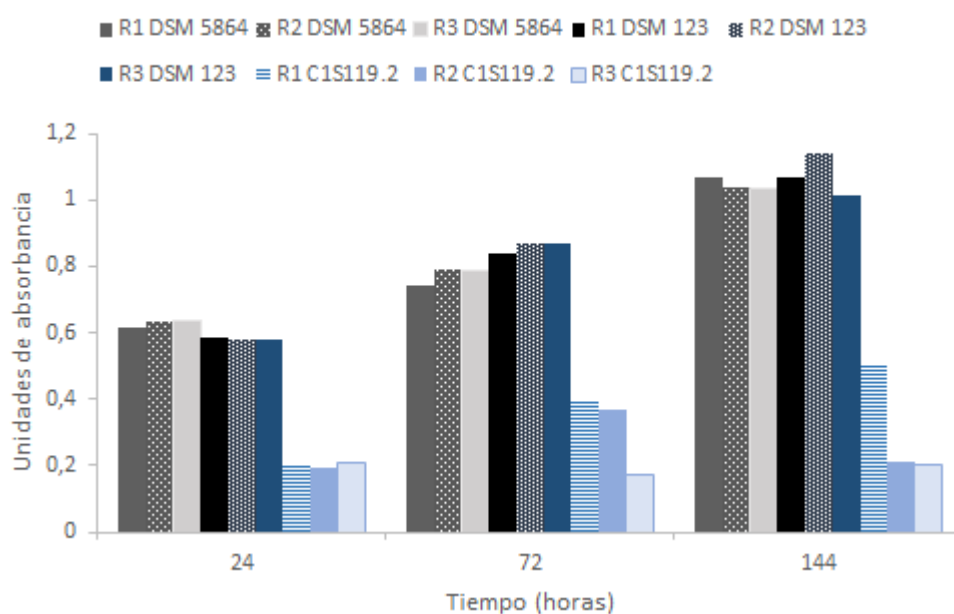


Figura 7: Absorbancia medida a una longitud de onda de 600nm de tres réplicas (R1, R2 y R3) de cepas de proteobacterias cultivadas en medio DSM27 bajo altas concentraciones de nitrógeno durante 24, 72 y 144h. *Rhodobacter* sp DSM 5864, *Rhodopseudomonas pseudopalustris* DSM 123 y el aislado C1S119.2.

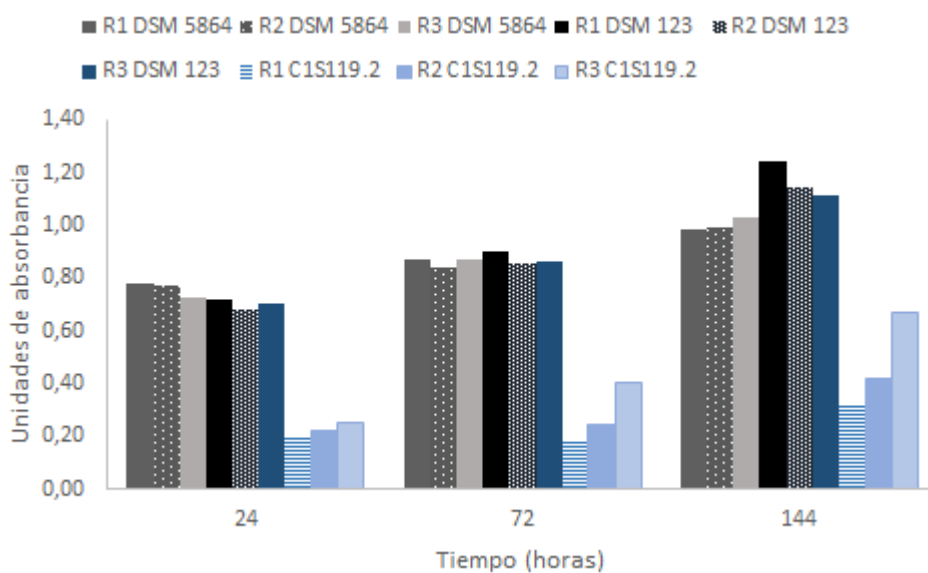


Figura 8: Absorbancia medida a una longitud de onda de 600nm de tres réplicas (R1, R2 y R3) de cepas de proteobacterias cultivadas en medio DSM27, sin acetato de amonio y cloruro de amonio, bajo una atmósfera de helio durante 24, 72 y 144h. *Rhodobacter* sp DSM 5864, *Rhodopseudomonas pseudopalustris* DSM 123 y el aislado C1S119.2.

La producción de hidrógeno en estas bacterias depende del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA). Cuando la nitrogenasa es inhibida, la actividad del ciclo TCA se ve limitada y se activan

rutas alternativas como la de síntesis de polisacáridos, lo que reduce la producción de H₂ y de energía. (Koku et al., 2002). Durante el ciclo de transporte de electrones, los protones se bombean a través de la membrana, generando un gradiente de protones a cada lado que es utilizado por la ATP-sintetasa para dar ATP. La energía generada en forma de ATP se usa para transportar electrones a una ferredoxina. En un ambiente con N₂, estos electrones son usados por la nitrogenasa para reducir N₂ a NH₃. En cambio, cuando el N₂ no está presente, la nitrogenasa usa este ATP extra y los electrones dirigidos a la ferredoxina para reducir protones a H₂ y, de este modo, los ácidos orgánicos se transforman en CO₂ y H₂ (Akkerman et al., 2002).

Se ha demostrado que el NH₃ producido por la nitrogenasa inhibe la actividad de la misma en *Rhodobacter capsulatus* y *Rhodospseudomonas palustris*, y que esta inhibición desaparece cuando éste se ha consumido. Una concentración de 10 µM de amonio puede inhibir la producción de H₂ e incluso llegar a inactivar por completo la enzima nitrogenasa cuando esta alcanza los 0,5 mM en *Rhodobacter capsulatus* (Meyer J. et al., 1978).

Además, las bacterias fotofermentadoras como *Rhodobacter* sp., pueden fijar NH₃ siguiendo la vía GS/GOGAT (Reacción 1 – Introducción; Reacciones 3 y 4) donde intervienen la glutamina sintetasa, la glutamato sintetasa y la enzima nitrogenasa.

$\text{NH}_3 + \text{glutamato} + \text{ATP} \rightarrow \text{Glutamina} + \text{ADP} + \text{P}_i$ (Reacción 3)

$\text{Glutamina} + 2\text{-oxoglutarato} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{ glutamato} + \text{NADP}^+$ (Reacción 4)

El NH₃ que se acumula durante la exposición a N₂ es empleado por la glutamina sintetasa (Reacción 3) como sustrato para producir glutamina. Experimentos previos realizados por Jones L. Benjamien y sus colaboradores (Jones & Monty, 1979) han demostrado que el efecto inhibitorio que se observa bajo atmósferas ricas en N₂, no está causado por la acumulación de NH₃, sino por el efecto de la glutamina sintetasa para la producción de glutamina y la acumulación de ésta (Reacción 3) (Jones & Monty, 1979). Mientras otros estudios justifican la baja producción de H₂ en ambientes ricos en N₂ por la afinidad que el amonio presenta ante la síntesis de la glutamina sintetasa y no de la nitrogenasa. (Zheng, Wang, & Kang, 2010). Es por esto que, en cualquier caso, para una eficiente producción de H₂ se deben evitar tanto saturaciones de N₂ gas como bajos ratios C/N en el medio.

4.2 BIOPRODUCCIÓN DE H₂ CON PERÍODOS DE LUZ Y OSCURIDAD

Para este experimento se usaron las mismas cepas que en el anterior (*Rhodospseudomonas pseudopalustris* DSM 123, *Rhodobacter* sp. DSM 5864 y el aislado C1S119.2) diferenciando entre un medio completo de crecimiento (DSM 27) y un medio de producción sin cloruro de amonio y acetato amónico (ver Materiales y Metodología). En este caso se monitoreó la

producción de H₂ durante diferentes periodos de tiempo exponiendo los cultivos a ciclos con y sin luz bajo una atmósfera de He.

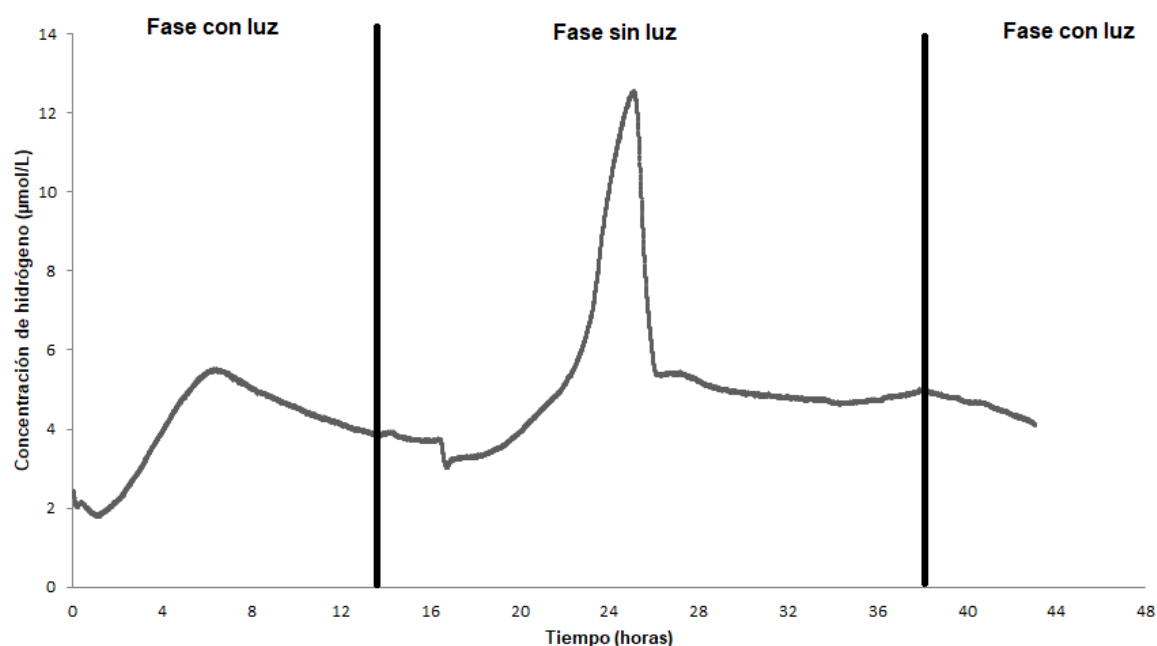


Figura 9: Cuantificación de la concentración de hidrógeno ($\mu\text{mol/L}$) en fase líquida por *Rhodopseudomonas pseudopalustris* DSM123 mediante microsensor intercalando fases con y sin luz durante 46h.

Los resultados obtenidos para *Rhodopseudomonas pseudopalustris* DSM123 demuestran que, durante el primer período con luz, esta cepa es capaz de producir H₂. Aproximadamente a las seis horas después de empezar el experimento, se llegó a una concentración máxima de 5,5 $\mu\text{mol/L}$ de H₂ (Figura 9). Este período en que se ha visto un aumento progresivo de la concentración de H₂, se relaciona directamente con la actividad de la enzima nitrogenasa. Posteriormente, se pudo ver un descenso lento de la concentración de H₂ que podría deberse al consumo de este compuesto mediado por las hidrogenasas. Este descenso y estabilización se produce a las diez horas posteriores a alcanzar la concentración máxima y abarca un período con luz y otro sin. En cambio, durante el período de ausencia de luz, se registra un aumento en la concentración de H₂ de hasta un máximo de 12,5 $\mu\text{mol/L}$. Este aumento del H₂ se relacionó con la fermentación oscura y con la actividad de las hidrogenasas. En las cuatro horas posteriores al máximo de concentración registrada, se produce un descenso rápido de la concentración de H₂, probablemente debido a que el H₂ actúa como inhibidor de su propia síntesis (Levin, Pitt, & Love, 2004). Durante las siguientes horas sin exposición a la luz, la concentración de hidrógeno se mantiene prácticamente constante. Y, finalmente, en el último período en presencia de luz, se aprecia una tendencia a la reducción de la concentración de este compuesto quizás por un agotamiento del acetato del medio.

Resultados similares se han obtenido para *Rhodobacter sp.* DSM 5864, donde la producción máxima se ha observado a las 89h durante la fase sin luz (Figura 10).

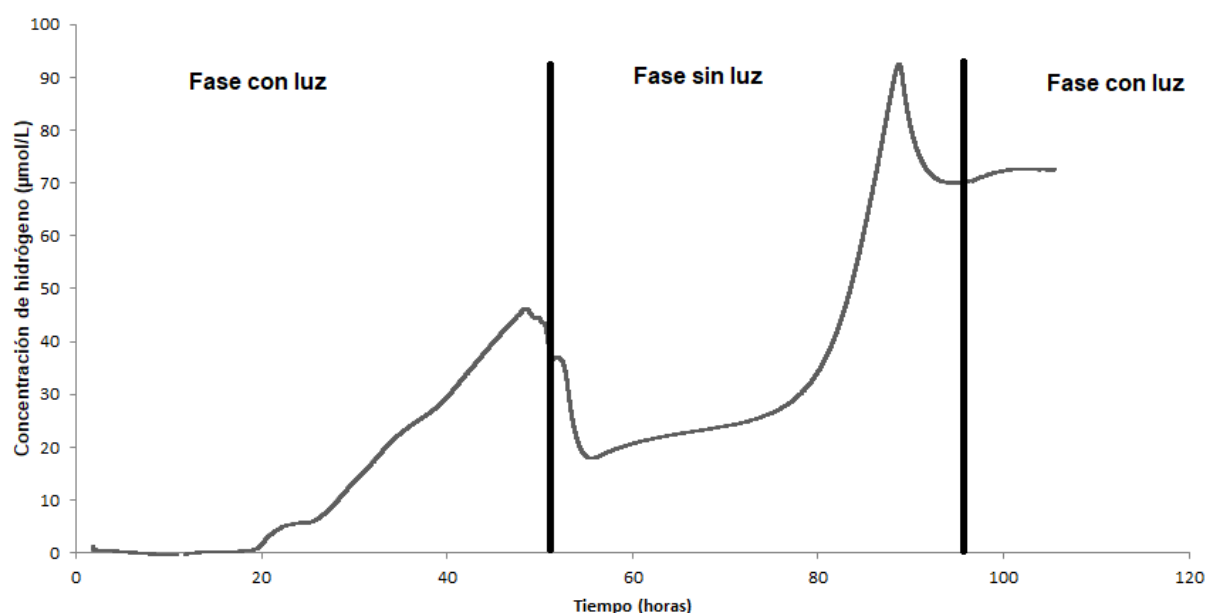


Figura 10: Cuantificación de la producción de hidrógeno ($\mu\text{mol/L}$) en fase líquida por *Rhodobacter sp.* DSM5864 mediante microsensar intercalando fases con luz y sin luz durante 105h.

En este caso se demuestra que *Rhodobacter sp.* sí produce H_2 durante la exposición a luz, llegando a una concentración de $45,63 \mu\text{mol/L}$ para las primeras 48h de exposición. Pasadas estas 48h se observó una bajada de la producción que coincide con la primera fase del estudio sin luz. Esta etapa sin luz, que se extiende de las 52 a las 96h incluye el máximo de producción de $92,48 \mu\text{mol/L}$ de hidrógeno a las 89h. La producción en la etapa sin luz se atribuye a la acción de las hidrogenasas que actúan durante la fermentación oscura. Posteriormente a este punto de inflexión se observa una rápida bajada y una estabilización de la producción, que se mantiene una vez se ha iluminado el cultivo de nuevo.

Como ya se ha comentado antes, la producción durante la etapa iluminada se debe a la acción de las nitrogenasas que producen H_2 en ausencia de N_2 (Reacción 2 - Introducción), seguidamente el descenso de la concentración de H_2 es consecuencia del consumo del H_2 por parte de las hidrogenasas, siendo estas mismas las responsables del punto máximo registrado durante la fase oscura (Eroglu & Melis, 2011). Al ser el H_2 un inhibidor de la propia hidrogenasa, después de alcanzar este pico máximo la concentración disminuye, y al exponer los cultivos de nuevo a luz, ésta disminuye o se mantiene pasando por un período de adaptación hasta que, probablemente se vuelvan a activar las nitrogenasas.

Al comparar los dos estudios, *Rhodopseudomonas pseudopalustris* (Figura 9) y *Rhodobacter sp.* (Figura 10), se observan varios aspectos en común, ambas presentan dos picos máximos de producción, uno durante la primera exposición a luz y otro durante la etapa sin luz,

conteniendo este el mayor valor registrado para las dos cepas. Por otra parte, ambas presentan una caída brusca de la concentración de H₂ tras alcanzar su máximo en la fase oscura, siendo más pronunciada en el caso de *Rhodopseudomonas pseudopalustris*, y luego alcanzan un equilibrio que coincide con la etapa final de la fase oscura y la segunda etapa de iluminación. Por lo tanto, ambas bacterias estabilizan su producción al final del experimento, siendo considerablemente mayor la concentración de hidrógeno registrada para *Rhodobacter sp.* 72,87 µmol/L, que para *Rhodopseudomonas pseudopalustris*, 4,17 µmol/L. La duración del tiempo de experimentación para cada cepa (Figuras 9 y 10) se ha observado previamente para *Rhodobacter sp.* (Sasikala, Ramana, Raghuvveer Rao, & Subrahmanyam, 1990) donde la producción se extendió durante 6 días, y para *Rhodopseudomonas sp.* donde experimentos con acetato como fuente de carbono tuvieron una duración de 150h (Carlozzi & Lambardi, 2009).

Tras la realización de este último experimento, no sé realizó el análisis correspondiente para el aislado C1S119.2 por falta de tiempo y espera realizarse tal experimento ajustando las condiciones de este a las necesidades de la bacteria.

4.3 ESTUDIO PRELIMINAR DE LA FILOGENIA DE PROTEOBACTERIAS

Como se ha comentado anteriormente (Materiales y Metodología) en este estudio se han usado seis proteobacterias diferentes. De cada una de ellas se amplificó un fragmento del gen 16S rRNA mediante PCR convencional para su posterior secuenciación. Se pudo comprobar que el gen de interés había amplificado correctamente, obteniendo una sola banda de DNA con una longitud correspondiente a la esperada (1400 pb) para cada bacteria, así como para el control positivo (Figuras 11 y 12).

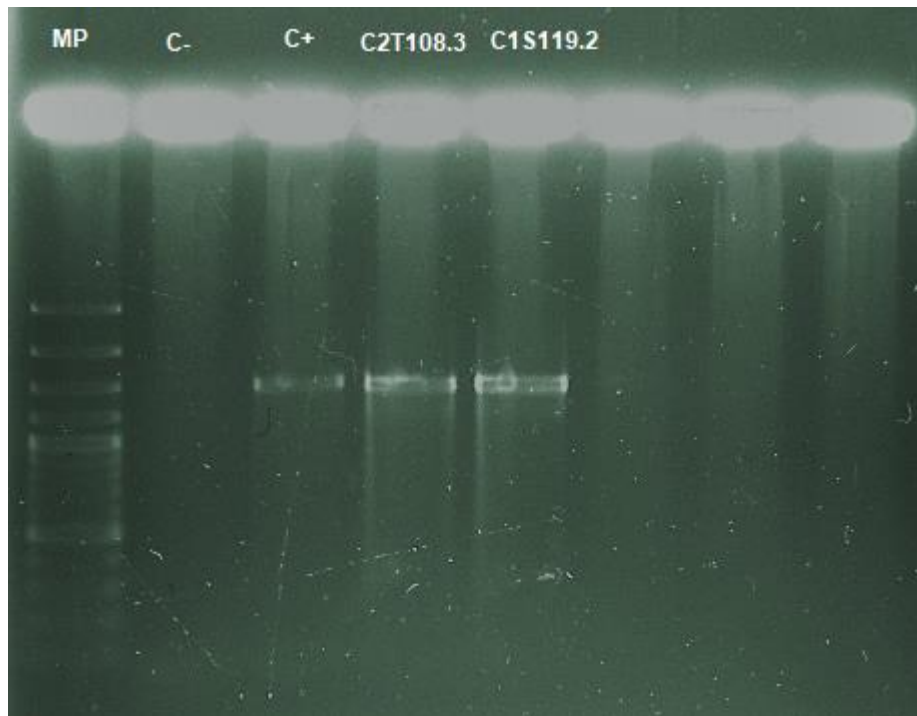


Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% del DNA amplificado por PCR para cada una de las bacterias de interés del presente proyecto. **MP**: Marcador de peso molecular GeneRuler™ 100bp DNA ladder Plus; **C-**: control negativo, **C+**: control positivo; aislados **C2T108.3** y **C1S119.2**.

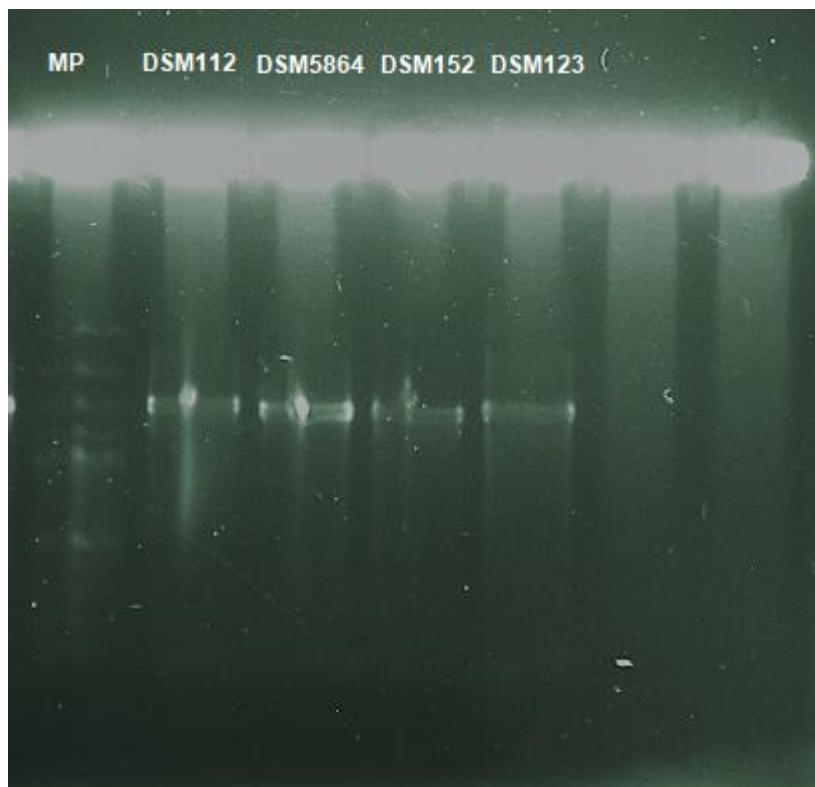


Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% del DNA amplificado por PCR para cada una de las bacterias de interés para el presente trabajo. **MP**: Marcador de peso molecular GeneRuler™ 100bp DNA ladder Plus. **DSM112**: *Rhodocyclus tenuis*, **DSM5864**: *Rhodopseudomonas pseudopalustris*, **DSM152**: *Rhodobacter capsulatus*, **DSM123**: *Rhodobacter* sp.

Por falta de tiempo la secuenciación no se ha llevado a cabo para la presentación de esta memoria. Aunque, se ha podido realizar un estudio preliminar de las relaciones filogenéticas entre las cepas usadas. Para ello, se obtuvieron secuencias parciales del gen 16S rRNA de la base de datos NCBI junto con las obtenidas en un estudio previo para los aislados C2T108.3 y C1S119.2 (Vilar-Sanz et al., 2018). Mediante la herramienta bioinformática BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) las secuencias correspondientes a cada uno de los aislados pudieron ser identificadas como *Rhodopseudomonas* sp. siendo *Rhodopseudomonas faecalis* la más parecida al aislado C2T108.3 y *Rhodopseudomonas palustris* al aislado C1S119.2 con un 99 y 100% de identidad, respectivamente.

5 CONCLUSIONS

1. Research conducted by *Rhodobacter sp.* and *Rhodopseudomonas sp.* showed that H₂ production was not detected under N₂ saturated atmosphere, probably because an inhibition of hydrogen production by nitrogenase. On the other hand, this production was detected in N₂ limiting conditions.
2. Hydrogen production was verified under illuminated and dark conditions, with maximum H₂ concentration values during dark phase. H₂ production in *Rhodobacter sp.* was higher than in *Rhodopseudomonas pseudopalustris*.
3. Providing the obtained results, we cannot classify the tested species in terms of specific H₂ production due to differences in the dark/light periods and the initial biomass. Additional experiments controlling these variables are to be performed in the near future.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Akkerman, I., Janssen, M., Rocha, J., & Wij, H. (2002). Photobiological hydrogen production : photochemical efficiency and bioreactor design. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1195–1208.
- Azwar, M. Y., Hussain, M. A., & Abdul-Wahab, A. K. (2014). Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 31, 158–173. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.11.022>
- Burroughs, N. J., Boehm, M., Eckert, C., Mastroianni, G., Spence, E. M., Yu, J., ... Bryan, S. J. (2014). Solar powered biohydrogen production requires specific localization of the hydrogenase. *Energy Environ. Sci.*, 7(11), 3791–3800. <https://doi.org/10.1039/C4EE02502D>
- Butler, L. O. (1970). Short Communications. *Microbiology*, 61(1), 137–140. <https://doi.org/10.1099/00221287-61-1-137>
- Carlozzi, P., & Lambardi, M. (2009). Fed-batch operation for bio-H₂ production by *Rhodospseudomonas palustris* (strain 42OL). *Renewable Energy*, 34(12), 2577–2584. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2009.04.016>
- Dworking, M. (Ed.). (2006). *The prokaryotes. A handbook of biology of bacteria. Proteobacteria: alpha and beta subclasses*. New York, USA: Springer
- Eroglu, E., & Melis, A. (2011). Photobiological hydrogen production: Recent advances and state of the art. *Bioresource Technology*, 102(18), 8403–8413. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.026>
- Hu, Y., Corbett, M. C., Fay, A. W., Webber, J. a, Hodgson, K. O., Hedman, B., & Ribbe, M. W. (2006). Nitrogenase Fe protein: A molybdate/homocitrate insertase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46), 17125–17130. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602651103>
- Jones, B. L., & Monty, K. J. (1979). Glutamine as a feedback inhibitor of the *Rhodospseudomonas sphaeroides* nitrogenase system. *Journal of Bacteriology*, 139(3), 1007–1013.
- Koku, H., Erolu, I., Gunduz, U., Yucel, M., & Turker, L. (2002). Aspect of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Int J Hydrogen Energy*, 27, 1315–1329. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00127-1](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00127-1)

- Kothari, A., Vaughn, M., & Garcia-Pichel, F. (2013). Comparative genomic analyses of the cyanobacterium, *Lyngbya aestuarii* BL J, a powerful hydrogen producer. *Frontiers in Microbiology*, 4(DEC), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00363>
- Levin, D. B., Pitt, L., & Love, M. (2004). Biohydrogen production: Prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(2), 173–185. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(03\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(03)00094-6)
- Nagarajan, D., Lee, D. J., Kondo, A., & Chang, J. S. (2017). Recent insights into biohydrogen production by microalgae – From biophotolysis to dark fermentation. *Bioresource Technology*, 227(1), 373–387. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.104>
- Puig, S., Ganigué, R., Batlle-Vilanova, P., Balaguer, M. D., Bañeras, L., & Colprim, J. (2017). Tracking bio-hydrogen-mediated production of commodity chemicals from carbon dioxide and renewable electricity. *Bioresource Technology*, 228, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.035>
- Reuter, W., & Wehrmeyer, W. (1988). Microbiology 9. *Archives of Microbiology*, (t 988), 534–540.
- Azwar, M. Y., Hussain, M. A., & Abdul-Wahab, A. K. (2014). Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 31, 158–173. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.11.022>
- Sağır, E., Yucel, M., & Hallenbeck, P. C. (2018). Demonstration and optimization of sequential microaerobic dark- and photo-fermentation biohydrogen production by immobilized *Rhodobacter capsulatus* JP91. *Bioresource Technology*, 250(October 2017), 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.018>
- Sakurai, H., Masukawa, H., Kitashima, M., & Inoue, K. (2013). Photobiological hydrogen production: Bioenergetics and challenges for its practical application. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 17, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2013.05.001>
- Sanusi, M., Kadir, C., Jahim, J., & Anuar, N. (2009). Biohydrogen Production by Local Isolate of *Clostridium butyricum*: Initial Nutrients Optimization Study. *Analysis*, 17(February 2008), 381–388.
- Sasikala, K., Ramana, C. V., Raghuvver Rao, P., & Subrahmanyam, M. (1990). Photoproduction of hydrogen, nitrogenase and hydrogenase activities of free and immobilized whole cells of *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. *FEMS Microbiology Letters*, 72(1–2), 23–28. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(90\)90338-Q](https://doi.org/10.1016/0378-1097(90)90338-Q)

- Singh, L., & Wahid, Z. A. (2015). Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21, 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.05.035>
- Vilar-Sanz, A., Pous, N., Puig, S., Balaguer, M. D., Colprim, J., & Bañeras, L. (2018). Denitrifying nirK-containing alphaproteobacteria exhibit different electrode driven nitrite reduction capacities. *Bioelectrochemistry*, 121, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.01.007>
- Wu, S. C., Lu, P. F., Lin, Y. C., Chen, P. C., & Lee, C. M. (2012). Bio-hydrogen production enhancement by co-cultivating *Rhodospseudomonas palustris* WP3-5 and *Anabaena* sp. CH3. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(3), 2231–2238. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.10.066>
- Zheng, G. H., Wang, L., & Kang, Z. H. (2010). Feasibility of biohydrogen production from tofu wastewater with glutamine auxotrophic mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *Renewable Energy*, 35(12), 2910–2913. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2010.04.030>

