



Famílies bacterianes comunes en els biofilms catòdics de quatre diferents sistemes bioelectroquímics

Estudiant: Albert Ferrer Ayats

Correu electrònic: albert.ferrer.ayats@gmail.com

Grau en Biotecnologia

Tutor: Eduard Bardaji Rodríguez

Cotutor: Lluís Bañeras Vives

Empresa/Institució: Universitat de Girona

Vistiplau del tutor (i cotutor, si escau):

Eduard Bardaji

Eduard.bardaji@udg.edu

Lluís Bañeras

Lluís.banyeras@udg.edu

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

RESUM

Els sistemes bioelectroquímics (BES) són un gran ventall de reactors que aprofiten el metabolisme de reducció-oxidació dels microorganismes per a sintetitzar o degradar compostos a una escala superior a la cel·lular. Així a escales experimentals, pilot o industrials els BES faciliten operacions de bioremediació, dessalinització, producció d'energia sostenible, síntesi orgànica o síntesi de biocombustibles. L'evident versatilitat d'aquests sistemes ha despertat, sobretot en l'última dècada, l'interès de la comunitat científica.

Les variants de BES capaces de sintetitzar compostos d'alt valor en el procés anomenat *Microbial Electrosynthesis* (MES) han aparegut recentment. Als reactors de MES, a diferència d'altres especialitzats en degradació, els hi és indispensable la presència d'un biofilm catalitzador de la reducció dels compostos sintetitzats. Aquesta reducció té lloc al càtode: en MES específicament parlem sempre de biocàtode.

Els biofilms dels biocàtodes són determinants en l'eficiència i productivitat de MES. Idealment les poblacions han de ser capaces de captar els electrons del càtode i reduir els compostos, és a dir, han de presentar electrotrofia. A la pràctica l'ecosistema bacterià de MES és canviant com qualsevol altre i no sempre selectiu per les espècies electròtrofes, de manera que aquesta inestabilitat del biofilm pot tenir conseqüències dramàtiques en l'eficiència del sistema. Per a encarar aquesta problemàtica, el treball present busca microorganismes potencialment electròtrofs amb una alta adaptabilitat a diferents tractaments del càtode, per a així determinar quins bacteris podrien ser més resistents a canvis a l'ambient catòdic.

S'han recuperat dades de seqüenciació del gen 16S rRNA des de quatre articles diferents; cada un amb un tractament diferenciat sobre el biocàtode: collita activa d'energia, addició de ferro iònic, reducció de p-nitrofenols i declorinació de tetracloroetilè. Després del processament i anàlisi taxonòmic amb RStudio s'han determinat tres famílies bacterianes (*Pseudomonadaceae*, *Porphyromonadaceae* i *Microbacteriaceae*) abundants i presents en com a mínim una mostra dels quatre experiments, fet que denota la seva adaptabilitat als diferents ambients catòdics. Es té constància que espècies com *P. aeruginosa* dins la família *Pseudomonadaceae* presenten activitat electròtrofa la qual la posiciona com a bona candidata per introduir-se en sistemes MES. Tot i així, no s'han pogut determinar més candidates per la profunditat de l'anàlisi taxonòmic realitzat. A més calen posteriors estudis per a confirmar l'electrotrofia dels bacteris dins les dues famílies seleccionades restants (*Porphyromonadaceae* i *Microbacteriaceae*).

RESUMEN

Los sistemas bioelectroquímicos (BES) son una gran variedad de reactores que aprovechan el metabolismo de reducción-oxidación de los microorganismos para sintetizar o degradar compuestos en una escala superior a la escala celular. Así a niveles experimentales, piloto o industriales los BES facilitan operaciones de bioremediación, desalinización, producción de energía sostenible, síntesis orgánica o síntesis de biocombustibles. La evidente versatilidad de estos sistemas ha despertado, sobretodo en la última década, el interés de la comunidad científica.

Las variantes de BES capaces de sintetizar compuestos de alto valor en el proceso llamado *Microbial Electrosynthesis* (MES) han aparecido recientemente. Los reactores de MES, a diferencia de otros especializados en degradación de compuestos, requieren para funcionar un biofilm catalizador de la reducción de los compuestos sintetizados. Esta reducción tiene lugar en el cátodo: en MES particularmente se trata siempre de un biocátodo.

Estos biofilms en los biocátodos son determinantes para la eficiencia y productividad de los sistemas MES. Idealmente las poblaciones deben ser capaces de recolectar los electrones del cátodo y reducir los compuestos, es decir, las poblaciones deben presentar electrotrofía. En la práctica el ecosistema bacteriano de MES es variable y no siempre selectivo para las especies electrótrofas, de forma que esta inestabilidad del biofilm puede tener consecuencias dramáticas en la eficiencia del sistema. Para afrontar estos problemas, el trabajo presente busca microorganismos potencialmente electrótrofos con alta adaptabilidad a diferentes tratamientos del cátodo, para determinar así qué bacterias pueden ser más resistentes a los cambios en el ambiente catódico.

Se han aprovechado datos de secuenciación del gen 16S rRNA desde cuatro artículos diferentes; cada uno con un diferente tratamiento sobre el biocátodo: cosecha activa de energía, adición de hierro iónico, reducción de p-nitrofenol y declorinación de tetracloroetileno. Tras el procesamiento y análisis taxonómico con RStudio se han determinado tres familias bacterianas (*Pseudomonadaceae*, *Porphyromonadaceae* y *Microbacteriaceae*) abundantes y presentes en al menos una muestra de los cuatro experimentos, lo que denota su adaptabilidad a diferentes ambientes catódicos. Se conocen especies como *P. aeruginosa* en la familia *Pseudomonadaceae* que presentan actividad electrótrofa, hecho que las posiciona muy buenas candidatas para introducirse en sistemas MES. Sin embargo, no se han podido determinar más candidatas por la profundidad del análisis taxonómico realizado. Además, se necesitan estudios complementarios para confirmar la electrotrofía de las bacterias dentro de las dos familias seleccionadas restantes (*Porphyromonadaceae* y *Microbacteriaceae*).

ABSTRACT

Bioelectrochemical systems (BES) are a wide range of unique reactors. They are able to utilize the reduction-oxidation metabolism of microorganisms for the synthesis or degradation of compounds at an experimental, pilot or industrial scales. In that way BESs hold as many different processes as bioremediation, desalination, sustainable energy production, organic synthesis or biofuel synthesis among others. BES's potential of action has awoken, especially in the last decade, much interest among the scientific community specialized in the fields mentioned above.

Recently, there has been a boom in the varieties of BES capable of synthesizing high-value compounds in a process named Microbial Electrosynthesis (MES). Inside MES reactors, biofilms catalysing the reduction of the produced compounds are an essential requisite. This reduction takes place on the cathode. In MES specifically this cathode is biological so it is referred as biocathode.

Biofilms inhabiting the biocathodes are key to the efficiency and productivity of MES systems. Ideally, these bacterial populations should be able to transfer the electrons coming from the cathode directly to the compounds being produced, hence, the biofilms should manifest electrotrophic activity. The actual situation is that the bacterial ecosystem on the cathode is unstable and susceptible to changes in its environment, and in addition not all species inhabiting this cathode are electrotrophs. Therefore, these changes in the biofilm composition can dramatically damage the efficiency of the system. In search of solutions to this problem, the present work intends to find potentially electrotrophic microorganisms with high adaptability to different cathode treatments, in order to determine which bacteria are more resistant to changes in the cathode environment.

Sequencing data of the 16S rRNA gene have been extracted from four different articles. Each article applied a different treatment on the biocathode: active energy harvesting, addition of ferric iron, reduction of p-nitrophenol and dechlorination of tetrachlorethylene. After the processing and the taxonomic analysis with Rstudio, three bacterial families have been determined (*Pseudomonadaceae*, *Porphyromonadaceae* and *Microbacteriaceae*), all of them abundant and present in at least one sample of the four experiments, which denotes their adaptability to different cathode environments. Moreover, there are known species such as *P. aeruginosa* in the *Pseudomonadaceae* family that manifest electrotrophic activity, which makes them good candidates to be introduced into MES systems. However, it has not been possible to determine more candidates because of the depth of the taxonomic analysis carried out. In addition, complementary studies are needed to confirm the electrotrophy of the bacteria within the two remaining selected families (*Porphyromonadaceae* and *Microbacteriaceae*).

ÍNDEX

1. Introducció	2
1.1. <i>Sistemes bioelectroquímics</i>	2
1.2. <i>Electrotrofia i transferència d'electrons</i>	5
2. Aim	6
3. Metodologia	7
3.1. <i>Recerca bibliogràfica</i>	7
3.2. <i>Articles seleccionats</i>	7
3.3. <i>Descàrrega de seqüències nucleotídiques</i>	9
3.4. <i>Anàlisi de les seqüències nucleotídiques</i>	9
3.5. <i>Criteris ètics i de sostenibilitat</i>	11
4. Resultats i discussió	12
4.1. <i>Anàlisi inicial de les seqüències i filtrat</i>	12
4.2. <i>Anàlisi taxonòmica</i>	15
4.3. <i>Anàlisi de diversitat alfa i discussió</i>	20
5. Conclusions	22
6. Bibliografia	22

1. Introducció

1.1. Sistemes bioelectroquímics

Els sistemes bioelectroquímics (BES) estan constituïts per reactors especialitzats en la transformació de l'energia química a energia elèctrica i a la inversa (Bajracharya et al., 2016). Són sistemes efectors de reaccions redox, és a dir, consten d'un ànode oxidant acceptor d'electrons i d'un càtode reductor donador d'electrons. La particularitat més interessant dels sistemes BES és la presència de biofilms que catalitzen la transferència d'electrons en l'ànode o el càtode o ambdós. Els BES han guanyat popularitat en l'última dècada en diferents camps de recerca passant per les energies renovables o la síntesi orgànica (Tremblay & Zhang, 2015). Segons les dades de Scopus (www.scopus.com), el nombre de publicacions relacionades amb els BES ha augmentat considerablement en els darrers anys. Als anys 90 no es publicaven més de 20 articles anuals sobre BES, als anys 2000 no es superaven els 100 articles i en canvi es publiquen 403 articles al 2010, 624 articles al 2013 i 838 l'any 2018. Aquest increment en l'interès està relacionat amb la cerca d'alternatives experimentals als combustibles fòssils en el context de la recerca per mitigar els efectes del canvi climàtic i l'escalfament global (Zhen, Kobayashi, Lu, & Xu, 2015). De fet els sistemes bioelectroquímics ofereixen aplicacions en producció d'energia sostenible, tractament d'aigües residuals o bioremediació i en síntesi de biocombustibles o compostos orgànics d'alt valor econòmic o energètic com per exemple l'àcid acètic. El terme BES és ampli ja que engloba, principalment, les Microbial Fuel Cells (MFC) i les Microbial Electrolysis Cells (MEC) entre d'altres variants que es mostren a la *Figura 1*.

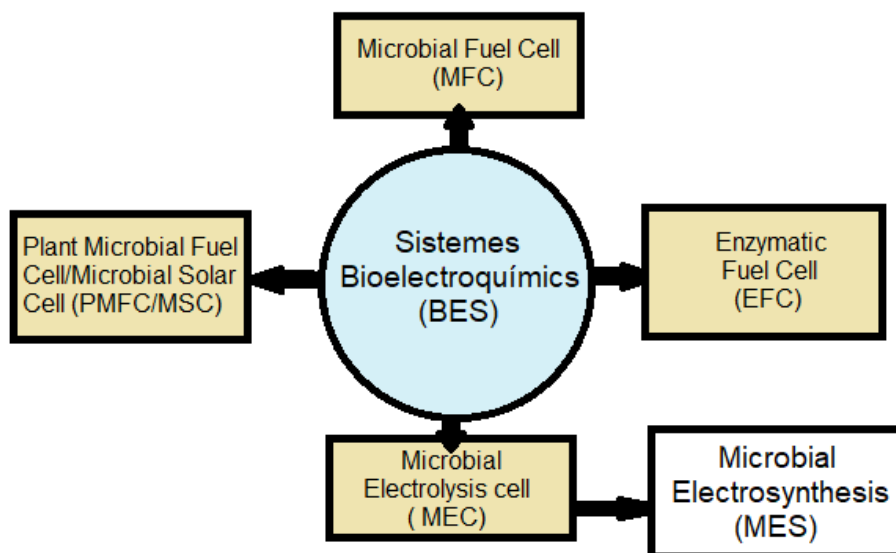


Figura 1. Esquema simplificat dels diferents tipus de sistemes bioelectroquímics. Adaptat de l'article de Bajracharya et al. del 2016.

Les cel·les microbianes de combustible o Microbial Fuel Cells (MFC) van ser els primers sistemes bioelectroquímics en desenvolupar-se. En sorgir-ne les variants com la Microbial Electrolysis Cell (MEC) i la Microbial Electrosynthesis (MES) es va creure convenient englobar-los tots en un terme comú, BES, donades les similituds operatives

i de construcció. Les MFC s'estenen notablement durant la dècada dels 2000 tot i que la primera la desenvolupa M.C. Potter l'any 1911 (Potter, 1911). Així doncs una MFC és un sistema que genera electricitat a partir de l'oxidació microbiana de matèria orgànica al compartiment de l'ànode. La degradació d'aquest substrat orgànic genera diòxid de carboni i protons que viatjaran selectivament fins al càtode. Els dos compartiments, ànode i càtode, es troben separats per una membrana selectiva catiònica (Proton Exchange Membrane, PEM). El protons que arriben al càtode contribueixen a mantenir l'electroneutralitat del sistema. Per altra banda, al compartiment del càtode els electrons provinents de l'ànode reduiran els protons i l'oxigen per a obtenir aigua, ja que aquest medi catòdic és aeròbic a diferència del compartiment de l'ànode que és anaeròbic.

La cel·la microbiana de combustible és una tecnologia energètica interessant pel fet d'operar en condicions ambientals suaus i per la gran varietat de compostos que es poden usar com a substrats. Idealment, i en aquesta característica rau l'elevat interès científic per la tecnologia com a tècnica alternativa per a la generació d'energies netes, qualsevol substrat oxidable és susceptible de ser usat per generar energia. Els estudis actuals apunten a una possible actuació sobre diferents tipus d'aigües residuals, explorant la capacitat dels sistemes de generar energia i alhora efectuant una bioremediació efectiva (D. Liu, Zhang, Chen, Buisman, & Ter Heijne, 2016).

D'altra banda les cel·les microbianes de dessalinització (MDC) són destacables dins les variants de MFC, permeten la dessalinització d'aigua *in situ* aprofitant el potencial generat pel mateix sistema (Luo, Xu, Roane, Jenkins, & Ren, 2012). Tot i això la tecnologia MFC encara presenta algunes limitacions, com les baixes potències i baixes densitats de corrent generades, a més del cost elevat de les membranes i els catalitzadors metàl·lics, com per exemple el platí, fan que la tecnologia no hagi estat utilitzada a gran escala de forma rendible. La Figura 2 és un esquema del funcionament d'una MFC.

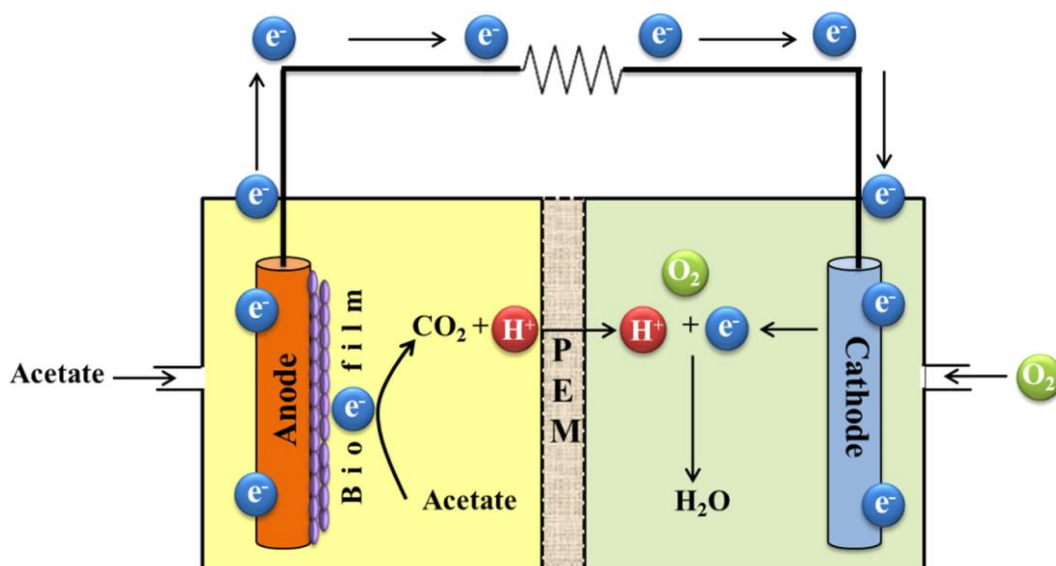


Figura 2. Diagrama del funcionament general d'una MFC (Elmekawy, Hegab, Vanbroekhoven, & Pant, 2014).

Una altra vessant dels BES són les cel·les microbianes d'electròlisi o Microbial Electrolysis Cells (MEC). Aquests sistemes necessiten l'aplicació d'un corrent extern, generalment constant, a diferència de les MFC. En les MEC el compartiment del càtode es manté anaeròbic, i possibilita la síntesi d'hidrogen gas o altres compostos d'alt valor energètic. La producció d'H₂ es genera a partir dels protons que es generen a l'ànode i que són transportats al càtode. En els casos abiòtics, els protons provenen de l'electròlisi de l'aigua al compartiment de l'ànode (Jeremiassse, Hamelers, & Buisman, 2010). En les MEC, l'objectiu és estabilitzar l'energia elèctrica en un compost emmagatzemable, l'hidrogen. D'altra banda, en els sistemes biològics, tant en les MEC com en les MFC s'allibera diòxid de carboni per la degradació de matèria orgànica en el compartiment de l'ànode. A grans termes les MEC permeten re-valoritzar l'energia elèctrica en treball útil, així es poden aconseguir eficiències més altes en el tractament d'aigües residuals que en una MFC i a la vegada sintetitzar compostos específics que necessiten forçosament el voltatge extern. La Figura 3 mostra el diagrama general d'una MEC.

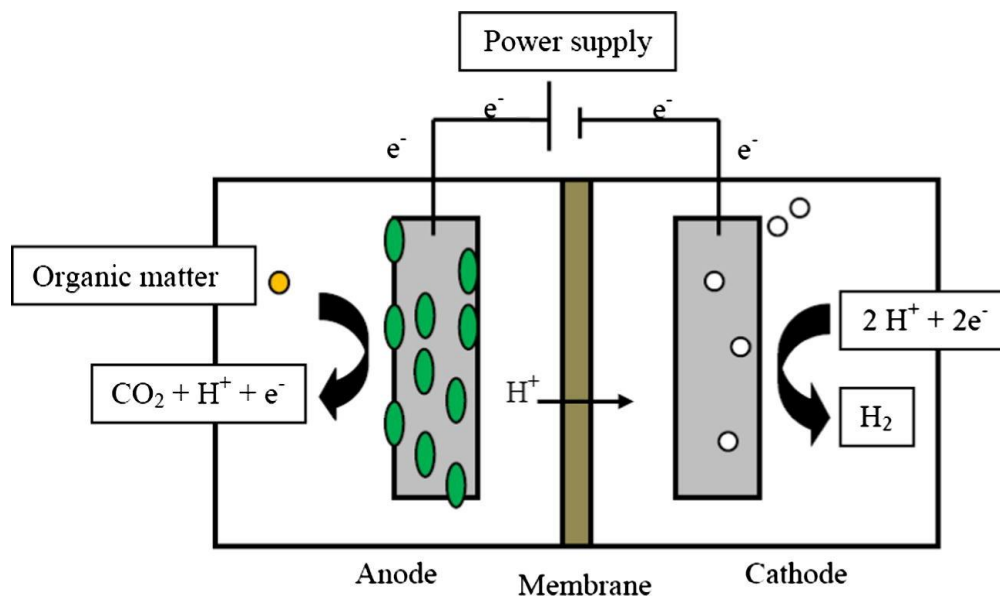


Figura 3. Diagrama del funcionament general d'una MEC (Kadier et al., 2016).

La bioelectrosíntesi o electrosíntesi microbiana (MES) és considerada una variant de la MEC (Figura 1). La tecnologia ha sorgit en els últims anys i ha despertat molt interès entre els científics ja que permet aprofitar el poder reductor generat a l'ànode per reduir matèria orgànica o CO₂ al càtode. D'aquesta forma les MES produeixen compostos orgànics amb valor afegit; productes com metà, acetat, etanol, butirat entre altres (Nevin, Woodard, Franks, Summers, & Lovley, 2010). La MES es diferencia de la MEC i la MFC en què el càtode necessita un biocatalitzador (biocàtode) mentre que MEC i MFC poden funcionar amb un bioànode i un càtode catalitzat per metall. Tot i això l'alt cost

d'aquests catalitzadors (ex. platí) també porta a la recerca de biocàtodes aplicables a MFC.

En les MES s'ha de facilitar l'adhesió del biofilm al biocàtode i és comú incrementar la superfície de contacte d'aquest per a maximitzar-ne l'eficiència. Això s'aconsegueix utilitzant micro/nanoestructures al càtode que faciliten l'adhesió dels microorganismes (Zhao, Zhang, Quan, & Zhao, 2016). El càtode pot estar format generalment d'acer inoxidable, tela de carboni, paper de carboni, feltre de grafit, grànuls de grafit o altres materials que es troben actualment en desenvolupament. En qualsevol cas, els components de carboni són els preferibles actualment en la majoria d'aplicacions. Paral·lelament al material del càtode la composició microbiana del biofilm també és determinant en MES (Rabaey & Rozendal, 2010). Aquesta comunitat és variable i susceptible a canvis en relació a les condicions del sistema. Per a fins productives interessa una alta especificitat i estabilitat de les poblacions de bacteris electrotròfics (Nevin et al., 2011). El terme electrotròfic engloba aquells microorganismes que són capaços de captar els electrons del càtode i transformar aquesta energia (juntament amb els protons que migren des de l'ànode) en energia metabòlica. Així l'estabilitat del biofilm convé que es mantingui, és a dir, que l'ecosistema del biocàtode no variï durant el procés de producció ja que d'aquest biofilm depèn l'eficiència de la síntesi i el tipus de compostos sintetitzats. En aquest camp cal molt d'estudi encara per a solucionar aquestes irregularitats de la MES.

1.2. Electrotròfia i transferència d'electrons

El desenvolupament de microorganismes electrotròfics i el seu manteniment és cabdal per un bon funcionament del biocàtode ja que són aquests els principals efectors de la reducció dels compostos simples com CO₂ a compostos multicarbònics. Tot i que els mecanismes de transferència externa d'electrons (EET) en els electròtrofs del càtode es coneixen poc en relació a la transferència existent a l'ànode (Lu, Xing, & Ren, 2012), en biocàtodes hi ha evidències de transferència directa i transferència mediada d'electrons. Es classifiquen a la *Taula 1*.

Taula 1. Mecanismes de transferència externa d'electrons (EET) en el biocàtode. Acrònims: MV methyl viologen, AQDS antraquinona-2,6-disulfonat, NR neutral red, PQQ pirroloquinolin quinona.

	Mecanisme	Exemple electròtrof
Transferència d'electrons directa	Citocroms Tipus C	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
	Citocrom Tipus C + Hidrogenases	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>
	Fotosistemes bacterians	<i>Heliobacteria</i>
	Altres oxidoreductases (Omp, laccases, etc.)	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>

Transferència d'electrons mediada	Mediadors artificials (MV, AQDS, NR)	<i>Clostridium beijerinckii</i>
	Mediadors naturals i intrínsecs (fenazines, flavines, PQQ)	<i>Shewanella oneidensis</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

Observem que els citocroms del tipus *c* són els principals sospitosos de participar com a transportadors d'electrons en electròtrofs. Aquests citocroms es troben a l'espai periplasmàtic de la cèl·lula i reben els electrons directament del càtode, en oxidar-se redueixen altres citocroms en una reacció en cadena que acaba als acceptors finals periplasmàtics (ex. nitrat) o acceptors finals intracel·lulars (ex. oxigen). A més en combinació amb les hidrogenases periplasmàtiques els citocroms són capaços de reduir els protons a hidrogen gas. Altres organismes tenen oxidoreductases associades a coure amb funcions anàlogues als citocroms tipus C, són exemples les proteïnes multi-coure OmpB i OmpC de *Geobacter sulfurreducens*. Pel que fa a la transferència d'electrons mediada cal destacar el potencial dels mediadors naturals i intrínsecs, els quals faciliten la transferència d'electrons també en altres microorganismes a més del productori de la molècula mediadora. Aquestes molècules poden actuar al periplasma, a la membrana citoplasmàtica i alguns cops dins el citoplasma (Rosenbaum, Aulenta, Villano, & Angenent, 2011).

Anteriorment s'ha comentat que les irregularitats en les poblacions bacterianes dels biocàtodes dificulten l'electrosíntesi microbiana. A partir d'aquesta problemàtica es defineix un treball de revisió que consisteix en l'anàlisi de les poblacions microbianes de biocàtodes operats en diferents condicions per a determinar elements comuns entre ells i per tant espècies electròtrofes que podrien ser molt bones candidates per a la bioelectrosíntesi.

2. Aim

Therefore, population variability of different biocathodes exposed to different operational conditions is not fully characterized at the present. For that reason, we focus this work on the analysis of bacterial communities in different BES experiments optimized for different conditions. The study will be accomplished through basic bioinformatics in RStudio. Four different selected articles and their associated data from the *Sequence Read Archive* (SRA) are the starting point of our project. These four articles have been selected by their operational features, so that their data will allow us to validate our own results. Our analysis focuses on the biocathodes of four reactors with different functions: active energy harvesting (Lu, Lobo, Xing, & Ren, 2019), addition of ferric iron (Q. Liu et al., 2018), reduction of p-nitrophenols (Zhang et al., 2016) and dechlorination of tetrachloroethylene (Chen et al., 2018). Finally, through the bioinformatic analysis we aim to compare the microbial communities inhabiting the four

biocathodes in order to determinate whether there are common elements in the microbiome of the four systems. We establish the following two objectives:

1. Evaluate the presence of common elements (core microbiome) within the bacterial communities inhabiting differently treated biocathodes in order to determine potentially electrotrophic microorganisms.
2. Practice basic bioinformatics tools for the analysis of amplicon based sequencing data of the 16S rRNA genes.

3. Metodologia

3.1. Recerca bibliogràfica

El motor de cerca especialitzada Google Scholar va permetre accedir directament als articles acadèmics dels diferents repositoris bibliogràfics i revistes online com ara: *ScienceDirect, Elsevier ResearchGate, Scopus, Springer, Wiley, Royal Society Publishing, American Society for Microbiology, Dialnet, EMBL i NCBI*. Entre els esmentats repositoris en aquells restringits al públic s'hi va accedir mitjançant la identificació institucional gràcies a la subscripció de la Universitat de Girona a aquestes revistes. D'altra banda des dels webs llistats es van seleccionar una vintena d'articles que queden citats a la bibliografia en funció de les característiques següents.

Les paraules clau introduïdes al cercador Google Scholar varen ser les següents, recuperades des de l'historial del navegador: *microbial electrolysis cell, cathode biofilm, cathode microbiome, cathode 16s, cathode microbiome 16s, microbial electrosynthesis review, biocathode review, biocathode metabolism, microbial fuel cell cathode, microbial fuel cell metabolism*.

Per a obtenir els articles seleccionats en l'anàlisi de seqüències es van introduir les paraules clau *cathode biofilm 16S accession* i *cathode microbiome 16S accession* la qual cosa va delimitar la cerca a només aquells articles interessants dels quals es disposava de les seqüències publicades en una base de dades accessible i utilitzable amb el software utilitzat.

3.2. Articles seleccionats

De la primera tria, es varen seleccionar quatre articles, tres dels quals són experiments MFC i l'últim és una estimulació bioelectroquímica per a la declorinació de tetracloroetilè. En tots s'analitza el microbioma corresponent al biofilm del càtode mitjançant l'amplicó del gen 16S rRNA i també en tots les seqüències provenen d'un mateix tipus d'aparell de seqüenciació massiva, en aquest cas de la marca Illumina model HiSeq/MiSeq. Cal destacar que no tots els treballs utilitzen la mateixa regió del gen per a l'anàlisi, la qual cosa tindrà conseqüències en l'anàlisi posterior (veure resultats).

A partir d'aquí els quatre experiments són diferents entre sí. Tot i que comparteixen el tret distintiu d'estar formats per un biocàtode, difereixen en el disseny del bioreactor i els objectius que es persegueixen amb els diferents sistemes. Això de fet és convenient ja que s'espera que les divergències en cada experiment donin una visió prou representativa de la diversitat ecològica dels biofilms catòdics. Els quatre articles utilitzats es mostren a la *Taula 2*.

Taula 2. Es mostren els títols i autors dels quatre articles, data de la seva publicació, localització de l'experiment, lectures (runs) descarregades i el seu pes en megabytes.

	Data de publicació	Localització	Lectures (Número de mostres)	Mb totals
1. Active harvesting enhances energy recovery and function of electroactive microbiomes in microbial fuel cells (Lu, Lobo, Xing, & Ren, 2019)	2019	Princeton, EEUU	4	167
2. Response of the microbial community structure of biofilms to ferric iron in microbial fuel cells (Liu et al., 2018)	2018	Harbin, Xina	3	211
3. Enhanced bioelectrochemical reduction of p-nitrophenols in the cathode of self-driven microbial fuel cells (Zhang et al., 2016)	2016	Nanjing, Xina	1	72,6
4. Effects of different carbon substrates on performance, microbiome community structure and function for bioelectrochemical-stimulated dechlorination of tetrachloroethylene (Chen et al., 2018)	2018	Harbin, Xina	3	119

El primer article es centra en millorar el rendiment energètic d'una MFC a través de la collita activa (mostres amb codi Harvest #) i a més aporta dades de la seqüenciació dels biofilms de l'ànode i del càtode. Per la nostra anàlisi es van recuperar 4 lectures del biocàtode: lectures de sistemes MFC sense collita activa i que per tant operen com una MFC convencional. D'aquesta manera les dades es van poder comparar amb la resta d'articles i es va considerar aquest biocàtode com a tractament neutre a diferència dels altres tres articles que són més específics. El segon article, per exemple, experimenta amb l'addició de ferro iònic insoluble tant en l'ànode com en el càtode d'una MFC. En aquest treball conclouen que l'eficiència augmenta en afegir baixes quantitats de Fe^{3+} i que aquesta addició modifica les comunitats bacterianes, especialment en el càtode. D'aquest segon article s'han extret 3 lectures del biofilm del càtode: a altes concentracions de Fe^{3+} (1000 μ m), a baixes concentracions de Fe^{3+} (200 μ m) i sense Fe^{3+} (mostres amb codi Ferro #). El tercer article monitoritza la reducció de p-nitrofenols a la cambra del càtode d'una MFC i es centra en les eficiències del sistema però també deixa

lloc a l'anàlisi del microbioma del càtode. D'aquest experiment recuperem un fitxer (lectura) de 72,6 megabytes del metagenoma del biocàtode (mostra amb codi Nitrofenols #). Finalment del quart i últim article obtenim 3 fitxers de seqüències. Corresponen als microbiomes seqüenciats al càtode quan la declorinació del tetracloroetilè s'ha realitzat respectivament amb 3 substrats de carboni diferents: glucosa, acetat de sodi (NaAc) o NaHCO₃ (mostres amb codi Declorin #).

3.3. Descàrrega de seqüències nucleotídiques

La descàrrega de lectures del SRA (NCBI) requeria d'alguns coneixements molt bàsics de llenguatge de programació. En haver llegit una guia del mateix SRA per obtenir les seqüències es va descarregar l'eina bàsica per a obtenir-les; l'*SRA Toolkit*. Aquest programari utilitza els *accession numbers*, que identifiquen cada lectura o fitxer de seqüències, per a connectar amb els servidors de NCBI i descarregar aquests fitxers els quals contenen molta informació i poden pesar de megabytes a uns quants gigabytes (*Taula 2*). Es mostren els codis identificadors dels fitxers utilitzats (*Taula 3*).

Taula 3. Accession numbers dels 11 fitxers de seqüències introduïts a SRA Toolkit, entre parèntesis s'enumera la mostra del fitxer. Per exemple SRR8373350 (1) és la mostra Harvest1.

Accession numbers	
Harvest #	SRR8373350 (1), SRR8373352 (2), SRR8373354 (3) , SRR8373356 (4)
Ferro #	SRR4266022 (1), SRR4266023(2), SRR4266024 (3)
Nitrofenols #	SRR2489405
Declorin #	SRR7091519 (1), SRR7091520 (2), SRR7091521 (3)

Abans de descarregar amb *SRA Toolkit* (v2.9.6) fou necessari seleccionar les lectures interessants dins d'un mateix experiment, en el nostre cas les lectures pertanyents al biofilm del càtode. Tot seguit per baixar els arxius el software SRA Toolkit s'ha d'executar des de la finestra de comandes (consola). Des de la consola de comandes es va accedir a través de múltiples ordres al compartiment *bin* dins la carpeta d'instal·lació del *SRA Toolkit*. A més a priori es van desar tots els arxius executables en aquest mateix compartiment. Un cop a la carpeta *bin* es varen indicar les ordres de *prefetch* i *fastq-dump* per a cada accession obtenint així els fitxers ".fastq" complets llestos per a processar-se amb el software d'anàlisi estadístic. Els fitxers .fastq contenen informació de les seqüències (lectura dels nucleòtids) i de la qualitat (grau de credibilitat de les lectures de cada posició a la seqüència del gen) que serà utilitzada en el procés d'anàlisi.

3.4. Anàlisi de les seqüències nucleotídiques

RStudio presenta una interfície adaptada a l'usuari a diferència de R commander així que es va optar per a treballar amb el primer dels softwares. Dins de RStudio (v3.6.0) es va treballar amb paquets específics per a l'anàlisi estadística en ecologia microbiana. Els paquets finalment utilitzats van ser *dada2*, *ggplot2*, *phyloseq*, *decipher*, *phangorn* i

gridExtra. Un cop descarregats i instal·lats, els paquets es van importar a una nova sessió de RStudio ubicada al directori de treball on es trobaven les seqüències per a processar. A partir d'aquí es comença el següent processament de seqüències; filtratge de qualitat, retall de les seqüències, estimació de taxes d'error, de-replicació, inferència mostral, eliminació de quimeres, construcció de la taula de seqüències i assignació taxonòmica fins a nivell de família. Tot dins un protocol per a filtrar la qualitat de les seqüències a través de diferents comandes dins de la consola de RStudio. Un cop es tenen els resultats finals d'aquest procés inicial, la taula d'abundàncies relatives i les assignacions taxonòmiques es poden iniciar anàlisis més exploratoris com l'anàlisi de la diversitat alfa; si bé la diversitat beta no ha estat possible pel fet de tractar diferents regions hivervariables de 16S rRNA en les diferents mostres. Per a establir la taxonomia i la diversitat filogenètica es va treballar amb la base de dades del projecte SILVA, ja que RStudio és capaç de comparar aquesta base de dades amb les seqüències mostrals i així estableix una classificació taxonòmica dels microorganismes detectats. D'altra banda per a la diversitat alfa es va haver de confeccionar una taula de *metadata* que inclou informació sobre les mostres.

Taula 4. Taula de metadata introduïda a RStudio.

	Experiment	Date	Location	Cat_material	Substrate	Inocule	pH	T(°C)	Voltage (V)
SRR2489405	Nitrofenols	2016	Xina	Carbon cloth	Saline electrolyte	Efluent reactor np	variable	30	-0,8to+_0,5
SRR4266022	Ferro	2017	Xina	Stainles steelcatalyst AC	Nutrient solution	Efluent MFC	7	35	MFC
SRR4266023	Ferro	2017	Xina	Stainles steel catalyst AC	Nutrient solution	Efluent MFC	7	35	MFC
SRR4266024	Ferro	2017	Xina	Stainles steel catalyst AC	Nutrient solution	Efluent MFC	7	35	MFC
SRR7091519	Declorin	2018	Xina	Graphite fiber brush	Carbon substrates	Anaerobic sludge	7	23	-0,26
SRR7091520	Declorin	2018	Xina	Graphite fiber brush	Carbon substrates	Anaerobic sludge	7	23	-0,26
SRR7091521	Declorin	2018	Xina	Graphite fiber brush	Carbon substrates	Anaerobic sludge	7	23	-0,26
SRR8373350	Harvest	2018	USA	Carbon cloth	Brewery wastewater	Anaerobic sludge	7,4	25	-0,7_to_0V
SRR8373352	Harvest	2018	USA	Carbon cloth	Brewery wastewater	Anaerobic sludge	7,4	25	-0,7_to_0V
SRR8373354	Harvest	2018	USA	Carbon cloth	Brewery wastewater	Anaerobic sludge	7,4	25	-0,7_to_0V
SRR8373356	Harvest	2018	USA	Carbon cloth	Brewery wastewater	Anaerobic sludge	7,4	25	-0,7_to_0V

Aquesta taula conté les característiques de cada mostra i el software les relaciona amb les dades de l'anàlisi taxonòmic establint una comparació de la diversitat mostral. A mode d'exemple s'adjunten les categories d'aquesta metadata envers una lectura de cada experiment analitzat (*Taula 4*). Com a software adicional va ser molt rellevant el *Paint* de Microsoft Windows per a diferenciar els tons cromàtics de la llegenda en els gràfics d'abundància que es mostren als resultats. A més a més es va recórrer a les

anàlisis taxonòmiques i a les conclusions dels propis articles productors de les dades per a contrastar-los amb els resultats obtinguts de les anàlisis fetes en aquest treball.

3.5. Criteris ètics i de sostenibilitat

El treball realitzat no implica criteris ètics que hagi de ser considerats de forma explícita més enllà dels derivats de les pràctiques habituals en el desenvolupament de treballs científics que no estan relacionats amb material sensible, dades sociològiques, i/o experimentacions amb humans o animals. Aquestes pràctiques inclouen el respecte per la propietat intel·lectual el que ens obliga a citar correctament les fonts bibliogràfiques o els repositoris de dades convenientment. S'ha posat especial cura en aquest aspecte durant tot el treball.

Pel que fa als criteris de sostenibilitat, l'execució experimental va estat únicament informàtica, i per tant no hi va haver cap risc ambiental directe. Indirectament sí que vam recopilar les dades de laboratoris tant de Xina com EEUU, que en estar associats a institucions públiques i universitats suposem que s'ha procedit degudament d'acord amb la legislació de cada país. La recerca tampoc ha implicat cap consideració de bioseguretat que s'hagi de tenir en compte en aquest apartat.

El que voldria destacar és que les tecnologies desenvolupades en els experiments (MFC, BES, MES) que s'han usat com a base de l'experimentació, són una alternativa de sostenibilitat i de resposta al creixent interès per les energies renovables. Considerem que tant que els investigadors implicats en aquests estudis, com jo mateix, són sensibles a aquests interessos.

4. Resultats i discussió

4.1. Anàlisi inicial de les seqüències i filtrat

Es va comprovar la qualitat inicial de les seqüències descarregades per tal d'obtenir informació per aplicar els criteris de filtrat corresponents. En general les seqüències obtingudes eren de bona qualitat (>30 en el Q Score) per la majoria de la seva llargada (Figura 4). Això m'ha permès utilitzar la totalitat de la seqüència en la majoria de casos. En haver utilitzat el sistema Illumina MiSeq/HiSeq, en totes les seqüències s'observa una pèrdua de qualitat conforme ens aproximem a la posició 250 de cada lectura ja que és la longitud màxima amb la qual treballa aquest aparell de seqüenciació.

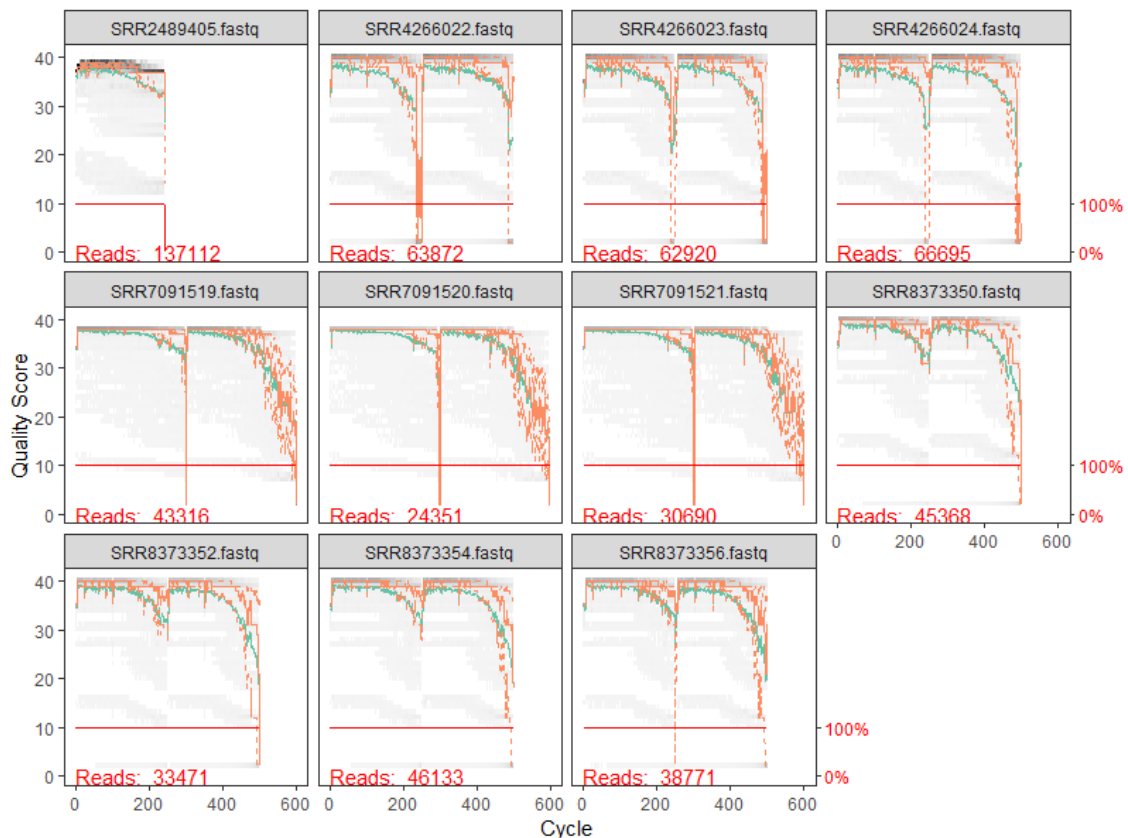


Figura 4. Gràfics de perfil de qualitat de les 11 mostres. La línia verda és la mitjana de qualitat de la posició nucleotídica corresponent. La intensitat de gris correspon a un mapa de calor de la distribució de la qualitat, de manera que un gris més intens denota més seqüències amb una determinada puntuació de qualitat.

Tots els fitxers de seqüències provenen de la unió de dues lectures nucleotídiques; a excepció de l'experiment de reducció de nitrofenols on presenten una sola lectura, de manera que les seqüències d'aquest experiment són aproximadament la meitat de llargues que la resta. Així doncs s'observen dues lectures clarament diferenciades en tots els gràfics excepte en la mostra Nitrofenols #. També es pot apreciar una davallada de la qualitat a les posicions finals de cada lectura. Tot i això la línia verda manté molta proximitat a la puntuació màxima de 40 la qual cosa indica que les seqüències es van filtrar abans de penjar-se a internet.

A continuació es va fer un càlcul de les taxes esperables d'error en l'assignació de nucleòtids en cadascuna de les posicions. Aquesta informació és usada per DADA2 com a complement al filtrat de les seqüències en base a la seva qualitat. Es basa en un procés d'aprenentatge i elaboració d'un model de correcció (Figura 5). Les taxes d'error per a totes les possibles transicions de bases han estat modelades correctament pel set de seqüències que s'ha utilitzat. En les representacions de la figura, la taxa d'error estimada és la línia negra i la taxa d'error observada són els punts. La línia vermella indica les taxes d'error esperades en funció de la puntuació de qualitat. Com podem veure les taxes esperades i observades coincideixen en totes les transicions denotant una bona qualitat de les seqüències descarregades.

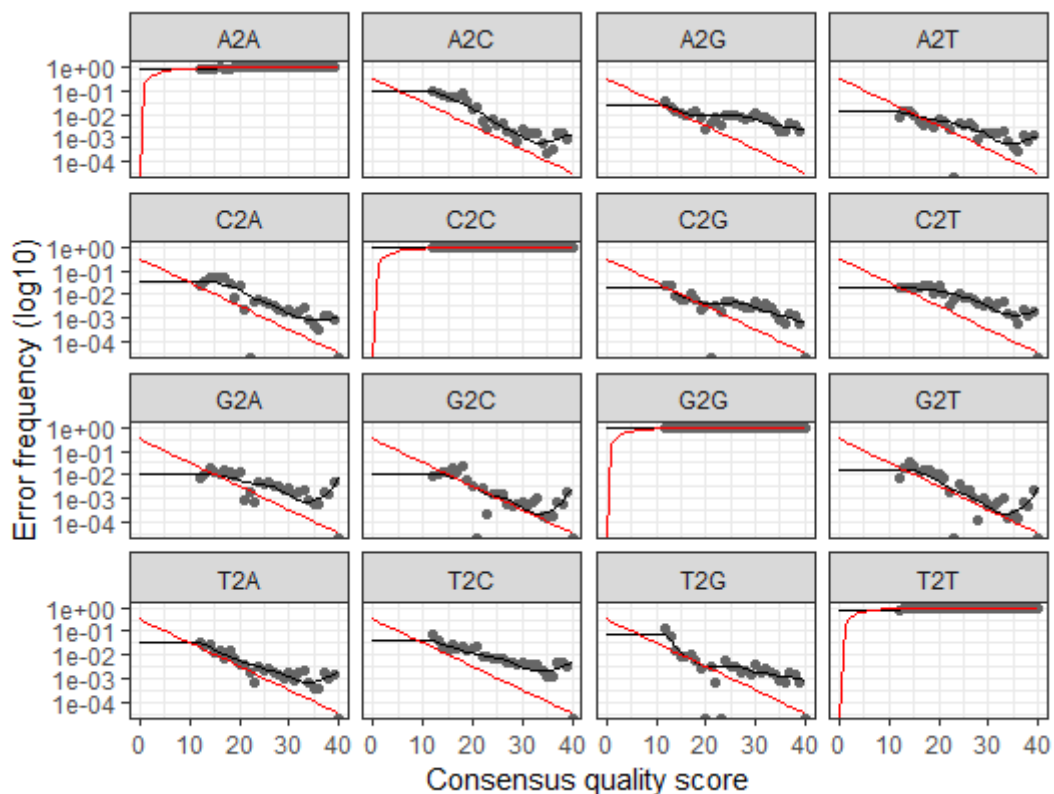


Figura 5. Diagrama de taxes d'error de les 11 mostres processades.

Un cop avaluades les seqüències recopilades vam aplicar un filtre de qualitat: com s'observa a la Taula 5 la majoria de les seqüències el van superar. Els paràmetres del filtre es van basar en un retall de 10 nucleòtids a l'inici de cada lectura, eliminació de seqüències amb un valor d'errors esperats superior a 2, truncament de les seqüències en el punt de detecció d'un QS igual o superior a 2, eliminació de seqüències associades al genoma *phiX* i compressió dels fitxers *fastq* un cop filtrats. Seguidament, el pas d'eliminació de quimeres va identificar i esborrar 263 bimeres de 3746 seqüències úniques. Les seqüències úniques (amb similitud del 100%) les calcula el paquet DADA2 a partir d'un algoritme basat en les *amplicon sequence variants* (ASV). Les ASV són anàlogues als OTUs però amb més alta resolució, ja que la taula generada de ASV enregistra les repeticions d'una regió exactament idèntica en cada mostra seqüenciada.

Taula 5. Seqüències introduïdes (reads.in) i les resultants (reads.out) després de tot el protocol de filtratge de qualitat. S'indiquen també seqüències amb regions hipervariables V3 i V4.

	reads.in	reads.out	V3	V4
SRR2489405	137112	125387	122525	115992
SRR4266022	63872	56271	54262	52005
SRR4266023	62920	54169	51901	51841
SRR4266024	66695	57024	53487	53487
SRR7091519	43316	40108	38303	33022
SRR7091520	24351	22852	21829	21581
SRR7091521	30690	28758	27870	27473
SRR8373350	45368	40207	36565	32639
SRR8373352	33471	29259	28039	25558
SRR8373354	46133	41502	40546	35346
SRR8373356	38771	35261	34723	31827

El total de seqüències llegides són 592699 envers les 530798 seqüències filtrades. El 89'6% de les seqüències han passat el filtre i això verifica l'elevada qualitat de les seqüències dipositades a la base de dades. Possiblement, les dades publicades havien estat filtrades anteriorment ja que no apareixen seqüències de mides molt curtes.

Degut a les diferències en les llargades de les seqüències dels diferents treballs utilitzats, el filtre que s'ha aplicat va ometre el pas de retall de seqüències amb restricció per a seqüències més llargues de 240 nucleòtids. Aquest pas ens eliminava bona part de les seqüències informatives ja que a cada experiment s'han seqüenciat regions hipervariables diferents dins el gen 16S rRNA (regions d'entre 30 i 100 nucleòtids) (Lee, Johnson, & Morgan, 1979). D'aquesta manera l'experiment de l'article 1 ha seqüenciat les regió V4, l'article 2 les regions V4-V5, l'article 3 les regions V1-V2 i finalment l'article

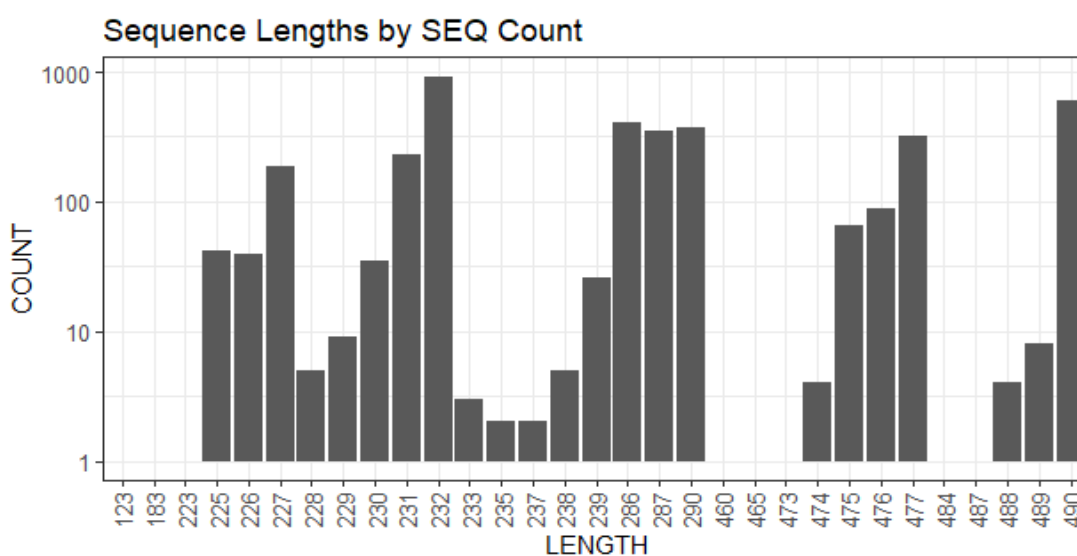


Figura 6. Distribució de les llargades de les seqüències filtrades. Es mostren les seqüències úniques (ASV) per això s'observen poques seqüències en relació a totes les que s'han filtrat.

4 les regions V1-V3. Això també comporta una alta variabilitat en la longitud de les seqüències filtrades com es mostra a la *Figura 6*.

S'observa que les seqüències es distribueixen entre 225 i 490 nucleòtids. Aquesta heterogeneïtat en les llargades de les seqüències s'explica pels diferents orígens i condicions de lectura de cada experiment. No obstant això, la causa principal de l'alta variabilitat són els *primers* diferents utilitzats en cada experiment per a seqüenciar les regions hipervariables de 16S rRNA.

4.2. Anàlisi taxonòmica

Les assignacions taxonòmiques es van fer a partir de la base de dades SILVA, concretament versió 128, fins a nivell taxonòmic de gènere. En primer lloc es van computar les dades filtrades obtenint els gràfics de prevalença dels Phyla mostrats a la *Figura 7*. Més tard vam comprovar que aquest mateix gràfic, tot i que il·lustratiu dels diferents Phyla, presenta valors incorrectes pel fet que els ASV que es computen no són comparables en els diferents experiments per la mateixa qüestió de les diferents regions hipervariables de 16S rRNA.

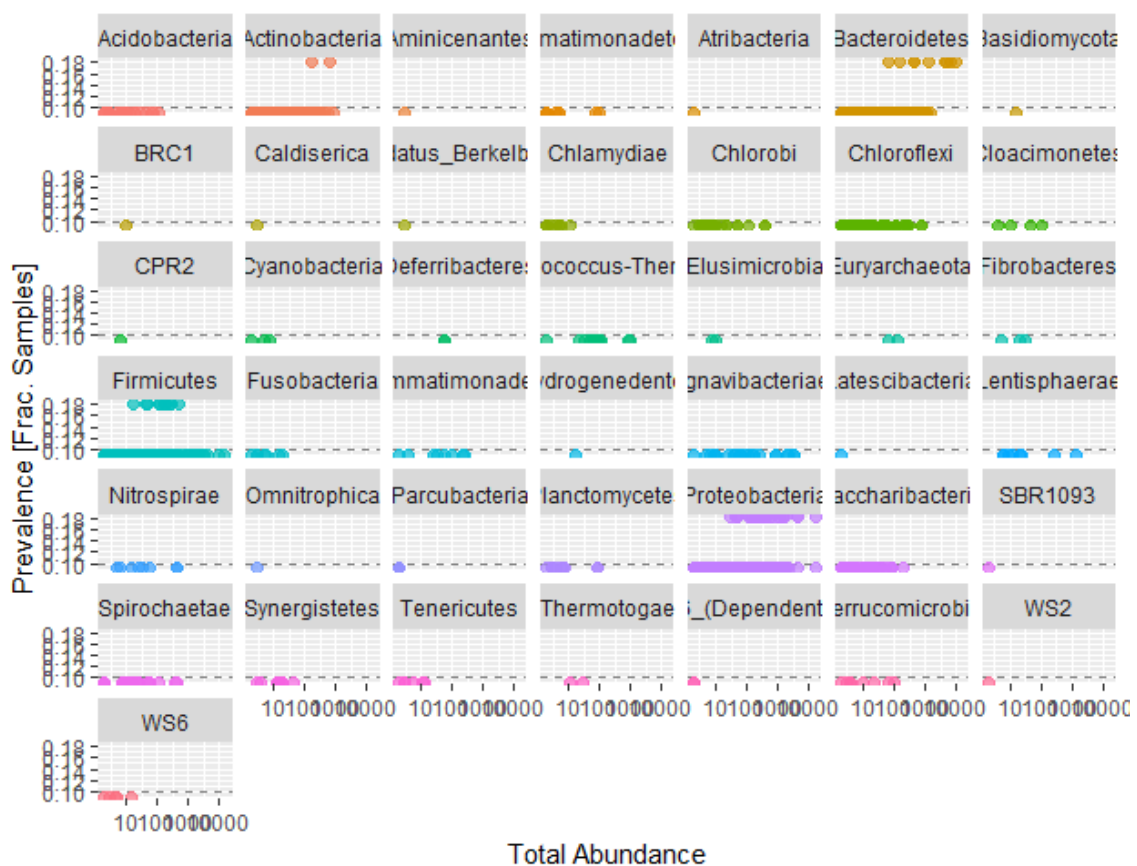


Figura 7. Gràfics de prevalença dels diferents Phyla en totes les mostres processades.

S'han detectat 43 Phyla el que ens porta a parlar d'una gran diversitat. No obstant això, en el gràfic també s'observa que molts Phyla (*Caldiserica*, *Deferribacteres*, *Latescibacteria*, *Hydrogenedentes*, *Omnitrophica* i altres) són molt escassos a totes les mostres analitzades, o molt específics per a una mostra en concret. Per a detectar els taxons més abundants en totes les mostres es va establir un llindar de prevalença de 0.1, és a dir, es van eliminar els Phyla sense representació a més d'un 10% de les mostres (Figura 8).

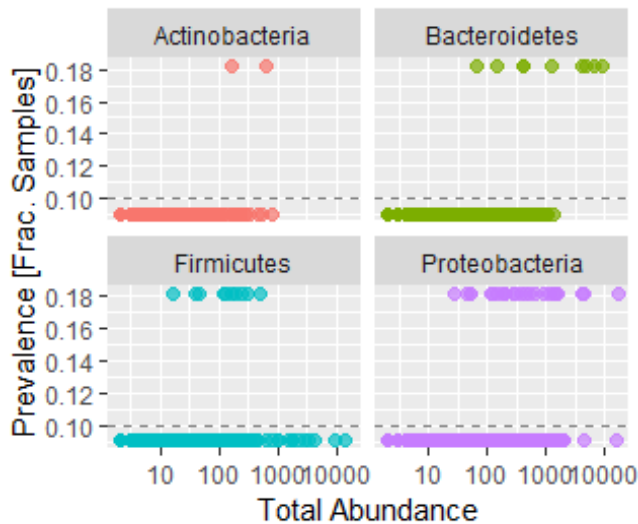


Figura 8. Gràfic de prevalença dels Phyla presents a més d'un 10% de les mostres

El gràfic de prevalença restringit conserva tan sols quatre Phyla: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Proteobacteria*. Per tant hi ha una gran diferència entre els Phyla dominants i els 39 Phyla restants que no es reparteixen ni en un 10% de les mostres.

Pel que fa a l'abundància real (nombre de seqüències, Figura 9) i relativa (proporció, Figura 10), es pot veure que aquests quatre Phyla cobreixen quasi el 100 % de les seqüències a totes les mostres assajades.

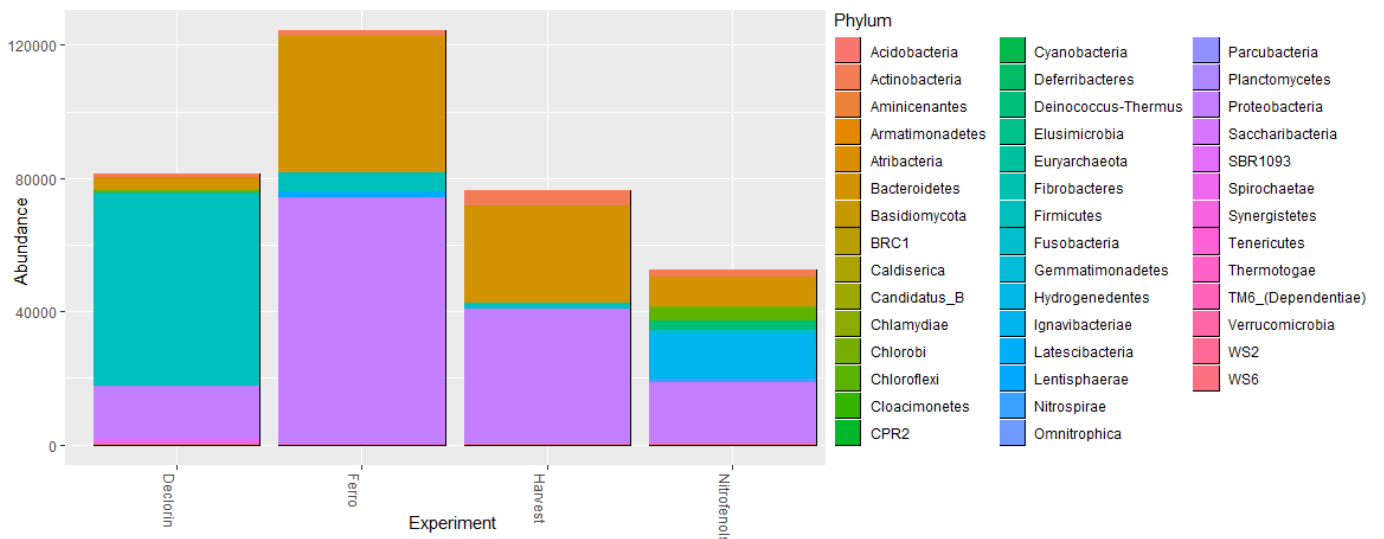


Figura 9. Gràfic de les abundàncies de tots els Phyla detectats en les mostres dels quatre experiments: declorinació, ferro, harvesting i nitrofenols.

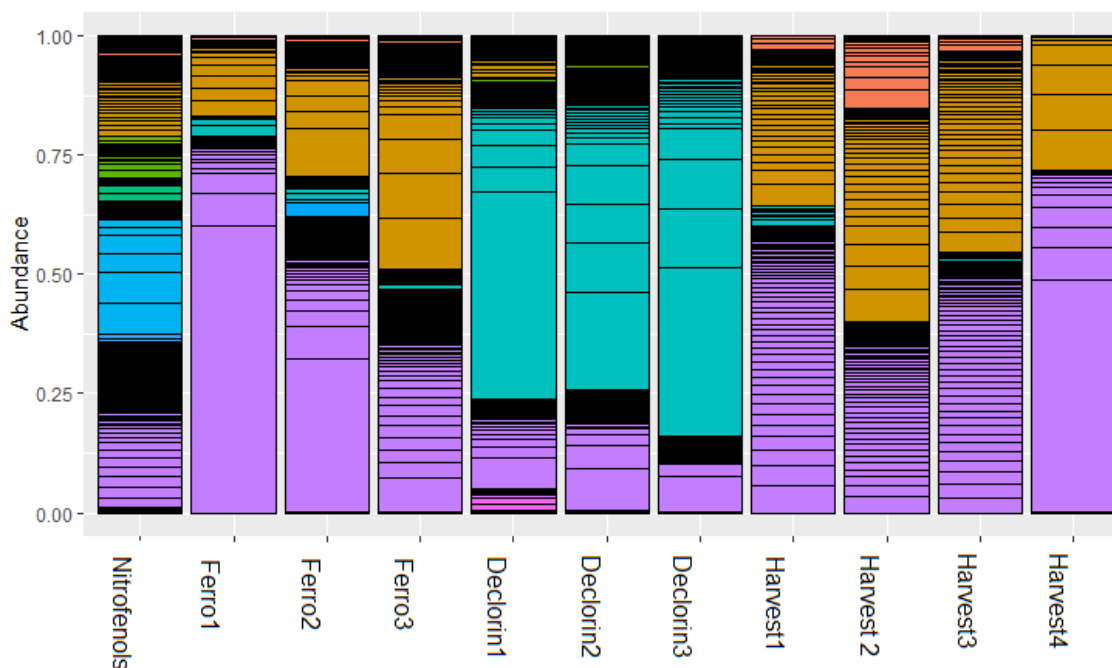


Figura 10. Classificació dels Phyla detectats a cada mostra. S'han eliminat els Phyla no classificables i s'han relativitzat les abundàncies. Els colors són idèntics a la llegenda de la Figura 9.

Tant la Figura 9 com la Figura 10 incorporen tots els Phyla de les onze mostres; en el primer cas agrupats per a cada experiment i en el segon cas per a cada mostra individual. A la Figura 10 s'ordenen d'esquerra a dreta la mostra Nitrofenol #, tres mostres Ferro #, tres mostres Declorin # i les quatre mostres Harvest #. En aquesta mateixa figura s'han eliminat els Phyla no classificables, ja que s'ha considerat que contenen errors de seqüenciació, i s'han relativitzat les abundàncies per a augmentar la resolució del gràfic. Els colors de la llegenda idèntics en les dues figures permeten observar que l'abundància de cada fílum és coherent. D'aquesta forma podem destacar una clara predominança del fílum *Firmicutes* en les mostres Declorin#, com també una bona presència del fílum *Proteobacteria* en totes les mostres, especialment dominant en els experiments Ferro# i Harvest#. En aquests dos experiments s'observa codominància del fílum *Bacteroidetes*. Seguint amb *Actinobacteria*, l'últim fílum dels quatre més prevalents, a la Figura 10 s'observa que és un fílum abundant en la mostra Harvest2 i minoritari en Harvest1 i Harvest3. La Figura 9 confirma la presència, tot i que més escassa, d'*Actinobacteria* també en la resta d'experiments. Per últim, la mostra Nitrofenols# presenta la més alta diversitat a aquest nivell ja que Phyla escassos o inexistents als altres experiments en aquest, en canvi, són notablement presents pel fet de ser bacteris reductors de nitrofenols clarament afavorits per les condicions d'operació d'aquesta MFC. En són exemples *Chlorobi*, *Ignavibacteriae* i *Nitrospirae*.

Posteriorment a l'anàlisi a nivell de Phyla vàrem aprofundir a la classificació a nivell de família pels quatre Phyla més abundants a les mostres. Vam obtenir els gràfics de les *Figures 11, 12, 13 i 14* pels Phyla *Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes i Actinobacteria*; respectivament.

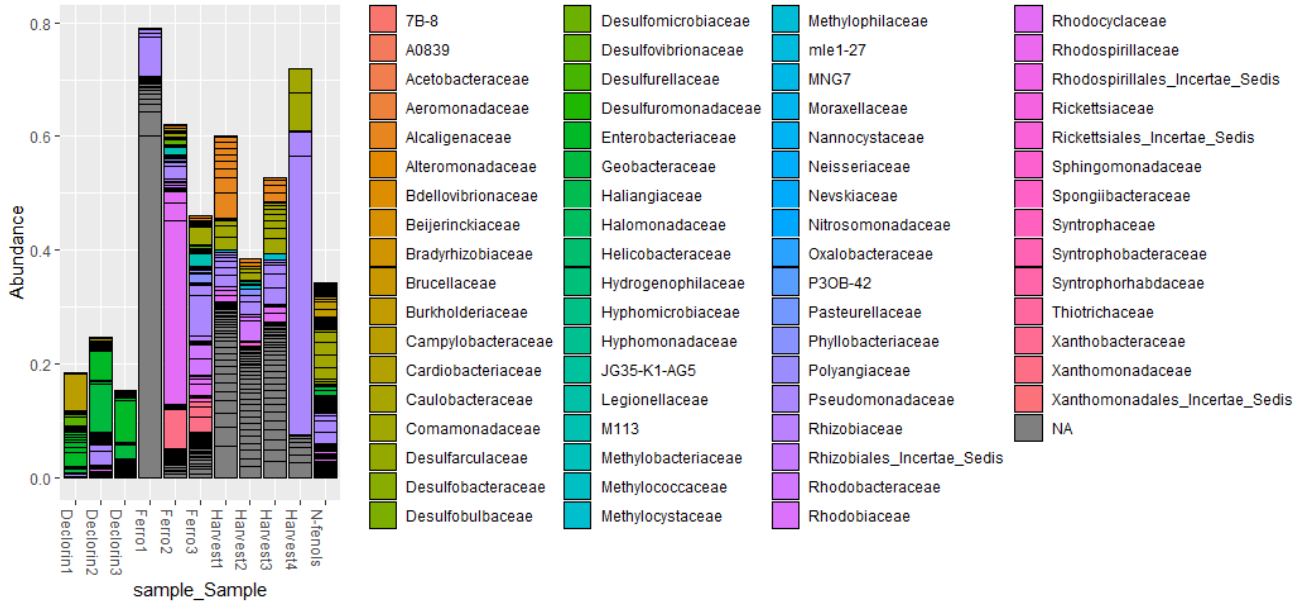


Figura 11. Distribució de les famílies del filum Proteobacteria en les diferents mostres de cada experiment.

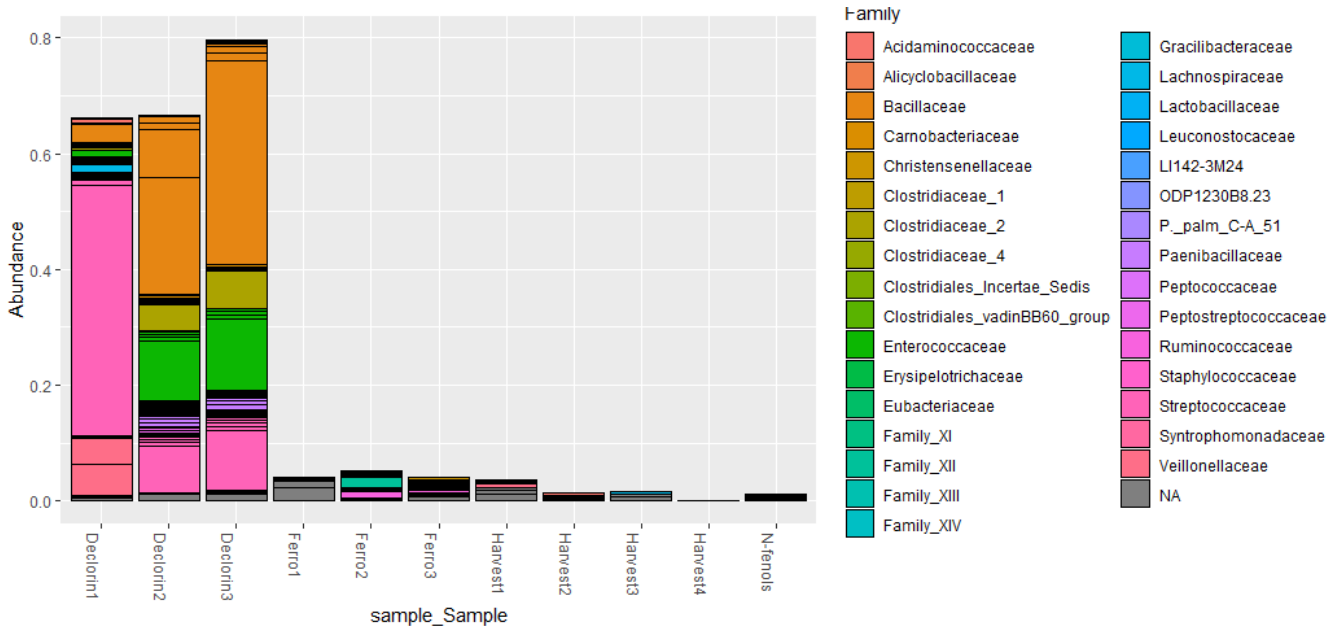


Figura 12. Distribució de les famílies del filum Firmicutes en les diferents mostres de cada experiment.

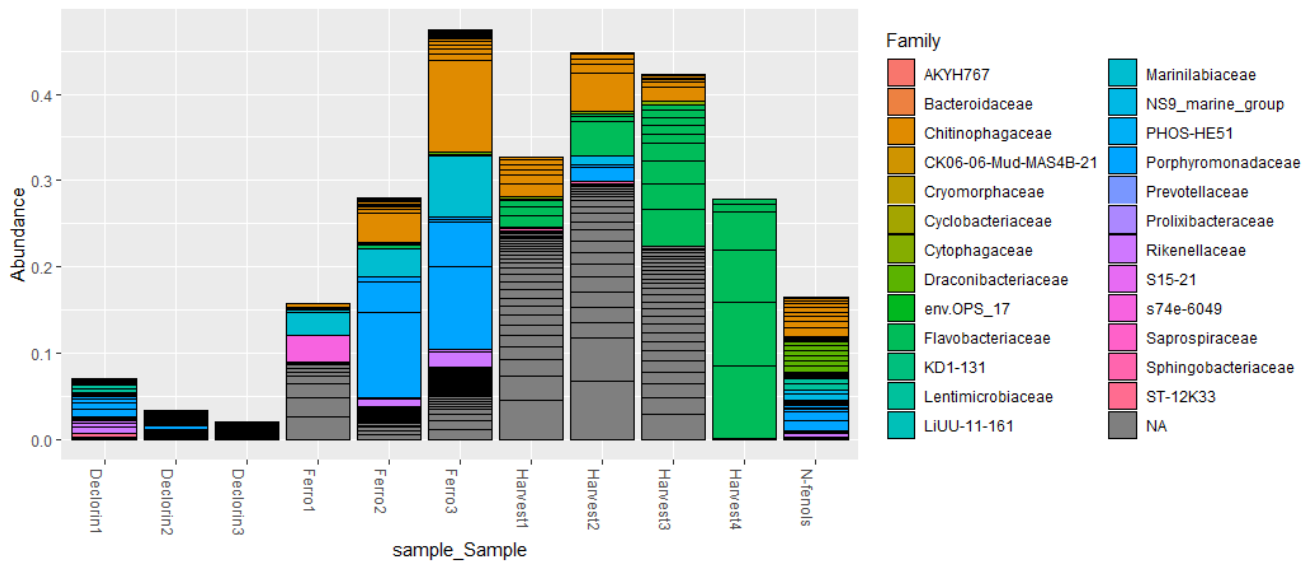


Figura 13. Distribució de les famílies del fílum Bacteroidetes en les diferents mostres de cada experiment

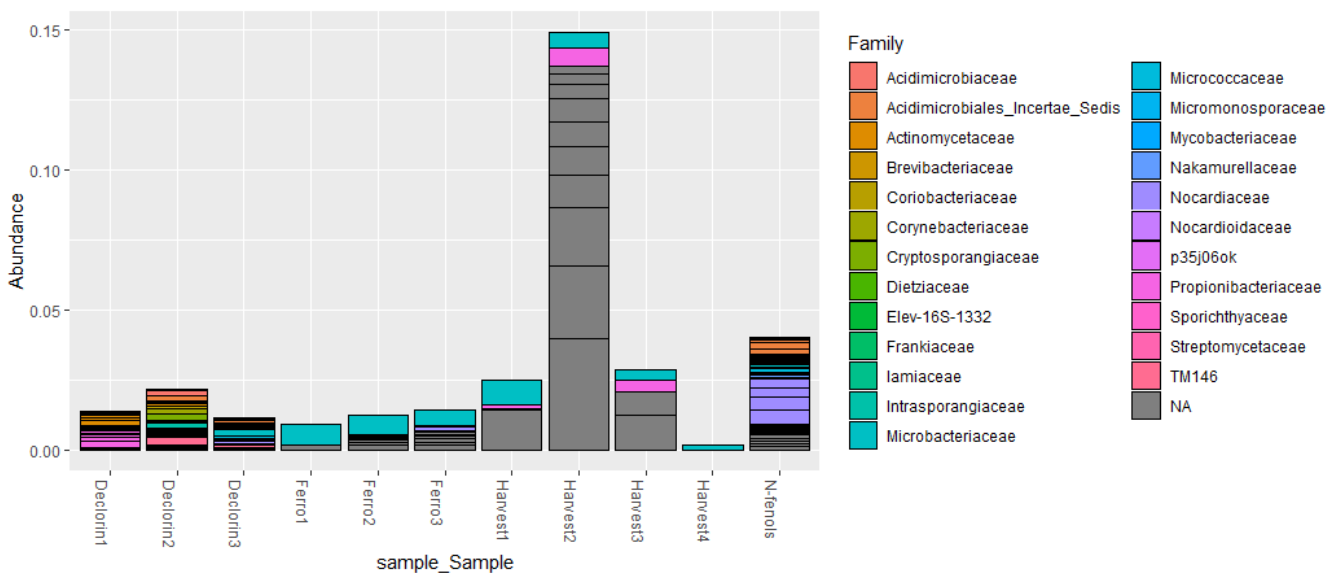


Figura 14. Distribució de les famílies del fílum Actinobacteria en les diferents mostres de cada experiment

Algunes famílies no s'han pogut classificar durant l'anàlisi taxonòmic, es mostren pintades en gris en els gràfics, sobretot en les figures 11, 13 i 14. Això ha afectat en especial les famílies dels biofilms de Harvest#. Fet aquest aclariment, la Figura 11 mostra una bona distribució de les famílies *Proteobacteria* en les diferents mostres. D'una banda la família *Pseudomonadaceae* (blau-gris) és la més ben distribuïda: es troba present en totes les mostres processades excepte Declorin1 (substrat glucosa) i Declorin3 (substrat NaHCO₃). En segona posició trobem la família *Caulobacteraceae* (ocre), en general abundant excepte en l'experiment Declorin# i en la mostra Ferro1. D'altra banda en les mostres Declorin# hi ha una clara predominança de la família *Geobacteraceae* en les tres mostres. *Rhodocyclaceae*, per exemple, destaca entre les demés famílies perquè és absolutament dominant en Ferro2 i també s'observa bé en Ferro3, Harvest1, Harvest2 i Harvest3.

En contraposició, a la *Figura 12* s'observa una distribució molt desigual de les famílies del fílum *Firmicutes*, ja que la majoria d'elles es concentren en l'experiment Declorin#. D'aquesta manera les famílies *Bacillaceae*, *Enterococcaceae* i *Streptococcaceae* dominen en les tres mostres Declorin#, però en canvi són molt escasses o inexistentes en la resta d'experiments. No obstant això, algunes famílies presents a la mostra Declorin1 (substrat glucosa) són més escasses però es distribueixen en altres experiments com: *Veillonellaceae* (Harvest1), *Acidaminococcaceae* (Harvest2) i *Lachnospiraceae* (Harvest3).

Pel que fa a les famílies del fílum *Bacteroidetes* (*Figura 13*) apreciem una distribució més aviat equitativa. L'única família observable en els quatre experiments és *Porphyromonadaceae*, es troba en les mostres Declorin1, Ferro2, Ferro3, Harvest2 i Nitrofenols. S'ha detectat la família *Chitinophagaceae* en totes les mostres de Ferro#, Harvest# i Nitrofenols# menys en Harvest4. Curiosament *Flavobacteriaceae* és l'única família *Bacteroidetes* observable en Harvest4 i s'observa també en les tres mostres restants de Harvest#. Encara en el fílum *Bacteroidetes* s'identifica la família *Rikenellaceae* present en quatre mostres de tres experiments: Declorin1, Ferro2, Ferro3 i Nitrofenols.

Finalment la *Figura 14* mostra les famílies del fílum *Actinobacteria*. Destaca la família *Microbacteriaceae* que és la única present en com a mínim una mostra de cada experiment. Així *Microbacteriaceae* s'observa en Declorin3, totes les mostres Ferro#, totes les mostres Harvest# i en l'única mostra de Nitrofenols#. D'altra banda *Propionibacteriaceae* és present en tres mostres Harvest# i en la mostra Declorin1. Altres famílies comunes entre experiments, tot i que escasses, són *Neocardiaceae* (Nitrofenols#, Declorin# i Ferro#) i *Acidimicrobiales Incertae Sedis* (Nitrofenols# i Declorin#).

4.3. Anàlisi de diversitat alfa i discussió

Un cop assignada la taxonomia a diferents nivells es va procedir a calcular la diversitat alfa de les 11 mostres per tots els Phyla detectats inicialment. A la *Figura 15* queden representades les diversitats a través els indicadors *Observed*, *Shannon* i *Inverse Simpson*.

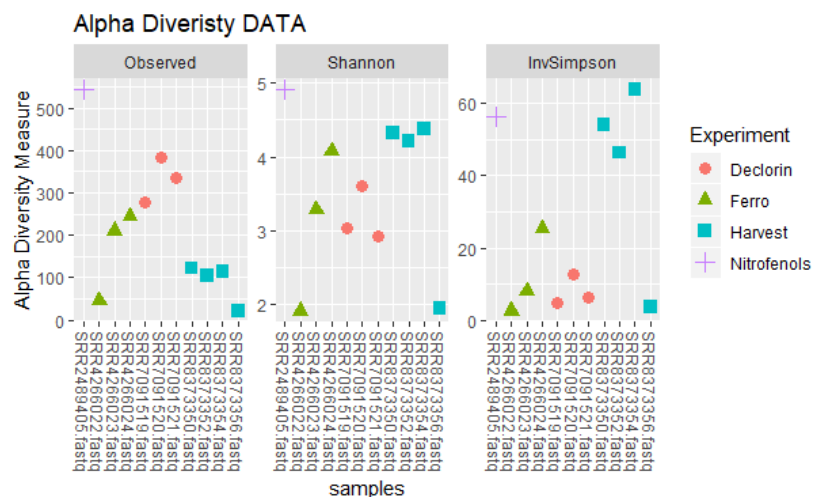


Figura 15. Diagrames de punts per tres indicadors bàsics de diversitat alfa (Observed, Shannon i Inverse Simpson) en els quatre experiments.

Els tres índexs de la *Figura 15* confirmen l'alta diversitat de la mostra Nitrofenols#. També indiquen que les mostres Ferro1, Ferro2 i Ferro3 augmenten en quant a diversitat per aquest ordre. Per altra banda, la mostra Declorin2 presenta la major diversitat en el seu experiment, seguida de Declorin1 i Declorin3, aquestes últimes molt properes entre sí. A l'experiment Harvest# destaca la mostra Harvest4 amb un valor molt baix en els tres índexs de diversitat, a diferència de les altres tres mostres que són altament diverses: per exemple Harvest3 és superior a Nitrofenols# en quant a uniformitat i anivellament de la diversitat (valor de l'índex *Inverse Simpson*).

Els resultats obtinguts a nivell de *Phyla* coincideixen amb els extrems pels autors dels articles seleccionats (Lu et al., 2019), (Q. Liu et al., 2018), (Zhang et al., 2016), (Chen et al., 2018). Cal remarcar que en el nostre anàlisi taxonòmic general s'ha pogut arribar al nivell taxonòmic de família mentre que els articles han aprofundit un nivell més en la taxonomia: al nivell de gènere. Tot i això, els gèneres detectats en els articles són evidentment integrables en les famílies detectades en aquest treball.

Entre els diferents anàlisis realitzats, les observacions al nivell taxonòmic de família són certament destacables, malgrat algunes poblacions bacterianes no varen poder ser identificades a aquest nivell. Així doncs, *Pseudomonadaceae* (*Proteobacteria*), *Porphyromonadaceae* (*Bacteroidetes*) i *Microbacteriaceae* (*Actinobacteria*) són tres famílies que s'identifiquen com a mínim en una mostra de cada experiment. A més, *Pseudomonadaceae* i *Porphyromonadaceae* presenten abundàncies considerables (predominants en cada cas) en algunes de les mostres. Aquestes famílies ben adaptades als càtodes de quatre sistemes bioelectroquímics diferenciats podrien ser bones candidates per a la MES. De fet, dins la família *Pseudomonadaceae*, s'ha comprovat que *Pseudomonas aeruginosa* és una espècie electrotrofa. En els darrers anys s'han utilitzat soques de *P. aeruginosa* en diversos estudis en el camp de la bioelectroquímica (Pouderoyen & Cigna, 1997; Ren et al., 2018; Zhou, Huang, He, Li, & Zhang, 2016). Tanmateix calen estudis addicionals en quant a la especificació de gènere i espècie de les famílies identificades, com també la recerca experimental per a confirmar la seva electrotrofia.

5. Conclusions

The determination of a core microbiome within the four experiments analysed has been realised in part. On the one hand, the depth of the analysis was a major limitation, as we could reliably identify families, but not genera or species, within the samples. On the other hand, some bacterial families could not be correctly classified using the SILVA database and consequently could not be analysed in detail. Moreover, we could classify bacteria by their phylogeny but not by their function, which means that our candidate families are not necessarily electrorophic bacteria.

Despite all of the above, at least three families from three different Phyla have been identified in at least one sample of each experiment: *Pseudomonadaceae* (Proteobacteria), *Porphyromonadaceae* (Bacteroidetes) and *Microbacteriaceae* (Actinobacteria). This result could be an indication of a potential ability of bacteria within these three groups towards forming biofilms over different cathode materials, different substrates and different inoculums.

The second purpose of this project was to gain skills on the processing of biological data, specifically 16S rRNA amplicon barcoded-sequences, through basic bioinformatic tools, which are not fully developed during our degree. I've learnt the basic methods and finally downloaded and processed data from experimental works produced worldwide: this fact opens up a way to face future in silico analyses of previously published metagenomic data. I must say that all analyses were performed in a basic laptop computer using free and community developed software. Memory allocation in the computer, however, was the main limitation I encountered when analysing large data sets.

6. Bibliografia

- Bajracharya, S., Sharma, M., Mohanakrishna, G., Dominguez Benneton, X., Strik, D. P. B. T. B., Sarma, P. M., & Pant, D. (2016). An overview on emerging bioelectrochemical systems (BESs): Technology for sustainable electricity, waste remediation, resource recovery, chemical production and beyond. *Renewable Energy*, *98*, 153–170. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.002>
- Chen, F., Li, Z. L., Yang, J. qi, Liang, B., Lin, X. Q., Nan, J., & Wang, A. J. (2018). Effects of different carbon substrates on performance, microbiome community structure and function for bioelectrochemical-stimulated dechlorination of tetrachloroethylene. *Chemical Engineering Journal*, *352*(May), 730–736. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.07.082>
- Elmekawy, A., Hegab, H. M., Vanbroekhoven, K., & Pant, D. (2014). Techno-productive potential of photosynthetic microbial fuel cells through different configurations. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *39*, 617–627. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.116>
- Jeremiase, A. W., Hamelers, H. V. M., & Buisman, C. J. N. (2010). Microbial electrolysis

- cell with a microbial biocathode. *Bioelectrochemistry*, 78(1), 39–43.
<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.05.005>
- Kadier, A., Simayi, Y., Abdeshahian, P., Azman, N. F., Chandrasekhar, K., & Kalil, M. S. (2016). A comprehensive review of microbial electrolysis cells (MEC) reactor designs and configurations for sustainable hydrogen gas production. *Alexandria Engineering Journal*, 55(1), 427–443. <https://doi.org/10.1016/j.aej.2015.10.008>
- Lee, J. S., Johnson, D. A., & Morgan, A. R. (1979). On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 6(14), 3073–3091.
- Liu, D., Zhang, L., Chen, S., Buisman, C., & Ter Heijne, A. (2016). Bioelectrochemical enhancement of methane production in low temperature anaerobic digestion at 10 °C. *Water Research*, 99, 281–287.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.04.020>
- Liu, Q., Yang, Y., Mei, X., Liu, B., Chen, C., & Xing, D. (2018). Response of the microbial community structure of biofilms to ferric iron in microbial fuel cells. *Science of the Total Environment*, 631–632, 695–701.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.008>
- Lu, L., Lobo, F. L., Xing, D., & Ren, Z. J. (2019). Active harvesting enhances energy recovery and function of electroactive microbiomes in microbial fuel cells. *Applied Energy*, 247(December 2018), 492–502.
<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2019.04.074>
- Lu, L., Xing, D., & Ren, N. (2012). Pyrosequencing reveals highly diverse microbial communities in microbial electrolysis cells involved in enhanced H₂ production from waste activated sludge. *Water Research*, 46(7), 2425–2434.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.02.005>
- Luo, H., Xu, P., Roane, T. M., Jenkins, P. E., & Ren, Z. (2012). Microbial desalination cells for improved performance in wastewater treatment, electricity production, and desalination. *Bioresour Technol*, 105, 60–66.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.098>
- Nevin, K. P., Hensley, S. A., Franks, A. E., Summers, Z. M., Ou, J., Woodard, T. L., ... Lovley, D. R. (2011). Electrosynthesis of Organic Compounds from Carbon Dioxide Is Catalyzed by a Diversity of Acetogenic Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(9), 2882–2886.
<https://doi.org/10.1128/aem.02642-10>
- Nevin, K. P., Woodard, T. L., Franks, A. E., Summers, Z. M., & Lovley, D. R. (2010). Microbial Electrosynthesis: Feeding Microbes Electricity To Convert Carbon Dioxide and Water to Multicarbon Extracellular Organic Compounds. *MBio*, 1(2), e00103-10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00103-10>
- Potter, M. C. (1911). Electrical Effects Accompanying the Decomposition of Organic Compounds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 84(571), 260–276. <https://doi.org/10.1098/rspb.1911.0073>

- Pouderoyen, G., & Cigna, G. (1997). Electron-Transfer Properties of *Pseudomonas Aeruginosa* azurin. *European Journal of ...*, 247, 322–331. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.1997.00322.x/abstract>
- Rabaey, K., & Rozendal, R. A. (2010). Microbial electrosynthesis — revisiting the electrical route for microbial production. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 706. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nrmicro2422>
- Ren, G., Sun, Y., Ding, Y., Lu, A., Li, Y., Wang, C., & Ding, H. (2018). Enhancing extracellular electron transfer between *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and light driven semiconducting birnessite. *Bioelectrochemistry*, 123, 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.06.003>
- Rosenbaum, M., Aulenta, F., Villano, M., & Angenent, L. T. (2011). Cathodes as electron donors for microbial metabolism: Which extracellular electron transfer mechanisms are involved? *Bioresource Technology*, 102(1), 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.008>
- Tremblay, P. L., & Zhang, T. (2015). Electrifying microbes for the production of chemicals. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00201>
- Zhang, L., Jiang, X., Shen, J., Xu, K., Li, J., Sun, X., ... Wang, L. (2016). Enhanced bioelectrochemical reduction of p-nitrophenols in the cathode of self-driven microbial fuel cells. *RSC Advances*, 6(35), 29072–29079. <https://doi.org/10.1039/c6ra04293g>
- Zhao, Z., Zhang, Y., Quan, X., & Zhao, H. (2016). Evaluation on direct interspecies electron transfer in anaerobic sludge digestion of microbial electrolysis cell. *Bioresource Technology*, 200, 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.021>
- Zhen, G., Kobayashi, T., Lu, X., & Xu, K. (2015). Understanding methane bioelectrosynthesis from carbon dioxide in a two-chamber microbial electrolysis cells (MECs) containing a carbon biocathode. *Bioresource Technology*, 186, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.064>
- Zhou, S., Huang, S., He, J., Li, H., & Zhang, Y. (2016). Electron transfer of *Pseudomonas aeruginosa* CP1 in electrochemical reduction of nitric oxide. *Bioresource Technology*, 218, 1271–1274. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.010>