

Optimització de la immobilització bacteriana per la bio- producció d'hidrogen amb alfa-proteobacteris

Estudiant: Ana Rosa Fleitas García

Grau en Biotecnologia

Correu electrònic: u1934650@campus.udg.edu

Tutor: Lluís Bañeras Vives

Cotutor*:

Empresa / institució: Institut d'Ecologia Aquàtica, Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor*):

Nom del tutor: Lluís Bañeras Vives

Nom del cotutor*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

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

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

Agraïments

Quiero agradecer a Eli y a Lluís por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo, por el apoyo y por todo lo aprendido durante estos meses. También, quiero agradecer a mis padres y a Martí por el apoyo y cariño de siempre, sobre todo durante mi estancia en Girona y la realización de este proyecto.

Índex

Resum	1
Abstract	2
Resumen	3
1. Introducció	4
1.1. Sistemes bioelectroquímics: importància i funcions	5
1.2. Bio-producció d'hidrogen.....	6
1.2.1. Algues i microorganismes fotosintètics	6
1.2.2. Bacteris porpres no del sofre (NPS)	7
1.2.3. Altres bacteris fermentadors	8
1.3. Proteobacteris i la seva importància en sistemes bioelectroquímics	9
1.4. Importància de la immobilització en sistemes bioelectroquímics	9
1.5. Aplicació de la immobilització per la bio-producció d'H ₂ i millora dels sistemes bioelectroquímics.....	10
2. Objectives	12
3. Materials i mètodes	13
3.1. Microorganismes utilitzats i medis de cultiu	13
3.2. Muntatge i funcionament del BES	14
3.3. Anàlisi de la composició dels gasos i del líquid	15
3.4. Seguiment on-line de la concentració d'H ₂	15
3.5. Mètodes d'immobilització	16
3.6. Experiment de producció d'H ₂ i de viabilitat cel·lular	17
3.7. Aspectes ètics i de sostenibilitat	17
4. Resultats i discussió	18
4.1. Anàlisi de les concentracions i produccions d'hidrogen per <i>Rhodobacter sp.</i>	21
4.2. Anàlisi de les concentracions i produccions d'hidrogen per <i>Rhodopseudomonas palustris</i> (aïllat C1S119.2)	23
4.3. Valoracions sobre el muntatge i el funcionament del BES.....	24
4.4. Valoracions sobre la optimització del mètode d'immobilització	24
5. Conclusions	26
Bibliografia	27

Resum

Actualment, ens trobem en un període de transició energètica que té com a ciments la cerca de sistemes d'energia més neta i sostenibles que permetin l'eliminació progressiva de la combustió de compostos fòssils per l'obtenció d'energia, per tal de disminuir les emissions contaminants i d'efecte hivernacle responsables, en gran mesura, del canvi climàtic.

L'hidrogen (H_2) és un combustible lliure de carboni que representa una font d'energia ecològica i renovable i que es pot produir a partir de sistemes bioelectroquímics. Aquests sistemes es basen en l'aprofitament de la capacitat dels microorganismes per dur a terme reaccions d'oxidació-reducció quan se'ls aplica un determinat potencial elèctric i es presenten com una alternativa per tal d'assolir els objectius abans esmentats. Aquests sistemes es poden aprofitar per la producció d'hidrogen utilitzant bacteris que presenten electroquimioactivitat i que, a més, contenen amb els enzims necessaris per la seva producció, característiques que són complertes per la gran majoria de bacteris propers no dels sofre (PNS) i dins d'aquest grup, més específicament, els alfa-proteobacteris.

La immobilització bacteriana serveix per optimitzar les produccions en bio-processos ja que aporta una sèrie d'avantatges en front del treball amb cèl·lules en suspensió: es pot operar en la fase de creixement durant un període de temps més llarg, es necessita menys espai i volum de medi de creixement degut a les cèl·lules es troben concentrades, s'aconsegueix major estabilitat catalítica i resistència a toxines o inhibidors enzimàtics externs. En el cas dels sistemes bioelectroquímics la immobilització bacteriana és important, ja que, a més, permetria disminuir el start-up time, és a dir el temps necessari entre la inoculació dels sistemes i el funcionament a ple rendiment.

En aquest projecte es pretén comprovar l'efectivitat d'un protocol d'immobilització basat en la utilització d'agar, en la producció d' H_2 per part dels alfa-proteobacteris *Rhodobacter sp.* DSM 5864 i l'aïllat C1S119.2 de *Rhodopseudomonas palustris* dins un sistema bio-electroquímic utilitzant un reactor de tipus H, aportant a aquests bacteris electrons i CO_2 com a font de carboni en un medi mineral. En el cas de *Rhodobacter sp.* DSM 5864 es varen aplicar potencials catòdics de -0,4, -0,6 i -0,8V vs SHE (standard hydrogen electrode) i en el cas de l'aïllat C1S119.2 es va fixar un potencial de -0,8V vs SHE. En ambdós casos es va mantenir una temperatura de 30°C i agitació constant. Les concentracions d'hidrogen assolides a la fase líquida del càtode s'han mesurat utilitzant una sonda d'hidrogen i a partir d'aquestes, es van determinar les produccions. Pel que fa a la immobilització, es va usar agar. Es varen realitzar, a més, per a cada experiment, controls sense immobilització del càtode amb agar i amb immobilització del càtode amb agar sense els bacteris. Es va determinar l'activitat redox de *Rhodobacter sp.* DSM 5864 mitjançant voltametria cíclica i la viabilitat de l'aïllat C1S119.2 afegint 1,5 mL de Na-acetat (2,5 mM) a la cambra catòdica en moments puntuals.

Es va concloure que les soques bacterianes utilitzades no són les més adients amb les condicions dels sistemes amb els quals es va treballar. A més, s'ha corroborat que l'agar no és el material més adequat per dur a terme la immobilització perquè impedeix la difusió al medi líquid. A més, s'ha optimitzat el protocol d'immobilització gràcies al mesurament de la densitat òptica dels cultius utilitzats per la immobilització, la utilització de concentracions d'agar de 10 g/L i l'aplicació de la mescla de cèl·lules i agar cobrint el càtode gràcies a una butxaca dissenyada per l'equip de treball.

Resumen

Actualmente, nos encontramos en un período de transición energética que tiene como cimientos la búsqueda de sistemas de energía más limpia y sostenibles que permitan la eliminación progresiva de la combustión de compuestos fósiles para la obtención de energía con el fin de disminuir las emisiones contaminantes y de efecto invernadero responsables, principalmente, del cambio climático.

El hidrógeno (H_2) es un combustible libre de carbono que representa una fuente de energía ecológica y renovable y que se puede producir a partir de sistemas bioelectroquímicos. Estos sistemas se basan en aprovechar la capacidad de los microorganismos para llevar a cabo reacciones de oxidación-reducción cuando se les aplica un potencial eléctrico y se presentan como una alternativa para alcanzar los objetivos antes mencionados. Estos sistemas se pueden aprovechar en la producción de hidrógeno utilizando bacterias que presentan electroquimioactividad y que, además, cuentan con las enzimas necesarias para su producción. Estas características son cumplidas por las bacterias púrpuras no del azufre (PNS) y dentro de este grupo, más específicamente, las alfa-proteobacterias.

La inmovilización bacteriana sirve para la optimización de los bio-procesos ya que aporta una serie de ventajas frente al trabajo con células en suspensión: se puede operar en la fase de crecimiento de las bacterias durante un período de tiempo más largo, se necesita menos espacio y volumen de medio de crecimiento debido a que las células se encuentran concentradas y se consigue una mayor estabilidad catalítica y mayor resistencia a toxinas o inhibidores enzimáticos externos. En el caso de los sistemas bioelectroquímicos la inmovilización bacteriana es importante, ya que, además, permite disminuir el *start-up time*, es decir, el tiempo necesario entre la inoculación del sistema y el funcionamiento para el completo rendimiento.

En este proyecto se pretende comprobar la efectividad de un protocolo de inmovilización bacteriana en la producción de H_2 por parte de las alfa-proteobacterias *Rhodobacter sp.* DSM 5864 y el aislado C1S119.2 de *Rhodopseudomonas palustris* en un sistema bio-electroquímico utilizando un reactor de tipo H, aportando a estas bacterias electrones y CO_2 como fuente de carbono en un medio mineral. En el caso de *Rhodobacter sp.* DSM 5864 se aplicaron potenciales catódicos diferentes: -0,4, -0,6 i -0,8V vs. SHE (standard hydrogen electrode) y en el caso del aislado C1S119.2 se fijó un potencial de -0.8V vs. SHE. En ambos casos se mantuvo una temperatura de 30°C y agitación constante. Las concentraciones de hidrogeno alcanzadas en la fase líquida del cátodo se midieron utilizando una sonda de hidrógeno i a partir de estas, se determinaron las producciones de hidrogeno. Respecto a la inmovilización se utilizó agar. Se realizaron, además, para cada experimento, controles sin inmovilización del cátodo con agar y con inmovilización del cátodo con agar sin las bacterias. Se determinó la actividad redox de *Rhodobacter sp.* DSM 5864 mediante voltametría cíclica y la viabilidad del aislado C1S119.2 agregando 1,5 mL de Na-acetato (2,5 mM) en la cámara catódica en momentos puntuales.

Se concluyó que las sepas bacterianas utilizadas no son las más adecuadas con las condiciones del sistema trabajado. Además, se corroboró que el agar no es el material adecuado para realizar la inmovilización porque impide la difusión al medio. Además, se optimizó el protocolo de inmovilización gracias al hecho de medir la densidad óptica de los cultivos utilizados para la inmovilización, la utilización de concentraciones de agar de 10 g/L y la aplicación de la mezcla de células y agar cubriendo el cátodo gracias al bolsillo diseñado por el equipo de trabajo.

Abstract

Currently, we find ourselves in a period of energy transition based on the search of cleaner and more sustainable energy systems allowing the progressive disuse of fossil compounds' combustion-based systems in order to reduce pollutant emissions and greenhouse gases mainly responsible of the climate change.

Hydrogen (H₂) is a carbon-free fuel representing an ecological and renewable energy source that can be produced from bio-electrochemical systems. These systems take advantage of the capacity of microorganisms to carry out oxidation-reduction reactions when an electric potential is applied, and they are presented as an alternative to achieve the aforementioned objectives. These systems can be exploited in the hydrogen's production using bacteria that have electrochemical activity and that, also, have the enzymes necessary for their production. These characteristics are fulfilled by the purple non-sulfur bacteria (PNS) and within this group, more specifically, the alpha-proteobacteria.

Bacterial immobilization is useful for the optimization of bio-processes since it provides a series of advantages over working with cells in suspension: it can be operated during the growth phase of bacteria for a long time period, it takes less space and volume of growth medium phase due to the fact that the cells are concentrated and a greater catalytic stability and greater resistance to toxins or external enzymatic inhibitors can be achieved. In the case of the bio-electrochemical systems, bacterial immobilization is important because, in addition, it allows to reduce the start-up time that is, the necessary time between the inoculation of the system and the operation of the complete performance.

This project aims to verify the effectiveness of bacterial immobilization protocols in the production of H₂ by the alpha-proteobacteria *Rhodobacter sp.* DSM 5864 and the isolate C1S119.2 of *Rhodopseudomonas palustris* in a bio-electrochemical system using an H-type reactor. To achieve this purpose, bio-electrochemical systems have been implemented by providing these bacteria with electrons and CO₂ as a source of carbon in a mineral medium. For *Rhodobacter sp.* DSM 5864 we have applied potentials of -0,4, -0,6 and -0,8V vs. SHE (standard hydrogen electrode) and in the case of the isolate C1S119.2 we have fixed a potential of -0,8V vs. SHE. In both cases maintaining a temperature of 30°C and in a constant agitation. Hydrogen concentrations achieved in the liquid phase of the cathode were measured using a hydrogen probe and, from these concentrations, we could determine the hydrogen productions. We had used agar for the immobilization. In addition, for each experiment, controls were carried out without immobilization of the cathode with agar and with immobilization of the cathode with agar without the bacteria. It was determined the redox activity of *Rhodobacter sp.* through a cyclic voltammetry and the viability of the isolate C1S119.2 through the addition of 1,5 mL of Na-acetate (2,5 mM) in the cathodic chamber at specific moments.

It was concluded that the bacterial strains used are not the most adequate with the conditions of the system with which we have been working. In addition, it was corroborated that agar isn't a suitable material to perform the immobilization because it prevents the diffusion to the medium. In addition, the immobilization protocol was optimized thanks to the fact of measuring the optical density of the cultures used for the immobilization, the use of agar concentrations of 10 g/L and the application of the mixture of cells and agar covering the cathode thanks to the pocket designed by the team.

1. Introducció

Ens enfrontem a la imminent incapacitat del planeta per absorbir les emissions contaminants i d'efecte hivernacle ocasionades per la combustió de compostos fòssils que ha tingut lloc des de principis del segle XX (D Das, 2002).

Per aquest motiu, ens trobem amb la necessitat de trobar noves fonts d'energia renovables i ecològiques. L'hidrogen (H_2) és un combustible net, lliure de carboni, ja que en cremar-se dona lloc a aigua (Batlle-Vilanova et al., 2015). A més, conté la major font d'energia continguda per unitat de pes (142 kJ/g) (Debabrata Das & Veziroglu, 2008). En l'actualitat, els processos d'obtenció d'hidrogen es basen principalment en la transformació de hidrocarburs fòssils i la hidròlisi o gasificació del carbó. Aquests són processos a gran escala a partir de fonts no renovables on es consumeix una gran quantitat d'energia i es contribueix a l'escalfament global degut a les enormes emissions de diòxid de carboni (CO_2) (Azwar, Hussain, & Abdul-Wahab, 2014).

No obstant això, en els darrers anys s'ha començat a estendre en la comunitat científica un interès creixent per la producció d'hidrogen a partir de sistemes alternatius com són els sistemes electroquímics (Figura 1) i els bioelectroquímics. Aquests primers, tenen com a principi l'electròlisi de l'aigua. Es troben formats per una cubeta o recipient que conté l'electròlit. Els elèctrodes es troben en compartiments separats per una membrana, que permet la difusió dels ions. Quan s'aplica un voltatge les reaccions tenen lloc a la interfase metall-electròlit. Aquests sistemes depenen de la presència de catalitzadors (Choi, Davenport, & Haile, 2019) com poden ser aquells compostos per MoS_2 , grafè, TiO_2 , entre altres compostos (Yang et al., 2016). Els costos de producció d'aquests materials són elevats i es poden usar, de forma general, durant un període curt de temps, a més, moltes vegades, són contaminants.

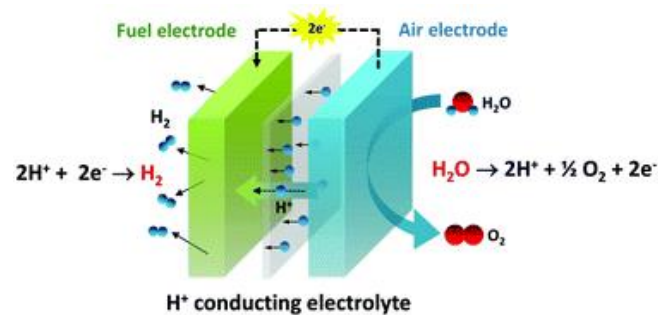


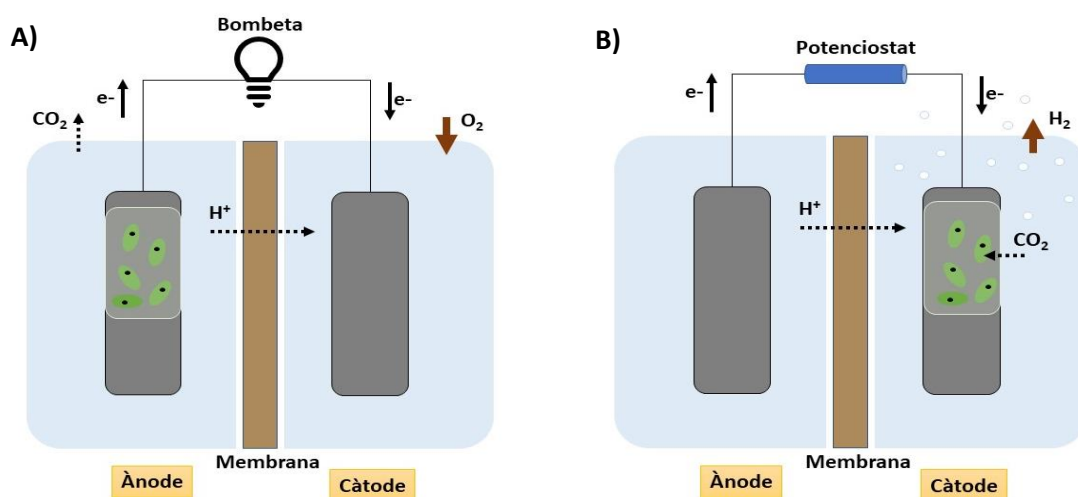
Figura 1: Exemple de funcionament simplificat d'un sistema electro-químic. Extret de: (Choi, Davenport, & Haile, 2019).

En contraposició, els sistemes bioelectroquímics no tenen dependència de l'ús de catalitzadors, es poden mantenir en funcionament durant un període llarg de temps amb un manteniment mínim. A més, presenten un atractiu important: es tracta d'una via de producció sostenible degut a que no és agressiva pel medi ambient, especialment pel que fa a la producció de CO_2 . Per aquest motiu, és interessant cercar mecanismes per potenciar la bio-producció d' H_2 a partir d'aquests sistemes, com poden ser la utilització de tècniques de immobilització microbiana.

1.1 Sistemes bioelectroquímics: importància i funcions

Els sistemes bioelectroquímics (BES) es basen en l'aprofitament de la capacitat dels microorganismes per catalitzar reaccions electroquímiques que involucren una transferència d'electrons com són les reaccions d'oxidació-reducció. Consisteixen en dos elèctrodes, un càtode i un ànode, generalment localitzats en dos compartiments separats per una membrana catiònica o aniònica. Una solució aquosa anomenada electròlit es troba envoltant aquests elèctrodes. Aquest sistema funciona gràcies a l'aportació d'un voltatge a partir d'un potenciostat. La intensitat d'aquest voltatge ve determinada per la termodinàmica de les reaccions (Aguilar-Gonzalez, Buitron, Shimada-Miyasaka, & Mora-Izaguirre, 2016).

Els sistemes bioelectroquímics són útils ja que es poden obtenir diferents productes, a més són sistemes que poden tenir diferents configuracions segons el seus objectius (Figura 2). Mitjançant cel·les de combustibles microbianes (CCM) es pot generar energia elèctrica (Figura 2 A). En aquests sistemes el voltatge, generalment, no es controla i depèn de les reaccions que passen a l'ànode per generar corrent elèctric aprofitable. A partir de cel·les d'electròlisi microbiana (CEM) es poden produir diversos compostos químics inorgànics com, per exemple, l'hidrogen (Figura 2 B). Les cel·les d'electrosíntesi microbiana (CESM) solen usar-se per la síntesi de compostos orgànics (Figura 2 C), i els microorganismes poden trobar-se tant al càtode com a l'ànode. Per últim, les cel·les de dessalinització microbiana (CXM), serveixen per a diferents aplicacions relacionades amb el tractament d'aigües (Figura 2 D). D'aquesta manera, els sistemes bioelectroquímics es poden utilitzar en una àmplia varietat de camps, ja sigui per la bioremediació, generació de corrent elèctric, aprofitament de matèries de rebuig per produir nous productes o l'obtenció de noves fonts d'energia sostenibles.



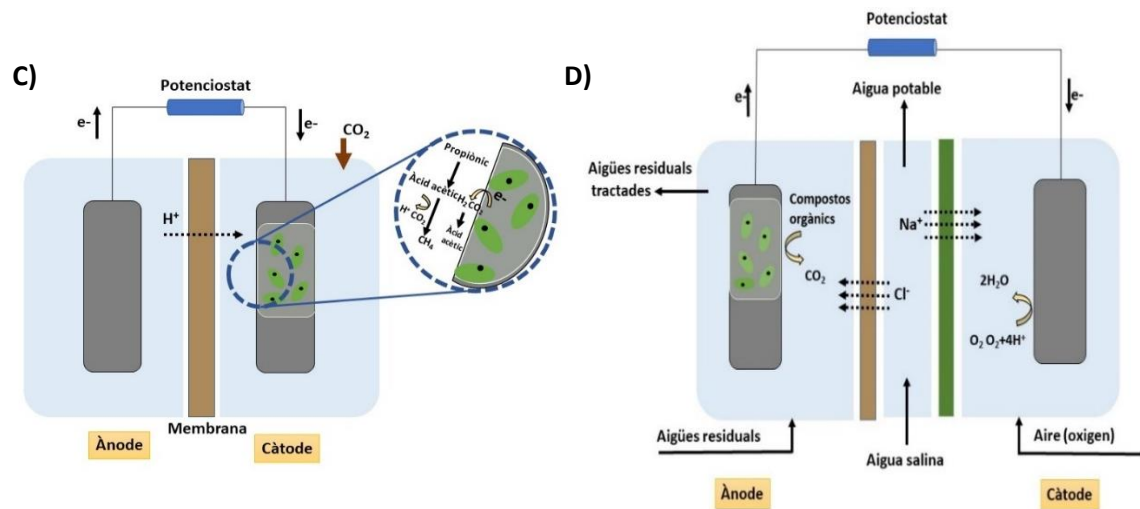


Figura 2: Configuracions dels sistemes bioelectroquímics més usades. A) Esquema d'una cel·la de combustió microbiana. B) Esquema d'una cel·la d'electròlisi microbiana. C) Esquema d'una cel·la d'electrosíntesi microbiana. D) Esquema d'una cel·la de dessalinització microbiana.

Entre les possibilitats més importants d'ús dels sistemes bioelectroquímics es troba l'oxidació de matèria orgànica i l'oxidació de molts altres materials en un bio-ànode per la producció de nous productes. Alguns exemples dels possibles substrat utilitzats són: acetat, cel·lulosa, midó, substàncies de rebuig provinents del consum domèstic o de l'activitat industrial.

La segona possibilitat es troba relacionada amb els bio-càtodes dels sistemes bioelectroquímics. Els microorganismes poden catalitzar moltes reaccions catòdiques com per exemple, la reducció d'oxigen a l'aigua o la reducció de nitrat del nitrogen gas (N₂). Els microorganismes s'utilitzen per tal d'obtenir energies d'activacions més petites (Aguilar-Gonzalez et al., 2016).

1.2 Bio-producció d'hidrogen

Els principals processos mitjançant els quals els microorganismes produeixen hidrogen són la foto-fermentació i la fermentació fosca. També existeixen altres mecanismes que presenten un menor rendiment en la producció d'H₂ com la biofotòlisi (Azwar, Hussain, & Abdul-Wahab, 2014).

1.2.1 Algues i microorganismes fotosintètics

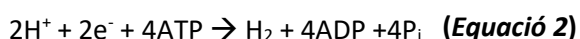
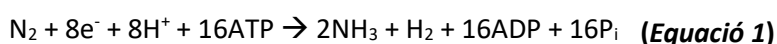
La biofotòlisi de l'aigua pot ser realitzada tant per cianobacteris com per microalgues. No obstant això, aquest procés presenta taxes de producció baixes en condicions de poca il·luminació (Wu et al., 2012).

Les microalgues unicel·lulars, de forma general, utilitzen l'enzim hidrogenasa reversible per dur a terme aquest procés. L'H₂ es produeix a partir de la unió dels electrons del final de la cadena de transport d'electrons, amb un protó enlloc del NADP⁺. Representen una font prometedora de biomassa per la producció d'hidrogen degut a que presenten una taxa de creixement elevada. Algunes algues també poden dur a terme la fermentació fosca, encara que la realitzen principalment bacteris anaeròbics. S'ha confirmat que sota condicions de limitació de nutrients, amb un medi lliure de sofre i en condicions d'anaerobiosi, algunes microalgues com ara *Chlamydomonas reinhardtii* són capaces de produir H₂ de manera sostinguda en el temps (Happe, Molser, & Naber, 1994).

Per altra banda, els cianobacteris, organismes que viuen en condicions aeròbiques, utilitzen principalment les nitrogenases que, de forma secundària a la fixació de nitrogen atmosfèric, catalitzen la reducció de protons i la consegüent producció d'hidrogen en la biofotòlisi de l'aigua. No obstant això, hi ha un consum parcial d'aquest hidrogen catalitzat per una hidrogenasa unidireccional. D'aquesta manera, l'eficàcia de conversió es baixa. Tot i així, els cianobacteris són uns candidats acceptables per la producció fotobiològica d'H₂ degut a que tenen requeriments nutricionals mínims: N₂, CO₂, H₂O com a font d'electrons i d'agent reductor, sals minerals i font d'energia constant provinent de la llum solar. La taxa de producció d'hidrogen es pot incrementar amb tècniques de modificació genètica del bacteri o amb la utilització de co-cultius (Chaparro, 2016).

1.2.2 Bacteris porpres no del sofre (PNS)

Els bacteris porpres no del sofre (PNS) són bacteris fotosintètics ja que capten l'energia de la llum a partir de bacterioclorofil·les i els carotenoides i, són generalment anaerobis. Poden utilitzar tant substàncies orgàniques com inorgàniques (H₂ i sulfurs) com a donadors d'electrons. També són capaços de captar el CO₂ de l'aire o d'una gran diversitat de compostos orgànics que els serveixen de font de carboni com els àcids grassos, sucres, aminoàcids, alcohols, entre d'altres. (Martinez, Veronica & García, 2010). Duen a terme la producció de H₂ mitjançant la foto-fermentació, principalment, igual que els cianobacteris, però en condicions anòxiques. Tenen un metabolisme variat, encara que presenten un millor creixement en presència de llum (condició amb la que les nitrogenases presenten major activitat), amb un medi ric en substrats orgànics. La producció d'H₂ a partir de la foto-fermentació, per part d'aquests bacteris, es realitza durant la fixació de N₂ a través de dues vies diferents (Larimer et al., 2004). La primera té lloc en un medi amb saturació de N₂ (*Equació 1*) (Koku, Erolu, Gunduz, Yucel, & Turker, 2002). Mentre, la segona, s'activa en presència de baixes concentracions de N₂ o NH₃ (*Equació 2*) (Akkerman, Janssen, Rocha, & Wij, 2002).



Així doncs, aquests bacteris, representen una important font de biomassa per la producció d'hidrogen a partir de sistemes bioelectroquímics, ja que és possible cultivar aquests bacteris fàcilment, en condicions d'anaerobiosi, amb llum i amb limitació de N₂ i NH₃. A més, els foto-fermentadors consumeixen un mínim de recursos no renovables. No obstant això, la producció de gas en relació a l'energia lluminosa proporcionada és baixa, per tant, cal una exposició continuada a la llum (Martinez, Veronica & García, 2010).

Els bacteris porpres no del sofre es distribueixen entre α -proteobacteris i β -proteobacteris. Dins d'aquesta darrera classe, es troba el gènere Burholderiales, dins del qual es troben aquells β -proteobacteris amb la capacitat de produir hidrogen com, per exemple, *Herbaspirillum seropedicae* (Fu & Burris, 1989) i també es troba el gènere *Rhodocyclus* (Richaud, Vignais, Colbeau, Uffen, & Cauvin, 1991), com per exemple, *Rhodocyclus purpureus*, que també presenten aquesta capacitat. Alguns exemples de α -proteobacteris productors d'H₂ a partir de la foto-fermentació són: *Rhodopseudomonas sp.*, *Rhodobacter sp.* i *Rhodospirillum sp.* En molts processos de foto-fermentació s'ha utilitzat *Rhodobacter sp.*, obtenint com a taxes de producció

destacables valors entre els 0,009 i els 0,008 L d'H₂/h/L substrat. (Bedoya, Ramírez, Vásquez, Castrillón, & Arias, 2007).

Alguns d'aquests α -proteobacteris són molt sensibles a concentracions baixes d'oxigen mentre que altres el toleren. Alguns es poden desenvolupar en condicions aeròbiques i de foscor i altres poden presentar un creixement en condicions anaeròbiques i de foscor duent a terme fermentació i, tal vegada, duent a terme un creixement dependent d'oxidació (Imhoff J.F., 2006). Presenten un metabolisme variat i flexible (Figura 3), encara que presenten un millor creixement, en general, amb condicions de fotoorganoheterotrofia. Tot i això, algunes espècies poden créixer fotolitotròficament amb hidrogen molecular, sulfur o tiosulfat com a donador d'electrons. També poden presentar un creixement quimiotròfic en condicions que van des de micro-òxiques fins a òxiques en condicions de foscor.

Rhodospseudomonas palustris és un α -proteobacteri que presenta gens estructurals que codifiquen per 3 nitrogenases diferents: nitrogenasa dependent de molibdè (es troba a tots els bacteris fixadors de nitrogen), nitrogenasa dependent de vanadi i una ferro nitrogenasa alternativa. Aquests bacteris presenten una capacitat prometedora per a la producció d'hidrogen gràcies a la seva elevada conversió de substrat, la manca de generació d'oxigen durant la seva activitat i la facilitat per usar una ampla longitud d'ona per la foto-fermentació (Larimer et al., 2004).

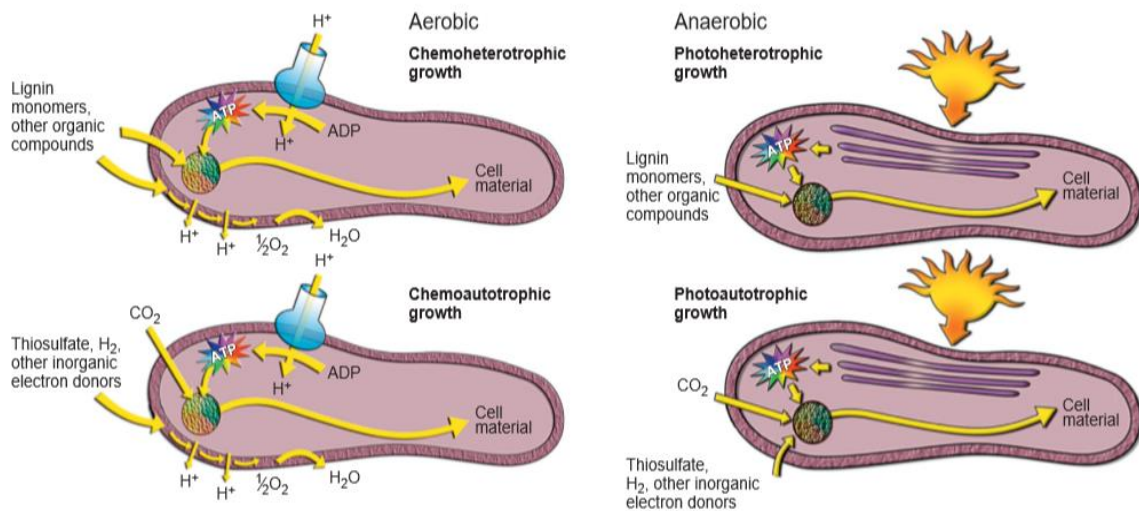


Figura 3: Representació de les quatre tipologies de metabolismes en *Rhodospseudomonas palustris*. Extret de: Larimer et al., 2014

1.2.3 Altres bacteris fermentadors

La fermentació fosca és un procés complex que té lloc en dos etapes diferents i que es produeix independentment de la llum. Primerament, succeeix la hidròlisi enzimàtica de compostos orgànics com ara els carbohidrats, les proteïnes o els lípids a compostos orgànics simples com són sucres, aminoàcids i àcids orgànics. Durant la segona fase es produeix la reducció d'aquests darrers compostos a àcids grassos volàtils, CO_2 i H_2 . No obstant això, les taxes de producció d' H_2 a partir d'aquest procés són baixes. Alguns bacteris del gènere *Clostridium*, com per exemple *Clostridium buytricum* i *Clostridium thermolacticum*, tenen la capacitat de realitzar aquesta fermentació fosca, reduint compostos orgànics a H_2 i CO_2 en condicions de foscor, anòxiques i pH neutre (Porwal et al., 2008). És imprescindible el control del pH, l' O_2 i el substrat orgànic, fet

que dificulta el seu cultiu. Altres bacteris capaços de realitzar la fermentació fosca i de produir H_2 a través de les vies àcid mixta i la 2-3 butanodiòlica són els pertanyents als enterobacteris (Martinez, Veronica & García, 2010) (Bedoya et al., 2007).

1.3 Proteobacteris i la seva importància en sistemes bioelectroquímics

Els proteobacteris són bacteris gram-negatius que presenten un metabolisme variat (Figura 4), com anteriorment s'ha explicat. La majoria són anaeròbics facultatius o heteròtrofs obligats, però hi ha excepcions. Molts d'ells, també, són responsables de la fixació de N_2 . Hi ha dos grups de proteobacteris que es caracteritzen per realitzar la fotosíntesi. Per una banda, es troben els bacteris vermells del sofre que utilitzen el sofre o sulfur d'hidrogen com a donador d'electrons. Per l'altra, es troben els bacteris vermells no del sofre, que utilitzen l'hidrogen com a font d'electrons (Kerstens K. et al, 2016).

Els proteobacteris són utilitzats en sistemes bioelectroquímics degut a la seva electroquímioactivitat. Proteobacteris del gènere *Desulfovibrio* són un exemple d'aquesta afirmació com és el cas de *Desulfovibrio paquesii*. Aulenta i col·laboradors van demostrar que per a la producció d'hidrogen a partir de matèria orgànica (lactat i sulfat) es podia aprofitar l'activitat d'aquest bacteri, inoculat en una cambra catòdica aplicant potencials de $-0,9\text{ V vs. SHE}$ (Aulenta et al., 2012).

Encara i així, existeixen altres microorganismes que presenten electroquímioactivitat com són alguns del fílum Firmicutes. Per exemple, *Sporomusa ovata* és un bacteri que no utilitza nitrat ni sulfat com a acceptor d'electrons i utilitza la matèria orgànica com a substrat per tal de dur a terme la fermentació d'hidrogen molecular fins a acetat (Möller, Oßmer, Howard, Gottschalk, & Hippe, 1984). Aquesta ruta és aprofitada pel bacteri per rebre els electrons que li aporta el sistema bio-electroquímic, ja que té una gran afinitat pel càtode. (Aryal, Tremblay, Lizak, & Zhang, 2017).

Aquests microorganismes electroquímicament actius es poden trobar en co-cultiu dins d'una de les cambres del sistema bio-electroquímic. Aquests ús de co-cultius és útil, ja que es poden generar productes d'interès a partir de la coexistència dels diferents processos duts a terme per part dels bacteris, amb la producció d'hidrogen com a pas intermediari. Un exemple és la presència de *Rhodobacter sp*, proteobacteri capaç de produir H_2 a partir de la reducció de protons i que és capaç de formar un biofilm a l'elèctrode, i *Clostridium sp*, que es troba preferiblement a la fase líquida i que és capaç de reduir el CO_2 a àcids orgànics i alcohols. Aquests bacteris es poden trobar coexistent a la cambra catòdica d'un sistema bio-electroquímic, al qual s'apliquen potencials entre $-0,8\text{ V vs. SHE}$ (Puig et al., 2017). Altres estudis també han detectat la presència de proteobacteris com *Desulfovibrio sp*. a la cambra catòdica on probablement facilitaven la producció d'hidrogen mitjançada bioelèctricament com a pas intermediari per a la metanogènesi per part de *Methanobacterium sp* (Perona-Vico, Blasco-Gómez, Colprim, Puig, & Bañeras, 2019).

1.4 Importància de la immobilització en sistemes bioelectroquímics

La immobilització de cèl·lules bacterianes es presenta com a una alternativa per l'optimització

dels bio-processos degut a que aporta una sèrie d'avantatges en relació a l'ús de les cèl·lules bacterianes en suspensió dins del bioreactor. Entre els més importants es troba la possibilitat d'operar en fase de creixement durant un període més llarg de temps, la necessitat de menys espai i volum de medi de creixement ja que s'aconsegueix una elevada concentració de cèl·lules per unitat del volum del bioreactor, el fet de que les reaccions presenten una major estabilitat catalítica i, la major resistència a toxines o inhibidors enzimàtics externs en les cèl·lules immobilitzades. Tot i així, hi ha una sèrie de requisits que han de superar els materials destinats a la immobilització bacteriana com per exemple, han de ser materials que siguin d'un baix cost de producció, no han de ser degradables i han de suportar les condicions de pH i temperatura a les quals es troba el sistema (Osuna-castro, Villavelazquez, & Escalante-minakata, 2011).

Quan es treballa amb sistemes bioelectroquímics és interessant reduir al màxim el temps necessari perquè es desenvolupi la funció desitjada, és a dir, el *start-up time*. Aquest, es relaciona directament amb el temps necessari per la formació de biofilm i l'inici de l'activitat bacteriana després de la inoculació. La combinació d'un seguit de variables, com les característiques de l'inòcul, els paràmetres d'operació del sistema i l'arquitectura del sistema condiciona la durada del *start-up time* (Boghani, Kim, Dinsdale, Guwy, & Premier, 2013).

El *start-up time* treballant tant amb cultius purs com amb cultius mixts es pot disminuir amb tècniques d'immobilització bacteriana.

Quan es treballa amb cultius mixts es produeix una compartimentalització entre el biofilm format sobre l'elèctrode i el bulk que, com s'ha exemplificat a l'apartat 1.3, consisteix en la coexistència dels processos duts a terme per diferents bacteris que es troben al biofilm i a la fase líquida en una de les cambres. Encara que l'ús de cultius purs és útil per l'estudi fonamental de les característiques de les soques, en sistemes bioelectroquímics, l'ús de cultius mixts ofereix una major eficàcia en quant a produccions. Això és degut a que els consorcis microbians que contenen diferents soques proporcionen una major estabilitat que no pas l'ús d'una única soca en el sistema i al mateix temps versatilitat i flexibilitat, característiques que es poden aprofitar en casos reals en els que no es compleixen unes condicions d'esterilitat mínimes. Les tècniques d'immobilització bacteriana potencien l'activitat dels diferents tipus bacterians que coexisteixen ja que faciliten el fenomen de compartimentalització (Kumar et al., 2017).

1.5 Aplicació de la immobilització per la bio-producció d'H₂ i millora del sistemes bioelectroquímics

Al llarg dels anys s'han estudiat diferents tècniques i materials d'immobilització bacteriana per tal de potenciar la producció d'hidrogen. Yokoi i col·laboradors van estudiar la producció d'hidrogen a partir d'un bioreactor en continu immobilitzant *Clostridium butyricum*, del filum Firmicutes, en un gel d'agar. També van dur a terme la seva immobilització en perles de vidre porós de 2 mm de diàmetre i amb una mida de porus entre els 60 i 300 µm. Els resultats mostraven que el vidre porós permet l'arribada del substrat fins la cèl·lula i la sortida dels gasos produïts amb més facilitat. En contrast, el gel d'agar sura en la superfície, els substrats no arriben fàcilment al bacteri ni s'evacuen correctament els gasos produïts. A més, amb el bacteri immobilitzat en agar obtenien una taxa de producció inferior a la obtinguda amb el bacteri lliure (Yokoi, Maeda, Hirose, Hayashi, & Takasaki, 1997).

Emanuelsson i col·laboradors van estudiar la producció d'hidrogen a partir de la immobilització de bacteris presents en fang procedent d'aigües residuals usant un bioreactor en continu en condicions anaeròbies. Per la immobilització bacteriana van usar gel de silicona (1:5) que contenia les cèl·lules presents al fang mesclades amb pols de carbó actiu. Els millors resultats els van obtenir en condicions amb un menor temps de retenció hidràulic i altes concentracions de sucrosa (producció volumètrica d'H₂ 14,5-15,1 L d'H₂/h/L de substrat) (Emanuelsson, 1996).

Diversos autors han estudiat la producció d'H₂ per part de bacteris fotosintètics usant diferents mètodes de immobilització. Per exemple, Zang i col·laboradors van avaluar les taxes de producció usant un reactor en *batch* i immobilitzant els bacteris en grànuls d'alginat. Quan treballaven amb una mida de porus dels grànuls d'entre 1 i 1,5 mm i 1-3 mg de cèl·lules/mL cèl·lules (72-96 hores de cultiu previ) s'obtenien unes majors taxes de producció d'H₂ (Zhang et al., 2017). D'altra banda, Fibler i col·laboradors van analitzar la producció d'hidrogen a partir de compostos aromàtics usant l'alfa-proteobacteri *Rhodopseudomonas palustris* immobilitzat en diferents materials polimèrics (agar, agarosa, k-carragenina i gel d'alginat sòdic) utilitzant un reactor en *batch*. Amb les matrius d'agar, agarosa i k-carragenina van obtenir una producció d'hidrogen inferior que la que es produïa amb les cèl·lules lliures en el líquid. Amb la matriu d'alginat sòdic van poder obtenir una taxa superior que les obtingudes amb les cèl·lules en suspensió (Fibler, GW, & F, 1995). Així, l'alginat de sodi es presenta com un material candidat per realitzar la immobilització.

Les tècniques d'immobilització també s'han utilitzat per tal d'aportar millores en la producció de diferents compostos utilitzant sistemes bioelectroquímics. Un exemple és el treball dut a terme per Le Ouay i col·laboradors, que van estudiar la producció d'H₂ usant *E.coli* immobilitzat en un bio-ànode. Com a material d'immobilització van dissenyar un hidrogel de sílice i carboni, material que permetia el pas dels electrons i l'hidrogen i el manteniment de la viabilitat de les cèl·lules durant un període de temps de 14 dies (Le Ouay, Coradin, & Laberty-Robert, 2013). Una altre aproximació usant una cel·la de combustió microbiana va permetre la immobilització en el bio-ànode de l'eubacteri *Shewanella algae* DSMZ 9167 en un hidrogel conductor compostat per alginat, polyanilina, TiO₂ i grafit. Usant aquest hidrogel, que permetia el pas d'electrons del bacteri a l'elèctrode, es va poder augmentar l'estabilitat de la cel·la de combustió microbiana (Szöllősi et al., 2017). També en un bio-ànode, s'ha aconseguit immobilitzar el proteobacteri *Geobacter sulfurreducens* en una matriu conductora formada per alginat i nanotúbuls de carboni. En aquestes condicions es va poder comparar l'ús de perles i de càpsula. L'ús d'aquest hidrogel va permetre augmentar la conductivitat dels materials i per tant, l'intercanvi d'electrons. Aquests hidrogels són útils per fomentar la compartimentalització de biofilms dins d'una de les cambres del sistema bio-electroquímic. Aquesta estratègia facilita la nutrició dels microorganismes, fent-la més eficient, i facilita l'eliminació de subproductes resultants de l'activitat electroquímica dels bacteris (Mottet et al., 2018).

2. Objectives

In this work, from the Molecular Microbial Ecology group of the UdG, that works in collaboration with the LEQUiA in the European project BioReCO₂ver, it is intended to produce hydrogen utilizing a bio-electrochemical system at laboratory conditions. Reactors were operated at a temperature of 30°C, atmospheric pressure, without light and under anaerobic conditions. The bacteria were immobilized in the cathode in direct contact with the electrode therefore enhancing direct electron transfer between electrode and cells. The purpose was to make use of these electrons to stimulate and modify the metabolism of the microorganisms in order to optimize the production of hydrogen above the abiotic electrochemical reaction.

Specifically, the aims of this work were:

1. To develop a lab-scale setup to test for the effectiveness of immobilization protocols in the H₂ production using a bioelectrochemical system. Setup includes H₂-sensing, H-type reactor, and cell immobilization.
2. To test for the reliability of the developed set-up for the example of strains *Rhodopseudomonas palustris* isolate C1S119.2 and *Rhodobacter sp.* DSM 5864.

3. Materials i mètodes

3.1 Microorganismes utilitzats i medis de cultiu

Pel desenvolupament d'aquest treball s'han emprat dues espècies bacterianes del grup dels α -proteobacteris: *Rhodobacter* sp. DSM 5864 obtingut de DSMZ (<https://dsmz.de/>) i un aïllat obtingut anteriorment pel grup de recerca d'Ecologia Microbiana Molecular a partir de mostres d'un sistema bio-electroquímic desnitrificant identificat com a C1S119.2 (Vilar-Sanz et al., 2018). L'aïllat C1S119.2 presenta una seqüència del gen 16S rRNA 100% igual a la de *Rhodopseudomonas palustris* DBNRh25 (KJ776425). L'elecció d'aquest aïllat es va fer tenint en compte que en experiments anteriors realitzats per Vilar-Sanz i col·laboradors, es va detectar mitjançant voltametria cíclica un elevat potencial per a la producció d'hidrogen (Vilar-Sanz et al., 2018).

Ambos bacteris es varen cultivar en medi líquid DSM 27, per tal d'afavorir el seu creixement. La composició d'aquest medi per un total de 1000 mL és la següent: 0,3 g d'extracte de llevat; 1 g de Na₂-succinat · 6 H₂O, 0,5 g de (NH₄)-acetat; 5 mL de solució de citrat Fe (III) (0,1% en H₂O); 0,5 g de KH₂PO₄; 0,4 g de NH₄Cl; 0,05 g de CaCl₂ · 2H₂O; 0,02 mL de solució de vitamina B₁₂ (10 mg en 100 mL de H₂O); 0,1 mL de solució d'elements traça SL-6; 0,3 g de clorur de L-cisteïna i 0,05 mL de resazurin (0,1%). Les dues soques es van mantenir en aquest medi de cultiu en un incubador (Sanyo, MIR-253) a 25°C i amb llum fluorescent constant amb una potència de 15 W (LUMIX Cool Daylight, Germany).

Per omplir les cambres anòdica i catòdica dels sistemes bioelectroquímics es va treballar amb medi líquid DSM 27 contenint només les sals minerals, les vitamines i la solució de metalls. Per tant, la seva composició per un volum de 1000 mL és la següent: 5 mL de solució de citrat Fe (III) (0,1% en H₂O); 0,5 g de KH₂PO₄; 0,4 g de NH₄Cl; 0,05 g de CaCl₂ · 2H₂O; 0,02 mL de solució de vitamina B₁₂ (10 mg en 100 mL de H₂O); 0,1 mL de solució d'elements traça SL-6; 0,3 g de clorur de L-cisteïna i 0,05 mL de resazurin (0,1%).

Totes les manipulacions es van dur a terme en condicions estrictament anaeròbiques en una cambra d'anaerobis (Coy laboratory products. Inc.) amb una composició de gasos de 5% CO₂, 5% H₂ i 90% N₂. El manteniment dels cultius es realitzava quan a les ampolles s'observava una major terbolesa i formació de biofilm. Consistia en transferir volums dels cultius crescuts a nous medis líquids DSM 27 prèviament desgasificats. Els cultius més antics i crescuts es passaven per l'autoclau i posteriorment es rebutjaven.

3.2 Muntatge i funcionament del BES

Pels experiments d'aquest treball es va utilitzar un sistema bio-electroquímic (BES) de tipus H (H-type). Aquests sistemes es caracteritzen per trobar-se formats per dues cambres, separades per una membrana, en cadascuna de les quals es posiciona un dels elèctrodes: ànode i càtode.

En el sistema es va utilitzar com a electròlit medi DSM 27 que contenia només les sals inorgàniques, les vitamines i la solució de metalls, com s'ha explicat anteriorment, i que havia estat prèviament desgasificat amb He per tal de mantenir les condicions d'anaerobiosi, ja que

l'He és un gas noble que no interacciona amb altres elements. S'utilitza aquest gas enlloc de nitrogen (N_2) per tal de poder activar les nitrogenases presents a la via de producció d'hidrogen ja que aquestes, només duen a terme aquesta funció en baixes concentracions d' N_2 . Ambdues cambres contenen un volum de treball de 155 mL d'electròlit i la resta de volum (aproximadament 5 mL) corresponien a la cambra de gas. Les dues cambres estaven separades per una membrana bipolar semipermeable (FUMATECH BWT GmbH). La cambra anòdica contenia una barra de grafit (5X250 mm, MERSEN IBERICA, Espanya) usada com a ànode. A més, en aquest compartiment es van inserir dues agulles amb una vàlvula a la part superior, per tal de poder afegir o treure medi en cas que fos necessari. La cambra catòdica contenia una làmina de *carbon cloth* (NuVant's ELAT LT2400W, FuelCellsEtc, USA) amb una superfície total de 24 cm^2 , connectat a un cable d'acer inoxidable. L'elèctrode de referència d'Ag/AgCl (+0,197 V vs. SHE, sat KCl, SE11 Sensortechnik Meinsberg, Germany) també es va situar en aquesta cambra, a més de contenir un sensor d'hidrogen (NP-500, Unisense, Dinamarca) que permetia monitoritzar-ne les concentracions mitjançant el software SensorTrace Suite v3.1.150 (Unisense, Dinamarca). Per tal de bombollear el medi periòdicament així com afegir o treure volum de medi d'aquesta cambra es van incloure dues agulles amb vàlvula a la part superior de la cambra. Un potenciostat (BioLogic, Model VSP, France) es trobava connectat al càtode a través del cable d'acer inoxidable i també a la secció que sobresortia de l'ànode, de manera que tenia lloc el flux d'electrons des de l'ànode cap al càtode al aplicar potencials d'entre -0,4 fins a -0,8V vs. SHE, segons fos necessari. El monitoratge de la intensitat de corrent respecte el temps es va dur a terme a partir del software EC-Lab v10.31 (Bio-Logic Science Instruments, França) (Figura 5).

En aquest sistema es va treballar a pressió atmosfèrica i la temperatura es va mantenir a uns $30 \pm 2^\circ\text{C}$ controlant-la mitjançant un bany termòstat (PolyScience, Afora S.A.). Es va prevenir l'entrada de llum dins les cambres anòdica i catòdica cobrint-les amb paper d'alumini. A més, es va mantenir el medi de la cambra catòdica en agitació constant.

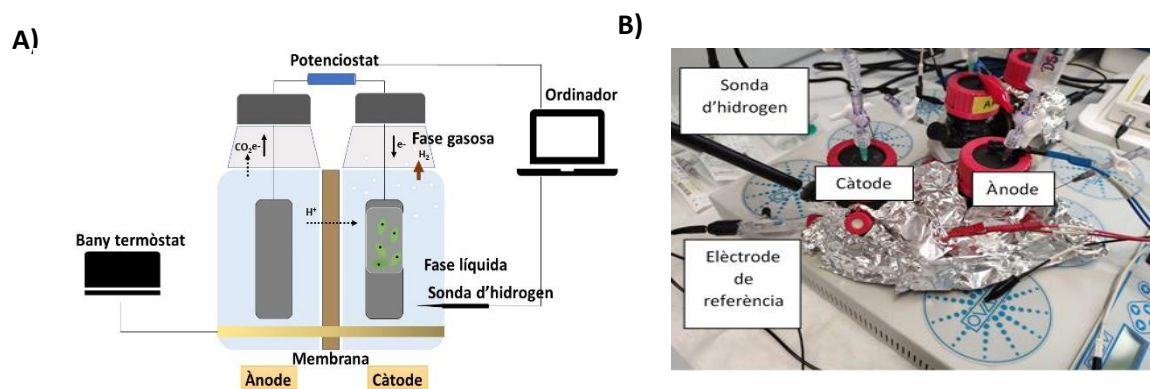


Figura 5: A) Esquema del sistema bioelectroquímic emprat amb les parts més importants senyalitzades. B) Fotografia del sistema bio-electroquímic utilitzat. Es mostren els noms de les parts més rellevants.

3.3 Anàlisi de la composició de gasos i líquids

Per a monitoritzar els experiments, es prenen mostres tant de la fase líquida com de la gasosa únicament de la cambra catòdica. Cada cop que es prenia una mostra de la fase líquida s'afegia un volum equivalent a la mostra extreta de medi DSM27 modificat, prèviament desgasificat amb He, per tal de mantenir el volum de la cambra catòdica constant. Després, es bombollevava amb

CO₂. La composició dels gasos (CO₂, CH₄, H₂ i CO) continguts per la cambra catòdica es va monitoritzar mitjançant cromatografia de gasos utilitzant un cromatògraf de gasos (GC) Agilent 7890A (Agilent Technologies, USA). La presència o absència d'àcids grassos volàtils i alcohols (com l'acetat i l'etanol) es va analitzar emprant el mateix cromatògraf.

Per la preparació de les mostres destinades a la cromatografia de líquids es prenia un volum de 5 mL del líquid i es filtrava amb un filtre de porus 22 µm. Del filtrat se n'usaven 1,5 mL per preparar un vial on s'afegien 100 µL d'àcid fosfòric i 85 µL d'àcid catiònic. La resta del volum s'emprava per mesurar el pH. Les mostres gasoses, d'aproximadament uns 5 mL, es preniën directament de la fase gasosa, i es transferien a un Vacutainer®.

3.4 Seguiment on-line de la concentració d'H₂

Com s'ha comentat prèviament, la concentració d'hidrogen en la fase líquida de la cambra catòdica es va mesurar emprant un microsensor. El monitoratge es va realitzar usant el software SensorTrace Basic. El sensor té un límit de detecció proper als 0,02% d'hidrogen (0,1 µM en aigua). Prèviament a la presa de dades, es duia a terme la polarització del sensor d'hidrogen a +1000 mV i s'espera fins que el senyal s'estabilitzi entre els 0-50 picoampers. Un cop assolits aquests valors, es pot procedir a la calibració de la sonda a partir de la realització d'una recta de regressió amb dos punts. Primerament es mesura el senyal rebut en condicions sense hidrogen submergint el sensor en aigua destil·lada i després es mesura el senyal rebut submergint el sensor en aigua destil·lada bombollejada amb una mescla de gasos que contenia hidrogen (80% CO₂ i 20% H₂). Una vegada realitzada la calibració de la sonda es podia començar a prendre mesures de les concentracions d'hidrogen mentre s'operaven els sistemes. A una pressió parcial atmosfèrica d'H₂ a una temperatura de 30°C, la concentració d'hidrogen a saturació és de 762,05 µmol/L.

3.5 Mètodes d'immobilització

Es va utilitzar agar (Liofilchem s.r.l. BACTERIOLOGY PRODUCTIS, Itàlia) com a material per dur a terme la immobilització del càtode. Segons el tipus d'experiment es va realitzar només immobilització del càtode amb agar o immobilització de cèl·lules amb agar al càtode. En aquest darrer cas (Figura 6 A) és necessari el tractament de les cèl·lules com a pas previ per tal d'obtenir la concentració cel·lular adequada i preparar-les per les condicions del medi DSM 27 utilitzat al sistema, comentat a l'apartat 3.1.

Per a la preparació de les cèl·lules primerament, es va mesurar la densitat òptica a 600 nm del cultiu emprat en cada cas (aïllat C2S119.2 i *Rhodobacter* sp. DSM 5864) que s'havien mantingut en medi DSM 27, 25 °C i il·luminació constant. Es van seleccionar els cultius amb densitats òptiques en un rang d'entre 1,2 i 1,4 UA a 600 nm. El nombre de cèl·lules es va estimar a partir de la relació següent:

$$\text{nombre de cèl·lules} = \frac{1,2 \text{ UA} \times 1 \cdot 10^8}{0,2} = 6 \cdot 10^8 \text{ cèl·lules}$$

D'aquestes suspensions de cèl·lules, una vegada mesurada la densitat òptica, es realitzava la centrifugació de 40 mL del medi crescut durant 15 min a 4400 rpm i 4°C. Posteriorment, s'eliminava el sobrenedant i el pellet es resuspenia amb 1 mL de medi DSM 27 inorgànic (contenint només les sals inorgàniques, les vitamines i la solució de metalls), sota un flux constant d'He, obtenint un volum final de 4 mL d'inòcul. En cas de treballar amb l'aïllat C2S119.2 es preparaven 10 mL d'agar fos al 10%, mentre que amb *Rhodobacter* sp. DSM 5864 es preparaven 10 mL d'agar al 30%. Aquests volums d'agar es mantenien en un bany fins al moment de l'aplicació i, posteriorment, es mesclava amb l'inòcul.

L'aplicació de l'agar, ja sigui amb les cèl·lules o sense en el *carbon cloth* es va realitzar seguint dues metodologies diferents. La primera consistia en l'aplicació sobre el *carbon cloth* utilitzant una xeringa. D'aquesta manera l'agar formava una capa fina sobre el càtode fins que gelificava. La segona metodologia (Figura 6 B) consistia en la mescla dins d'una butxaca dins la qual es col·locava prèviament, el *carbon cloth* i, després s'abocava l'agar o la mescla d'agar i cèl·lules. Amb aquesta metodologia es cobria tot el càtode amb una capa d'agar uniforme que no es despenya d'uns 1,5 mm d'amplada, aproximadament.

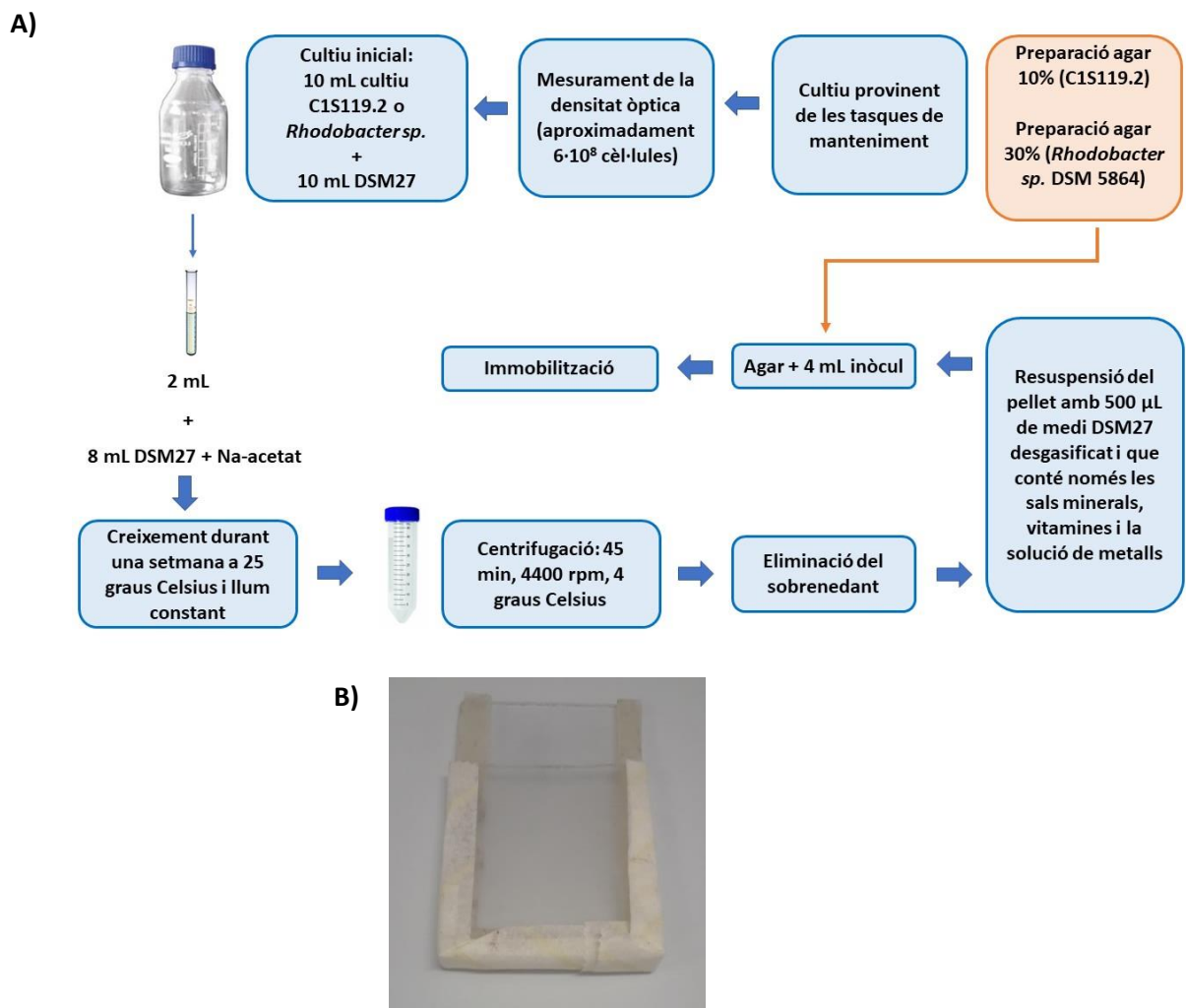


Figura 6: A) Esquema dels passos duts a terme per la immobilització dels bacteris al càtode utilitzant agar com a material i B) Butxaca dissenyada per l'equip de treball per tal de realitzar l'aplicació de la mescla d'agar i cèl·lules recobrint el carbon cloth.

3.6 Experiments de producció d'H₂ i viabilitat cel·lular

Usant *Rhodobacter* sp. DSM 5864, es van realitzar dues rèpliques on els experiments es dividien en: control abiòtic sense material de immobilització, control abiòtic juntament amb la immobilització i experiment biòtic amb immobilització. Tots ells van tenir una durada de 9 hores passant per tres potencials catòdics diferents (-0,4, -0,6 i -0,8V vs. SHE). D'altra banda, es va realitzar un experiment biòtic immobilitzant les cèl·lules bacterianes amb un temps d'operació més llarg (24 hores pels controls amb i sense material de immobilització i, 360 hores pel biòtic).

En canvi, amb l'aïllat C1S119.2 l'experimental es va dividir en dos blocs en els quals es van realitzar els mateixos tests (abiòtic, abiòtic immobilitzat i biòtic immobilitzat). En el primer bloc, les immobilitzacions es van realitzar mitjançant una xeringa per tal d'aplicar la mescla agar-bacteris sobre l'elèctrode, mentre que en el segon s'usava una butxaca com a suport per a la mescla. Els controls abiòtics van tenir una durada de 24 hores mentre que els experiments biòtics es van operar durant 240 -300 hores (primer i segon bloc, respectivament). El potencial es va fixar a -0,8 V vs. SHE. Les taxes de producció d'hidrogen, en tots els casos, es van calcular a partir les pendents de les corbes que representen la velocitat de producció d'hidrogen.

Per tal de comprovar la viabilitat cel·lular durant els experiments biòtics en els quals els bacteris es trobaven immobilitats amb agar al càtode, es va afegir 1,5 mL de Na-acetat (2,5 mM) a la cambra catòdica en moments puntuals (només mentre s'usava l'aïllat C1S119.2). Es va analitzar el comportament del bacteri a partir de les concentracions d'hidrogen recollides a través del sensor. També es va analitzar la presència de l'acetat a partir de l'anàlisi per cromatografia, com s'ha comentat anteriorment, amb mostres líquides.

3.7 Aspectes ètics i de sostenibilitat

Aquest projecte no involucra la utilització de cap tipus d'organisme modificat genèticament ni cèl·lules humanes, ni avarca proves clíniques o pre-clíniques. Per tant no hi ha aspectes explícits que puguin ser considerats èticament negatius. No obstant això, la memòria del TFG compleix amb els aspectes ètics acadèmics degut a que s'ajusta a la Llei 1/1996, de 12 d'abril, article 32, ja que correspon a un treball original amb la informació extreta de treballs d'altres autors correctament citada.

Els criteris de sostenibilitat varen ser complerts ja que durant el desenvolupament experimental del treball es varen prendre mesures per minimitzar els residus ocasionats a partir de la gestió correcta del material de laboratori: tot el material que podia ser reutilitzable es va reciclar i els materials amb vida limitada i residus generats es varen abocar correctament.

Aquest treball s'enfoca en l'ús potencial de l'hidrogen com a font d'energia neta i sostenible, que pot ser útil en quant a la reducció de les emissions de CO₂ ocasionades per la combustió de compostos fòssils per generar energia i que afecten pejorativament a l'escalfament global. De forma més general, l'aprofitament d'algues i de bacteris capaços de produir hidrogen a partir de residus orgànics i utilitzant energia lluminosa en sistemes bioelectroquímics és molt atractiu en quant a l'obtenció de fonts d'energia no agressives pel medi ambient i renovables. No obstant això, és necessari l'estudi de la viabilitat econòmica dels sistemes bioelectroquímics en quant a les produccions d'hidrogen o dels altres productes per poder aplicar-los a gran escala.

4. Resultats i discussió

4.1 Concentracions i produccions d'hidrogen amb *Rhodobacter sp.* DSM 5864

En aquest apartat es mostren els resultats obtinguts per a dues rèpliques que corresponen a experiments a curt termini realitzats amb l'objectiu d'analitzar l'evolució del sistema fins a 9 hores de funcionament amb les condicions abans esmentades (Materials i Mètodes) durant la producció d'hidrogen usant *Rhodobacter sp.* DSM 5864 immobilitzat al càtode i també durant els experiments abiòtics (Figura 7) i les seves respectives voltametries cícliques (Figura 8). També es mostren els resultats obtinguts per un experiment biòtic a llarg termini amb els seus respectius controls (Figura 9).

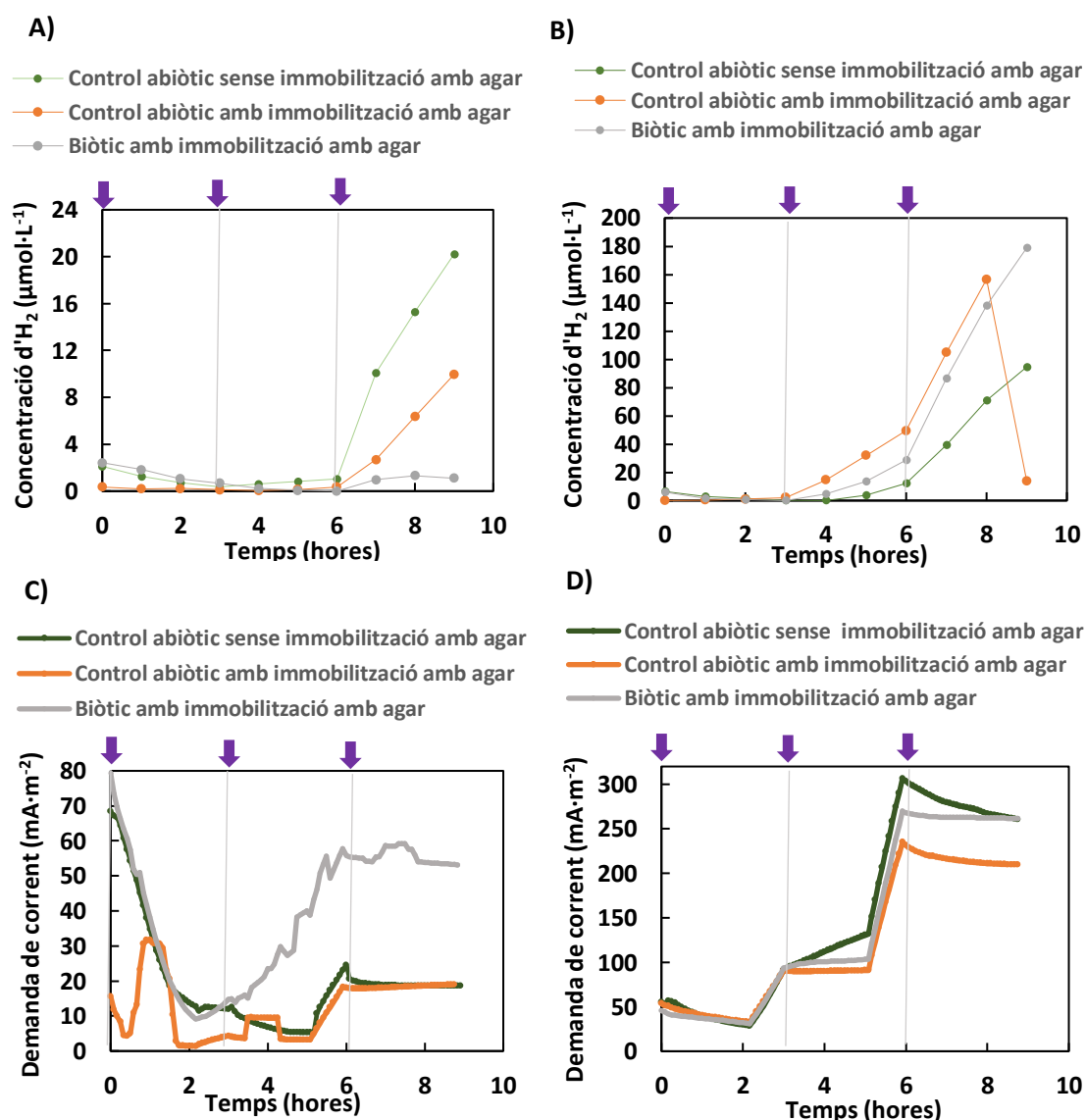


Figura 7: A) Evolució de les concentracions d'hidrogen al llarg del temps per la rèplica 1. B) Evolució de les concentracions d'hidrogen al llarg del temps per la rèplica 2. C) Evolució de la demanda de corrent al llarg del temps per la rèplica 1. D) Evolució de la demanda de corrent al llarg del temps per la rèplica 2. En tots els casos, les fletxes liles indiquen els diferents cavis de potencials: a 0 hores de $-0,4\text{V}$, a les 3 hores de $-0,6\text{V}$ i a les 6 hores de $-0,8\text{V}$.

La Taula 1 recull les produccions d'hidrogen obtingudes per cadascun dels experiments realitzats a cada rèplica.

Taula 1: Produccions d' hidrogen durant els diferents experiments duts a terme en les rèpliques 1 i 2.

Produccions d'hidrogen ($\mu\text{mol/L}\cdot\text{h}$)			
Rèplica	Abiòtic sense immobilització amb agar	Abiòtic amb immobilització amb agar	Biòtic amb immobilització amb agar
1	4,64	7,88	7,69
2	6,99	6,16	8,07

A partir dels resultats de la Figura 7 i la Taula 1, es pot veure que no existeix una replicabilitat entre els diferents experiments. Una de les explicacions per aquests resultats és el fet de treballar amb concentracions d'agar de 30 g/L, de manera que es formava una capa gruixuda que no quedava del tot enganxada al *carbon cloth*, no era uniforme i dificultava l'evacuació del gas. Per aquest motiu, no s'obtenen rèpliques amb els mateixos resultats i es tarda un temps en començar a detectar l'hidrogen en la fase líquida.

Analitzant els gràfics de les concentracions d'hidrogen de les rèpliques 1 i 2 (Figura 7 A-B) es pot deduir que les concentracions més elevades s'obtenen amb una potencial de -0,8V i coincideix, amb els punts de major demanda de corrent (Figura 7 C-D). Amb potencials de -0,4 i -0,6V no

La Figura 8 mostra els resultats de voltametria cíclica per a les dues rèpliques.

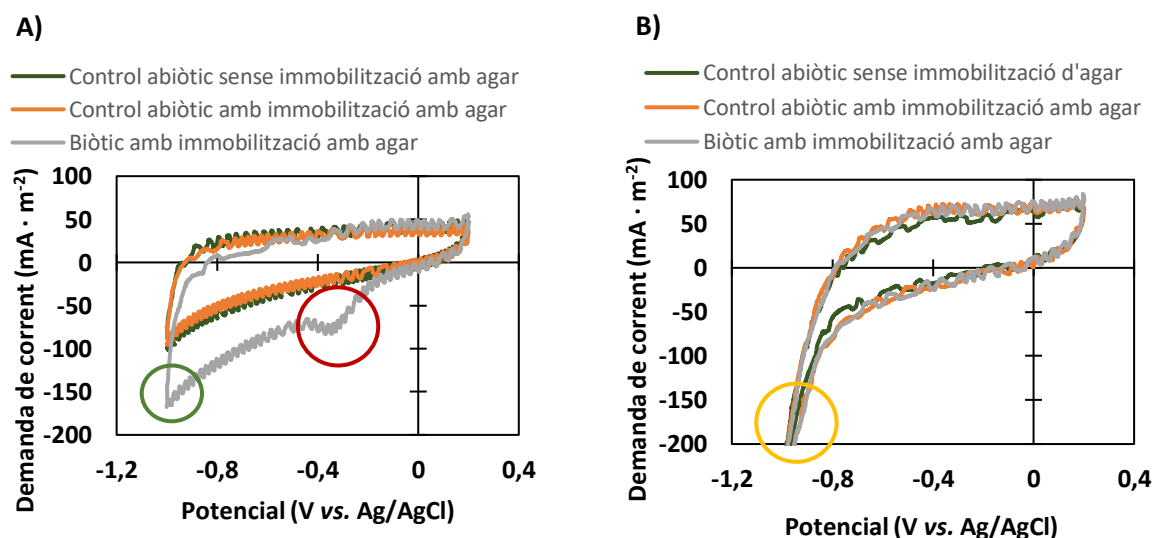


Figura 8: A) Resultat de les voltametries cícliques per la rèplica 1. El cercle verd indica un pic d'activitat d'oxidació-reducció per part dels microorganismes mentre que el cercle vermell indica activitat redox per part d'altres proteïnes al medi. B) Resultats de les voltametries cícliques per la rèplica 2 on, el cercle groc, representa la convergència dels pics dels experiments abiòtics i el biòtic.

La voltametria cíclica de la rèplica 1 presentada en la Figura 8 A mostra una lleugera activitat d'oxidació-reducció per part dels microorganismes degut al pic que es troba als potencials més negatius (cercle verd). L'altre pic (cercle vermell), indica l'activitat d'oxidació-reducció per part d'altres proteïnes al medi, però que pot no ser duta a terme per *Rhodobacter sp.* DSM 5864. La voltametria cíclica de la rèplica 2 mostrada (Figura 8 B) indica que els bacteris no formen part

de les reaccions d'oxidació-reducció, ja que se solapen els pics dels experiments abiòtics amb l'experiment biòtic (cercle groc). De manera que no es pot assegurar l'activitat de les cèl·lules.

La Figura 9 recull els resultats obtinguts per un experiment biòtic de llarga durada amb els respectius controls abiòtics. Es treballa amb potencials de -0,8V tot el temps.

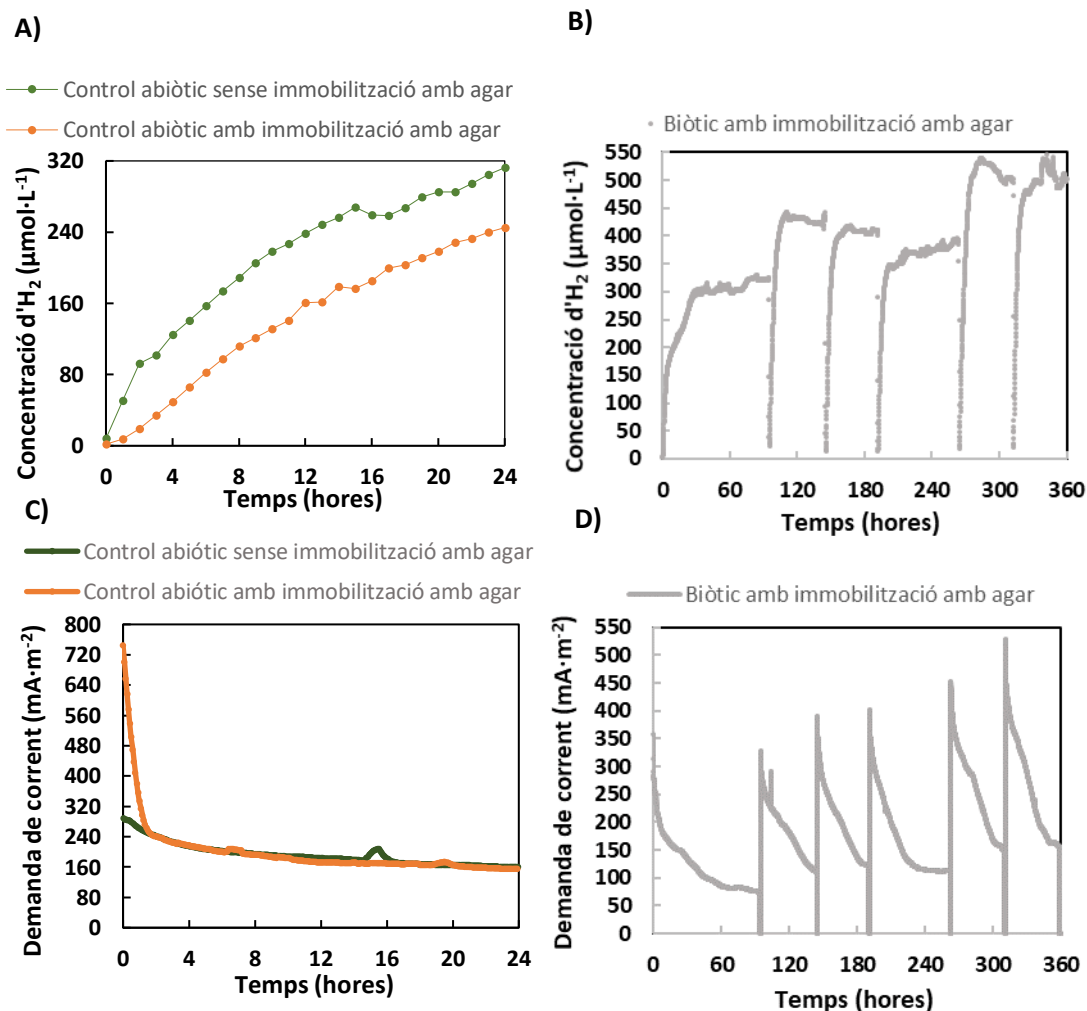


Figura 9: A) Evolució de les concentracions d'hidrogen al llarg de les primeres 24 hores dels experiments abiòtics. B) Evolució de les concentracions d'hidrogen al llarg de l'experiment biòtic a llarg termini. C) Evolució de la demanda de potencial en relació al temps durant les primeres 24 hores dels experiments abiòtics. D) Evolució de la demanda de potencial en relació al temps de l'experiment biòtic a llarg termini.

La Taula 2 recull les produccions d'hidrogen obtingudes pels experiments mostrats a la Figura 9.

Taula 2: Produccions d' hidrogen durant els diferents experiments duts a terme en les rèpliques 1 i 2.

Produccions d'hidrogen (µmol/L·h)		
Abiòtic sense immobilització amb agar	Abiòtic amb immobilització amb agar	Biòtic amb immobilització amb agar
10,789	10,413	15,29 ± 8,164

Les concentracions d'hidrogen amb les condicions d'aquest sistema com a màxim poden arribar fins a uns valors de 762,05 µmol/L. En la Figura 9 B es veuen els diferents cicles de producció que no superen concentracions de 550 µmol/L. Això pot ser degut a la pèrdua de pressió del sistema i la consegüent disminució de la solubilitat del gas, degut a fuites ocasionades una

vegada s'assoleix una concentració d'hidrogen a la fase líquida propera als 550 $\mu\text{mol/L}$, encara que s'intenta treballar amb un sistema tancat i completament anaerobi. Es va calcular una producció mitjana d'hidrogen per aquest experiment biòtic de $15,291 \pm 8,164 \mu\text{mol/L}\cdot\text{h}$ (Taula 2), major que les obtingudes als experiments biòtics recollits a la Figura 7 i la Taula 1 i també que els controls abiòtics.

4.2 Concentracions i produccions d'hidrogen usant *Rhodopseudomonas palustris* (aïllat C1S119.2)

En aquest apartat es mostren els resultats obtinguts per a dos blocs experimentals amb els quals es pretén analitzar l'evolució dels sistemes fins a les 24 hores de funcionament amb les condicions abans esmentades (Materials i Mètodes) per part de *Rhodopseudomonas palustris* (aïllat C1S119.2) immobilitzat al càtode i dels experiments abiòtics. En el primer bloc experimental la immobilització es va realitzar utilitzant una xeringa i en el segon bloc experimental es va utilitzar la butxaca exposada a l'apartat 3.5 i que es mostra en la Figura 6 B. També, es mostren els experiments biòtics de cadascun d'aquests dos blocs experimentals durant un llarg període de temps.

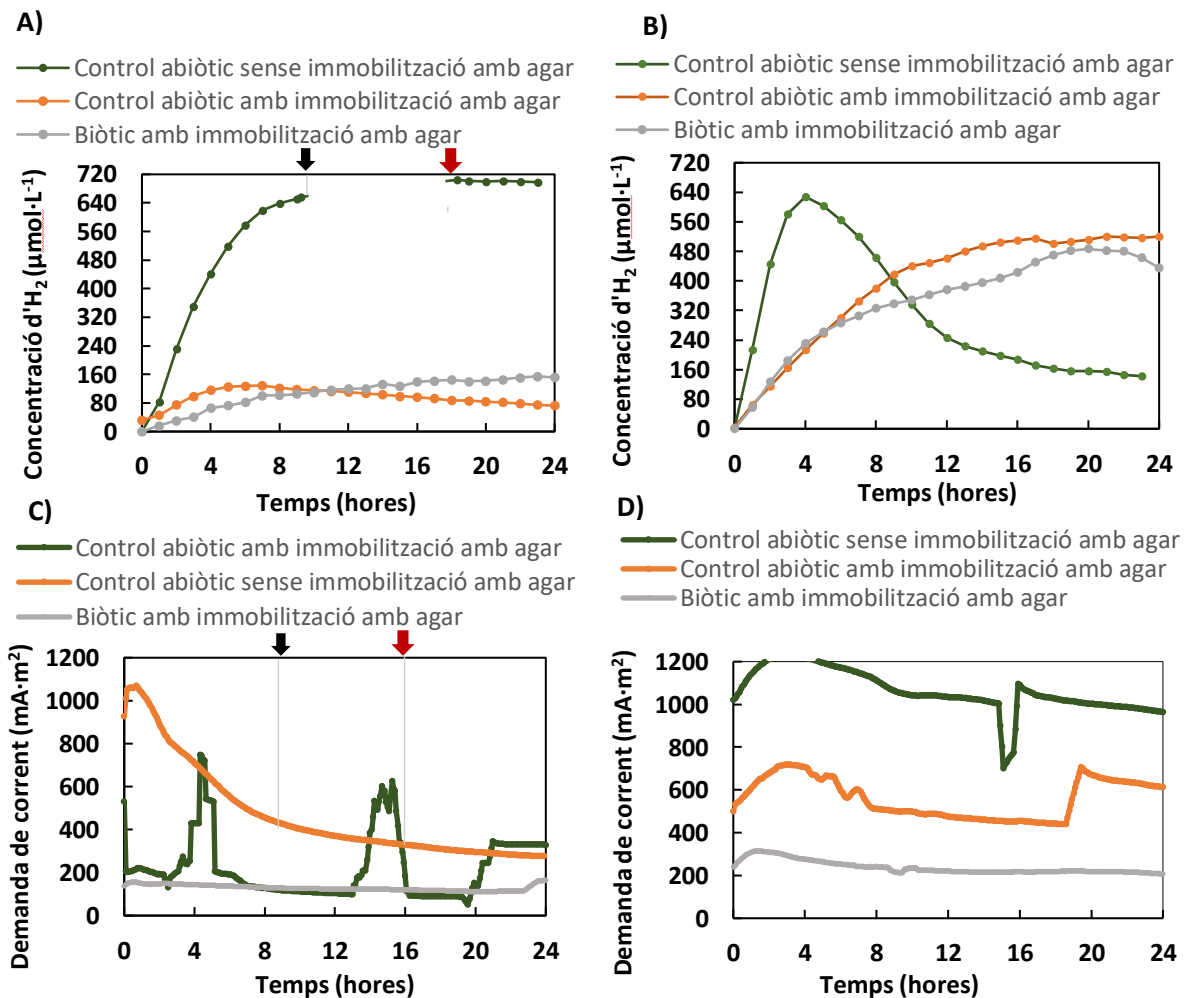


Figura 10: A) Evolució de les concentracions d'hidrogen al llarg de les primeres 24 hores durant el primer bloc experimental. La fletxa negra representa una aturada de la sonda d'hidrogen i la vermella una posada en marxa d'aquesta un altre cop. B) Evolució de les concentracions d'hidrogen al llarg de les primeres 24 hores durant el segon bloc experimental. C) Evolució de la demanda de potencial en relació al temps durant les primeres 24 hores pel primer bloc experimental. La fletxa negra representa el temps que va estar aturada la sonda d'hidrogen i la vermella una posada en marxa d'aquesta un altre cop. D) Evolució de la demanda de potencial en relació al temps durant les primeres 24 hores pel segon bloc experimental.

Les produccions d'hidrogen per a cadascun dels blocs experimentals es mostren a la Taula 3.

Taula 3: Produccions d' hidrogen durant els diferents experiments duts a terme en els blocs experimentals durant les primeres 24 hores.

Bloc experimental	Produccions d'hidrogen ($\mu\text{mol/L}\cdot\text{h}$)		
	Abiòtic sense immobilització amb agar	Abiòtic amb immobilització amb agar	Biòtic amb immobilització amb agar
	Primer	22,25	4,37
Segon	34,83	7,47	10,33

Es pot observar que, en ambdós blocs, hi ha una major concentració d'hidrogen a la fase líquida de la cambra catòdica durant els experiments abiòtics sense immobilització amb agar que durant els experiments abiòtics amb immobilització amb agar i els experiments biòtics amb els bacteris immobilitzats al càtode (Figura 10 A i B). A més, s'ha obtingut una major producció d'hidrogen en ambdós blocs durant els controls abiòtics sense immobilització amb agar que durant els control biòtics amb immobilització amb agar i els experiments biòtics amb immobilització (Taula 3).

A partir d'aquests resultats i tenint en compte també els obtinguts a l'apartat 4.1 de la discussió de resultats, es pot deduir que l'agar no és un material adient per tal de realitzar la immobilització d'aquests bacteris amb les condicions establertes del sistema, independentment de la concentració amb la qual es treballi, ja que dificulta el pas de l'hidrogen a través seu. Aquests resultats es corroboren a partir de la comparació amb la bibliografia exposada a l'apartat 1.5 de la introducció, que recull estudis similars al nostre. Com ja s'ha indicat anteriorment, Fibler i col·laboradors van obtenir produccions d'hidrogen més baixes amb *Rhodopseudomonas palustris* immobilitzat en un reactor en *batch* que amb les cèl·lules en suspensió. Aquests resultats negatius no només els van obtenir per les immobilitzacions amb agar, sinó també amb matrius d'agarosa i k-carragenina (Fibler et al., 1995). D'aquesta manera, es pot deduir que, encara que aquests materials polimèrics compleixen les característiques establertes per ser utilitzats com a material d'immobilització, les mides dels seus porus fan que no siguin els materials més adients en assaigs de bio-producció d'hidrogen.

Aquest problema es pot corregir utilitzant altres materials que permetin una eficient evacuació de l'hidrogen cap a la cambra catòdica del sistema i que també permetin una millor arribada dels electrons fins al bacteri, ja que aquest és un punt clau en les taxes de producció d'hidrogen al nostre sistema. Actualment, en sistemes bioelectroquímics s'aposta pel disseny d'hidrogels formats per diferents materials com poden ser l'alginat de sodi o el sílice combinats amb materials conductors com poden ser el carbó actiu (Emanuelsson, 1996) o el grafit (Szöllősi et al., 2017).

A continuació, la Figura 11 mostra l'evolució a llarg termini dels biòtics amb immobilització amb agar dels dos blocs experimentals per a *Rhodopseudomonas palustris* (aïllat C1S119.2 presentats a la Figura 10 A-B).

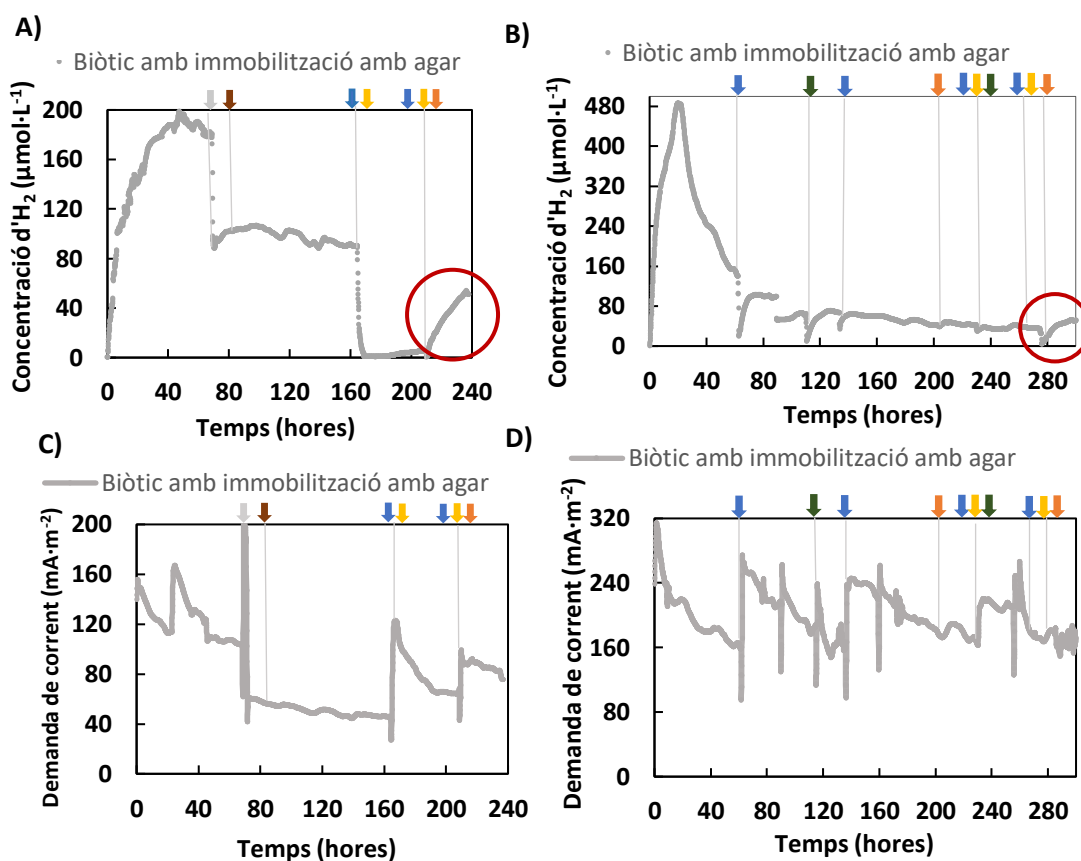


Figura 11: A) Evolució de la concentració d'hidrogen al llarg del temps per al primer experiment biòtic. B) Evolució de la concentració d'hidrogen al llarg del temps per al segon experiment biòtic. C) Evolució de la demanda de corrent al llarg del temps per al primer experiment biòtic. D) Evolució de la demanda de corrent al llarg del temps per al segon experiment biòtic. En totes les figures la fletxa gris representa l'addició de medi DSM 27, la fletxa marró representa un canvi de potencial de -1 V vs. Ag/AgCl a -0,8 V vs. Ag/AgCl, la blava representa una presa de mostra de líquid, la groga una presa de mostra de gas de la cambra de gas, la verda el bombolleig amb CO₂, la taronja addició de 1,5 mL de Na-acetat i el cercle vermell indica l'augment de la concentració d'hidrogen en afegir 5 mL de Na-acetat (2,5 mM).

La Taula 4 mostra els resultats de les cromatografies de gasos per les mostres gasoses preses durant els experiments biòtics a llarg termini amb *Rhodospseudomonas palustris* (aïllat C1S119.2) pels dos blocs experimentals.

Taula 4: Resultats de la composició de les mostres gasoses preses durant els experiments.

		Composició del gas normalitzat a 100%					
	Bloc experimental	Temps (hores)	CO ₂	H ₂	CH ₄	CO	N ₂ /O ₂
Biòtics amb immobilització amb agar	Primer	163	84,18	15,64	0,07	0,11	3,36
	Segon	228	54,13	45,08	0	0,79	2,39
		274	56,28	42,98	0	0,74	3,14

En la Taula 4 es pot veure que hi ha una major concentració d'hidrogen a la fase gasosa al bloc experimental 2, el que indica que hi ha una major producció d'hidrogen per part dels microorganismes utilitzant la butxaca (Figura 11 B) per a realitzar la immobilització dels bacteris que utilitzant una xeringa (Figura 11 A). Es pot dir que una capa d'agar uniforme i poc gruixuda,

que s'intercala entre les fibres del *carbon cloth* permet l'arribada dels electrons al bacteri d'una manera més eficient i també permet un millor alliberament de l'hidrogen cap al medi.

Comparant les mitjanes de les produccions d'hidrogen durant els experiments biòtics amb immobilització de l'aïllat C1S119.2 en els blocs experimentals 1 i 2 (7,75 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{h}$ i 13,33 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{h}$ respectivament) i dels controls abiòtics amb immobilització amb agar dels mateixos blocs (Taula 3) es pot veure que l'aplicació de la mescla de cèl·lules i agar o l'agar només en la superfície del *carbon cloth* utilitzant la butxaca aporta millors resultats que no l'aplicació amb la xeringa. Això és degut a que utilitzant la butxaca es recobreix completament el càtode amb una capa fina i uniforme que pot penetrar dins de les seves fibres com anteriorment s'ha explicat. D'aquesta manera s'aconsegueix una millor sortida de l'hidrogen cap al medi i també permet una millor arribada dels electrons a les cèl·lules ja que aquestes es troben en major contacte amb el càtode. Això també es veu als resultats de les mostres gasoses normalitzades al 100% recollides a la Taula 3 i els resultats presentats a la Figura 11 A-B com s'ha comentat abans.

Durant la realització dels experiments biòtics per l'aïllat C1S119.2 (Figura 11 A-B) no es varen dur a terme les voltametries cícliques però es va realitzar una prova per determinar la viabilitat del microorganismes durant el primer i el segon bloc experimental i els resultats obtinguts pel segon bloc experimental es recullen a la Taula 5. El en cas del primer bloc experimental El cercle vermell a la Figura 11 A indica l'augment de la concentració d'hidrogen en afegir 5 mL de Na-acetat (2,5 mM) a la cambra catòdica.

Taula 5: Resultats de la cromatografia de gasos per a l'experiment biòtic amb immobilització amb agar corresponent al segon bloc experimental.

Bloc experimental	Temps (Hores)	Àcid acètic (mg/L)
Segon	228	830,48
	274	297,91

La disminució d'àcid acètic, conjuntament amb l'augment de la concentració d'hidrogen a partir dels punts en el temps en què s'afegeix aquest compost orgànic marcat en un cercle en la Figura 11 B, ens va servir per comprovar si els bacteris inoculats en el segon bloc experimental eren viables. Amb els resultats obtinguts es comprova que el substrat pot arribar fins al bacteri immobilitzat i ser consumit. S'ha comprovat que *Rhodopseudomonas palustris* té la capacitat de produir hidrogen a partir del consum de matèria orgànica amb les condicions del nostre sistema.

4.3 Valoració del muntatge i funcionament del BES

A partir dels resultats obtinguts als experiments abiòtics sense immobilització amb agar dels apartats 4.1 i 4.2 es pot assegurar el funcionament del sistema i per tant, que el muntatge és correcte. Això és degut a que, en tots el casos hi ha una producció d'hidrogen pròpia del sistema.

4.4 Valoració sobre l'optimització del mètode d'immobilització

A partir d'aquest treball, s'ha corroborat la importància de la concentració i el gruix d'aquest material (l'agar) per la immobilització de cèl·lules. Utilitzant concentracions de 30 g/L per la immobilització de *Rhodobacter sp.* DSM 5864 o només del càtode s'havia d'esperar un període llarg de temps perquè gelifiqués. En contraposició, utilitzant concentracions de 10 g/L aquesta

gelificació tenia lloc en uns 2 minuts, facilitant el procés. Amb la fixació d'una concentració d'agar de 10 g/L es va facilitar l'aplicació del material d'immobilització sobre el *carbon cloth* i el seu endinsament dins de les fibres d'aquest, ja que amb aquestes concentracions el temps de refredament de l'agar és d'uns pocs minuts i el material queda ben aferrat al *carbon cloth*.

La immobilització només amb agar o de la mescla d'agar amb cèl·lules, com s'ha explicat a l'apartat 4.2 ha donat millors resultats que realitzant les immobilitzacions amb la xeringa, per tant, ha permès també l'optimització del protocol.

L'elecció de les soques bacterianes es va realitzar a partir d'altres estudis centrats en les vies implicades en la producció d'hidrogen i també en estudis anteriors realitzats pel grup d'Ecologia Microbiana i Molecular de la UdG. Per tant, semblaria que es tracta de bacteris, la capacitat de produir hidrogen de les quals, havia quedat demostrada. No obstant, en el nostre sistema no s'han aportat les condicions idònies per obtenir elevades taxes de producció d'hidrogen per part d'aquests. Això ha quedat demostrat a partir de les voltametries cícliques (Figura 8) i també a partir de l'experiment de viabilitat amb l'aïllat C1S119.2.

5. Conclusions

The following conclusions could be derived from this project:

- 1- Based on the experiments carried out we can conclude agar isn't the most appropriate material to immobilize bacteria on cathode surfaces. It may happen that the material doesn't have the right porosity and conductance for this purpose in bio-electrochemical systems. Alternative materials should be tested.
- 2- It has been demonstrated that the protocol to perform immobilizations plays a fundamental role in hydrogen production. We have shown that a homogeneous layer of the immobilizing material probably penetrating the cathode fibers provides better results.
- 3- Isolate C1S119.2 and *Rhodobacter* sp. DSM 5864 can produce hydrogen from the use of organic matter. But it is necessary to make more experiments to analyse the capacity of the bacteria to produce hydrogen from the electrons provided by the cathode and CO₂ as a carbon source. It seems that conditions of our system aren't the most suitable for the activity of the microorganisms used.

Bibliografía

- Aguilar-Gonzalez, M., Buitron, G., Shimada-Miyasaka, A., & Mora-Izaguirre, O. (2016). State of the Art of Bioelectrochemical Systems: Feasibility for Enhancing Rumen Propionate Production. *Agrociencia*, *50*, 149–166.
- 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.
- Aryal, N., Tremblay, P. L., Lizak, D. M., & Zhang, T. (2017). Performance of different *Sporomusa* species for the microbial electrosynthesis of acetate from carbon dioxide. *Bioresource Technology*, *233*, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.128>
- Aulenta, F., Catapano, L., Snip, L., Villano, M., & Majone, M. (2012). Linking bacterial metabolism to graphite cathodes: Electrochemical insights into the H₂-producing capability of *desulfovibrio* sp. *ChemSusChem*, *5*(6), 1080–1085. <https://doi.org/10.1002/cssc.201100720>
- 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>
- Batlle-Vilanova, P., Puig, S., Gonzalez-Olmos, R., Vilajeliu-Pons, A., Balaguer, M. D., & Colprim, J. (2015). Deciphering the electron transfer mechanisms for biogas upgrading to biomethane within a mixed culture biocathode. *RSC Advances*, *5*(64), 52243–52251. <https://doi.org/10.1039/c5ra09039c>
- Bedoya, A., Ramírez, J. E., Vásquez, J. E., Castrillón, J. C., & Arias, M. (2007). Biological Production of Hydrogen: a Literature Survey. *Dyna*, *3*, 137–157. Retrieved from <http://www.google.com.co/url?sa=t&rct=j&q=producción biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte&source=web&cd=1&ved=0CCQQFjAA&url=http://dyna.unalmed.edu.co/ediciones/154/articulos/a14v75n154/a14v75n1>
- Boghani, H. C., Kim, J. R., Dinsdale, R. M., Guwy, A. J., & Premier, G. C. (2013). Control of power sourced from a microbial fuel cell reduces its start-up time and increases bioelectrochemical activity. *Bioresource Technology*, *140*, 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.087>
- Chaparro, D. M. (2016). Producción de biohidrógeno a partir de microalgas Hydrogen production from microalgae. *Energética*. Das, D. (2002). Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, *26*(1), 13–28. [https://doi.org/10.1016/s0360-3199\(00\)00058-6](https://doi.org/10.1016/s0360-3199(00)00058-6)
- Choi, S., Davenport, T. C., & Haile, S. M. (2019). Protonic ceramic electrochemical cells for hydrogen production and electricity generation: Exceptional reversibility, stability, and demonstrated faradaic efficiency. *Energy and Environmental Science*, *12*(1), 206–215. <https://doi.org/10.1039/c8ee02865f>
- Das, D. (2002). Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, *26*(1), 13–28. [https://doi.org/10.1016/s0360-3199\(00\)00058-6](https://doi.org/10.1016/s0360-3199(00)00058-6)
- Emanuelsson, M. A. E. (1996). Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery. *Journal of Anatomy*, *189* (Pt 3(4)), 503–505. <https://doi.org/10.1002/bit>

- Imhoff J.F. (2006) The Phototrophic Alpha-Proteobacteria. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY
- Kerstens K., De Vos P., Gillis M., Swings J., Vandamme P., Stackebrandt E. (2006) Introduction to the Proteobacteria. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY
- Fibler, J., GW, K., & F, G. (1995). Enhanced hydrogen production from aromatic acids by immobilized cells of *R. palustris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 44, 43–46.
- Fu, H., & Burris, R. H. (1989). Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. *Journal of Bacteriology*, 171(6), 3168–3175. <https://doi.org/10.1128/jb.171.6.3168-3175.1989>
- Happe, T., Molser, B., & Naber, J. D. (1994). Induction, localization and metal content of hydrogenase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Biochemistry*, 222(3), 769–774. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18923.x>
- 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)
- Kumar, G., Bakonyi, P., Zhen, G., Sivagurunathan, P., Koók, L., Kim, S. H., ... Bélafi-Bakó, K. (2017). Microbial electrochemical systems for sustainable biohydrogen production: Surveying the experiences from a start-up viewpoint. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 70(September 2016), 589–597. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.107>
- Larimer, F. W., Chain, P., Hauser, L., Lamerdin, J., Malfatti, S., Do, L., ... Harwood, C. S. (2004). Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Nature Biotechnology*, 22(1), 55–61. <https://doi.org/10.1038/nbt923>
- Le Ouay, B., Coradin, T., & Laberty-Robert, C. (2013). Silica-carbon hydrogels as cyto-compatible bioelectrodes. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(5), 606–609. <https://doi.org/10.1039/c2tb00312k>
- Martinez, Veronica & García, R. (2010). Fermentación oscura, fotofermentación y biofotólisis: análisis de su aplicación en secuencia para la producción de hidrógeno biológico., (September), 7. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2415.9844>
- Möller, B., Oßmer, R., Howard, B. H., Gottschalk, G., & Hippe, H. (1984). *Sporomusa*, a new genus of gram-negative anaerobic bacteria including *Sporomusa sphaeroides* spec. nov. and *Sporomusa ovata* spec. nov. *Archives of Microbiology*, 139(4), 388–396. <https://doi.org/10.1007/BF00408385>
- Möller, B., Oßmer, R., Howard, B. H., Gottschalk, G., & Hippe, H. (1984). *Sporomusa*, a new genus of gram-negative anaerobic bacteria including *Sporomusa sphaeroides* spec. nov. and *Sporomusa ovata* spec. nov. *Archives of Microbiology*, 139(4), 388–396. <https://doi.org/10.1007/BF00408385>
- Mottet, L., Le Cornec, D., Noël, J. M., Kanoufi, F., Delord, B., Poulin, P., ... Bremond, N. (2018). A conductive hydrogel based on alginate and carbon nanotubes for probing microbial electroactivity. *Soft Matter*, 14(8), 1434–1441. <https://doi.org/10.1039/c7sm01929g>
- Osuna-Castro, J. A. (2011). 2011 Volumen 3, No. 6. *Acta Química Mexicana*, 3(6), 42–56.
- Osuna-castro, J. A., Villavelazquez, C., & Escalante-minakata, P. (2011). Inmovilización de células y enzimas, (July 2014).

- Perona-Vico, E., Blasco-Gómez, R., Colprim, J. S., Puig, S., & Bañeras, L. (2019). [NiFe]-hydrogenases are constitutively expressed in an enriched Methanobacterium sp. Population during electromethanogenesis. *PLoS ONE*, *14*(4), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215029>
- 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>
- Porwal, S., Kumar, T., Lal, S., Rani, A., Kumar, S., Cheema, S., ... Kalia, V. C. (2008). Hydrogen and polyhydroxybutyrate producing abilities of microbes from diverse habitats by dark fermentative process. *Bioresource Technology*, *99*(13), 5444–5451. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.011>
- 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>
- 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>
- Richaud, P., Vignais, P. M., Colbeau, A., Uffen, R. L., & Cauvin, B. (1991). Molecular biology studies of the uptake hydrogenase of Rhodobacter capsulatus and Rhodocyclus gelatinosus. *FEMS Microbiology Letters*, *87*(3–4), 413–418. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(90\)90488-C](https://doi.org/10.1016/0378-1097(90)90488-C)
- Szöllösi, A., Hoschke, Á., Rezessy-Szabó, J. M., Bujna, E., Kun, S., & Nguyen, Q. D. (2017). Formation of novel hydrogel bio-anode by immobilization of biocatalyst in alginate/polyaniline/titanium-dioxide/graphite composites and its electrical performance. *Chemosphere*, *174*, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.095>
- 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 Rhodospirillum rubrum 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>
- Yang, X., Huang, H., Kubota, M., He, Z., Kobayashi, N., Zhou, X., ... Luo, J. (2016). Synergetic effect of MoS₂ and g-C₃N₄ as cocatalysts for enhanced photocatalytic H₂ production activity of TiO₂. *Materials Research Bulletin*, *76*, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2015.12.009>
- Yokoi, H., Maeda, Y., Hirose, J., Hayashi, S., & Takasaki, Y. (1997). H₂ production by immobilized cells of Clostridium butyricum on porous glass beads. *Biotechnology Techniques*, *11*(6), 431–433. <https://doi.org/10.1023/A:1018429109020>
- Zhang, H., Chen, G., Zhang, Q., Lee, D. J., Zhang, Z., Li, Y., ... Yan, B. (2017). Photosynthetic hydrogen production by alginate immobilized bacterial consortium. *Bioresource Technology*, *236*, 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.171>