

Defensa de tesi doctoral

Importance of hydrogen-mediated mechanisms for microbial electrosynthesis: regulation at the molecular level

A càrrec de la Sra. Elisabet Perona Vico

Divendres, 28 de gener de 2022

Hora: **11.00**

Aula Magna de la Facultat de Ciències (Montilivi).



[Link to follow the defense on Microsoft Teams](#)

Resum

La lluita contra el canvi climàtic ja fa temps que té lloc en diferents fronts. Un dels més importants són les anomenades tecnologies de captura i utilització del diòxid de carboni, que no només redueixen les emissions de gasos d'efecte hivernacle sinó que, a més a més, transformen el carboni captat en productes de valor afegit.

El **Grup de Recerca en Ecologia Microbiana Molecular (gEMM)** i el **Laboratori d'Enginyeria Química i Ambiental (LEQUIA)** de la Universitat de Girona fa més d'una dècada que treballen en una d'aquestes tecnologies: l'**electrosíntesi microbiana** (en anglès, *microbial electrosynthesis*, MES). L'electrosíntesi microbiana aprofita les propietats elèctriques d'alguns microorganismes (sobretot, bacteris i arqueus) per a reduir el diòxid de carboni. Només es necessita una petita quantitat d'energia elèctrica i aigua, així com controlar la producció d'hidrogen com a compost intermediari clau. Seguint aquest principi, a escala laboratori ja s'han sintetitzat amb èxit diferents compostos orgànics, com ara metà, butanol, etanol o acetat. Tanmateix, per implementar el procés a escala industrial encara existeixen diverses limitacions.

Elisabet Perona Vico ha aplicat tècniques avançades de microbiologia molecular, electroquímica, i enginyeria genètica, per tal de superar aquestes limitacions. Així, per estudiar els gens potencialment implicats en la transferència d'electrons, va emprar un reactor electrometanogènic. L'anàlisi de la composició de la comunitat microbiana, utilitzant l'ADN i l'ADN complementari, va destacar *Methanobacterium* sp. com a principal arqueu. Per a determinar els nivells d'expressió gènica de [NiFe]-hidrogenases (Eha, Ehb i Mvh), heterodisulfur reductasa (Hdr), coenzim F₄₂₀ [NiFe]-hidrogenasa (Frh) i la proteïna de maduració Hyp, es van induir canvis a curt termini en el flux d'electrons (circuit elèctric obert o tancat). Els resultats obtinguts amb RT-PCR suggerien que els mecanismes implicats en la transferència d'electrons no es trobaven regulats a nivell transcripcional.

Un altre aspecte destacable de la seva tesi doctoral és l'estudi dels microorganismes que poden ser potencials bio-productors d'H₂ en els biocàtodes. Concretament, va estudiar la producció biològica d'H₂ en biocàtodes operats a -1.0 V vs. Ag/AgCl, emprant una metodologia comparable i CO₂ com a font de carboni. Es van escollir deu soques bacterianes dels gèneres *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodocyclus*, *Desulfovibrio* i *Sporomusa*, totes elles descrites com a candidats per a la producció d'H₂. Vuit de les deu soques testades van mostrar electroactivitat i les taxes de producció d'H₂ van ser significativament superiors respecte a les condicions abiòtiques (de 2 a 8 vegades) en dues d'elles (*Desulfovibrio paquesii* DSM 16681 i *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 642).

Els resultats indicaven que l'aplicació de biocàtodes per a la producció sostinguda d'H₂ pot ser que no sigui prou eficient per a mantenir els requeriments que han de permetre incentivar el metabolisme d'altres soques microbianes. En conseqüència, es van aplicar tècniques d'enginyeria genètica per incrementar l'habilitat de *D. paquesii* per a la producció d'H₂. Els gens seleccionats per ser sobre-expressats van ser la [Fe]-hidrogenasa i el citocrom *c3* en dues soques, *D. vulgaris* DSM 644 i *D. paquesii* DSM 16681. Es van testar diverses condicions i protocols experimentals per la implementació dels mecanismes adients que asseguressin la sobre-expressió dels gens seleccionats.

La tesi d'Elisabet Perona Vico contribueix a entendre millor el paper clau de l'H₂ durant l'electrosíntesi microbiana i permet formular diverses conclusions. La primera és que expandir el coneixement sobre els mecanismes de transferència d'electrons ha de permetre un millor control dels sistemes bioelectroquímics. La segona és que el requeriment d'H₂ per poder operar de manera sostinguda els processos bioelectroquímics pot subministrar-se d'una manera eficient usant microorganismes amb la capacitat de produir H₂. Finalment, es corrobora que l'aplicació de la biologia sintètica així com dels co-cultius definits són dues contribucions prometedores que contribuiran a fer possible la industrialització de l'electrosíntesi microbiana. La tesi, que ha estat dirigida pels Drs. Lluís Bañeras (gEMM) i Sebastià Puig (LEQUIA), es defensarà el proper divendres 28 de gener a les 11:00h a l'Aula Magna de la Facultat de Ciències de la UdG i es podrà seguir per [Microsoft Teams](#).

Abstract

Fight against climate change is taking place on multiple fronts. One of the most relevant is the so-called carbon capture and utilisation technologies (CCUs). CCUs not only reduce greenhouse gas emissions but also convert capture carbon into added-value products.

The **Research Group of Molecular Microbial Ecology (geMM)** and the **Laboratory of Chemical and Environmental Engineering (LEQUIA)** of the University of Girona (UdG) have been working for more than a decade on one of such CCUs technologies: **microbial electrosynthesis (MES)**. Microbial electrosynthesis technologies use the electrical properties of some microorganisms (mainly, bacteria and archaea) to reduce carbon dioxide. To operate MES, small amounts of electrical power and water are required, and the production of hydrogen as a key intermediate compound should be controlled. By following this principle, many organic compounds such as methane, butanol, ethanol, or acetate, have already been successfully synthesised at laboratory scale. Still, some limitations hamper the industrial upscale of the process.

Elisabet Perona Vico has applied advanced molecular, electrochemical, and genetic engineering techniques to overcome such limitations. Thus, an electromethanogenic reactor was used to study putative genes taking part in extracellular electron transfer (EET). Microbial community composition analysis through both DNA and cDNA signatures revealed that electromethanogenesis was conducted by *Methanobacterium* sp. Short-time changes in electron flow (closed and open electric circuits) were used to determine the gene expression levels of [NiFe]-hydrogenases (Eha, Ehb, and Mvh), heterodisulfide reductase (Hdr), coenzyme F₄₂₀-reducing [NiFe]-hydrogenase (Frh), and hydrogenase maturation protein (Hyp). According to RT-PCR data, suspected mechanisms were not regulated at the transcriptional level.

Another remarkable aspect of Elisabet Perona's doctoral thesis is the study of microorganisms that could serve as potentially interesting sustainable H₂ producers in biocathodes. Particularly, she has studied the biological H₂ production in biocathodes operated at -1.0 V vs. Ag/AgCl, using a highly comparable technology and using CO₂ as the sole carbon feedstock. Ten different bacterial strains were chosen from genera *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodocyclus*, *Desulfovibrio*, and *Sporomusa*, all described as hydrogen-producing candidates. Eight over ten bacterial strains showed electroactivity and H₂ production rates increased significantly (2 to 8-fold) compared to abiotic conditions for two of them (*Desulfovibrio paquesii* DSM 16681 and *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 642).

Results showed that the application of bacteria-coated cathodes for sustainable H₂ production may not be efficient enough to maintain H₂ biosynthetic requirements for highly efficient producing strains. Here, we applied genetic engineering tools intending to further increase the H₂ production ability of *D. paquesii*. [Fe]-only hydrogenase and tetraheme cytochrome c3 were selected as genes of interest to be overexpressed in *D. vulgaris* DSM 644 and *D. paquesii* DSM 16681. Different conditions and described protocols were tested towards implementing the proper mechanisms to ensure overexpression of the selected genes.

To sum up, Elisabet Perona's doctoral thesis contributes to a better understanding of the key role of H₂ during microbial electrosynthesis and leads to the formulation of several conclusions. First, enhancing the current knowledge of extracellular electron transfer may lead to better control of reductive BES. Second, the required H₂ supply for sustainable electrochemical bioprocesses may be provided in a more efficient way using bio-H₂ evolving microorganisms. Finally, the thesis corroborates that the application of synthetic biology and defined consortia are new and promising contributions in the METs field. The thesis was directed by Drs Lluís Bañeras (geMM) and Sebastià Puig (LEQUIA). The dissertation's defence will take place next Friday 28th January at 11:00h at "Aula Magna" of UdG Faculty of Sciences and can be followed on [Microsoft Teams](#).

Resumen

Desde hace tiempo, la lucha contra el cambio climático tiene lugar en diferentes frentes. Uno de los más importantes son las llamadas tecnologías de captura y utilización del dióxido de carbono, que no sólo reducen las emisiones de gases de efecto invernadero, sino que además, transforman el carbono captado en productos de valor añadido.

El **Grupo de Investigación en Ecología Microbiana Molecular (gEMM)** y el **Laboratorio de Ingeniería Química y Ambiental (LEQUIA)** de la Universitat de Girona trabajan en una de estas tecnologías desde hace más de una década: la **electrosíntesis microbiana** (en inglés: microbial electrosynthesis, MES). La electrosíntesis microbiana aprovecha las propiedades eléctricas de algunos microorganismos (sobretudo, bacterias y arqueas) para reducir el dióxido de carbono. Solo se precisa una pequeña cantidad de energía eléctrica y agua, así como controlar la producción de hidrógeno como compuesto intermedio clave. Siguiendo este principio, a escala laboratorio ya se han sintetizado con éxito distintos compuestos orgánicos, como, por ejemplo, metano, butanol, etanol o acetato. Sin embargo, la implementación del proceso a escala industrial aún presenta una serie de limitaciones.

Elisabet Perona Vico ha aplicado técnicas de microbiología molecular, electroquímica y ingeniería genética para superar estas limitaciones. Así, para estudiar los genes potencialmente implicados en la transferencia de electrones utilizó un reactor electrometanogénico. El análisis de la composición de la comunidad microbiana, usando el ADN i el ADN complementario, destacaron *Methanobacterium* sp. como principal arquea. Para determinar los niveles de expresión génica de [NiFe]-hidrogenasas (Eha, Ehb y Mvh), heterodisulfuro reductasa (Hdr), coenzima F₄₂₀ [NiFe]-hidrogenasa (Frh) y la proteína de maduración Hyp, se indujeron cambios en el flujo de electrones (circuito eléctrico abierto o cerrado). Los resultados obtenidos por RT-PCR sugerían que los mecanismos implicados en la transferencia de electrones no estaban regulados a nivel de transcripción.

Otro aspecto destacable de su tesis doctoral es el estudio de los microorganismos que pueden ser potenciales bio-productores de H₂ en los biocátodos. Concretamente, se ha estudiado la producción biológica de H₂ en biocátodos operados a -1.0 V vs. Ag/AgCl, usando una metodología comparable y CO₂ como fuente de carbono. Se escogieron diez cepas bacterianas de los géneros *Rhodobacter*, *Rhodospseudomonas*, *Rhodocyclus*, *Desulfovibrio* y *Sporomusa*, todos ellos descritos como potenciales candidatos para la producción de H₂. Ocho de las diez cepas testadas mostraron electroactividad y las tasas de producción de H₂ fueron significativamente superiores respecto a las condiciones abióticas (de 2 a 8 veces) en dos de ellas (*Desulfovibrio paquesii* DSM 16681 y *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 642).

Los resultados indicaron que la aplicación de biocátodos para la producción sostenida de H₂ puede no ser suficientemente eficiente para el mantenimiento de los requerimientos que deben permitir incentivar el metabolismo de otras cepas microbianas. Por esto, hemos aplicado métodos de ingeniería genética para incrementar la habilidad de *D. paquesii* para la producción de H₂. Los genes seleccionados para ser sobre-expresados fueron la [Fe]-hidrogenasa y el citocromo c3 en dos cepas, *D. vulgaris* DSM 644 y *D. paquesii* DSM 16681. Se testaron varias condiciones y protocolos experimentales para la implementación de los mecanismos adecuados que asegurasen la sobreexpresión de los genes seleccionados, pero no se obtuvieron los resultados deseados.

La tesi de Elisabet Perona Vico contribueix a entendre millor el paper clau del H₂ durant la electrosíntesi microbiana i permet formular distintes conclusions. La primera, que ampliar el coneixement sobre els mecanismes de transferència d'electrons ha de permetre un major control dels sistemes bioelectroquímics. La segona, que el requeriment de H₂ que permet operar els processos bioelectroquímics de manera sostenible, pot ser subministrat usant microorganismes amb la capacitat de produir H₂. Per últim, la tesi corrobora que l'aplicació de la biologia sintètica, així com de les co-cultures definides, són dues contribucions prometedores en el camp de les tecnologies electroquímiques. La defensa de la tesi que ha estat dirigida per els Drs. Lluís Bañeras (gEMM) i Sebastià Puig (LEQUIA), tindrà lloc el proper viernes 28 de enero a las 11:00h en el Aula Magna de la Facultat de Ciències de la UdG i se podrà seguir per [Microsoft Teams](#).