



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Determinación de la estructura y componentes de biopelícula de diferentes cepas de *Geobacter sulfurreducens* sobre diversas superficies

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Lic. Luis Miguel Rodríguez Torres

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Katy Juárez López

[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. David Romero Camarena

[Centro de Ciencias Genómicas, UNAM](#)

Dra. Margarita Miranda Hernández

[Instituto de Energías Renovables, UNAM](#)

Dra. Katy Juárez López

[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos, México. Mayo, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado

Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán
Presidente

Dra. Rosa Laura Camarena Mejía
Secretario

Dr. Daniel Genaro Segura González
Vocal

Dra. Adriana Margarita Longoria Hernández
Vocal

Dr. Luis Felipe Cházaro Ruiz
Vocal

Citas

En la ciencia es vital la competencia entre cerebros humanos. Cada hombre, enloquecido por sus propias ideas, debe contrarrestar el pensamiento de su prójimo.

Paul de Kruif

¿Es posible que el último fin de la ciencia es suministrar al hombre todo el placer posible y ahorrarle todas las molestias que puedan evitarse? ¿Y cómo, si el placer y el dolor están fuertemente atados uno al otro? ...Tal vez lo que se conoce ahora mejor de la ciencia es su facultad de privar a los hombres de placer y de tornarlos más fríos, más insensibles, más estoicos. Pero también podrían descubrirse en ella facultades de gran dispensadora de dolores. Y entonces se descubriría a la vez su fuerza contraria, su facultad inmensa de ofrecer al placer un nuevo cielo estrellado.

La gaya ciencia. Libro primero. Aforismo 12. Del fin de la ciencia. Friedrich Wilhelm Nietzsche

Pues todo se marchita y se vuelve rápidamente legendario. Rápidamente también el olvido absoluto lo entierra. Y hago esas afirmaciones a propósito de los que brillaron hasta la admiración, porque los restantes, nada más exhalar el alma, son desconocidos e ignorados... ¿Qué es, entonces, hacia lo que es necesario dirigir el empeño? Sólo una cosa, reflexión justa, acciones comunitarias, razón capaz de no equivocarse y disposición que se conforma con cualquier suceso como algo necesario, familiar y que fluye desde tal principio y fuente.

Meditaciones. Libro IV. 33. Marco Aurelio

Y pensaba; "¡Si no muriese! ¡Si me perdonaran la vida! ¡Qué eternidad! ¡Y toda mía! Entonces cada minuto sería para mí como una existencia entera, no perdería uno solo y vigilaría cada instante para no malgastarlo...".

El idiota. Parte primera. Capítulo V. Fiódor Mijáilovich Dostoyevski

Agradecimientos

Quiero agradecer especialmente a mi madre: Fabiola Rodríguez Torres, por ser la persona que más me ha apoyado y amado a lo largo de toda mi vida. Juntos hemos compartido y superado diversas situaciones a lo largo de esta vida. A ella le dedico especialmente este trabajo que requirió de un arduo esfuerzo.

Quiero agradecer a mi asesora de tesis, la Dra. Katy Juárez López, por su constante apoyo, guía e impulso para que yo aprendiera y desarrollará mi proyecto.

También, quiero agradecer a mi Comité Tutorial conformado por el Dr. David Romero Camarena (Centro de Ciencias Genómicas) y la Dra. Margarita Miranda Hernández (Instituto de Energías Renovables) quienes me aconsejaron sobre cómo mejorar, me enseñaron nuevas perspectivas y compartieron su conocimiento conmigo.

Quiero agradecer a todos mis compañeros y amigos del laboratorio 9 del edificio Sur del IBt-UNAM, especialmente a:

- Al Dr. Guillermo Antonio Huerta Miranda por su apoyo en técnicas electroquímicas y su amistad.
- A la Lic. Nayely López Delgado por su apoyo y amistad a lo largo de esta maestría.
- Al M.C. Juan Bernardo Jaramillo Rodríguez por su apoyo en técnicas de Biología Molecular y su amistad.
- Al Dr. José Alberto Hernández Eligio por su apoyo en el laboratorio, sus consejos y su amistad.
- A la Lic. Dulce Berenice Castrejón López por apoyo en las técnicas y análisis de microscopía confocal.

Además, quiero agradecer a mis entrañables amigos: Giancarlo Aquilano Rodríguez, Álvaro Madrid Arroyo y Daniel Huelgas Méndez. Con ellos he compartido momentos gratos desde que los conozco y han estado conmigo en momentos difíciles.

También quiero agradecer a la familia Romo Gutiérrez por abrirnos las puertas de su casa a mi mamá y a mí, y por apoyarnos en diversas situaciones.

Quiero agradecer al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por su apoyo económico para asistir y participar en el “Seventh International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering” (7 ISEBE) en Marsella, Francia.

Quiero agradecer al proyecto PAPIIT-UNAM No. IN212022, por el financiamiento del proyecto.

Finalmente, quiero agradecer al CONAHCYT por la beca de manutención a lo largo de mi posgrado en la Maestría.

Índice general

Índice de figuras	IV
Índice de tablas	VII
Abreviaturas	IX
Resumen	XI
Introducción.....	1
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	1
Biopelícula.....	3
Antecedentes.....	4
Biopelícula electroactiva de <i>G. sulfurreducens</i>	4
Estructura de la biopelícula de <i>G. sulfurreducens</i>	8
Descripción de la mutante Δ gsu1771 de <i>G. sulfurreducens</i>	9
Sistemas bioelectroquímicos: herramientas para estudiar las biopelículas de <i>G. sulfurreducens</i>	10
Electrodos: soportes para el crecimiento de la biopelícula de <i>G.</i> <i>sulfurreducens</i>	13
Estudios electroquímicos de las biopelículas de <i>Geobacter</i> <i>sulfurreducens</i>	14
Materiales utilizados para el estudio de biopelículas electroactivas	16
Justificación	20
Hipótesis	20
Objetivos	21
Objetivo general.....	21
Objetivos específicos	21
Materiales.....	22

Métodos.....	23
Generación de condiciones anaeróbicas para el cultivo de <i>G. sulfurreducens</i>	23
Cuantificación de la formación de biopelícula por cristal violeta.....	23
Observación de la estructura de la biopelícula	24
Pruebas electroquímicas.....	25
Extracción de ARN.....	25
Tratamiento con DNasa I	26
Transcripción reversa (RT)	26
Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).....	27
Resultados y discusión	30
Cuantificación por cristal violeta de la formación de biopelícula.....	30
Desarrollo de la biopelícula y observación de su estructura empleando microscopia confocal.	32
Biopelícula sobre vidrio	32
Biopelícula sobre Fe₂O₃-vidrio	35
Biopelícula sobre FTO nuevo	37
Biopelícula sobre Fe₂O₃-FTO	40
Biopelícula sobre grafito	43
Biopelícula sobre acero inoxidable.....	45
Parámetros obtenidos a partir del CLSM.....	48
Pruebas electroquímicas.....	53
Potencial de circuito abierto (OCP).....	53
Voltamperometría cíclica (CV)	59
Voltamperometría de onda cuadrada (SWV)	64

Expresión de genes involucrados en la transferencia de electrones extracelular y en la formación de biopelícula.....	69
Genes involucrados en la transferencia de electrones extracelular	70
Gen involucrado en la producción de exopolisacáridos.....	72
Genes involucrados en sistemas de transporte	73
Gen involucrado en metabolismo central.....	75
Conclusiones.....	78
Perspectivas	79
Bibliografía.....	80
Anexos	97
Material suplementario	102

Índice de figuras

Figura 1. Capacidad de <i>G. sulfurreducens</i> para reducir químicamente metales pesados y formar relaciones sintróficas con otros microorganismos.	2
Figura 2. Proteínas implicadas en procesos de EET de <i>G. sulfurreducens</i>	7
Figura 3. Esquema general de un sistema bioelectroquímico (SBE).	12
Figura 4. <i>G. sulfurreducens</i> utiliza el acetato como donador de electrones.	16
Figura 5. Crecimiento de las cepas WT y $\Delta gsu1771$ sobre vidrio y FTO.	31
Figura 6. Imágenes de microscopía confocal sobre vidrio (Vista superior).	33
Figura 7. Imágenes de microscopía confocal sobre vidrio (vista lateral).	34
Figura 8. Imágenes de microscopía confocal en Fe_2O_3 sobre vidrio (Vista superior).	36
Figura 9. Imágenes de microscopía confocal en Fe_2O_3 sobre vidrio (vista lateral).	36
Figura 10. Imágenes de microscopía confocal sobre FTO nuevo (Vista superior).	38
Figura 11. Imágenes de microscopía confocal sobre FTO nuevo (vista lateral).	39
Figura 12. Imágenes de microscopía confocal en Fe_2O_3 sobre FTO (Vista superior).	41
Figura 13. Imágenes de microscopía confocal en Fe_2O_3 sobre FTO (vista lateral).	42
Figura 14. Imágenes de microscopía confocal sobre grafito (vista superior).	44
Figura 15. Imágenes de microscopía confocal sobre grafito (vista lateral).	44
Figura 16. Imágenes de microscopía confocal sobre acero inoxidable (vista superior).	47
Figura 17. Imágenes de microscopía confocal sobre acero inoxidable (vista lateral).	47

Figura 18. Representación del OCP de los materiales de electrodo con y sin biopelícula de las cepas de <i>G. sulfurreducens</i> .	54
Figura 19. Potencial a circuito abierto de las cepas WT y mutante $\Delta gsu1771$ sobre FTO.	55
Figura 20. Potencial a circuito abierto de las cepas WT y mutante $\Delta gsu1771$ sobre grafito.	56
Figura 21. Potencial a circuito abierto de las cepas WT y mutante $\Delta gsu1771$ en Fe_2O_3 -FTO.	57
Figura 22. Potencial a circuito abierto de las cepas WT y mutante $\Delta gsu1771$ en acero inoxidable.	58
Figura 23. Voltamperometría cíclica a 0.01 V/s de las cepas WT y mutante $\Delta gsu1771$ sobre FTO.	60
Figura 24. Voltamperometría cíclica a 0.01 V/s de las cepas WT y mutante $\Delta gsu1771$ sobre grafito.	61
Figura 25. Voltamperometría cíclica a 0.01 V/s de las cepas WT y mutante $\Delta gsu1771$ en Fe_2O_3 -FTO.	62
Figura 26. Voltamperometría cíclica a 0.01 V/s de las cepas WT y mutante $\Delta gsu1771$ en acero inoxidable.	63
Figura 27. Voltamperometría de onda cuadrada a 0.001 V/s, 30 Hz y 0.01 V de amplitud de las cepas WT y mutante $\Delta gsu1771$ sobre FTO.	65
Figura 28. Voltamperometría de onda cuadrada a 0.001 V/s, 30 Hz y 0.01 V de amplitud de las cepas WT y mutante $\Delta gsu1771$ sobre grafito.	66
Figura 29. Voltamperometría de onda cuadrada a 0.001 V/s, 30 Hz y 0.01 V de amplitud de las cepas WT y mutante $\Delta gsu1771$ en Fe_2O_3 sobre FTO.	67
Figura 30. Voltamperometría de onda cuadrada a 0.001 V/s, 30 Hz y 0.01 V de amplitud de las cepas WT y mutante $\Delta gsu1771$ sobre acero inoxidable.	68
Figura 31. Heat map de la expresión relativa de los genes <i>pilA</i> , <i>omcZ</i> , <i>omcS</i> , <i>omcB</i> , <i>omcC</i> , <i>omcE</i> , <i>omcM</i> , <i>omcF</i> , <i>pgcA</i> , <i>acnA</i> , <i>dcuB</i> , <i>epsH</i> y <i>ftsX</i> de biopelícula	

de la cepa mutante $\Delta gsu1771$ en comparación con la cepa WT de *G. sulfurreducens* DL1 sobre vidrio, Fe₂O₃-vidrio, FTO, Fe₂O₃-FTO, grafito y acero inoxidable por RT-qPCR. 76

Figura S1. Imágenes de microscopía confocal sobre acero inoxidable con los canales separados (vista superior)..... 102

Figura S2. Imágenes de microscopía confocal en Fe₂O₃ sobre FTO (Vistas inferior, superior y laterales)..... 103

Figura S3. Imágenes SEM del electrodo de acero inoxidable..... 104

Índice de tablas

Tabla 1. Materiales utilizados como soporte	16
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para qPCR	28
Tabla 3. Viabilidad de las células que constituyen la biopelícula sobre vidrio.	34
Tabla 4. Grosor máximo y biovolumen de las biopelícula formadas por las cepas WT y $\Delta gsu1771$ sobre vidrio.	34
Tabla 5. Viabilidad de las células que constituyen la biopelícula en Fe_2O_3 -vidrio.	37
Tabla 6. Grosor máximo y biovolumen de las biopelícula formadas por las cepas WT y $\Delta gsu1771$ sobre Fe_2O_3 -vidrio.....	37
Tabla 7. Viabilidad de las células que constituyen la biopelícula sobre FTO nuevo.	39
Tabla 8. Grosor máximo y biovolumen de las biopelícula formadas por las cepas WT y $\Delta gsu1771$ sobre FTO nuevo.	39
Tabla 9. Viabilidad de las células que constituyen la biopelícula en Fe_2O_3 -FTO. .	42
Tabla 10. Grosor máximo y biovolumen de las biopelícula formadas por las cepas WT y $\Delta gsu1771$ sobre Fe_2O_3 -FTO.....	42
Tabla 11. Viabilidad de las células que constituyen la biopelícula sobre grafito....	45
Tabla 12. Grosor máximo y biovolumen de las biopelícula formadas por las cepas WT y $\Delta gsu1771$ sobre grafito.....	45
Tabla 13. Viabilidad de las células que constituyen la biopelícula sobre acero inoxidable.....	48
Tabla 14. Grosor máximo y biovolumen de las biopelícula formadas por las cepas WT y $\Delta gsu1771$ sobre acero inoxidable.....	48
Tabla 15. Viabilidad bacteriana que constituyen las biopelículas sobre todos los materiales.....	49

Tabla 16. Biovolumen y grosor máximo de las biopelículas formadas por las cepas WT y $\Delta gsu1771$ sobre todos los materiales	50
Tabla S1. Expresión relativa de cada uno de los genes estudiados de la biopelícula de la cepa mutante $\Delta gsu1771$ en comparación con la biopelícula de la cepa WT de <i>G. sulfurreducens</i> DL1 sobre los seis materiales de estudio con su respectivo error estándar.	105

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

AgCl: cloruro de plata

ARN: ácido ribonucleico

CaCl₂: cloruro de calcio

CO₂: dióxido de carbono

CV: voltamperometría cíclica

EDTA: ácido

etilendiaminotetraacético

EET: transferencia extracelular de electrones

EPS: sustancia polimérica extracelular

Fe₂O₃: hematita

FTO: vidrio semiconductor de óxido de estaño dopado con flúor

g: gramos

G. sulfurreducens: *Geobacter sulfurreducens*

H₂: hidrógeno molecular

H₂O: agua

ITO: vidrio semiconductor de óxido de estaño e indio

MEC: matriz extracelular

MECs: celdas microbianas de electrólisis

MFCs: celdas microbianas de combustible

MIC: corrosión influenciada microbiológicamente

mg: miligramo

MgSO₄: sulfato de magnesio

mL: mililitro

N₂: nitrógeno molecular

Na₂SeO₄: seleniato de sodio

NaAc o C₂H₃NaO₂: acetato de sodio

NaHCO₃: bicarbonato de sodio

Na₂CO₃: carbonato de sodio

OCP: potencial de circuito abierto

OD: densidad óptica

PBS: solución salina amortiguada por fosfatos

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

rpm: revoluciones por minuto

RT: transcripción reversa

SBEs: sistemas bioelectroquímicos

SEM: microscopía electrónica de barrido

SHE: electrodo estándar de hidrógeno

SWV: voltamperometría de onda cuadrada

TBE: Tris – Borato - EDTA

TE: Tris - EDTA

U: unidad

V: voltios

WT: cepa silvestre

µg: microgramo

µL: microlitro

Resumen

Geobacter sulfurreducens DL1 es una bacteria capaz de acoplar la degradación de materia orgánica con la producción de electricidad y reducción de metales pesados, esto es posible debido a la producción de pili tipo IV y citocromos tipo c que le permiten realizar transferencia extracelular de electrones (EET) hacia diferentes materiales de soporte, los cuales pueden influir en la formación de biopelícula y EET de esta bacteria. Para este proyecto se utilizaron dos cepas de *G. sulfurreducens* DL1: la cepa silvestre (WT) y la cepa mutante $\Delta gsu1771$ (este gen codifica a la proteína GSU1771 que funciona como un regulador transcripcional), esta cepa se caracteriza por producir más biopelícula y más corriente eléctrica que la cepa WT; para estudiar la formación de biopelículas sobre diferentes materiales de soporte: vidrio, hematita (Fe_2O_3) sobre vidrio, vidrio semiconductor de óxido de estaño dopado con flúor (FTO), Fe_2O_3 sobre FTO, grafito y acero inoxidable. A cada una de las biopelículas formadas sobre los diferentes materiales se les realizaron las siguientes pruebas experimentales: cuantificación de biopelícula por cristal violeta, observación por microscopía confocal láser de barrido (CLSM), determinación de actividad electroquímica y cuantificación de la expresión relativa de ciertos genes por RT-qPCR. Se encontró que la cepa WT forma una delgada biopelícula uniforme que muestra diferentes grosores dependiendo del material sobre el que crezca y presenta diferentes procesos redox característicos asociados a cada material conductor. Por otro lado, la cepa mutante $\Delta gsu1771$ forma biopelículas más gruesas que las de la cepa WT y forma estructuras características sobre todos los materiales de electrodo. Los procesos redox asociados con la cepa mutante son similares a los de la cepa WT; sin embargo, produce más corriente, lo cual se asocia con una mayor expresión relativa de genes que están involucrados en la EET y en la producción de exopolisacáridos.

Introducción

Geobacter sulfurreducens

Geobacter sulfurreducens es una δ -proteobacteria anaeróbica que habita en el subsuelo. Desde su descubrimiento en 1994, esta bacteria ha generado mucho interés por sus capacidades metabólicas y aplicaciones biotecnológicas, entre las que se pueden mencionar:

- Acoplamiento de la degradación de materia orgánica a la reducción de metales (Figura 1) y mineralización (Caccavo *et al.*, 1994).
- Participar de manera fundamental en los ciclos biogeoquímicos del hierro (Fe) (Figura 1) y del manganeso (Mn).
- Capacidad de reducir diversos metales pesados como uranio (U) (Figura 1), cadmio (Cd), cobalto (Co), paladio (Pd) y tecnecio (Tc) (Reguera & Kashefi, 2019).
- Poseer más de 100 citocromos tipo *c* codificados en su genoma (Methé *et al.*, 2003).
- Presentar un pili tipo IV con capacidades conductivas (nanocables) en rangos y distancias sin precedentes (Reguera *et al.*, 2005), cuya estructura y configuración se ha intentado determinar por modelos y simulaciones (Reardon & Mueller, 2013; Feliciano *et al.*, 2015).
- Nanocables de pili capaces de extender la cadena respiratoria más allá de su envoltura celular para reducir óxidos de hierro a magnetita (Figura 1), lo que le permite acoplarse electrónicamente a pares sintróficos (Kato *et al.*, 2012).
- Capacidad para crecer como biopelículas electroactivas sobre electrodos, permitiendo su cultivo en dispositivos bioelectroquímicos (Steidl *et al.*, 2016; Tabares *et al.*, 2019).

G. sulfurreducens es un microorganismo disimilatorio reductor de Fe(III), Mn(IV), fumarato, azufre y cobalto, utilizándolos como aceptores de electrones, mientras que usa el hidrógeno y el acetato como donadores de electrones; este último

también lo puede utilizar como fuente de carbono (Caccavo *et al.*, 1994; Reguera & Kashefi, 2019). *G. sulfurreducens* es un microorganismo litótrofo facultativo anaerobio, que puede usar como donador de electrones el hidrógeno molecular y compuestos orgánicos sencillos. Además, esta bacteria utiliza compuestos de Fe(III) como aceptor de electrones para reducirlos a Fe(II).

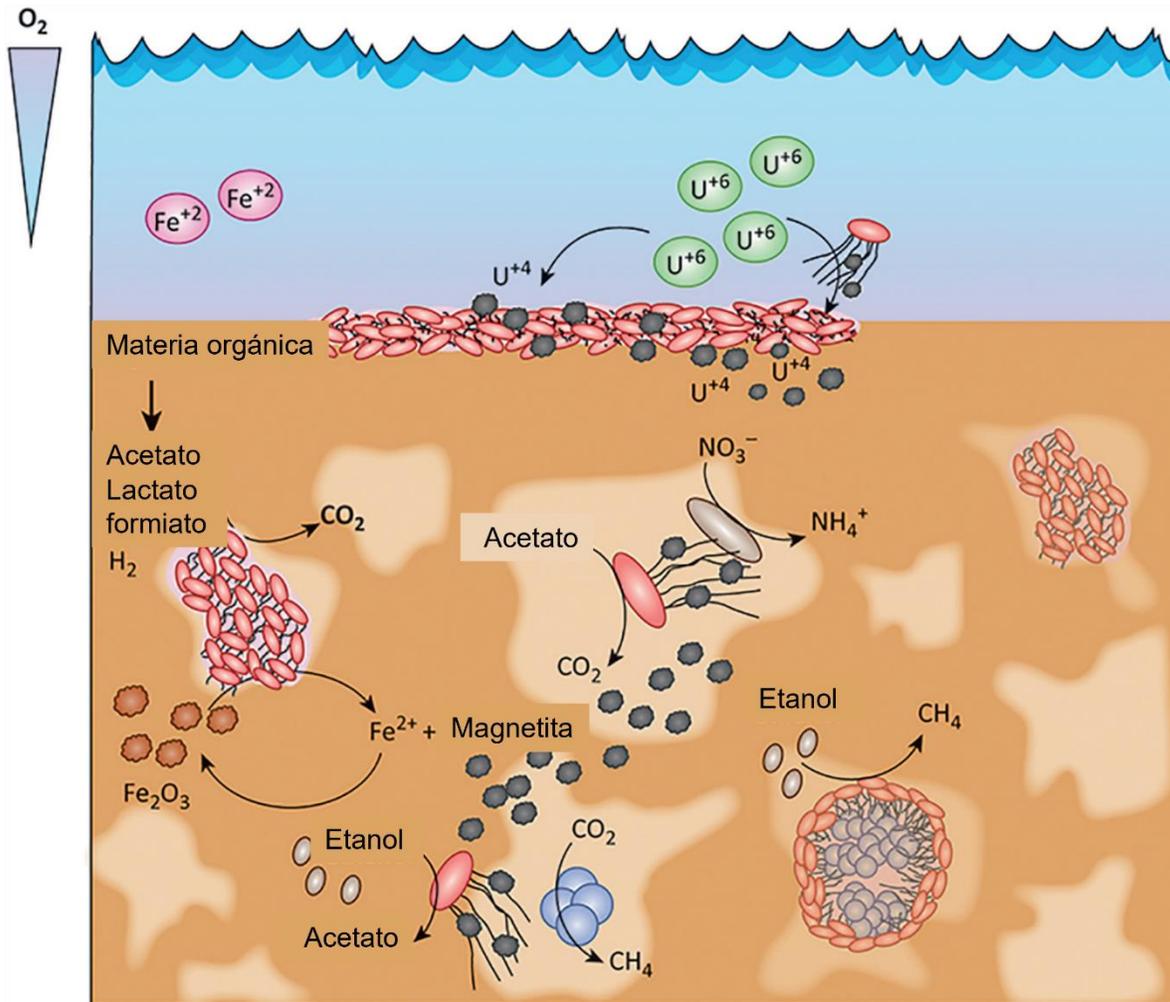


Figura 1. Capacidad de *G. sulfurreducens* para reducir químicamente metales pesados y formar relaciones sintróficas con otros microorganismos. Tomado de Tabares *et al.*, 2019.

La reducción disimilatoria de metales es un proceso utilizado por microorganismos para conservar energía mediante la oxidación de donadores de electrones

orgánicos o inorgánicos y la reducción de un metal. La reducción microbiana de metales permite a los organismos crear gradientes electroquímicos, lo que les proporciona la energía química necesaria para su crecimiento (Lloyd, 2003).

Biopelícula

La biopelícula es una matriz extracelular (MEC) tridimensional en la que se encuentran embebidas complejas comunidades de una o más especies de microorganismos, los cuales desarrollan fenotipos únicos o característicos de adaptación comparados con los microorganismos de vida libre (Loera Muro *et al.*, 2012). También se ha determinado que los modelos de biopelícula *in vitro* (en dispositivos de laboratorio) e *in vivo* (en modelos animales) tienen comportamientos distintos dado el ambiente en que se desarrollen (Bjarnsholt *et al.*, 2013).

La formación de la MEC es clave para la biopelícula, la cual está constituida por exopolisacáridos sintetizados por los microorganismos que la integran, además de otras macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y otros productos procedentes de la lisis bacteriana. La arquitectura de la MEC no es sólida y las bacterias en biopelículas viven en cúmulos celulares que se extienden en forma tridimensional desde la superficie a la cual están adheridas (Flemming & Wingender, 2010).

La formación de biopelícula pasa por cinco etapas: en la primera etapa se observa una adhesión leve y débil al sustrato, en la segunda se presenta una adhesión irreversible al sustrato, en la tercera etapa se observa la maduración de la biopelícula, en la cuarta se presenta la formación de microcolonias y en la quinta etapa algunas de las células que conforman la biopelícula vuelven a su estado planctónico, se liberan y comienzan nuevamente el ciclo (O'Toole *et al.*, 2000).

Antecedentes

Biopelícula electroactiva de *G. sulfurreducens*

Una biopelícula electroactiva es aquella capaz de transferir carga en sistemas bioelectroquímicos (SBE), los cuales generan electricidad. La biopelícula electroactiva contiene muchas similitudes con las biopelículas tradicionales que están compuestas por una matriz que comprende agua, microorganismos y sustancia polimérica extracelular, que está compuesta por ácidos nucleicos, lípidos, proteínas y polisacáridos. La estructura y función de las biopelículas electroactivas están determinadas por una multitud de factores diferentes, incluidos los biológicos, el material del electrodo sobre el que se desarrolla, el diseño del SBE y los parámetros operativos (Semenec & Franks, 2015). *G. sulfurreducens* es de los pocos microorganismos capaces de desarrollar una biopelícula electroactiva sobre un electrodo en SBE.

Las biopelículas electroactivas utilizan la superficie del electrodo tanto como un andamio de fijación como un dispositivo respiratorio. La matriz de este tipo de biopelículas contiene bolsas y canales, los cuales no contienen células bacterianas sino que están llenas de nutrientes y productos de desecho del metabolismo (Semenec & Franks, 2015).

G. sulfurreducens es capaz de formar biopelícula sobre las superficies del electrodo que funciona como un ánodo, lo cual da lugar a un nuevo electrodo denominado bioánodo. La elección del material del electrodo, así como del potencial aplicado al electrodo, influirá en la composición y comportamiento de la biopelícula. Además, se ha encontrado que las biopelículas de cultivo puro de *G. sulfurreducens* son capaces de producir una energía equivalente a la de las biopelículas de cultivo mixto de microorganismos, siendo hasta el momento la cepa que produce las densidades de corriente más altas. También se conoce que la variación del tamaño del ánodo y del material afecta el espesor de la biopelícula desarrollada en los cultivos puros de esta cepa (Nevin *et al.*, 2008), pero hasta el momento no se sabe de qué forma se regula.

En los últimos años se ha estudiado la biopelícula electroactiva de *G. sulfurreducens* y se ha propuesto que la transferencia de electrones a través de sus biopelículas electroactivas requiere la expresión tanto de algunos citocromos tipo *c* como de pili tipo IV, lo que promueve reacciones de transferencia de electrones a corta distancia en biopelículas delgadas (con un espesor menor a 10 μm) de este microorganismo (Bonanni *et al.*, 2013).

El **pili tipo IV** o e-pili desempeña un papel muy importante en la conductividad eléctrica de las biopelículas gruesas (con un espesor que oscila entre 10-50 μm) formadas por *G. sulfurreducens* sobre el ánodo acoplado a la oxidación del acetato a la generación de corriente eléctrica y proporcionando soporte estructural. Es por eso que, la transición de una biopelícula monocapa a una biopelícula madura multicapa requiere de la expresión de pili conductivo, consistente con el papel esencial de estos apéndices de proteínas extracelulares como conductores electrónicos a través de todas las capas de las biopelículas (Steidl *et al.*, 2016).

Por otro lado, los citocromos también tienen un rol notable en la conductividad de la biopelícula de *G. sulfurreducens*. De los más de 100 citocromos que puede expresar esta bacteria, sólo algunos han mostrado ser esenciales para la transferencia extracelular de electrones (EET), y se considera que esta gran cantidad de citocromos le dan una gran versatilidad a *G. sulfurreducens* en cuanto a los aceptores de electrones que puede emplear. Entre ellos, se ha encontrado que los citocromos de membrana externa más importantes (Figura 2), por contribuir a la transferencia de carga directa en biopelículas electroactivas, son los siguientes:

- **OmcB**: citocromo tipo *c* de membrana externa dodecahemo involucrado en la reducción de Fe(III) soluble, junto con la proteína de la membrana externa similar a la porina OmbB y el citocromo de tipo *c* periplásmico OmaB, forma parte de un **complejo porina-citocromo** que transfiere electrones a través de la interfase electrodo/biopelícula (Leang *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2014).

- **OmcS**: citocromo tipo *c* hexahemo asociado al pili tipo IV conductivo esencial para la reducción de óxidos de Fe(III) y Mn(IV) insolubles (Ueki, 2021).
- **OmcZ**: citocromo tipo *c* de membrana externa octahemo necesario para la transferencia de electrones a electrodos y a lo largo de la biopelícula (Richter *et al.*, 2009).

No obstante, se pueden mencionar otros citocromos de membrana externa que podrían ayudar en la transferencia de electrones extracelular tales como:

- **OmcC**: proteína homóloga al citocromo tipo *c* OmcB, probablemente resultado de una duplicación genética, y que, junto con la proteína de la membrana externa similar a la porina OmbC y el citocromo de tipo *c* periplásmico OmaC, forma otro **complejo porina-citocromo** (Leang & Lovley, 2005).
- **OmcE**: citocromo tipo *c* tetrahemo de membrana externa involucrado en la reducción de óxidos de Fe(III) (Mehta *et al.*, 2005).
- **OmcF**: citocromo tipo *c* monohemo de membrana externa que es requerido para la reducción de Fe(III) y la producción de corriente eléctrica. Hasta el momento, no se sabe si desempeña un papel directo en la transferencia de electrones extracelular o realiza una función como regulador de la expresión de OmcB y OmcC (Kim *et al.*, 2008).
- **OmcT**: proteína homóloga al citocromo tipo *c* OmcS (Mehta *et al.*, 2005).
- **PgcA**: citocromo tipo *c* trihemo extracelular que facilita la reducción de óxidos de Fe(III) y de Mn(IV) (Zacharoff *et al.*, 2017).

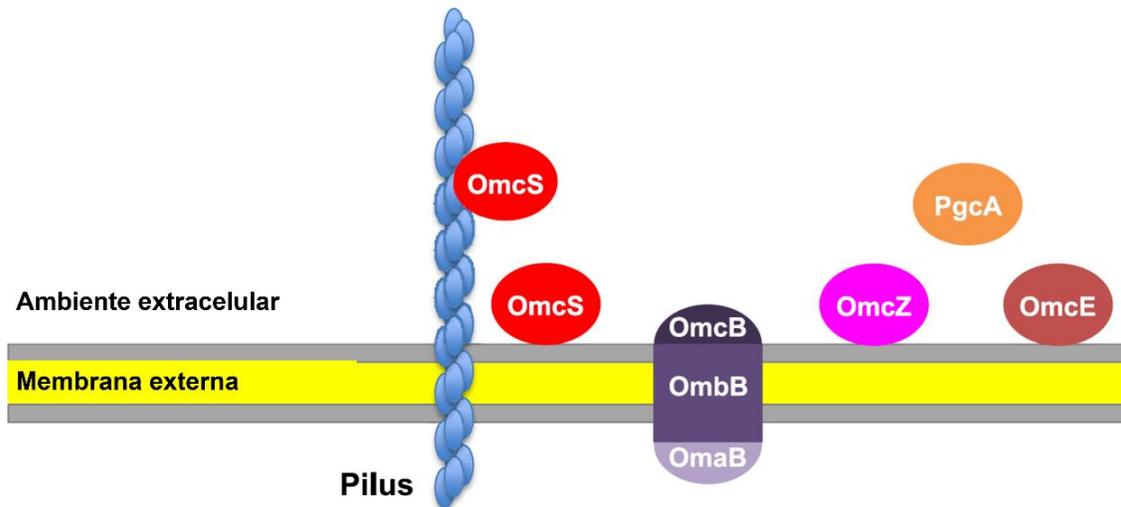


Figura 2. Proteínas implicadas en procesos de EET de *G. sulfurreducens*.

Tomado de Ueki *et al.*, 2021.

Los **complejos porina-citocromo** consisten en un citocromo tipo *c* multihemo expuesto al periplasma que está asociado a una proteína barril β transmembranal y otro citocromo tipo *c* multihemo expuesto en la superficie externa de la célula, formando un conducto por el que se puede transferir electrones a través de la membrana (Lovley & Holmes, 2022). Hasta el momento se conoce que *G. sulfurreducens* tiene cinco complejos porina-citocromo presentes en su genoma (Gralnick & Bond, 2023).

En un estudio reciente, se trabajó con dos complejos porina-citocromo que se ubican en un mismo locus de *G. sulfurreducens* y se encontró que la delección de este grupo de genes *ombB-omaB-omcB-orfS-ombC-omaC-omcC* no afectó el crecimiento de *G. sulfurreducens* en un medio con fumarato, pero disminuyó la capacidad de esta cepa mutante para reducir citrato férrico (Liu *et al.*, 2014).

Por otra parte, se trabajó con la biopelícula de una cepa mutante *extABCD⁺*, en la cual se deletaron cuatro de los cinco complejos porina-citocromo de membrana externa presentes en *G. sulfurreducens* y se dejó sólo el grupo de genes *extABCD* que codifica un complejo porina-citocromo, y se observó que tiene una densidad celular y actividad anabólica más alta que la cepa WT. La información anterior indica que la transferencia de electrones entre células fue mayor en la cepa

mutante que en la cepa WT, lo cual se comprobó midiendo la conductividad eléctrica de las biopelículas de *G. sulfurreducens* en un SBE (Jiménez Otero *et al.*, 2021).

Además, se encontró que las mediciones de conductividad eléctrica *in situ* en biopelículas de *G. sulfurreducens* crecidas sobre un electrodo de matriz interdigitada (IDA) demostraron la dependencia térmica del transporte de carga, que es consistente con la conductividad eléctrica (saltos de electrones) mediada por los grupos hemo de los citocromos tipo *c* asociados a la matriz (Yates *et al.*, 2015).

Por otro lado, se encontró que el exopolisacárido que conforma la biopelícula electroactiva de *G. sulfurreducens* tiene varias funciones, una de ellas es la de funcionar como anclaje para los citocromos tipo *c* extracelulares, siendo esencial en la transferencia de electrones extracelular, esto contribuye a la actividad redox de las sustancias poliméricas extracelulares (Zhuang *et al.*, 2022).

Estructura de la biopelícula de *G. sulfurreducens*

Se han realizado estudios para determinar la estructura de la biopelícula electroactiva de *G. sulfurreducens* y en muchos de ellos se ha empleado la microscopía confocal para observar la matriz extracelular y los pilares que se forman en la biopelícula.

En algunos estudios se ha realizado la observación de la biopelícula de *G. sulfurreducens* por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM). Sin embargo, el recubrimiento metálico que implica este procedimiento impide la investigación detallada de la unión microbiana, la presencia de exopolisacárido y los detalles finos de la superficie que pueden dilucidar los mecanismos detrás de la formación de la arquitectura y el intercambio de material genético en la biopelícula. No obstante, con el desarrollo de nuevas técnicas, tales como la microscopía de iones de helio, se ha logrado observar la estructura de la biopelícula electroactiva de este microorganismo con más detalle, revelando

detalles reales de la superficie de *G. sulfurreducens*, como las pilinas (Belianinov *et al.*, 2017).

En nuestro grupo de trabajo, se han estudiado varios reguladores globales implicados en la formación de biopelícula, entre éstos, se encontró que la cepa mutante $\Delta gsu1771$ (un regulador transcripcional) forma una biopelícula con estructuras características tipo columnas con canales internos, las cuales no están presentes en la cepa WT (Hernández-Eligio *et al.*, 2022). La cepa mutante $\Delta gsu1771$ se describe a continuación.

Descripción de la mutante $\Delta gsu1771$ de *G. sulfurreducens*

En estudios de evolución adaptativa inicialmente se describió una mutación que incrementó la transferencia de electrones, mapeada en el gen *gsu1771*, el cual codifica una proteína de unión a ADN que funciona como un regulador transcripcional tipo SARP (Proteína Reguladora de Antibióticos de *Streptomyces*) (Tremblay *et al.*, 2011).

En nuestro grupo de trabajo, se deletó el gen *gsu1771* por medio de doble recombinación en *G. sulfurreducens*, lo que provocó una serie de cambios fenotípicos en la cepa mutante, tales como una disminución en el crecimiento de células planctónicas en comparación con la cepa WT empleando el acetato como donador y el fumarato como aceptor de electrones, y se observó un aumento en la reducción de Fe(III) soluble como aceptor de electrones. También se comprobó que la proteína GSU1771 controla la transcripción de varios genes que codifican proteínas involucradas en la reducción de metales y el metabolismo de fumarato (Hernández-Eligio *et al.*, 2022).

Al estudiar la estructura de la biopelícula formada por la cepa mutante $\Delta gsu1771$ se determinó que presentó un grosor mayor y que formó unas estructuras características tipo columnas con canales internos, además generó aproximadamente cien veces más corriente eléctrica que la biopelícula de la cepa WT (Hernández-Eligio *et al.*, 2022).

Estudios recientes de transcriptoma demostraron que la proteína GSU1771 de *G. sulfurreducens* regula la transcripción de varios genes, incluido *pilA* y muchos citocromos de tipo *c* implicados en la reducción de Fe(III) y en la transferencia de electrones extracelular a electrodos; además, se determinó que GSU1771 regula directamente la transcripción de *omcE*, *omcS*, *omcZ* y *pilA* (Hernández-Eligio *et al.*, 2022).

Todo lo anterior sugiere una amplia función reguladora de la proteína GSU1771 en *G. sulfurreducens*, por lo que se consideró importante estudiar la biopelícula de la cepa mutante Δ *gsu1771* sobre diferentes tipos de materiales conductores y no conductores para este proyecto, debido a que forma una biopelícula más gruesa y genera más corriente que la cepa WT.

Sistemas bioelectroquímicos: herramientas para estudiar las biopelículas de *G. sulfurreducens*

Los sistemas bioelectroquímicos (SBEs) son sistemas híbridos emergentes de la biotecnología y la electroquímica que llevan a cabo la conversión de energía química o eléctrica, o viceversa, de manera sostenible a través de reacciones químicas redox catalizadas por microorganismos. Según el modo de aplicación, los SBEs se pueden dividir en celdas microbianas de combustible (MFCs), celdas microbianas de electrólisis (MECs), electrosíntesis microbiana (MESs), celdas microbianas de desalinización (MDCs) y celdas microbianas solares (MSCs); entre las cuales, las MFCs y las MECs son los sistemas más estudiados en los últimos años (Li & Chen, 2018).

Al igual que otros tipos de celdas electroquímicas, tanto las MFCs (Malvankar *et al.*, 2012) como las MECs constan de dos electrodos, es decir, un ánodo y un cátodo, que están conectados con un cable conductor externo para formar un circuito eléctrico cerrado (Li & Chen, 2018). Los sistemas bioelectroquímicos (SBEs) representados en el esquema de la Figura 3, son sistemas únicos que aprovechan el metabolismo de los microorganismos para convertir la energía

química en energía eléctrica u otro producto químico formado en el cátodo por un proceso de reducción electroquímica (Pant *et al.*, 2012).

Es muy importante el diseño del SBE que se utiliza para crecer y analizar la biopelícula de *G. sulfurreducens*, ya que esta cepa tiene dos opciones principales para ser cultivado en este tipo de sistemas, las cuales se describen a continuación:

- **Celdas microbianas de combustible (MFCs):** Una MFC genera energía eléctrica. El católito (electrólito adyacente al cátodo de una celda electroquímica) preferido en este tipo de sistemas es una solución electrolítica que contiene O_2 disuelto (compartimiento aireado), el cual funge como aceptor final de electrones. En algunos casos, la desventaja es que se lleva a una reducción electroquímica parcial del O_2 porque en lugar de producir agua, se genera H_2O_2 . Este problema se puede sobrellevar si el cátodo está dopado con un metal catalizador, como el platino. También se puede reemplazar por algún otro católito líquido, que contenga otro aceptor final de electrones como el ferrocianuro o el permanganato (Babauta & Beyenal, 2015).
- **Celdas microbianas de electrólisis (MECs):** En este tipo de sistemas, el producto final en el compartimiento catódico es el H_2 gaseoso y es el más usado para el cultivo de *G. sulfurreducens*. Se ha observado que la generación de corriente eléctrica y el grosor de la biopelícula es mucho mayor en estas celdas que en una MFC (Speers & Reguera, 2015).

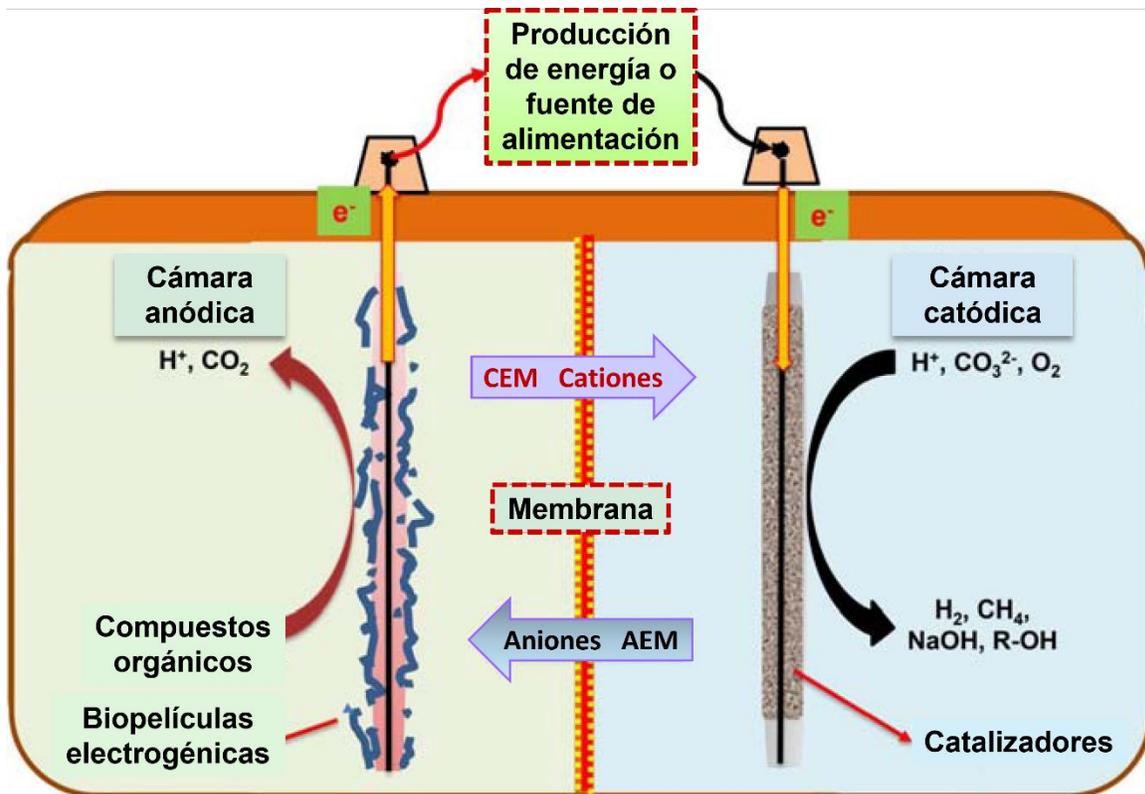


Figura 3. Esquema general de un sistema bioelectroquímico (SBE). CEM: membrana de intercambio catiónico, AEM: membrana de intercambio aniónico. Modificado de Li *et al.*, 2015.

Las bacterias electroactivas se organizan como una biopelícula en la superficie del electrodo, ya sea un ánodo o un cátodo. Su dinámica de crecimiento y actividad electroquímica en la superficie del electrodo evolucionan continuamente de acuerdo con las poblaciones de la comunidad microbiana y las condiciones fisicoquímicas de la interfase entre el electrodo y la biopelícula (Pinck *et al.*, 2020).

Los parámetros que influyen en los SBEs son:

a) **Las bacterias electroactivas que conforman la biopelícula.**

- Inóculo
- Tasa de crecimiento de la biopelícula
- Población electroactiva relativa
- Mecanismos de transferencia de electrones

- Producción de exopolisacárido (EPS)
- b) **Las propiedades del electrodo.**
- Material
 - (micro) Topografía
 - Porosidad
 - Geometría
 - Relación superficie/volumen
 - Potencial
- c) **Los parámetros que influyen en el electrolito.**
- Sistema en lote/continuo
 - Tasa de cizallamiento
 - pH (electrolito amortiguador)
 - Temperatura
 - Carga de sustrato
 - Aceptores de electrones solubles

Electrodos: soportes para el crecimiento de la biopelícula de *G. sulfurreducens*

La elección del material del electrodo donde crece la biopelícula de *G. sulfurreducens* es importante (Nevin *et al.*, 2008). Algunas de las características más importantes son la estructura de los poros, la morfología de la superficie, la rugosidad y la hidrofilia del material que determinan la estabilidad microbiana en los SBEs (Pinck *et al.*, 2020). Los materiales del ánodo, los cuales tienen una polaridad negativa en una MFC, son generalmente preferidos por los exoelectrógenos (Li & Chen, 2018).

Algunos de los ánodos que se utilizan para estudiar la biopelícula electroconductiva de *G. sulfurreducens* son los óxidos conductores transparentes, tales como FTO (vidrios semiconductores de óxido de estaño dopados con flúor), ITO (vidrios semiconductores de óxido de estaño e indio) o materiales transparentes a base de oro (Scarabotti *et al.*, 2022).

Recientemente se han utilizado vidrios cubiertos por una capa de oro y paladio como ánodos transparentes para el crecimiento de las biopelículas de *G. sulfurreducens*. Se observó que los cambios de grosor de los ánodos (de 12.5 a 200 nm) no tienen efecto sobre las biopelículas anódicas de *G. sulfurreducens* en etapas tempranas en los siguientes parámetros: la densidad máxima de corriente eléctrica generada, el tiempo *lag* (el tiempo expresado en días que necesitan las biopelículas para generar una densidad de corriente de 1 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) y en el coeficiente de rendimiento de las células planctónicas (Scarabotti *et al.*, 2022).

Además, se ha reportado que un potencial de ánodo más alto aplicado a un SBE tipo electrolítico microbiano con un cultivo puro de *G. sulfurreducens* resultó en una mayor biomasa de biopelícula, una mayor producción de corriente eléctrica y un tiempo de inicio más rápido, dentro de un intervalo determinado de potencial de semicelda de -160 mV a 0.0 mV *versus* un electrodo de hidrógeno estándar (SHE) (Franks & Nevin, 2010).

También, se ha observado que tanto los cultivos puros de *G. sulfurreducens* como los cultivos de comunidades microbianas mezcladas tienen mejoras si se aumenta el potencial hasta cierto límite. Esto se puede explicar de dos maneras: “respuesta por reestructuración de la comunidad” (las comunidades microbianas presentes en la biopelícula cambian) y “selección de la vía de transferencia extracelular de electrones” (los microorganismos seleccionan una vía de EET específica según el potencial). Estudios recientes demuestran que ambas situaciones se podrían estar llevando a cabo como un proceso de adaptación a los cambios de potencial (Franks & Nevin, 2010).

Estudios electroquímicos de las biopelículas de *Geobacter sulfurreducens*

La electroquímica es la ciencia que estudia las consecuencias de transferir cargas eléctricas de una fase a otra, es decir, las propiedades eléctricas de las interfases. De esta manera, en una celda electroquímica, en una interfase electrodo-electrolito, los electrones dejan el electrodo (fuente de electrones o cátodo) y las partículas (cationes) de la solución son reducidas, mientras que en la otra

interfase, el electrodo (aceptor de electrones, ánodo) toma electrones de las partículas y tiene lugar la oxidación (Yasri & Gunasekaran, 2017).

Para llevar a cabo las pruebas electroquímicas en biopelículas de *G. sulfurreducens* se requiere de algunos componentes necesarios: un potenciostato, una celda electroquímica, un electrodo de trabajo, un contraelectrodo, un electrodo de referencia y un tubo de dispersión de gas (Babauta & Beyenal, 2015). Para este trabajo se consideró importante conocer la respuesta de la biopelícula ante la presencia de acetato de sodio como donador de electrones (Figura 4).

Existen varias técnicas electroquímicas que se pueden utilizar para analizar la capacidad conductiva de las biopelículas electroconductoras de *G. sulfurreducens* en un sistema bioelectroquímico, entre las que se pueden mencionar las siguientes:

- **Potencial de circuito abierto (OCP):** potencial establecido entre la superficie del electrodo de trabajo a estudiar y el electrolito dentro de una celda electroquímica, con respecto a un electrodo de referencia (Mischler & Munoz, 2018).
- **Voltamperometría cíclica (CV):** una técnica electroquímica que aplica un barrido de potencial lineal en el electrodo de trabajo, desde un potencial de corriente nula hasta un potencial de inversión en el que cambia la dirección del barrido. Esta perturbación da lugar a una respuesta en corriente eléctrica. El objetivo de esta técnica es identificar el potencial en el cual, los miembros de las parejas redox activas relacionados a la biopelícula electroquímicamente activa (EAB) son oxidados o reducidos (Babauta *et al.*, 2012).
- **Voltamperometría de onda cuadrada (SWV):** una técnica electroquímica diferencial de gran amplitud en la que se aplica al electrodo de trabajo una forma de onda compuesta por una onda cuadrada simétrica, superpuesta a un potencial de escalera base (Osteryoung & Osteryoung, 1985). Esta técnica puede detectar bajas concentraciones de especies activas electroquímicamente que no son fácilmente detectables por voltamperometría cíclica (Babauta & Beyenal, 2015).

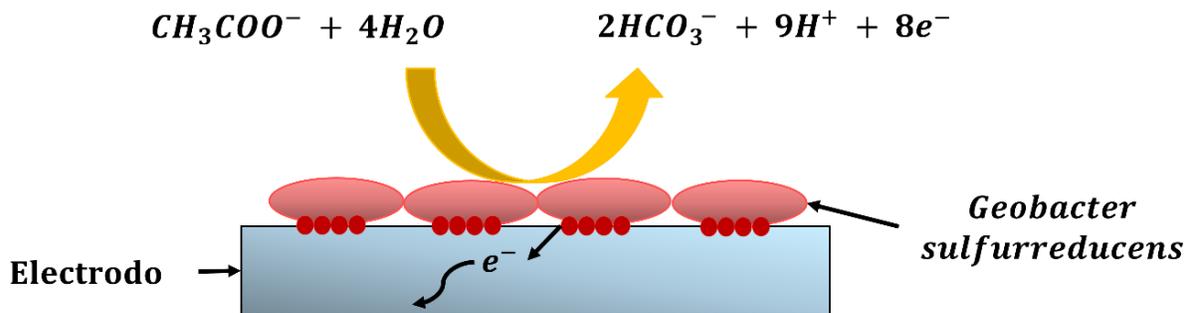


Figura 4. *G. sulfurreducens* utiliza el acetato como donador de electrones. Los electrones resultantes son transferidos al electrodo por EET.

Materiales utilizados para el estudio de biopelículas electroactivas

La siguiente tabla presenta los materiales comúnmente utilizados para estudiar biopelículas electroactivas:

Tabla 1. Materiales utilizados como soporte				
Material	Descripción	Potencial de circuito abierto (V vs. SHE)	Microorganismos	Referencias
Vidrio	Material inorgánico duro, frágil, transparente y amorfo	N/A	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Yi <i>et al.</i> , 2009; Cologgi <i>et al.</i> , 2014; Richter <i>et al.</i> , 2017; Huerta-Miranda <i>et al.</i> , 2019; Huerta-Miranda <i>et al.</i> , 2023; Jaramillo-Rodríguez <i>et al.</i> , 2023
			<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	Thormann <i>et al.</i> , 2004; Chao <i>et al.</i> , 2013
ITO	Óxido de indio y estaño	0.15 - 0.2 ^a	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Jain <i>et al.</i> , 2011; Matsuda <i>et al.</i> , 2011; Robuschi <i>et</i>

	semiconductor transparente			<i>al.</i> , 2017; Ren <i>et al.</i> , 2021; Frühauf <i>et al.</i> , 2022
			<i>Azospirillum humicireducens</i>	Chen <i>et al.</i> , 2023; Wu <i>et al.</i> , 2023
			<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	Kuo <i>et al.</i> , 2024
			Consorcio microbiano	Saavedra <i>et al.</i> , 2023
FTO	Óxido de estaño conductor transparente dopado con flúor	0.39 - 0.43 ^b	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Huerta-Miranda <i>et al.</i> , 2019; Zhang <i>et al.</i> , 2021; Hernández-Eligio <i>et al.</i> , 2022; Neu <i>et al.</i> , 2022; Huerta-Miranda <i>et al.</i> , 2023
			<i>Chlorella vulgaris</i>	Thorne <i>et al.</i> , 2011; Saifuddin <i>et al.</i> , 2022
			Consorcio microbiano	Heijne <i>et al.</i> , 2018; Molenaar <i>et al.</i> , 2018; Ueoka <i>et al.</i> , 2018; Pereira <i>et al.</i> , 2022; Sridharan <i>et al.</i> , 2022
Fe₂O₃	Una capa de hematita sobre diferentes tipos de materiales	0.2 - 0.3 ^c	Especies de <i>Geobacter</i>	Kato <i>et al.</i> , 2013; Li <i>et al.</i> , 2014; Huerta Miranda <i>et al.</i> , 2023
			<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	Meitl <i>et al.</i> , 2009; Johs <i>et al.</i> , 2010; Qian <i>et al.</i> , 2014; Zhou <i>et al.</i> , 2015; Gao <i>et al.</i> , 2019
			<i>Shewanella putrefaciens</i> CN-32	Hu <i>et al.</i> , 2020
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ren <i>et al.</i> , 2017
			Consorcio microbiano	Liang <i>et al.</i> , 2016; Wen <i>et al.</i> , 2022

Grafito	Una forma de carbono frágil semiconductora de color negro	0.1 - 0.55 ^d	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Bond & Lovley 2003; Marsili <i>et al.</i> , 2008; Katuri <i>et al.</i> , 2012; Jana <i>et al.</i> , 2014; Huerta-Miranda <i>et al.</i> , 2023; Jaramillo-Rodríguez <i>et al.</i> , 2023
			<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	Matsumoto <i>et al.</i> , 2021
			<i>Listeria monocytogenes</i>	Light <i>et al.</i> , 2018
			<i>Thermincola ferriacetica</i>	Lusk <i>et al.</i> , 2016; Faustino <i>et al.</i> , 2021
			Consorcio microbiano	Liu <i>et al.</i> , 2007; Tavakolian <i>et al.</i> , 2020
Acero inoxidable	Aleación de acero que puede contener en diferentes cantidades a otros metales, como cromo, molibdeno, níquel y tungsteno.	0.15 - 0.2 ^e	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Dumas <i>et al.</i> , 2008; Tang <i>et al.</i> , 2019; Tang <i>et al.</i> , 2021
			<i>Geobacter metallireducens</i>	Tang <i>et al.</i> , 2021
			Consorcio microbiano	Pocaznoi <i>et al.</i> , 2012; Ledezma <i>et al.</i> , 2015; Pu <i>et al.</i> , 2018
Oro	Electrodo metálico altamente conductor y químicamente inerte	0.17 - 0.21 ^f	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Richter <i>et al.</i> , 2008; Liu <i>et al.</i> , 2011; Vargas <i>et al.</i> , 2013; Kuzume <i>et al.</i> , 2013; Maestro <i>et al.</i> , 2014; Zhang <i>et al.</i> , 2016; Champigneux <i>et al.</i> , 2018; Füg <i>et al.</i> , 2019; Scarabotti <i>et al.</i> , 2021

			<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	Kane <i>et al.</i> , 2013
			<i>Escherichia coli</i>	Borghol <i>et al.</i> , 2010
^a Matveeva <i>et al.</i> , 2005; ^b Korjenic & Raja, 2019; ^c Shimizu <i>et al.</i> , 2012; ^d Renslow <i>et al.</i> , 2011; ^e Tang <i>et al.</i> , 2021; ^f Pinto <i>et al.</i> , 2019				

Comprender cómo se forman las biopelículas de *G. sulfurreducens* sobre diferentes superficies es esencial para el desarrollo adecuado de biopelículas electroactivas y su uso en dispositivos bioelectroquímicos, en el que la influencia de los materiales de los electrodos en la estructura de las biopelículas también es un parámetro importante por considerar.

En este estudio se analizó la estructura de la biopelícula y sus propiedades bioelectroquímicas utilizando diferentes materiales de electrodos con diferentes características químicas: vidrio como material inerte no conductor, vidrio cubierto con óxidos de hierro (Fe₂O₃-vidrio) y materiales semiconductores (FTO, Fe₂O₃-FTO, grafito y acero inoxidable). Estas biopelículas se caracterizaron mediante su cuantificación por medio de tinción por cristal violeta, observación de la estructura a través de microscopía confocal láser de barrido (CLSM), caracterización de las propiedades electroquímicas y expresión relativa de determinados genes mediante RT-qPCR.

Justificación

Geobacter sulfurreducens es una bacteria que tiene la capacidad de transferir electrones de manera extracelular directamente a compuestos insolubles, por lo que tiene un gran potencial biotecnológico en la producción de bioelectricidad y la biorremediación de metales pesados. Para estos dos procesos es importante la formación de una biopelícula en las superficies a las que se transferirán los electrones. Es por ello que el conocimiento que se obtenga acerca de la formación, estructura y regulación de la biopelícula, nos permitirá comprender dicho proceso y proponer modelos de su formación.

Hipótesis

La composición y estructura de las biopelículas generadas por la cepa mutante $\Delta gsu1771$ y la cepa WT de *G. sulfurreducens* mejorará su capacidad de transferir carga eléctrica dependiendo de los diferentes materiales conductores sobre los que crezcan.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar y comparar la biopelícula de la cepa mutante $\Delta gsu1771$ con la cepa silvestre de *G. sulfurreducens* formadas sobre diversos materiales de soporte conductores y no conductores.

Objetivos específicos

Analizar la estructura de las biopelículas de las cepas WT y $\Delta gsu1771$ de *G. sulfurreducens* sobre diferentes materiales de soporte.

Analizar la actividad electroquímica de las biopelículas de las cepas WT y $\Delta gsu1771$ de *G. sulfurreducens* sobre los diferentes materiales conductores.

Determinar la expresión de los citocromos más relevantes de las biopelículas en los soportes analizados.

Determinar la expresión del pili en las diferentes biopelículas formadas en función del soporte empleado.

Materiales

Cepas

En este proyecto se trabajó con las siguientes cepas:

Cepas	Características	Referencias
<i>Geobacter sulfurreducens</i> DL1	Cepa silvestre DL1	Colección del laboratorio (Juárez <i>et al.</i> , 2009)
<i>Geobacter sulfurreducens</i> DL1 Δgsu1771	Derivada de <i>G. sulfurreducens</i> DL1 con una deleción del gen <i>gsu1771</i>	Almazán (2018), Hernández-Eligio <i>et al.</i> (2022)

Medios de cultivo

- **Medio NBAF:** medio nutritivo suplementado con 30 mM de acetato de sodio como donador de electrones y 40 mM de fumarato de sodio como aceptor de electrones. La forma de preparación se describe en la sección de Anexos.

Materiales de soporte y electrodos

En este proyecto se probaron los siguientes materiales como soporte y electrodos, contruidos en el laboratorio, para la formación de biopelícula de *G. sulfurreducens*:

Materiales	Medidas
Vidrio	1 x 3 cm.
Vidrio cubierto por una capa de hematita (Fe₂O₃)	1 x 3 cm.
FTO (vidrio semiconductor de óxido de estaño dopado con flúor)	1 x 3 cm.
FTO cubierto por una capa de hematita (Fe₂O₃)	1 x 3 cm.
Grafito plano rígido de carbono puro	1 x 3 cm.
Acero inoxidable T316	1 x 3 cm.

Métodos

Generación de condiciones anaeróbicas para el cultivo de *G. sulfurreducens*

Para crear un ambiente anaerobio se empleó una estación de gases. Primero, se utilizó el H₂ y luego la mezcla de N₂:CO₂ (80:20). Se burbujeó con la mezcla de N₂:CO₂ (80:20) la fase líquida y luego la fase gaseosa del medio dentro de un recipiente para desplazar el O₂, 8 minutos por cada 10 mL. Se sellaron y se esterilizaron en autoclave para tener condiciones estériles.

El medio NBAF se redujo agregándole 100 µL de cisteína 100 mM y 100 µL de extracto de levadura 5% por cada 10 mL de medio NBAF. Las cepas de *G. sulfurreducens* se cultivaron en medio NBAF, utilizando 30 mM de acetato de sodio como donador de electrones y 40 mM de fumarato de sodio como aceptor de electrones (Coppi *et al.*, 2001), sobre los seis materiales como soporte y electrodos (vidrio, Fe₂O₃-vidrio, FTO, Fe₂O₃-FTO, grafito y acero inoxidable) para la formación de biopelícula a 25 °C por un tiempo determinado.

Cuantificación de la formación de biopelícula por cristal violeta

Se dejó crecer la biopelícula de *G. sulfurreducens* sobre los diferentes materiales de soporte a 25 y 30 °C por 48 horas. Se retiró el material de soporte del medio y se enjuagó la biopelícula con gotas de PBS 1x hasta cubrir el material. Se agregaron gotas de metanol 100% hasta cubrir la superficie y se dejó por 10 minutos para fijar la biopelícula. Una vez que la superficie se secó, las biopelículas se tiñeron con gotas de cristal violeta 1% por 10 minutos cubriendo toda la superficie. El exceso de cristal violeta se retiró lavando con agua Mili-Q. Luego, el material de soporte se colocó dentro de un tubo cónico de 15 mL y el colorante de las biopelículas teñidas se solubilizó con 1 mL de ácido acético 60%. Finalmente, cada solución de ácido acético junto con el colorante se transfirió a una celda, se diluyó en caso de ser necesario y, se tomó una lectura de absorbancia a 550 nm (OD₅₅₀), los resultados obtenidos son directamente proporcionales a la biomasa total de la biopelícula.

Observación de la estructura de la biopelícula

Se preparó la mezcla de colorantes del 'Kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD' en un tubo Eppendorf, los colorantes se pusieron en hielo y se cubrieron de la luz, ya que son fotosensibles. La cantidad de mezcla de colorantes se preparó dependiendo del número de muestras que se analizaron, tomando en cuenta que cada muestra requirió de 25 µL de solución de colorante.

Syto 9	7.5 µL	
Yoduro de propidio	7.5 µL	
Solución salina burbujeada y estéril	50.0 µL	
Cisteína burbujeada y estéril	50.0 µL	
	115.0 µL	= 4 muestras

Se dejó crecer la biopelícula de *G. sulfurreducens* sobre los diferentes materiales de soporte a 25 °C por 24, 48 y 72 horas. En una habitación con poca luz se retiró el material de soporte del tubo. Se agregaron unas gotas de solución salina 0.9% + cisteína 100 mM para quitar las células plactónicas de la biopelícula. Al material de soporte con la biopelícula adherida se le agregaron 25 µL de la mezcla de colorante y solución salina 0.9% + cisteína 100 mM para teñir la biopelícula. El material de soporte se dejó 10 minutos y se cubrió con papel aluminio para que no recibiera luz. Luego, el material de soporte se lavó con solución salina 0.9% + cisteína 100 mM para quitar el exceso de colorante. El material de soporte se dejó sobre la superficie de una caja de Petri pequeña y se observó en el microscopio confocal Olympus FV1000 Multi-fotónico tipo Upright BX61WI. Durante la observación de la biopelícula se debió cuidar que la superficie no se secase agregando solución salina 0.9% + cisteína 100 mM. Finalmente, las imágenes obtenidas se analizaron con los programas Fiji y Comstat (Heydorn *et al.*, 2000; Vorregaard, 2008), tal como se describe en la sección de Anexos.

Pruebas electroquímicas

Las cepas se adaptaron previamente a los materiales de electrodo que se iban a analizar (Hernández-Eligio *et al.*, 2022), con dos pases semanales previos. Posteriormente, las células se dejaron creciendo en medio NBAF sobre un material de electrodo a 25 °C por 48 horas; excepto el grafito, que se dejó a 96 horas. Se utilizaron diferentes soluciones electrolíticas: medio basal, medio basal para acero inoxidable y ferri/ferrocianuro de potasio, cuyos componentes se describen en la sección de Anexos. Se utilizó una celda electroquímica con arreglo de tres electrodos: un sistema Ag/AgCl como electrodo de referencia, un grafito plano como contraelectrodo y las biopelículas crecidas sobre los diferentes materiales de electrodo como electrodo de trabajo. Se agregaron 10 mL de solución electrolítica a la celda electroquímica, se instalaron los electrodos y se burbujeó con la mezcla de gases N₂:CO₂ (80:20) para desplazar el O₂. El potencióstato se utilizó para aplicar un potencial a la biopelícula crecida sobre el material de soporte, el cual fungió como bioánodo.

Se retiró el electrodo del tubo, se sujetó con unas pinzas, se cubrió con parafina hasta que quedó expuesta un área aproximada de 1 cm² de la biopelícula y se introdujo a la celda electroquímica. Los tres electrodos se conectaron al potencióstato y se llevaron a cabo los estudios electroquímicos a los bioánodos utilizando el software DropView 8400: potencial de circuito abierto (OCP), voltamperometría cíclica (CV) y voltamperometría de onda cuadrada (SWV). Todos los valores de potencial en este trabajo están referidos al Electrodo Estándar de Hidrógeno (SHE (por sus siglas en inglés) = 0.199 V vs. Ag/AgCl).

Extracción de ARN

Las células se dejaron creciendo en medio NBAF sobre los diferentes materiales de soporte a 25 °C por 48 horas. Se retiró el material de soporte del tubo, se puso dentro de un tubo Falcon y la biopelícula se resuspendió en medio NBAF fresco. La biopelícula resuspendida se puso dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se

agregó “RNAlater Invitrogen” para proteger el ARN de las muestras y se incubó en hielo. Se centrifugó y se desechó el sobrenadante.

Para realizar la extracción de ARN se utilizó el ‘RNeasy Mini Kit de Qiagen’. Los primeros pasos se realizaron para lisar la célula. Los siguientes pasos se realizaron para separar el material genético de los demás componentes celulares. Los pasos posteriores se realizaron para lavar la muestra de contaminantes. Y el último paso consistió en eluir la muestra en 30-50 µL de agua libre de RNasa. Se comprobó la integridad del ARN en un gel de agarosa TBE 1x y se cuantificó utilizando un nano espectrofotómetro.

Tratamiento con DNasa I

Se calculó la cantidad necesaria de cada reactivo (1 µg de ARN, Buffer 10x, DNasa I [1 U /µL] y H₂O) y se preparó la reacción en su respectivo tubo Eppendorf de 1.5 mL para eliminar el ADN genómico contaminante de cada muestra. La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera:

Reacción enzimática	37 °C	40 minutos
Inactivación	65 °C	10 minutos
Almacenamiento	4 °C	∞¹

Se comprobó la integridad del ARN en un gel de agarosa TBE 1x y se cuantificó utilizando un nano espectrofotómetro. Posteriormente se realizó una PCR para comprobar la ausencia de ADN genómico en cada muestra.

Transcripción reversa (RT)

Se usó el kit “Revert Aid First Strand DNA Synthesis” de Thermo Fisher Scientific, en el que se realizaron dos reacciones:

¹ En este contexto, ∞ significa que es por tiempo indefinido.

Reacción 1

Reactivo	Cantidad
ARN	1.0 µg
Oligonucleótidos	20 pmoles
H ₂ O	Ajustar a 12 µL

Condiciones de reacción

Temperatura	Tiempo
65 °C	5 minutos
4 °C	2 minutos

Reacción 2

Reactivo	Cantidad
Reacción 1	12.0 µL
dNTPs	2.0 µL
Ribolock	1.0 µL
Buffer 5x	4.0 µL
Transcriptasa reversa	1.0 µL
	20.0 µL

Condiciones de reacción

Temperatura	Tiempo
42 °C	60 minutos
70 °C	10 minutos

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Se usó la “Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix” de Thermo Fisher Scientific y oligonucleótidos específicos de genes (Tabla 2). Las reacciones se realizaron por triplicado.

Reactivos	Cantidad
SYBR Green Master Mix 2x	5.0 µL
Oligonucleótidos (5 pmoles/µL)	1.0 µL
ADNc	0.5 µL
H ₂ O	3.5 µL
	10.0 µL

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un “Rotor-Gene Q MDx” (QIAGEN).

Condiciones de reacción

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	10 minutos	} 1
95 °C	10 segundos	} 40
70 °C	60 segundos	

El cálculo de la expresión relativa se realizó en el programa “Rotor-Gene Q Series Software” mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ tomando la expresión de un gen constitutivo (*recA* y *gsu2822*) como normalizador.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para qPCR		
Nombre	Secuencia 5' → 3'	Referencia
qPCRacnAFw	CCC GCT ACA ACT ACC ACT CC	Andrade <i>et al.</i> , 2021
qPCRacnARev	CGC AAA AGG TTT TCC AGA AG	Andrade <i>et al.</i> , 2021
qPCRdcuBFw	GCC ATC AAG ACC GGT ATC C	Andrade <i>et al.</i> , 2021
qpCRdcuBrev	AGC CGA GGA AAA AGG TCA CT	Andrade <i>et al.</i> , 2021
qPCRRepsHfw	CTA TGC AGC CCT CAC CAT CC	Jaramillo-Rodríguez <i>et al.</i> , 2023
qPCRRepsHrv	GTG AAT GAC ATT GCC CTC GC	Jaramillo-Rodríguez <i>et al.</i> , 2023
qPCRftsXfw	AGC GGC AAG ATC CAG GTT AC	Este trabajo

qPCRftsXrv	TAG GAA ACG CGT GAA GTC CC	Este trabajo
qPCRomcBFw	GGA GTA TGT GGC ATC CCT TG	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> , 2020
qPCRomcBrev	ACC GTT GGC ATT CGT ATC TC	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> , 2020
qPCRomcCFw	AGA GTA CGT GGC ATC CCT TG	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> , 2020
qPCRomcCrev	CCG TTG GCA TTC GTA TCT CT	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> , 2020
qPCRomcEFw	CCA GAT CTG CGT GTT CTG TC	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> , 2020
qPCRomcErev	CAT GCT GCT GGA CGA GTA GA	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> , 2020
qPCRomcFfw	GAC GTG GCG GCC TAC ATC	Este trabajo
qPCRomcFrv	CGA CGT ACT CCC CGA TCT TC	Este trabajo
qPCRomcMfw	TGG AGA CTA CCC ATG CTG AA	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> , 2020
qPCRomcMrev	AGA CGT CGA GGT GCT CGT AT	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> , 2020
qPCRomcSFw	TCC TAC CAG AAC AGC AAC GA	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> , 2020
qPCRomcSrev	ATA GGA ACC GCT CAG GGA CT	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> , 2020
qPCRomcZfw	AAG CCG ACT GTC TCG AGT GT	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> , 2020
qPCRomcZrev	CGG AGG TAT TGA TGC AGC TT	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> , 2020
qPCRpilAfw	TCG GTA TTC TCG CTG CAA T	Andrade <i>et al.</i> , 2021
qPCRpilArev	AAT GCG GAC TCA AGA GCA GT	Andrade <i>et al.</i> , 2021
qPCRpgcAFw	GTC TCC AGA GTG CCG TAA GC	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> , 2022
qPCRpgcARev	AGT AGG AGC CAC TGC CAA GA	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> , 2022

Resultados y discusión

En este estudio se analizó la estructura de la biopelícula y sus propiedades bioelectroquímicas utilizando diferentes materiales de electrodos con diferentes características químicas: vidrio como material inerte no conductor, vidrio cubierto con óxidos de hierro (Fe_2O_3 -vidrio) y materiales semiconductores (FTO, Fe_2O_3 -FTO, grafito y acero inoxidable). Estas biopelículas se caracterizaron mediante su cuantificación por medio de tinción por cristal violeta, observación de la estructura a través de microscopía confocal láser de barrido (CLSM), caracterización de las propiedades electroquímicas y expresión relativa de determinados genes mediante RT-qPCR.

Cuantificación por cristal violeta de la formación de biopelícula.

La cuantificación por cristal violeta de la formación de biopelícula por cristal violeta de *G. sulfurreducens* solo se realizó en los soportes de vidrio y FTO (Figura 5). Esta técnica no se realizó en grafito ya que este material absorbe colorante y tampoco se realizó en Fe_2O_3 -vidrio y Fe_2O_3 -FTO debido a que estos materiales se les podría despegar la capa de hematita. Para la técnica de cristal violeta, la absorbancia medida a una densidad óptica a 550 nm (OD_{550}) es directamente proporcional a la biomasa total de la biopelícula formada por las cepas.

Se encontró que la cepa $\Delta\text{gsu1771}$ produjo una biopelícula con mayor biomasa que la cepa WT (Hernández-Eligio *et al.*, 2022) sobre vidrio y FTO. Además, se observó que la cepa mutante generó una biopelícula con mayor biomasa al crecer sobre vidrio que sobre FTO a 25 °C (Figura 5A). Por otro lado, se observó que la turbidez del medio producido por las células plantónicas de las cepas de *G. sulfurreducens* no cambió significativamente dependiendo del material sobre el que crecieron, pero se observó que la turbidez de la cepa WT es mayor que la de la mutante $\Delta\text{gsu1771}$ (Figura 5B).

Con los resultados obtenidos se concluye que la cepa mutante $\Delta gsu1771$ de *G. sulfurreducens* forma una biopelícula con mayor biomasa al crecer sobre vidrio que sobre FTO, lo cual coincide en proporción con los biovolúmenes obtenidos con el microscopio confocal láser de barrido (CLSM) de la biopelícula de la cepa mutante $\Delta gsu1771$ comparada con la de la cepa WT crecida sobre vidrio (Tabla 4) y sobre FTO (Tabla 8) que se presentan posteriormente. También, se puede inferir que la cepa $\Delta gsu1771$ se encuentra mayormente en estado de biopelícula que en estado planctónico, mientras que la cepa WT se encuentra mayormente en estado planctónico que en estado de biopelícula (Figura 5).

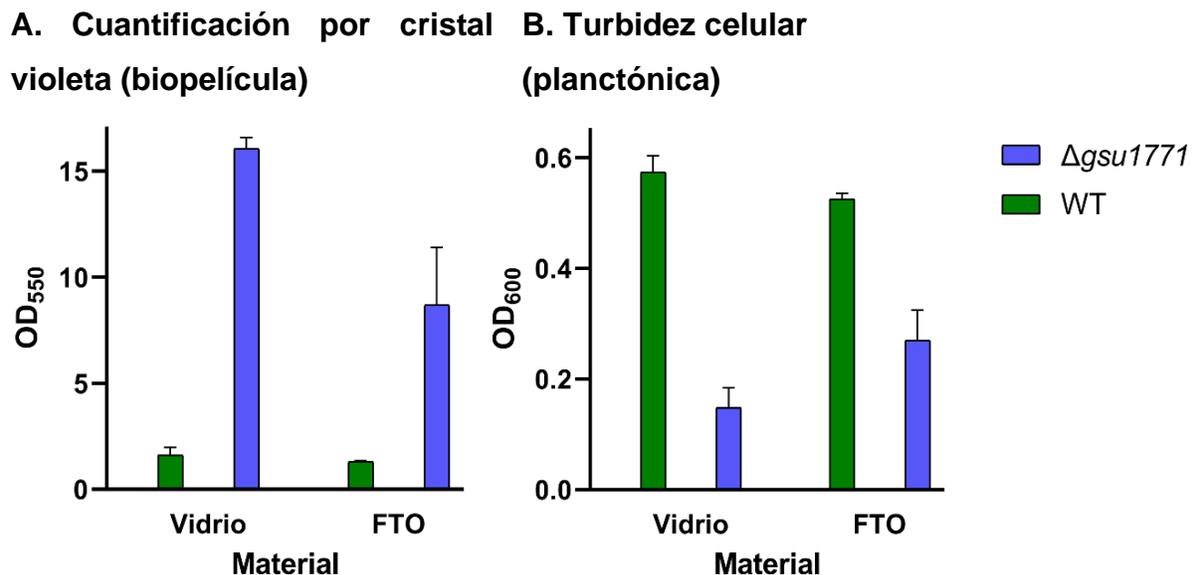


Figura 5. Crecimiento de las cepas WT y $\Delta gsu1771$ sobre vidrio y FTO. A. Cuantificación por cristal violeta de las biopelículas de las cepas de *G. sulfurreducens*. **B.** Turbidez celular del medio NBAF donde se dejó creciendo las cepas de *G. sulfurreducens*. Los cultivos se dejaron creciendo a 25 °C por 48 horas.

Desarrollo de la biopelícula y observación de su estructura empleando microscopía confocal.

La observación de la estructura tridimensional de la biopelícula a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas) mediante microscopía confocal láser de barrido (CLSM) se realizó sobre los materiales utilizados para este trabajo: vidrio, Fe₂O₃-vidrio, FTO, Fe₂O₃-FTO, grafito y acero inoxidable (Figuras 6-17). A través del CLSM se logró obtener imágenes de la vista superior y la vista lateral de cada biopelícula, así como los parámetros de viabilidad celular (porcentaje de células vivas), grosor máximo (longitud máxima del espesor de una biopelícula) y biovolumen (volumen celular que tienen las células que forman parte de la biopelícula).

Biopelícula sobre vidrio

En el vidrio, el grosor de las biopelículas de ambas cepas fue aumentando conforme avanzaron los días (Figura 7), el grosor de la biopelícula de la cepa WT fue menor en comparación con el de la cepa mutante $\Delta gsu1771$ (Tabla 4). En el caso de la WT, en las primeras 24 horas se observaron muchos espacios vacíos. Luego, a las 48 y 72 horas la colonización fue mucho mayor, ya que los espacios vacíos disminuyeron por una mayor presencia de bacterias sobre toda la superficie. En el caso de la mutante $\Delta gsu1771$, se observó que toda la superficie del vidrio se cubrió de células y que la biopelícula presentó una estructura tridimensional compleja debido a que formó unos pilares o columnas con canales (Hernández-Eligio *et al.*, 2022), que fueron visibles desde las primeras 24 horas (Figura 6).

Se pudo destacar la presencia de un “micropuente” conformado por bacterias vivas que conectaba unas columnas con otras en el caso de la biopelícula de la mutante $\Delta gsu1771$ a las 72 horas (Figura 7, indicados con flechas blancas).

Además, se observó una alta viabilidad celular (Tabla 3) en las biopelículas de *G. sulfurreducens* (Figuras 6-7) a juzgar por el número reducido de células teñidas con yoduro de propidio (células muertas).

En el caso del biovolumen, se observó un aumento progresivo, con un valor máximo para la cepa WT a las 72 horas, mientras que para la mutante $\Delta gsu1771$ el valor máximo se alcanzó a las 48 horas (Tabla 4).

Se puede destacar que la biopelícula que formó la cepa WT sobre el vidrio es el que presentó el biovolumen y el grosor máximo más bajo de los seis materiales analizados en este trabajo (Tabla 4).

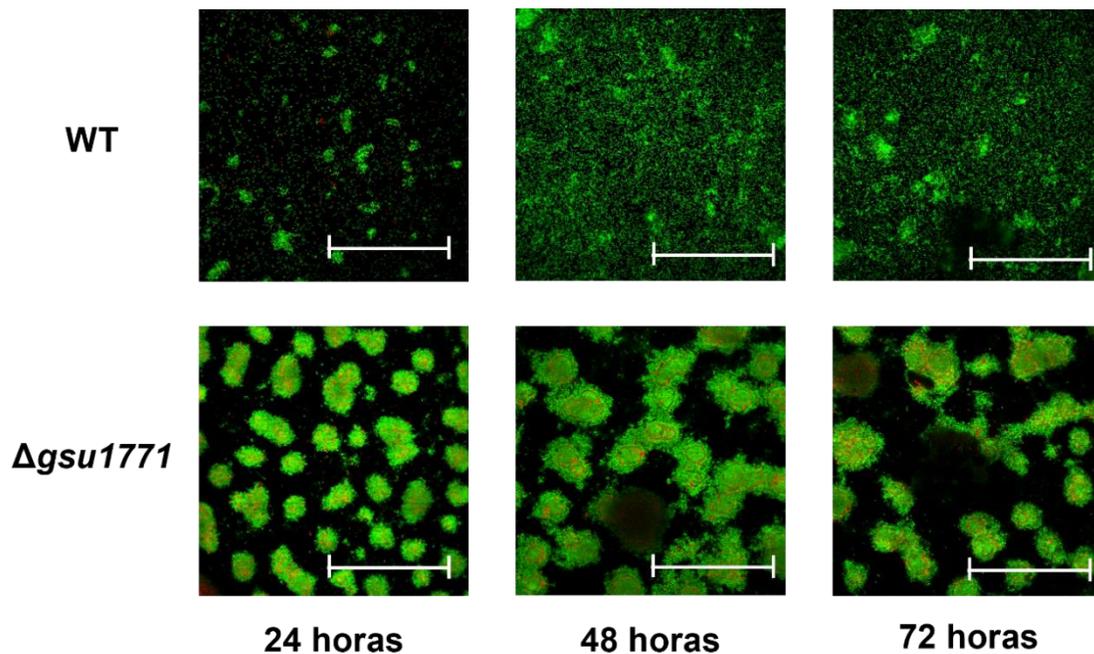


Figura 6. Imágenes de microscopía confocal sobre vidrio (Vista superior). Cepas *G. sulfurreducens* DL1 WT y $\Delta gsu1771$ a 24, 48 y 72 horas. La biopelícula fue teñida con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD. Las células vivas se tiñeron de color verde y las células muertas de color rojo. Los cultivos se incubaron a 25°C. Los programas utilizados para su análisis fueron Fiji y Comstat. La línea blanca indica una escala de 100 μm .

Biopelícula sobre Fe₂O₃-vidrio

Cuando el vidrio se cubrió con la película de hematita (Fe₂O₃-vidrio), la biopelícula de la cepa WT presentó un espesor mayor que la biopelícula que creció sobre el vidrio desnudo (Figura 9). En la literatura, algunos informes hablan del uso de la hematita, un aceptor de electrones estrechamente relacionado con los ambientes naturales donde se encuentra *G. sulfurreducens*, para promover la formación de biopelículas electroactivas (Wen *et al.*, 2022). Los resultados concordaron con esos informes ya que se observó que la cepa WT creció mejor en este vidrio modificado con Fe₂O₃ (Huerta-Miranda *et al.*, 2023).

En el sustrato Fe₂O₃-vidrio, el grosor de las biopelículas de ambas cepas aumentó con el paso de los días (Figura 9), y en donde el grosor de la biopelícula de la cepa WT fue menor en comparación con el de la cepa mutante $\Delta gsu1771$ (Tabla 6). En el caso de la WT, se observó que la bacteria cubrió toda la superficie a lo largo de los tres días de prueba (24, 48 y 72 horas), mientras que en el caso de la mutante $\Delta gsu1771$, se pudo notar que toda la superficie del material se cubrió por células y que la biopelícula presentó una estructura tridimensional más compleja debido a que formó unos pilares o columnas con canales (Hernández-Eligio *et al.*, 2022), que fueron visibles desde las primeras 24 horas (Figura 8), con la diferencia de que estos pilares fueron más delgados que los que crecieron sobre el vidrio.

Además, la presencia de células muertas (manchas rojas) fue menor en las imágenes obtenidas (Figuras 8-9), lo que indicó una alta viabilidad celular (Tabla 5).

En el caso del biovolumen, se observó un aumento progresivo, con el valor más alto para la cepa WT a las 48 horas, mientras que para la mutante $\Delta gsu1771$ el valor más alto se alcanzó a las 72 horas (Tabla 6).

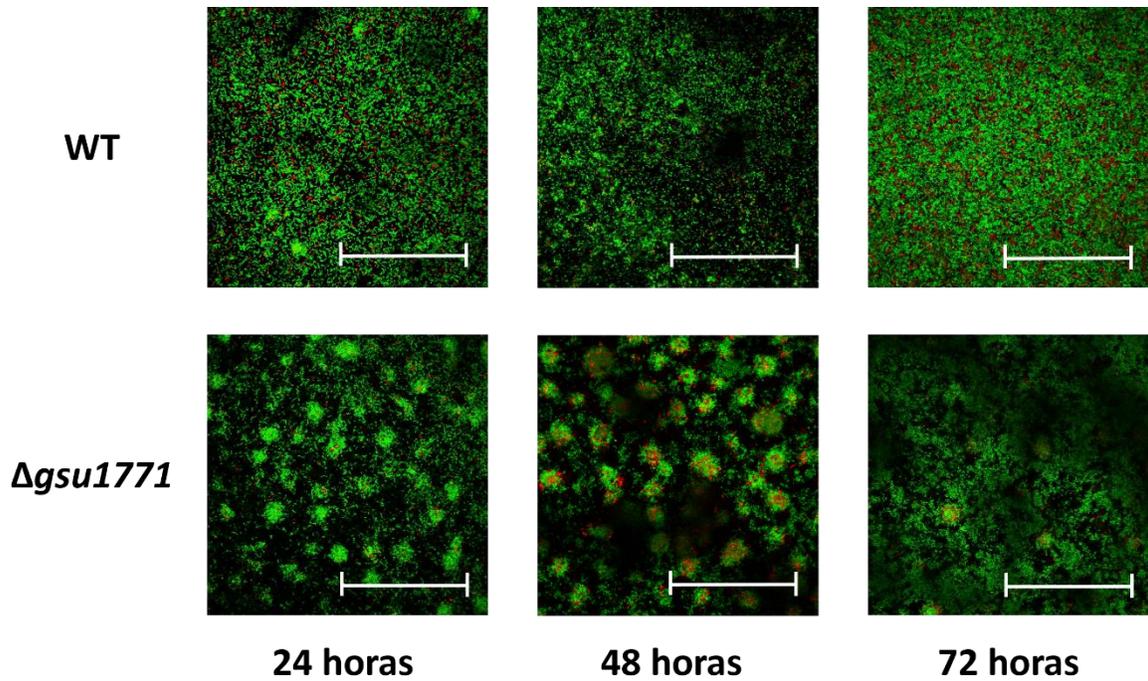


Figura 8. Imágenes de microscopía confocal en Fe_2O_3 sobre vidrio (Vista superior). Cepas *G. sulfurreducens* DL1 WT y Δ gsu1771 a 24, 48 y 72 horas. La biopelícula fue teñida con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD. Las células vivas se tiñeron de color verde y las células muertas de color rojo. Los cultivos se incubaron a 25°C. Los programas utilizados para su análisis fueron Fiji y Comstat. La línea blanca indica una escala de 100 μm .

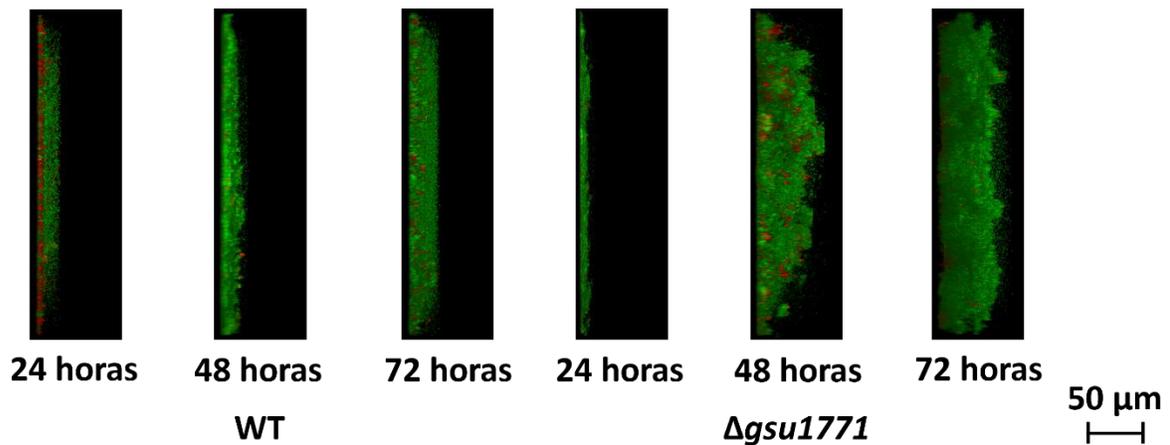


Figura 9. Imágenes de microscopía confocal en Fe_2O_3 sobre vidrio (vista lateral). Cepas *G. sulfurreducens* DL1 WT y Δ gsu1771 a 24, 48 y 72 horas. La

biopelícula fue teñida con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD. Las células vivas se tiñeron de color verde y las células muertas de color rojo. Los cultivos se incubaron a 25°C. Los programas utilizados para su análisis fueron Fiji y Comstat.

Tabla 5. Viabilidad de las células que constituyen la biopelícula en Fe₂O₃-vidrio.

% células vivas		
Soporte	Fe ₂ O ₃ sobre vidrio	
Cepa	WT	$\Delta gsu1771$
24 horas	76.17 ± 5.39	77.72 ± 1.52
48 horas	91.05 ± 3.48	78.90 ± 0.32
72 horas	83.75 ± 2.27	91.60 ± 2.09

Tabla 6. Grosor máximo y biovolumen de las biopelícula formadas por las cepas WT y $\Delta gsu1771$ sobre Fe₂O₃-vidrio.

Fe ₂ O ₃ sobre vidrio	Grosor máximo (µm)		Biovolumen (µm ³ /µm ²)	
	WT	$\Delta gsu1771$	WT	$\Delta gsu1771$
Cepa				
24 horas	17.15 ± 2.03	36.75 ± 2.25	1.24 ± 0.13	12.47 ± 0.03
48 horas	20.25 ± 0.75	68.5 ± 18.5	4.43 ± 0.20	23.19 ± 0.75
72 horas	22.37 ± 7.04	49.88 ± 2.63	3.05 ± 0.55	33.13 ± 4.38

Biopelícula sobre FTO nuevo

En investigaciones previas se utilizó el óxido de estaño dopado con flúor (FTO) como material de soporte que indujo a *G. sulfurreducens* a formar una biopelícula más gruesa, debido a la naturaleza conductiva de este material (Huerta-Miranda *et al.*, 2019; Hernández-Eligio *et al.*, 2022). Estos trabajos destacaron por explorar el uso de los óxidos semiconductores transparentes (TCOs) como materiales de soporte para la formación de biopelículas electroactivas (Matsuda *et al.*, 2011; Jain *et al.*, 2011).

Sobre el FTO, el grosor de las biopelículas de ambas cepas fue aumentando de manera lenta y progresiva conforme avanzaron los días (Figura 11). En el caso de la cepa WT formó una biopelícula homogénea con pequeños agregados (áreas

con una alta densidad de bacterias) (Figura 10). Por otra parte, la cepa $\Delta gsu1771$ formó una biopelícula más gruesa que la de la cepa WT (Tabla 8), en la que se lograron observar estructuras en forma de columnas con canales (Figura 10), como se había observado previamente en nuestro grupo de trabajo (Hernández-Eligio *et al.*, 2022).

Además, la presencia de células muertas (manchas rojas) estuvo casi ausente (Figuras 10-11), lo que indicó una alta viabilidad celular (Tabla 7).

En el caso del biovolumen, se observó un aumento progresivo, en donde la cepa WT y la mutante $\Delta gsu1771$ alcanzaron su valor más alto a las 48 horas (Tabla 8).

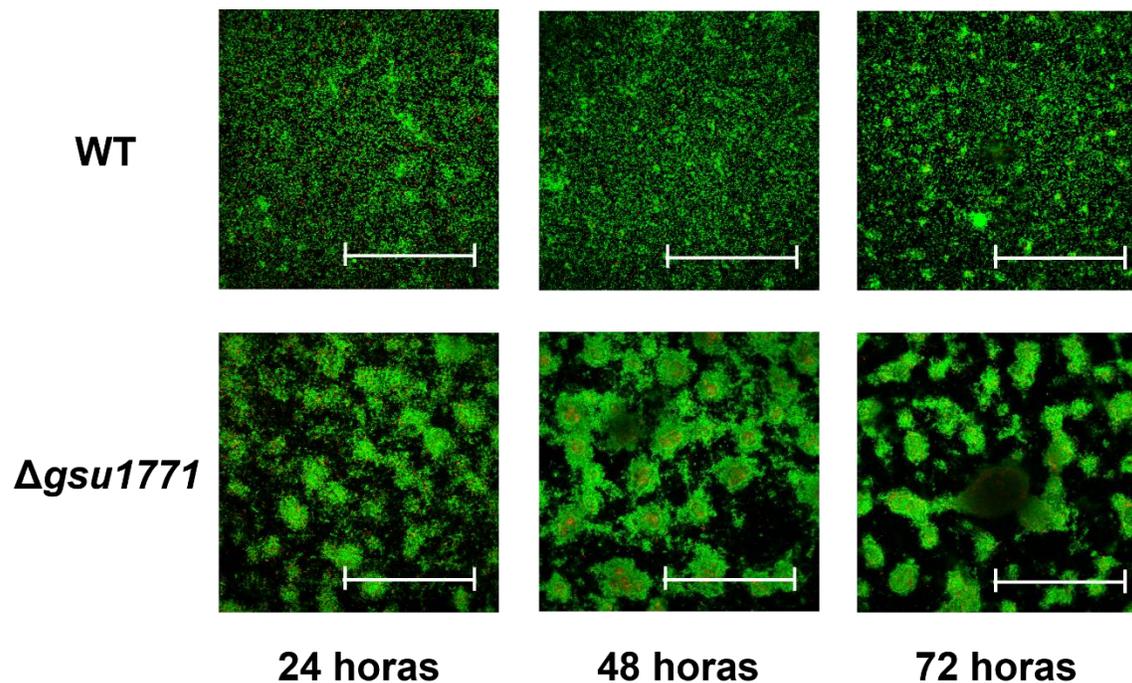


Figura 10. Imágenes de microscopía confocal sobre FTO nuevo (Vista superior). Cepas *G. sulfurreducens* DL1 WT y $\Delta gsu1771$ a 24, 48 y 72 horas. La biopelícula fue teñida con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD. Las células vivas se tiñeron de color verde y las células muertas de color rojo. Los cultivos se incubaron a 25°C. Los programas utilizados para su análisis fueron Fiji y Comstat. La línea blanca indica una escala de 100 μm .

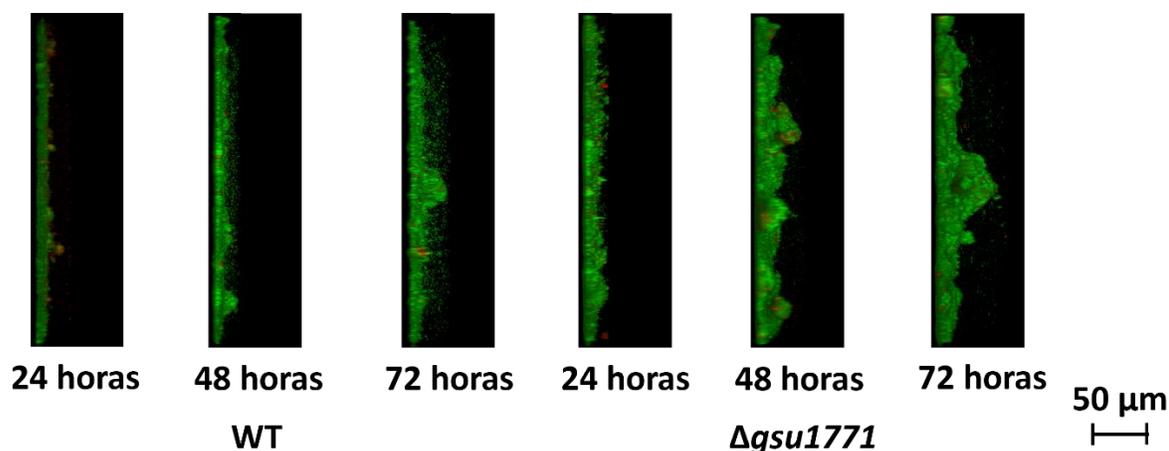


Figura 11. Imágenes de microscopía confocal sobre FTO nuevo (vista lateral). Cepas *G. sulfurreducens* DL1 WT y Δ *gsu1771* a 24, 48 y 72 horas. La biopelícula fue teñida con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD. Las células vivas se tiñeron de color verde y las células muertas de color rojo. Los cultivos se incubaron a 25°C. Los programas utilizados para su análisis fueron Fiji y Comstat.

Tabla 7. Viabilidad de las células que constituyen la biopelícula sobre FTO nuevo.

% células vivas		
Soporte	FTO nuevo	
Cepa	WT	Δ <i>gsu1771</i>
24 horas	80.74 ± 8.15	77.05 ± 4.84
48 horas	88.67 ± 2.32	92.60 ± 0.24
72 horas	93.66 ± 0.43	91.29 ± 1.43

Tabla 8. Grosor máximo y biovolumen de las biopelícula formadas por las cepas WT y Δ *gsu1771* sobre FTO nuevo.

FTO nuevo	Grosor máximo (μm)		Biovolumen (μm ³ /μm ²)	
	WT	Δ <i>gsu1771</i>	WT	Δ <i>gsu1771</i>
Cepa				
24 horas	15.6 ± 0.97	26.2 ± 3.44	1.96 ± 0.41	10.48 ± 0.3
48 horas	22.7 ± 3.37	39.2 ± 6.14	2.97 ± 0.21	22.79 ± 3.12
72 horas	25.58 ± 3.1	48.16 ± 5.07	2.04 ± 0.24	22.34 ± 2.94

Biopelícula sobre Fe₂O₃-FTO

La modificación del FTO con una capa de hematita (Fe₂O₃-FTO) indujo la formación de biopelículas más gruesas en la cepa WT llegando a formar grandes pilares a las 72 horas, pero menos homogéneas que las que se formaron sobre el FTO desnudo (Figura 13). Esto confirmó los beneficios de modificar los materiales de los electrodos con hematita en la formación de biopelículas de *G. sulfurreducens* (Huerta-Miranda *et al.*, 2023).

Sobre la Fe₂O₃-FTO, el grosor de las biopelículas de ambas cepas fue aumentando de manera lenta y progresiva conforme avanzaron los días (Figura 13). En el caso de la cepa WT formó una biopelícula homogénea con pequeños agregados (áreas con una alta densidad de bacterias) que fueron aumentando de tamaño conforme avanzaron los días (Figuras 12-13). Por otra parte, la cepa $\Delta gsu1771$ formó una biopelícula más gruesa que la de la cepa WT (Tabla 10), en el que se observaron estructuras en forma de columnas con canales (Hernández-Eligio *et al.*, 2022), que son visibles desde las primeras 24 horas y que fueron aumentando de grosor conforme avanzaron los días (Figura 12).

En el caso del biovolumen, se observó un aumento progresivo, siendo el más alto para la WT y la mutante $\Delta gsu1771$ a las 72 horas (Tabla 10).

Además, la baja presencia de células muertas (manchas rojas) (Figuras 12-13) indicó una alta viabilidad celular (Tabla 9), siendo más alta a las 48 horas. Una posible explicación de porqué la viabilidad celular disminuye a las 72 horas es que las biopelículas de ambas cepas presentaron columnas muy elevadas alcanzando un grosor máximo muy alto (Tabla 10), lo que deja expuesta a las células anaerobias a condiciones aerobias al momento de hacer la observación de la biopelícula, aumentando el porcentaje de células muertas.

La biopelícula que formó la cepa mutante $\Delta gsu1771$ sobre el Fe₂O₃-FTO presentó el mayor espesor en comparación con la que se formó de los seis materiales analizados en este trabajo (Tabla 10).

Con la información anterior, las biopelículas crecidas sobre Fe_2O_3 -FTO presentaron un grosor máximo alto, aunque su viabilidad celular fue baja en comparación con otros materiales, tal como se había observado en trabajos previos (Wen *et al.*, 2022). Esto confirmó los beneficios de modificar los materiales de los electrodos con hematita en la formación de biopelículas de *G. sulfurreducens* al generar biopelículas más gruesas y con mayor biovolumen (Huerta-Miranda *et al.*, 2023).

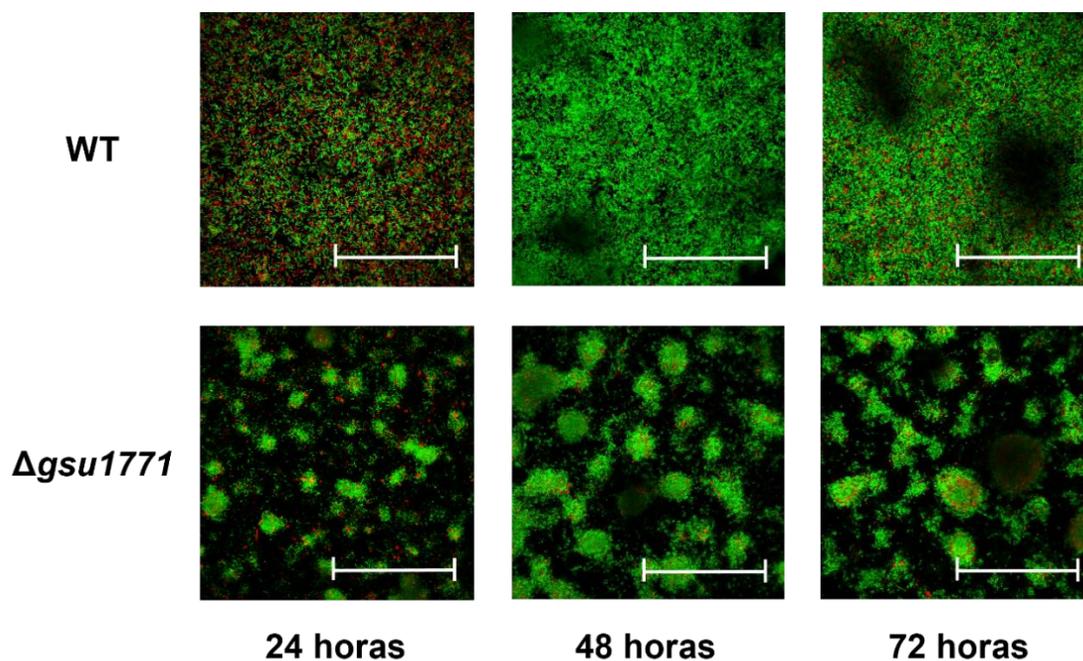


Figura 12. Imágenes de microscopía confocal en Fe_2O_3 sobre FTO (Vista superior). Cepas *G. sulfurreducens* DL1 WT y $\Delta\text{gsu1771}$ a 24, 48 y 72 horas. La biopelícula fue teñida con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD. Las células vivas se tiñeron de color verde y las células muertas de color rojo. Los cultivos se incubaron a 25°C . Los programas utilizados para su análisis fueron Fiji y Comstat. La línea blanca indica una escala de 100 μm .

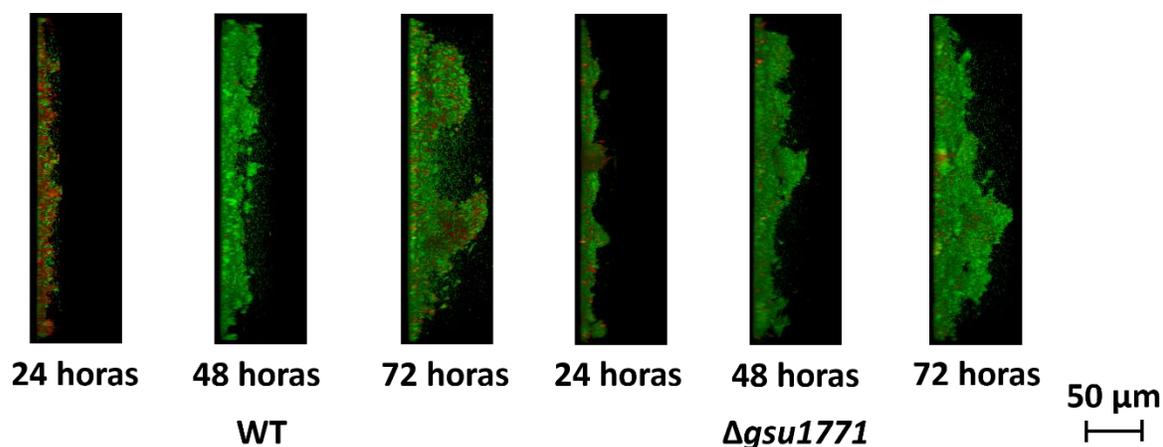


Figura 13. Imágenes de microscopía confocal en Fe_2O_3 sobre FTO (vista lateral). Cepas *G. sulfurreducens* DL1 WT y $\Delta\text{gsu1771}$ a 24, 48 y 72 horas. La biopelícula fue teñida con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD. Las células vivas se tiñeron de color verde y las células muertas de color rojo. Los cultivos se incubaron a 25°C . Los programas utilizados para su análisis fueron Fiji y Comstat.

Tabla 9. Viabilidad de las células que constituyen la biopelícula en Fe_2O_3 -FTO.

% células vivas		
Soporte	Fe_2O_3 sobre FTO	
Cepa	WT	$\Delta\text{gsu1771}$
24 horas	53.19 ± 1.80	68.72 ± 2.43
48 horas	86.42 ± 4.23	84.08 ± 2.35
72 horas	77.76 ± 2.66	79.50 ± 0.98

Tabla 10. Grosor máximo y biovolumen de las biopelícula formadas por las cepas WT y $\Delta\text{gsu1771}$ sobre Fe_2O_3 -FTO.

Fe_2O_3 sobre FTO	Grosor máximo (μm)		Biovolumen ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)	
	WT	$\Delta\text{gsu1771}$	WT	$\Delta\text{gsu1771}$
24 horas	14.43 ± 1.34	47.25 ± 12.22	1.40 ± 0.39	13.56 ± 1.45
48 horas	21 ± 1.56	45 ± 0	3.39 ± 0.62	18.36 ± 0.42
72 horas	32.53 ± 2.79	82.5 ± 24.75	6.66 ± 1.46	26.95 ± 8.46

Biopelícula sobre grafito

El grafito como material de soporte indujo a la cepa WT a formar biopelículas heterogéneas debido a que fueron gruesas, rugosas y dispersas, además de que se observaron muchas regiones vacías (Figura 14). En las vistas laterales se encontraron biopelículas más rugosas que las biopelículas crecidas sobre FTO y vidrio (Figura 15). La porosidad del grafito podría explicar este efecto, debido a que el grafito no es un material plano como los soportes basados en vidrio o FTO, sino que es un material que presenta una superficie irregular.

Sobre el grafito, el grosor de las biopelículas de ambas cepas aparentemente aumentó de manera lenta y progresiva conforme avanzaron los días, pero las formas irregulares de las biopelículas dificultaron determinarlo con exactitud (Figura 15). En el caso de la cepa WT formó una biopelícula heterogénea en el que células crecieron sobre la superficie irregular del material (Figura 14). Por otra parte, la cepa $\Delta gsu1771$ formó una biopelícula más gruesa que la de la cepa WT (Figura 15), en el que se lograron observar estructuras en forma de columnas con canales (Hernández-Eligio *et al.*, 2022), que fueron visibles desde las primeras 24 horas (Figura 14).

Además, la presencia de células muertas (manchas rojas) estuvo casi ausente (Figuras 14-15), lo que indicó una alta viabilidad celular (Tabla 11).

Resultó complicado calcular el biovolumen y el grosor máximo con precisión debido a que las biopelículas formadas sobre grafito fueron heterogéneas, generando resultados que no fueron coherentes con lo obtenido en la Tabla 12.

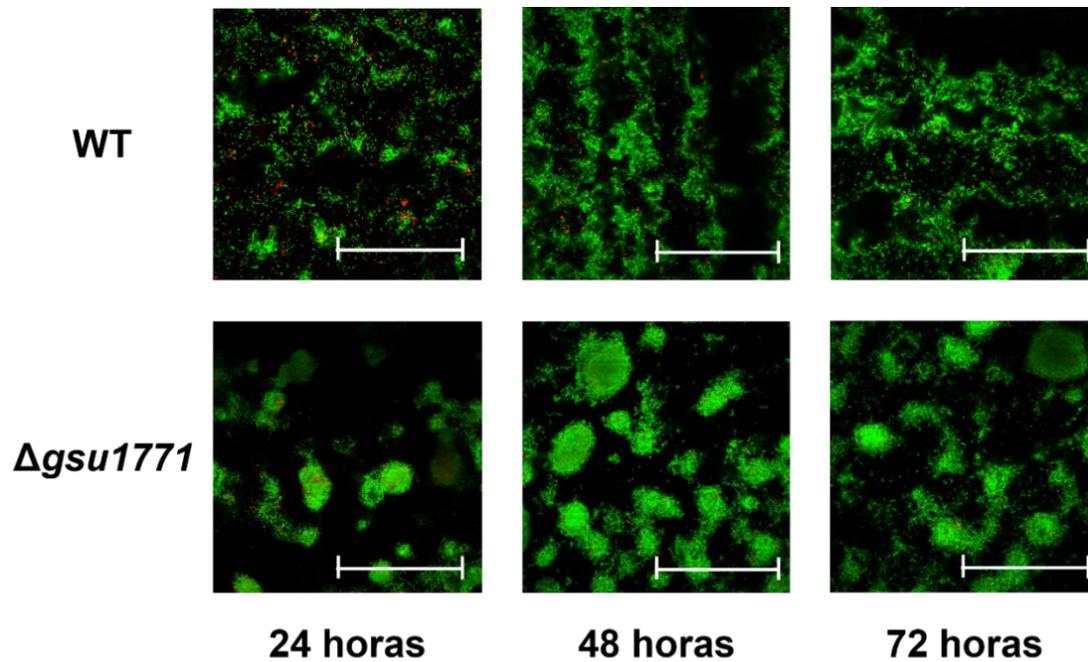


Figura 14. Imágenes de microscopía confocal sobre grafito (vista superior). Cepas *G. sulfurreducens* DL1 WT y Δ *gsu1771* a 24, 48 y 72 horas. La biopelícula fue teñida con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD. Las células vivas se tiñeron de color verde y las células muertas de color rojo. Los cultivos se incubaron a 25°C. Los programas utilizados para su análisis fueron Fiji y Comstat. La línea blanca indica una escala de 100 μ m.

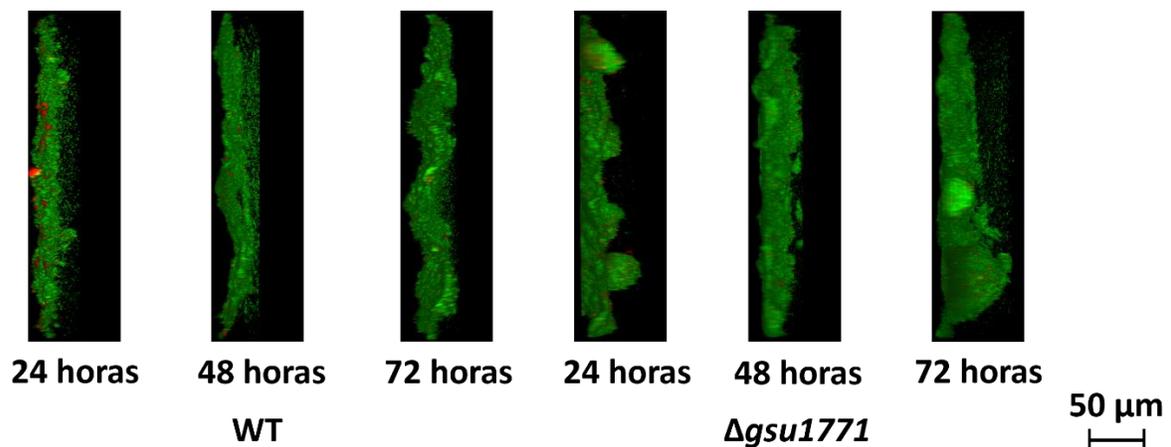


Figura 15. Imágenes de microscopía confocal sobre grafito (vista lateral). Cepas *G. sulfurreducens* DL1 WT y Δ *gsu1771* a 24, 48 y 72 horas. La biopelícula

fue teñida con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD. Las células vivas se tiñeron de color verde y las células muertas de color rojo. Los cultivos se incubaron a 25°C. Los programas utilizados para su análisis fueron Fiji y Comstat.

Tabla 11. Viabilidad de las células que constituyen la biopelícula sobre grafito.

% células vivas		
Soporte	Grafito	
Cepa	WT	$\Delta gsu1771$
24 horas	76.47 \pm 2.15	90.20 \pm 0.64
48 horas	93.73 \pm 0.43	92.13 \pm 0.71
72 horas	91.33 \pm 1.59	83.78 \pm 2.67

Tabla 12. Grosor máximo y biovolumen de las biopelícula formadas por las cepas WT y $\Delta gsu1771$ sobre grafito.

Grafito	Grosor máximo (μm)		Biovolumen ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)	
	WT	$\Delta gsu1771$	WT	$\Delta gsu1771$
Cepa	WT	$\Delta gsu1771$	WT	$\Delta gsu1771$
24 horas	22.57 \pm 4.55	50.5 \pm 2.22	0.90 \pm 0.44	30 \pm 1.82
48 horas	39.33 \pm 3.31	39.33 \pm 6.39	1.42 \pm 0.25	18.83 \pm 1.51
72 horas	41.92 \pm 4.16	48.5 \pm 3.68	4.95 \pm 2.69	23.49 \pm 6.05

Biopelícula sobre acero inoxidable

Finalmente, el acero inoxidable es una aleación metálica conformada por varios elementos (hierro, carbono, níquel, molibdeno, entre otros) que se caracteriza por su gran resistencia a la corrosión aunque no es un buen conductor, sobre el que las cepas de *G. sulfurreducens* formaron una abundante biopelícula.

Sobre el acero inoxidable, el grosor de las biopelículas de ambas cepas aumentó de manera lenta y progresiva conforme avanzaron los días (Figura 17). La cepa WT formó una biopelícula uniforme en la que se observaron agregados sobre este material (Figura 16). Además, la biopelícula de la cepa WT fue lo suficientemente delgada para permitir que el acero inoxidable absorbiera el yoduro de propidio al

momento de realizar la tinción de la biopelículas y se observó que la superficie de este material se tiñó de color rojo en el microscopio confocal (Figura S1).

Por otro lado, la cepa mutante $\Delta gsu1771$ formó una biopelícula más gruesa que la cepa WT con una cantidad de biovolumen considerablemente más alto que los otros materiales (Tabla 14). En la biopelícula se observó que forma sus estructuras características en forma de columnas rodeadas por canales (Hernández-Eligio *et al.*, 2022), pero la gran cantidad de células hace que estas estructuras fueran menos notorias conforme avanzaban los días (Figura 16).

Además, la presencia de células muertas (manchas rojas) estuvo casi ausente (Figuras 16-17), lo que indicó una alta viabilidad celular (Tabla 13).

En el caso del biovolumen, se observó que fue aumentado progresivamente, siendo el más alto para la mutante $\Delta gsu1771$ a las 72 horas y para el caso de la WT, fue complicado determinarlo con exactitud debido a que el colorante también se cuantifica al momento de realizar el análisis (Tabla 14), pero las imágenes parecen indicar que el mayor biovolumen para la cepa WT también fue a las 72 horas (Figuras 16 y 17). La biopelícula que formó la cepa mutante $\Delta gsu1771$ sobre el acero inoxidable fue el que tuvo el biovolumen más alto de los seis materiales analizados en este trabajo (Tabla 14).

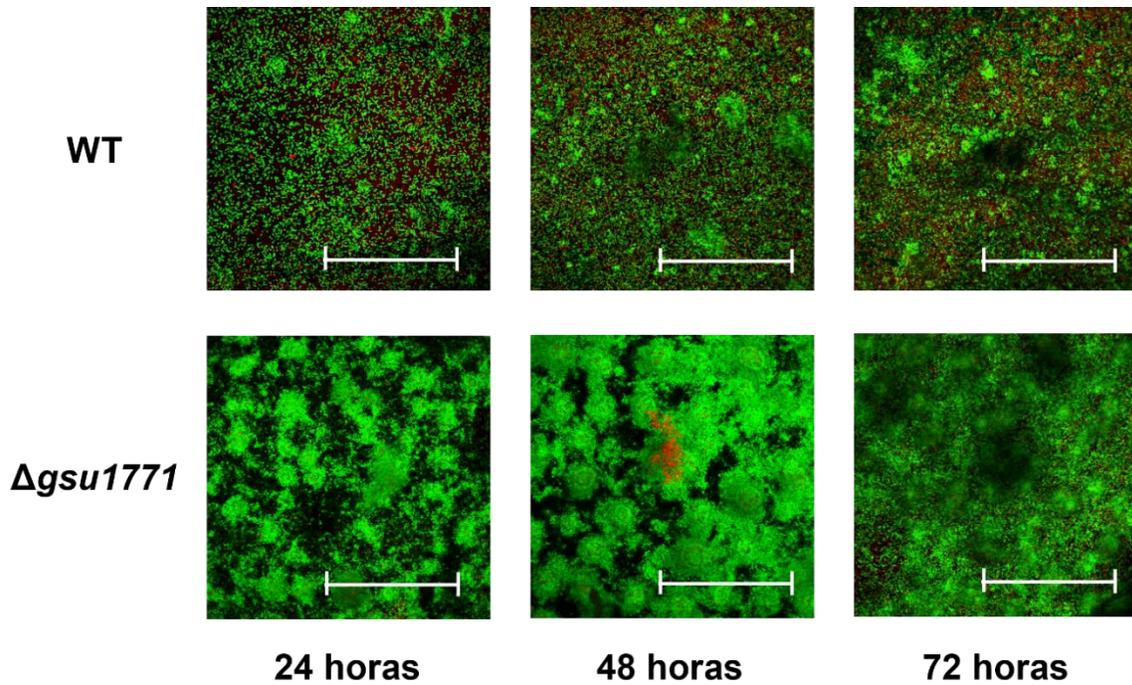


Figura 16. Imágenes de microscopía confocal sobre acero inoxidable (vista superior). Cepas *G. sulfurreducens* DL1 WT y Δ gsu1771 a 24, 48 y 72 horas. La biopelícula fue teñida con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD. Las células vivas se tiñeron de color verde y las células muertas de color rojo. Los cultivos se incubaron a 25°C. Los programas utilizados para su análisis fueron Fiji y Comstat. La línea blanca indica una escala de 100 μ m.

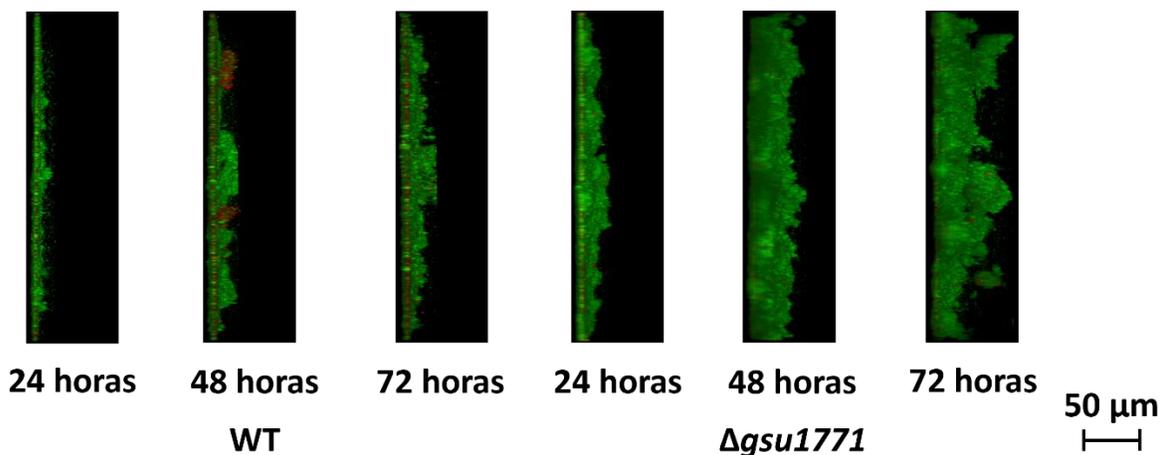


Figura 17. Imágenes de microscopía confocal sobre acero inoxidable (vista lateral). Cepas *G. sulfurreducens* DL1 WT y Δ gsu1771 a 24, 48 y 72 horas. La

biopelícula fue teñida con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD. Las células vivas se tiñeron de color verde y las células muertas de color rojo. Los cultivos se incubaron a 25°C. Los programas utilizados para su análisis fueron Fiji y Comstat.

Tabla 13. Viabilidad de las células que constituyen la biopelícula sobre acero inoxidable.

% células vivas		
Soporte	Acero inoxidable	
Cepa	WT	$\Delta gsu1771$
24 horas	73.96 ± 1.99	84.42 ± 0.8
48 horas	74.28 ± 0.69	92.85 ± 1.58
72 horas	67.34 ± 2.05	86.56 ± 0.95

Tabla 14. Grosor máximo y biovolumen de las biopelícula formadas por las cepas WT y $\Delta gsu1771$ sobre acero inoxidable.

Acero inoxidable	Grosor máximo (μm)		Biovolumen ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)	
	WT	$\Delta gsu1771$	WT	$\Delta gsu1771$
Cepa	WT	$\Delta gsu1771$	WT	$\Delta gsu1771$
24 horas	19.58 ± 5.27	34.5 ± 2.33	5.27 ± 0.32	25.03 ± 1.86
48 horas	24.8 ± 2.08	44.17 ± 4.74	5.14 ± 0.50	30.86 ± 4.49
72 horas	23.93 ± 3.91	56 ± 4.17	4.33 ± 0.39	39.88 ± 9.31

Estos resultados mostraron que la cepa WT es más susceptible a cambios en el material de soporte que la cepa $\Delta gsu1771$, siendo que esta última cepa pudo formar una biopelícula gruesa y con sus estructuras particulares sobre las seis diferentes superficies utilizadas en este trabajo.

Parámetros obtenidos a partir del CLSM

Además de observar la estructura tridimensional de las biopelículas que formaron las cepas de *G. sulfurreducens* sobre los distintos materiales, se analizaron otros parámetros relacionados a la biopelícula que se estuvieron mencionando previamente: porcentaje de células vivas y muertas, grosor máximo y biovolumen.

Con respecto al parámetro de porcentaje de células vivas y muertas, el análisis se realizó en el programa Fiji (Anexos) e indicó que el porcentaje más alto de células vivas se alcanzó a las 48 horas, siendo superior al 70%, para ambas cepas, tanto la WT como la mutante $\Delta gsu1771$, sobre los seis diferentes materiales, de manera general (Tabla 15).

Sin embargo, se observó que hay un menor porcentaje de viabilidad celular a las 24 horas sobre los seis diferentes materiales (Tabla 15), esto podría explicarse por el hecho de que las biopelículas que forman las cepas WT y la mutante $\Delta gsu1771$ a las 24 horas tienen menor grosor (Tabla 16), así que las células de *G. sulfurreducens* son más susceptibles al oxígeno presente en el aire al momento de retirar el material del medio anaerobio, lo que llevó a una mayor muerte celular y que se reflejó en una menor viabilidad celular. Esto cambia a las 48 y 72 horas, cuando la biopelícula de ambas cepas es más gruesa y eso permitió que las células sean menos susceptibles al oxígeno presente en el aire y que se reflejó en una mayor viabilidad celular.

Tabla 15. Viabilidad bacteriana que constituyen las biopelículas sobre todos los materiales

% células vivas		
Soporte	Vidrio	
Cepa	WT	$\Delta gsu1771$
24 horas	74.66 ± 11.45	78.94 ± 1.31
48 horas	97.40 ± 0.80	79.53 ± 1.39
72 horas	94.89 ± 1.15	75.24 ± 7.07
Soporte	Fe ₂ O ₃ sobre vidrio	
Cepa	WT	$\Delta gsu1771$
24 horas	76.17 ± 5.39	77.72 ± 1.52
48 horas	91.05 ± 3.48	78.90 ± 0.32
72 horas	83.75 ± 2.27	91.60 ± 2.09
Soporte	FTO nuevo	
Cepa	WT	$\Delta gsu1771$
24 horas	80.74 ± 8.15	77.05 ± 4.84
48 horas	88.67 ± 2.32	92.60 ± 0.24

72 horas	93.66 ± 0.43	91.29 ± 1.43
Soporte	Fe₂O₃ sobre FTO	
Cepa	WT	<i>Δgsu1771</i>
24 horas	53.19 ± 1.80	68.72 ± 2.43
48 horas	86.42 ± 4.23	84.08 ± 2.35
72 horas	77.76 ± 2.66	79.50 ± 0.98
Soporte	Grafito	
Cepa	WT	<i>Δgsu1771</i>
24 horas	76.47 ± 2.15	90.20 ± 0.64
48 horas	93.73 ± 0.43	92.13 ± 0.71
72 horas	91.33 ± 1.59	83.78 ± 2.67
Soporte	Acero inoxidable	
Cepa	WT	<i>Δgsu1771</i>
24 horas	73.96 ± 1.99	84.42 ± 0.8
48 horas	74.28 ± 0.69	92.85 ± 1.58
72 horas	67.34 ± 2.05	86.56 ± 0.95

Otro parámetro que se calculó fue el grosor máximo de las biopelículas, en el que se observó que el grosor de las biopelículas fue aumentado conforme avanzó el tiempo, de 1 a 3 días, logrando alcanzar su mayor grosor, por lo general, a las 72 horas (Tabla 16).

El último parámetro que se calculó fue el biovolumen, el cual es el volumen ocupado por los microorganismos en las tres dimensiones del espacio, se determina como el volumen de todos los vóxeles (el elemento más pequeño de una imagen tridimensional) que contienen biomasa dividido entre el área del sustrato (la imagen inferior de una representación tridimensional) para obtener un valor independiente del tamaño del área observada y su unidad es $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$. En este trabajo, se observó que el biovolumen de las biopelículas fue aumentado conforme avanzó el tiempo, de 1 a 3 días, logrando alcanzar su biovolumen más alto entre las 48 y 72 horas (Tabla 16).

Tabla 16. Biovolumen y grosor máximo de las biopelículas formadas por las cepas WT y *Δgsu1771* sobre todos los materiales

Vidrio	Grosor máximo (µm)		Biovolumen (µm³/µm²)	
Cepa	WT	$\Delta gsu1771$	WT	$\Delta gsu1771$
24 horas	10.41 ± 0.55	28.65 ± 2.34	0.35 ± 0.05	11.68 ± 1.47
48 horas	13.16 ± 1.19	58.75 ± 6.18	0.89 ± 0.20	29.35 ± 1.42
72 horas	17.5 ± 4.16	54.75 ± 9.43	1.06 ± 0.20	27.75 ± 2.33
Fe₂O₃ sobre vidrio	Grosor máximo (µm)		Biovolumen (µm³/µm²)	
Cepa	WT	$\Delta gsu1771$	WT	$\Delta gsu1771$
24 horas	17.15 ± 2.03	36.75 ± 2.25	1.24 ± 0.13	12.47 ± 0.03
48 horas	20.25 ± 0.75	68.5 ± 18.5	4.43 ± 0.20	23.19 ± 0.75
72 horas	22.37 ± 7.04	49.88 ± 2.63	3.05 ± 0.55	33.13 ± 4.38
FTO nuevo	Grosor máximo (µm)		Biovolumen (µm³/µm²)	
Cepa	WT	$\Delta gsu1771$	WT	$\Delta gsu1771$
24 horas	15.6 ± 0.97	26.2 ± 3.44	1.96 ± 0.41	10.48 ± 0.3
48 horas	22.7 ± 3.37	39.2 ± 6.14	2.97 ± 0.21	22.79 ± 3.12
72 horas	25.58 ± 3.1	48.16 ± 5.07	2.04 ± 0.24	22.34 ± 2.94
Fe₂O₃ sobre FTO	Grosor máximo (µm)		Biovolumen (µm³/µm²)	
Cepa	WT	$\Delta gsu1771$	WT	$\Delta gsu1771$
24 horas	14.43 ± 1.34	47.25 ± 12.22	1.40 ± 0.39	13.56 ± 1.45
48 horas	21 ± 1.56	45 ± 0	3.39 ± 0.62	18.36 ± 0.42
72 horas	32.53 ± 2.79	82.5 ± 24.75	6.66 ± 1.46	26.95 ± 8.46
Grafito	Grosor máximo (µm)		Biovolumen (µm³/µm²)	
Cepa	WT	$\Delta gsu1771$	WT	$\Delta gsu1771$
24 horas	22.57 ± 4.55	50.5 ± 2.22	0.90 ± 0.44	30 ± 1.82
48 horas	39.33 ± 3.31	39.33 ± 6.39	1.42 ± 0.25	18.83 ± 1.51
72 horas	41.92 ± 4.16	48.5 ± 3.68	4.95 ± 2.69	23.49 ± 6.05
Acero inoxidable	Grosor máximo (µm)		Biovolumen (µm³/µm²)	
Cepa	WT	$\Delta gsu1771$	WT	$\Delta gsu1771$
24 horas	19.58 ± 5.27	34.5 ± 2.33	5.27 ± 0.32	25.03 ± 1.86
48 horas	24.8 ± 2.08	44.17 ± 4.74	5.14 ± 0.50	30.86 ± 4.49
72 horas	23.93 ± 3.91	56 ± 4.17	4.33 ± 0.39	39.88 ± 9.31

Se ha observado que bajo determinadas condiciones (electrodos con potencial impuesto y mantenidas de manera constante en un biorreactor), tanto las células como la corriente de una biopelícula electroactiva incrementan de manera proporcional en los primeros tres días; luego, la biomasa sigue aumentando, pero la corriente se queda igual, es decir, se mantiene en un estado estacionario (Marsili *et al.*, 2008; Chadwick *et al.*, 2019). Una explicación es que la masa de

células vivas es más alto en los primeros tres días y en días posteriores estas células van disminuyendo debido a que la masa de células vivas son las responsables de la alta generación de corriente, más que el espesor de la biopelícula (Sun *et al.*, 2016). En días posteriores, estas biopelículas presentan crecimiento continuo cerca de la superficie del electrodo, empujando las células más viejas hacia la interfase biopelícula-medio, sorprendentemente sin inhibición o contribución de casi 80 μm de células que se encuentran encima de la capa que está activa (Chadwick *et al.*, 2019). Por otro lado, en este proyecto se creció biopelícula de *G. sulfurreducens* DL1 $\Delta\text{gsu1771}$ sobre materiales modificados con Fe_2O_3 por 144 horas (Figura S2) y se observó que las células que estaban cerca del material estaban más compactas y que el mayor número de células muertas se encontraban cerca del material ubicado debajo de los pilares que la cepa mutante formó. Se puede predecir que bajo las condiciones en las que nuestro grupo de trabajo crece *G. sulfurreducens* (electrodos sin potencial impuesto en un medio de cultivo dentro de un sistema cerrado), conforme avanzan los días, las biopelículas seguirán aumentando de grosor acorde a la cantidad de nutrientes disponibles en el que, después de aproximadamente tres días, la producción de corriente llegará a un estado estacionario debido a que la cantidad de células vivas será menor, mientras que la cantidad de células muertas irá aumentando y se acumularán en su mayoría en la interfase electrodo-biopelícula.

En general, las biopelículas conservaron su estructura tridimensional, llegando a tener pequeñas diferencias entre cada uno de estos materiales. La cepa WT formó una biopelícula delgada y uniforme sobre los distintos materiales, llegando a formar pequeños agregados (áreas con una alta densidad de bacterias) sobre algunos de estos. Por otro lado, la cepa mutante $\Delta\text{gsu1771}$ formó biopelículas con un mayor grosor que las de la cepa WT, además de que formaron unas estructuras peculiares en forma de pilares o columnas con canales (Hernández-Eligio *et al.*, 2022) sobre todos los materiales, no afectándole si el material era conductor o no conductor o, si tenía una superficie uniforme o irregular. La razón principal por la que la cepa mutante forma estas estructuras está bajo investigación actual en nuestro grupo de investigación. Por otro lado, los

materiales basados en hierro fueron los mejores al promover la formación de una biopelícula de *G. sulfurreducens* más gruesa y con mayor biovolumen.

Pruebas electroquímicas

La biopelícula que forma *G. sulfurreducens* DL1 es electroconductiva por lo que es primordial conocer su capacidad para conducir corriente por medio de pruebas electroquímicas, como el potencial de circuito abierto (OCP), la voltamperometría cíclica (CV) y la voltamperometría de onda cuadrada (SWV) (Babauta *et al.*, 2012). Se seleccionaron estas técnicas porque se puede obtener información relevante sobre el entorno electroquímico de la interfaz electrodo/biopelícula, la electroactividad de las biopelículas y el potencial relacionado con los citocromos tipo *c* en contacto con el electrodo, que realizan reacciones de transferencia directa de electrones de forma reversible (Hernández-Eligio *et al.*, 2022). Los estudios electroquímicos solo se pudieron realizar en FTO (Figuras 18, 22 y 26), grafito (Figuras 19, 23 y 27), Fe₂O₃-FTO (Figuras 20, 24 y 28) y acero inoxidable (Figuras 21, 25 y 29); en el caso del vidrio y Fe₂O₃-vidrio, no se pudieron realizar estos estudios porque estos materiales no son conductores.

Cabe señalar que en los siguientes experimentos no se impuso un potencial eléctrico externo durante el crecimiento de la biopelícula y las pruebas electroquímicas se realizaron en condiciones diferentes a las de los medios de cultivo. Todos los resultados podrían atribuirse únicamente al fenotipo expresado de cada cepa debido a que no hubo influencia externa sobre el desarrollo de biopelículas (Hernández-Eligio *et al.*, 2022).

Potencial de circuito abierto (OCP)

La medición del OCP puede proporcionar información acerca de las interacciones fisicoquímicas de las interfases involucradas en un sistema complejo como las biopelículas formadas sobre los electrodos. Para este trabajo, los materiales de

soporte se utilizaron como ánodos (electrodos en los que se produce una reacción de oxidación), siendo que el OCP de un electrodo con biopelícula de *G. sulfurreducens* se desplaza hacia valores negativos debido a la oxidación de moléculas electroactivas bacterianas en la interfaz biopelícula/electrodo (Figura 18) (Schrott *et al.* 2019; Hernández-Eligio *et al.* 2022).

Las figuras 19-22 muestran el valor promedio de OCP después de una medición de diez minutos en todos los electrodos. Los electrodos sin biopelícula mostraron diferentes valores de potencial; el electrodo FTO desnudo tuvo un OCP de alrededor de 0.4 V (Figura 19), lo que no era de esperar ya que, en trabajos previos, nuestro grupo reportó valores de OCP más negativos (Huerta-Miranda *et al.*, 2019; Hernández-Eligio *et al.*, 2022). El electrodo de grafito tuvo el rango más amplio y el valor OCP más positivo (0.3 V - 0.5 V). El electrodo Fe₂O₃-FTO tuvo el potencial más negativo (aprox. 0.05 V). El electrodo de acero inoxidable tuvo un potencial de alrededor de 0.12 V. Estos resultados indicaron que todos los materiales de los electrodos tuvieron diferentes entornos electroquímicos en sus interfases en el electrolito. Además, esto podría explicar por qué se observó por CLSM que la cepa WT forma biopelículas más gruesas y homogéneas en los materiales más negativos (FTO, Fe₂O₃-FTO y acero inoxidable) y biopelículas heterogéneas e irregulares en el material más positivo (grafito).

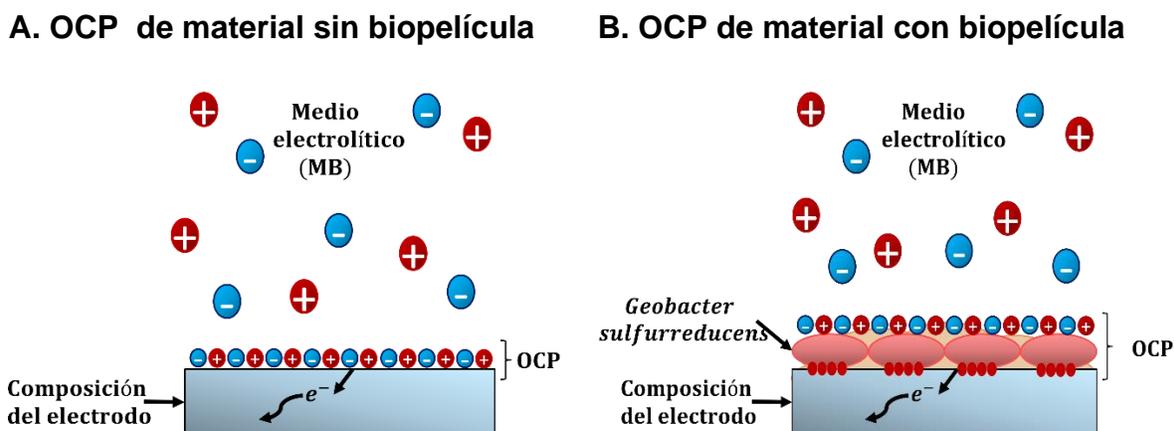


Figura 18. Representación del OCP de los materiales de electrodo con y sin biopelícula de las cepas de *G. sulfurreducens*.

A. OCP de material sin biopelícula. **B.** OCP de material con biopelícula, cuyo valor se vuelve más negativo en comparación con el material desnudo.

La cepa WT tuvo valores de OCP entre -0.1 y -0.2 V sin la adición de acetato de sodio (NaAc) al electrolito, pero en presencia de esta molécula orgánica, el OCP cambió a valores más negativos. Esto indicó que las biopelículas son electroactivas frente a la oxidación del acetato y la posterior transferencia de electrones al electrodo de FTO. Nuestro grupo de investigación ha informado de este comportamiento anteriormente, y que un cambio negativo en el valor de OCP indica que las biopelículas se encuentran en condiciones catalíticas (Hernández-Eligio et al., 2022). La cepa $\Delta gsu1771$ tuvo valores de OCP más negativos que WT, como se observó anteriormente; sin embargo, en presencia de acetato, el OCP no cambió significativamente (Figura 19).

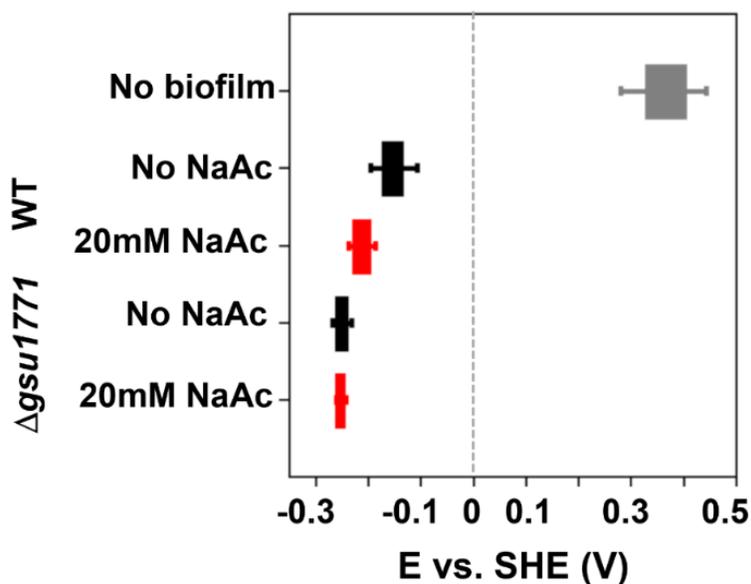


Figura 19. Potencial a circuito abierto de las cepas WT y mutante $\Delta gsu1771$ sobre FTO. Cepa WT y cepa mutante $\Delta gsu1771$ sobre FTO a 48 horas. La barra gris representa al material del soporte (control), la barra negra representa a la biopelícula y la barra roja representa a la biopelícula al momento de agregarle acetato.

Los valores de OCP de la biopelícula formada por la cepa WT sobre grafito oscilaron entre -0.03 y -0.17 V sin NaAc, y presentaron un ligero cambio al añadir este compuesto. La cepa $\Delta gsu1771$ fue un poco más negativa que WT, pero es difícil saberlo porque en este material se observó el rango más amplio de valores de OCP con y sin biopelículas (Figura 20). La porosidad de este material de electrodo posiblemente tuviera alguna relación con esto, si se tiene en cuenta que el electrolito necesitaría más tiempo para llenar estos poros respecto a materiales planos como el FTO; así, la formación de la doble capa estaría influenciada por este fenómeno (Madjarov et al., 2017).

Además, se buscó la manera de mejorar las respuestas electroquímicas de las biopelículas de las cepas de *G. sulfurreducens* DL1 que crecieron sobre el grafito, así que se buscaron varias opciones para aislar una sola cara y los bordes de este soporte, para ello se utilizaron varias resinas o se pegaron con teflón, evitando que estos materiales reaccionen con el medio NBAF.

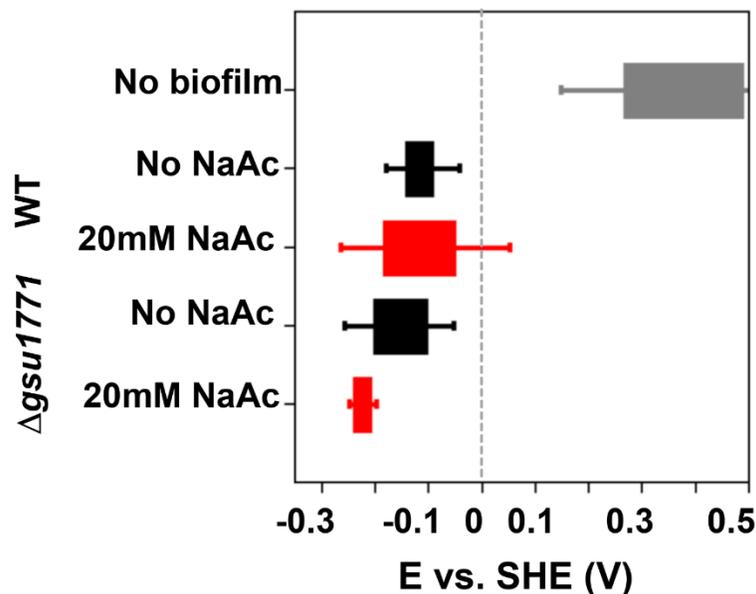


Figura 20. Potencial a circuito abierto de las cepas WT y mutante $\Delta gsu1771$ sobre grafito. Cepa WT y cepa mutante $\Delta gsu1771$ sobre grafito a 96 horas. La

barra gris representa al material del soporte (control), la barra negra representa a la biopelícula y la barra roja representa a la biopelícula al momento de agregarle acetato.

En el electrodo Fe_2O_3 -FTO se observó un comportamiento similar al del electrodo de FTO desnudo, esto podría significar que la película de Fe_2O_3 cambió por la presencia de los microorganismos, lo cual era de esperarse, ya que *G. sulfurreducens* es un microorganismo reductor de Fe(III), por lo tanto, algunas de las películas de Fe_2O_3 debían ser reducidas por la cepa WT y la cepa mutante $\Delta\text{gsu1771}$ (Figura 21).

Las ventajas que ofreció la hematita como soporte se vieron reflejadas en el hecho de que la bacteria formó una biopelícula más gruesa y con mayor capacidad para generar corriente, esto último solamente para Fe_2O_3 -FTO. Sin embargo, el problema con estos materiales modificados es que requieren pasar por varios procesos, lo que significa más tiempo y dinero de inversión para ser obtenidos, así como que se pueden utilizar una sola vez de manera eficiente.

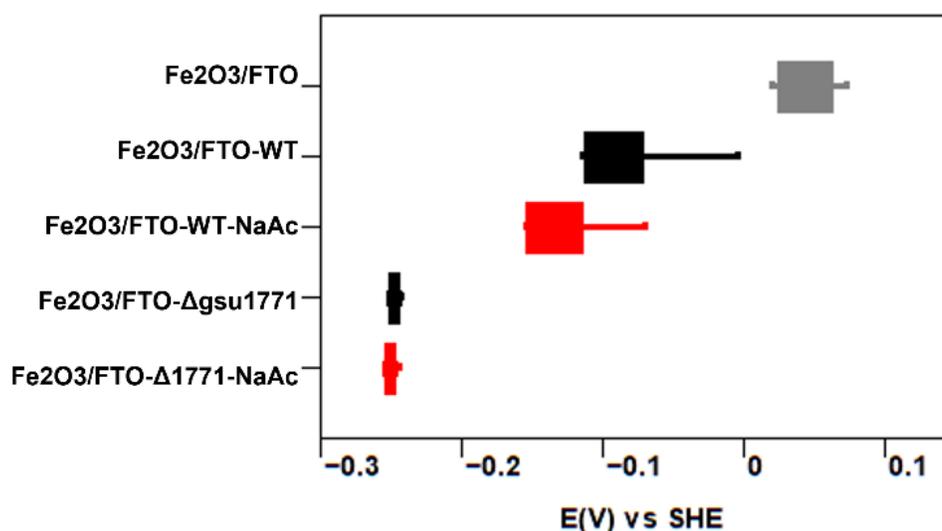


Figura 21. Potencial a circuito abierto de las cepas WT y mutante $\Delta\text{gsu1771}$ en Fe_2O_3 -FTO. Cepa WT y cepa mutante $\Delta\text{gsu1771}$ sobre Fe_2O_3 -FTO a 48

horas. La barra gris representa al material del soporte (control), la barra negra representa a la biopelícula y la barra roja representa a la biopelícula al momento de agregarle acetato.

Los valores de OCP de la biopelícula formada por la cepa WT sobre acero inoxidable oscilaron entre -0.03 y -0.06 V sin NaAc, y presentaron un ligero cambio al añadir este compuesto. La cepa $\Delta gsu1771$ tuvo valores de OCP más negativos que la WT; sin embargo, en presencia de acetato, el OCP se volvió un poco más negativo (Figura 22).

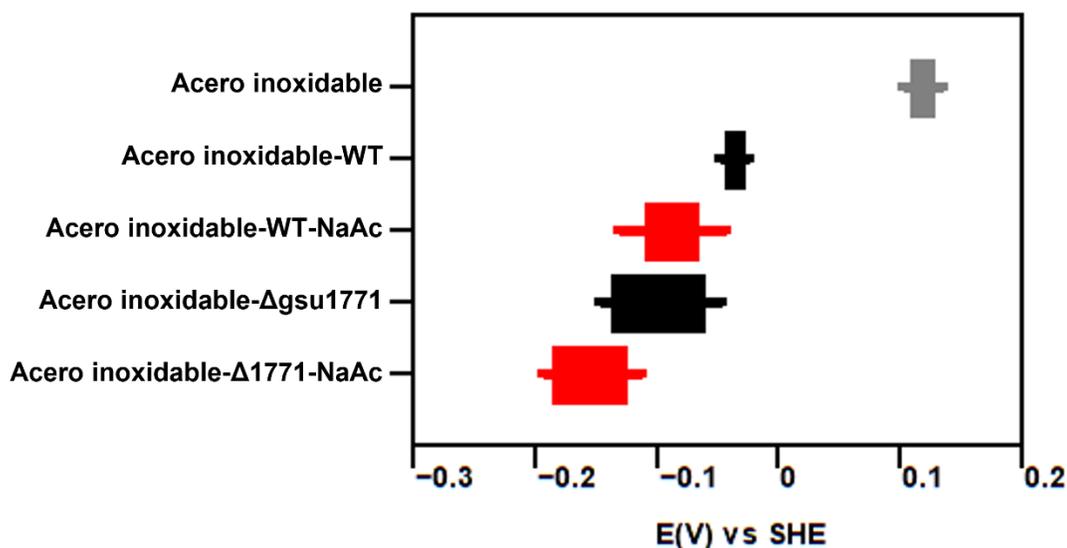


Figura 22. Potencial a circuito abierto de las cepas WT y mutante $\Delta gsu1771$ en acero inoxidable. Cepa WT y cepa mutante $\Delta gsu1771$ sobre acero inoxidable a 48 horas. La barra gris representa al material del soporte (control), la barra negra representa a la biopelícula y la barra roja representa a la biopelícula al momento de agregarle acetato.

Es necesario considerar que cada valor de OCP obtenido sobre cada material pudo no corresponder a una sola molécula, como un citocromo tipo c, porque el almacenamiento de carga puede suceder en diferentes moléculas redox con

potenciales superpuestos y que están conectadas eléctricamente entre sí y con el electrodo (Schrott *et al.*, 2019; Hernández-Eligio *et al.*, 2022).

Voltamperometría cíclica (CV)

La voltamperometría cíclica es un barrido de potencial lineal en el que se pueden observar los procesos redox asociados a la biopelícula, identificar el potencial asociado a estos procesos y la cantidad de corriente generada por la biopelícula (Babauta & Beyenal, 2015).

Las figuras 23-26 muestran las respuestas de CV de las biopelículas en todos los materiales de electrodos probados con y sin la adición de acetato de sodio. En todos los casos se trató de la misma área del electrodo para comparar las corrientes eléctricas generadas.

La cepa WT y la cepa $\Delta gsu1771$ mostraron un voltamperograma en forma de S en el electrodo FTO, lo que indicó biopelículas electroactivas (Figura 23). Sin embargo, en este caso la producción actual no fue tan alta como se observó anteriormente (Hernández-Eligio *et al.*, 2022). A pesar de esta disminución de corriente, el comportamiento de estas deformaciones en este material de electrodo fue consistente en términos del potencial en el punto de inflexión de las curvas (≈ 0.18 V).

Durante las pruebas electroquímicas con el FTO se presentó el problema de que aparecían procesos redox propios del material mientras se realizaban los voltamperogramas, los cuales no desaparecían, aunque se formara una biopelícula sobre este material, por lo que se tuvo que delimitar una nueva ventana de potencial, entre -1.1 y 0.3 V, para llevar a cabo las voltamperometrías, tanto la cíclica (Figura 23) como la de onda cuadrada (Figura 27).

En comparación con nuestro estudio previo, se pudo observar una disminución en la producción de corriente por parte de ambas cepas. No obstante, se conservó el hecho de que la cepa $\Delta gsu1771$ generó aproximadamente cinco veces más corriente que la cepa WT cuando crecieron sobre FTO, lo que indicó que la

transferencia de electrones hacia aceptores externos fue más eficiente en la cepa $\Delta gsu1771$ (Hernández-Eligio *et al.*, 2022), lo que estuvo relacionado con una mayor expresión de los citocromos tipo *c*, lo que nos indicó una mayor presencia de especies electroactivas en la biopelícula de esta cepa mutante (Figura 31).

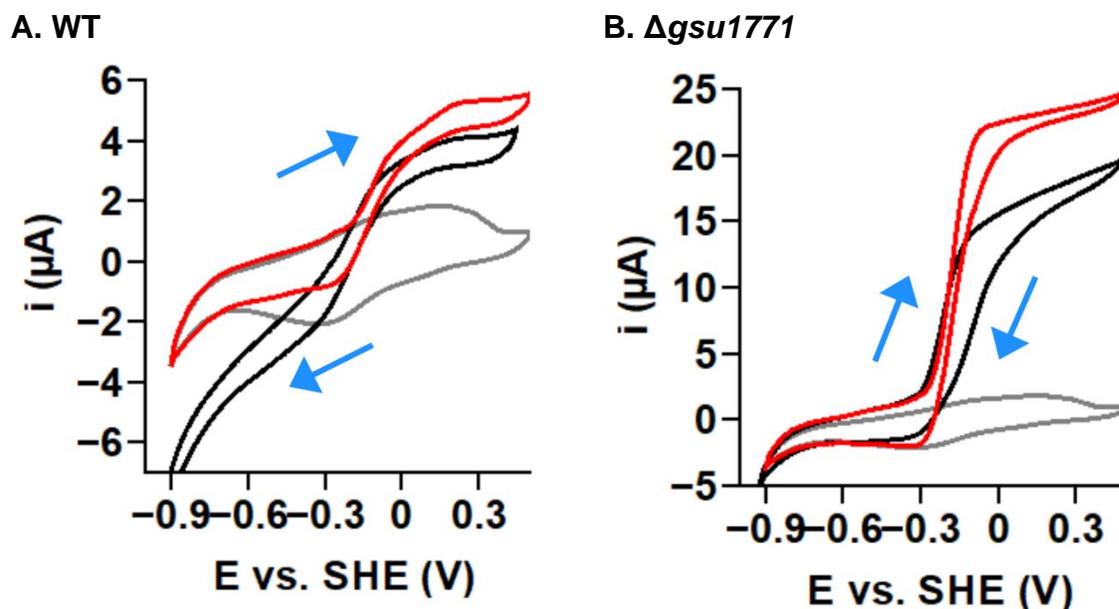


Figura 23. Voltamperometría cíclica a 0.01 V/s de las cepas WT y mutante $\Delta gsu1771$ sobre FTO. A. Cepa WT sobre FTO a 48 horas. B. Cepa mutante $\Delta gsu1771$ sobre FTO a 48 horas. La línea gris representa al material del soporte (control), la línea negra representa a la biopelícula y la línea roja representa a la biopelícula al momento de agregarle acetato.

El electrodo de grafito resultó ser un material de alta capacitancia debido a su gran porosidad, como se mencionó anteriormente. Esta capacitancia es la causa de la baja corriente faradaica de las biopelículas. Los voltamperogramas de deformación WT no mostraron procesos redox claros, y cuando se agregó NaAc, no hubo diferencia entre los voltamperogramas. La cepa $\Delta gsu1771$ presentó un pico redox reversible alrededor de -0.1 V, pero el voltamperograma no cambió en presencia de NaAc (Figura 24).

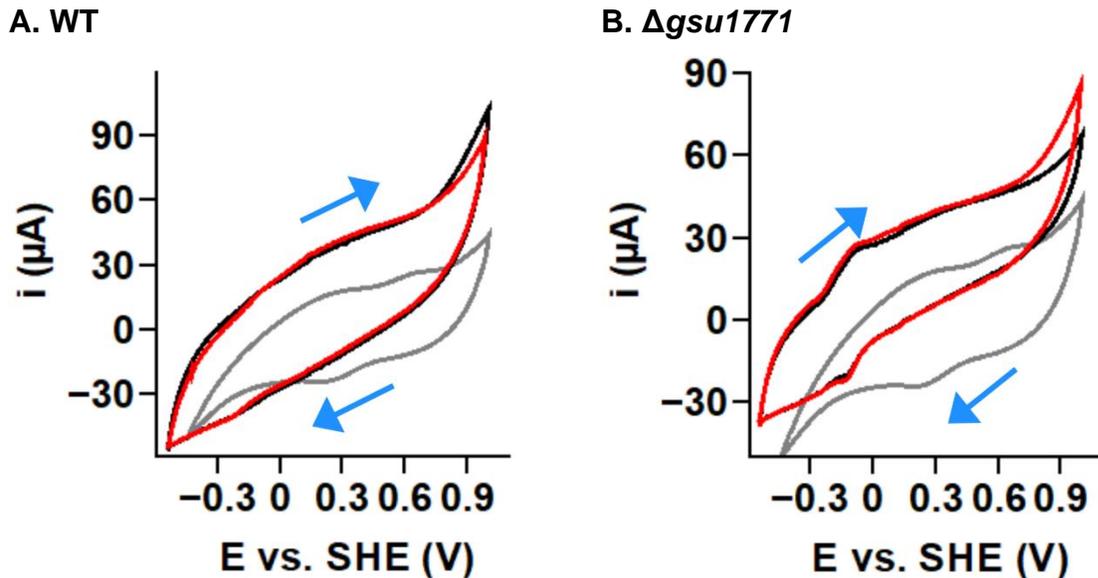


Figura 24. Voltamperometría cíclica a 0.01 V/s de las cepas WT y mutante Δ gsu1771 sobre grafito. A. Cepa WT sobre grafito a 96 horas. B. Cepa mutante Δ gsu1771 sobre grafito a 96 horas. La línea gris representa al material del soporte (control), la línea negra representa a la biopelícula y la línea roja representa a la biopelícula al momento de agregarle acetato.

El caso del electrodo $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-FTO}$ es muy interesante ya que se descubrió que las respuestas electroquímicas de estos electrodos tienen las corrientes más altas y son muy similares a las de aquellos sin biopelícula, lo que indica que el proceso observado es el par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ de las hematitas. Se observa una disminución de las corrientes máximas en presencia de acetato. Esto indica que la concentración de las especies electroactivas responsables de esa respuesta redox está disminuyendo en la interfaz electrodo/biopelícula (Figura 25). No obstante, los resultados mostrados en este trabajo son insuficientes para entender completamente este comportamiento; por lo tanto, se necesitan más estudios para caracterizar exhaustivamente los mecanismos de transferencia de electrones de las cepas presentadas en este documento.

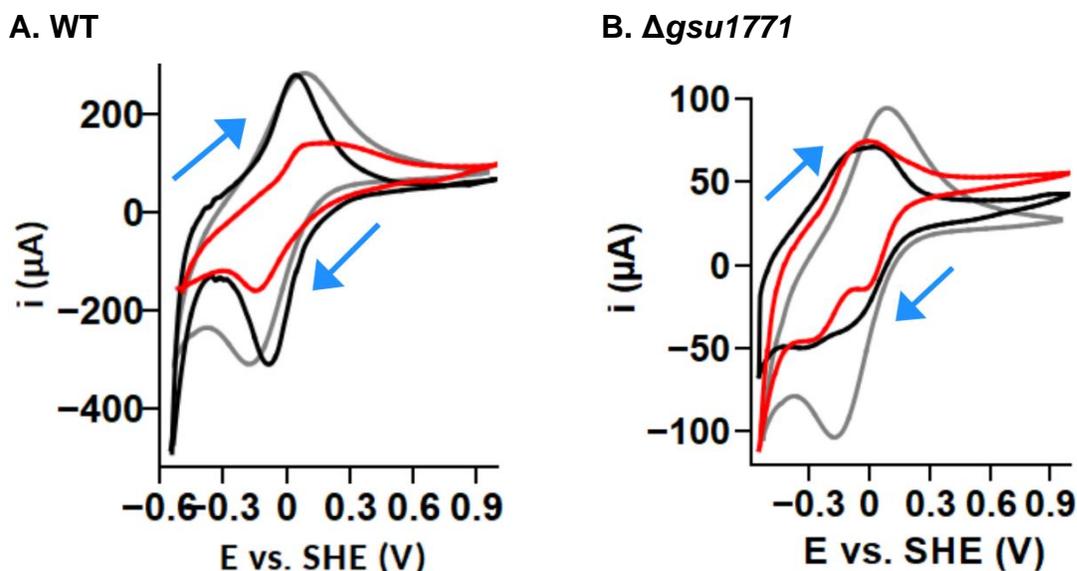


Figura 25. Voltamperometría cíclica a 0.01 V/s de las cepas WT y mutante $\Delta gsu1771$ en Fe_2O_3 -FTO. A. Cepa WT en Fe_2O_3 sobre FTO a 48 horas. B. Cepa mutante $\Delta gsu1771$ en Fe_2O_3 sobre FTO a 48 horas. La línea gris representa al material del soporte (control), la línea negra representa a la biopelícula y la línea roja representa a la biopelícula al momento de agregarle acetato.

El caso del electrodo de acero inoxidable también es interesante ya que se encontró que las respuestas electroquímicas de estos electrodos son muy similares a las de aquellos sin biopelícula, lo que indica que el proceso observado corresponde al del acero inoxidable, lo que posiblemente nos esté indicando corrosión del material (Figura 26), lo cual fue comprobado por un estudio posterior de microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figura S3).

El caso del acero inoxidable es importante ya que se trata de un material con potencial uso en SBEs (Pocaznoi *et al.*, 2012), por lo que es importante conocer cómo interactúa *G. sulfurreducens* con el acero inoxidable. En otros trabajos, se logró comprobar la corrosión del acero inoxidable por este microorganismo por medio de varias pruebas electroquímicas y se encontró que el citocromo tipo *c* OmcS es importante para llevar a cabo el proceso de corrosión sobre este material (Tang *et al.*, 2021). El fenómeno de corrosión en el acero inoxidable se podría

explicar por la oxidación del Fe^0 sobre la superficie de este material, el Fe^0 es oxidado por *G. sulfurreducens* a través de transferencia de electrones directa metal-microorganismo dando Fe^{2+} , parte de este proceso genera H^+ , que es consumido por este microorganismo durante su crecimiento por medio de hidrogenasas (Tang *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2021). Por lo que *G. sulfurreducens* está utilizando el acero inoxidable como cátodo, así que se está presentando el fenómeno de corrosión influenciado microbiológicamente (MIC), en el que los grupos funcionales presentes en las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) de la biopelícula interactúan con el hierro del acero inoxidable (Puentes-Cala *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022).

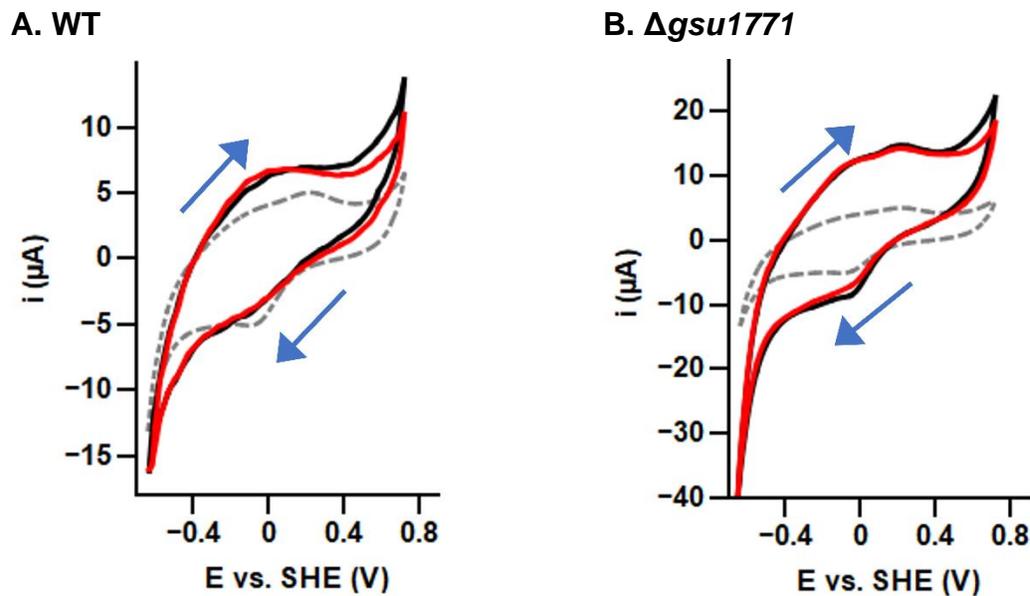


Figura 26. Voltamperometría cíclica a 0.01 V/s de las cepas WT y mutante $\Delta\text{gsu1771}$ en acero inoxidable. A. Cepa WT en acero inoxidable a 48 horas. B. Cepa mutante $\Delta\text{gsu1771}$ en acero inoxidable a 48 horas. La línea gris representa al material del soporte (control), la línea negra representa a la biopelícula y la línea roja representa a la biopelícula al momento de agregarle acetato.

Por otro lado, de acuerdo con las voltamperometrías cíclicas, se encontró que el FTO es el mejor material para la transferencia de carga eléctrica entre la biopelícula de *G. sulfurreducens* y el material. No obstante, la elección de un material conductor dependerá del uso que se le vaya a proporcionar.

Voltamperometría de onda cuadrada (SWV)

La voltamperometría de onda cuadrada es una técnica electroquímica capaz de reducir la capacitancia intrínseca de la CV. Los voltamogramas obtenidos suelen ofrecer una excelente resolución de especies electroactivas sucesivas en sistemas multicomponentes como biopelículas electroactivas (Babauta & Beyenal, 2015). Esta técnica nos permite distinguir entre procesos redox asociados al material de los procesos redox asociados a la biopelícula de *G. sulfurreducens*.

Las figuras 27-30 muestran las respuestas SWV de las biopelículas en todos los materiales de electrodos probados con y sin la adición de acetato de sodio.

La gráfica obtenida de la cepa WT en FTO muestra un pico claro a -0.12 V, correspondiente a la FTO (ver línea gris), pero a potenciales más negativos (-0.33 V, -0.42 V y -0.51 V), hay otros pequeños picos de árbol que no aparecen en la respuesta del electrodo sin biofilm. En la cepa $\Delta gsu1771$ también aparece el pico relacionado con FTO, se define mejor el proceso a -0.33 V y, los procesos a -0.42 V y -0.51 V observados en WT apenas logran observarse en la cepa $\Delta gsu1771$ (Figura 27).

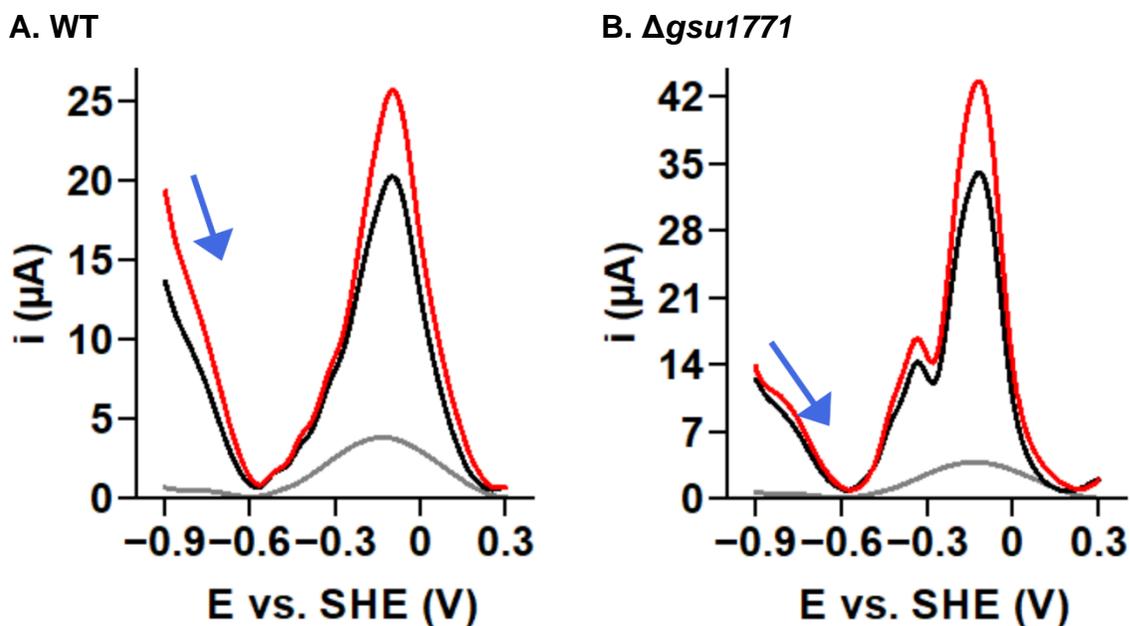


Figura 27. Voltamperometría de onda cuadrada a 0.001 V/s, 30 Hz y 0.01 V de amplitud de las cepas WT y mutante $\Delta gsu1771$ sobre FTO. A. Cepa WT sobre FTO a 48 horas. B. Cepa mutante $\Delta gsu1771$ sobre FTO a 48 horas. La línea gris representa al material del soporte (control), la línea negra representa a la biopelícula y la línea roja representa a la biopelícula al momento de agregarle acetato.

En el soporte de grafito se observa un proceso definido a 0.3 V que corresponde al propio material. Por otro lado, se observa un proceso en torno a -0.12 V en las biopelículas de ambas cepas, que no aparece en el electrodo desnudo. Además, se puede observar otro proceso adicional ubicado a -0.33 V presente en la biopelícula de la cepa $\Delta gsu1771$ (Figura 28).

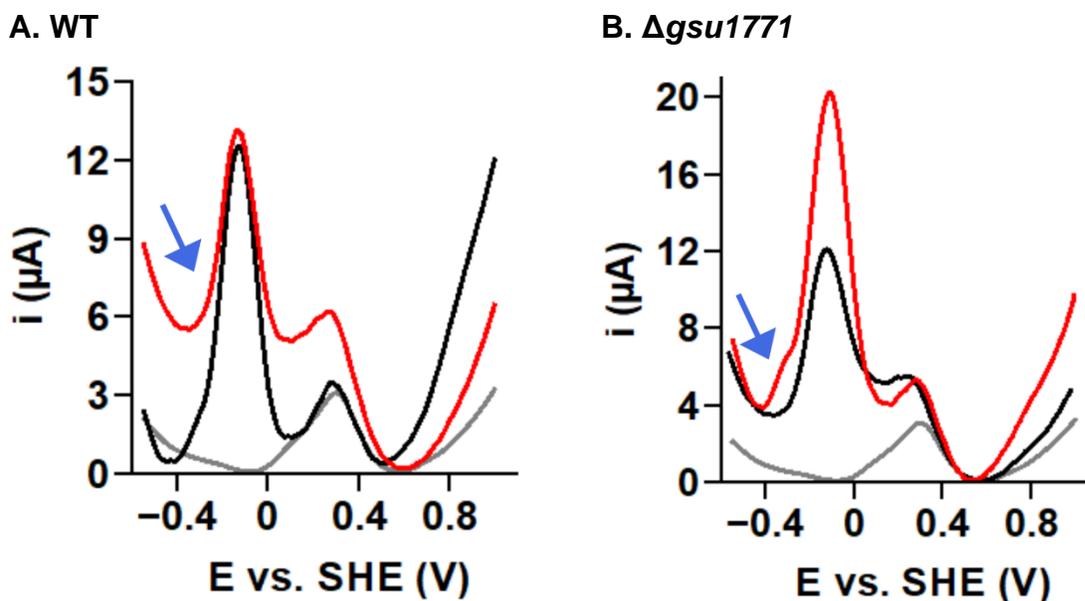


Figura 28. Voltamperometría de onda cuadrada a 0.001 V/s, 30 Hz y 0.01 V de amplitud de las cepas WT y mutante Δ *gsu1771* sobre grafito. A. Cepa WT sobre grafito a 96 horas. B. Cepa mutante Δ *gsu1771* sobre grafito a 96 horas. La línea gris representa al material del soporte (control), la línea negra representa a la biopelícula y la línea roja representa a la biopelícula al momento de agregarle acetato.

En el electrodo Fe_2O_3 -FTO se logró definir un único proceso ubicado a -0.12 V en las biopelículas de ambas cepas que podría relacionarse al par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ de la hematita. No obstante, se necesitan más estudios para comprender el comportamiento redox de las biopelículas crecidas sobre este material modificado (Figura 29).

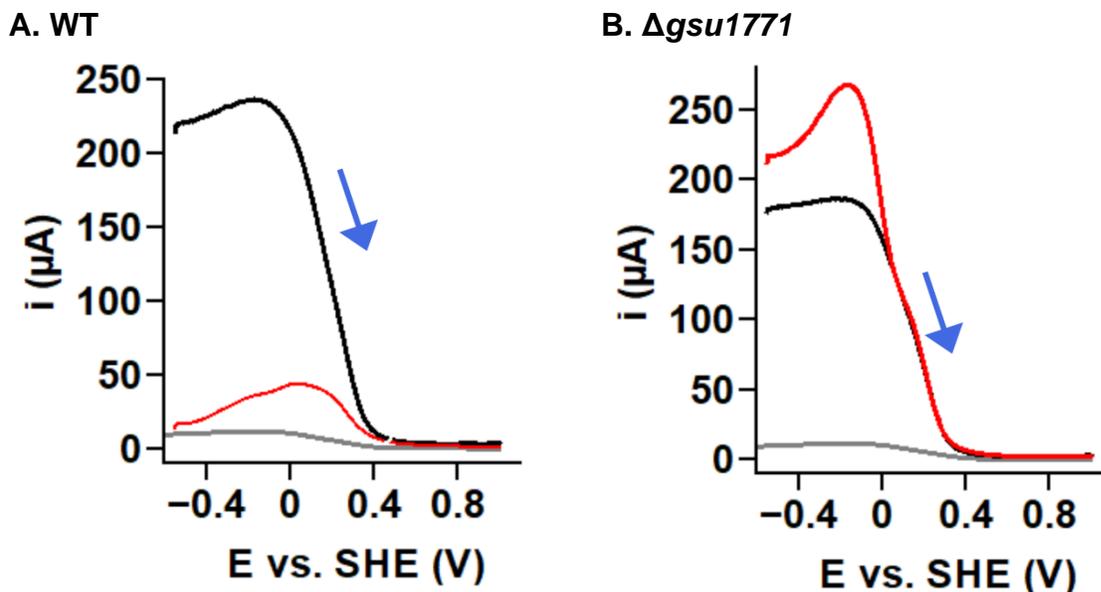


Figura 29. Voltamperometría de onda cuadrada a 0.001 V/s, 30 Hz y 0.01 V de amplitud de las cepas WT y mutante Δ *gsu1771* en Fe_2O_3 sobre FTO. A. Cepa WT en Fe_2O_3 sobre FTO a 48 horas. B. Cepa mutante Δ *gsu1771* en Fe_2O_3 sobre FTO a 48 horas. La línea gris representa al material del soporte (control), la línea negra representa a la biopelícula y la línea roja representa a la biopelícula al momento de agregarle acetato.

En el electrodo de acero inoxidable se observa un proceso ubicado a 0.0 V asociado al propio material, lo cual se podría relacionar con la presencia de H_2 tal como se había planteado con las CV del acero inoxidable (Tang *et al.*, 2021). También, se logra definir un proceso en torno a -0.42 V en las biopelículas de ambas cepas, que no aparece en el electrodo desnudo. Además, se logró definir un proceso en torno a -0.33 V que sólo se logró observar en la biopelícula de la cepa Δ *gsu1771* con acetato de sodio (Figura 30).

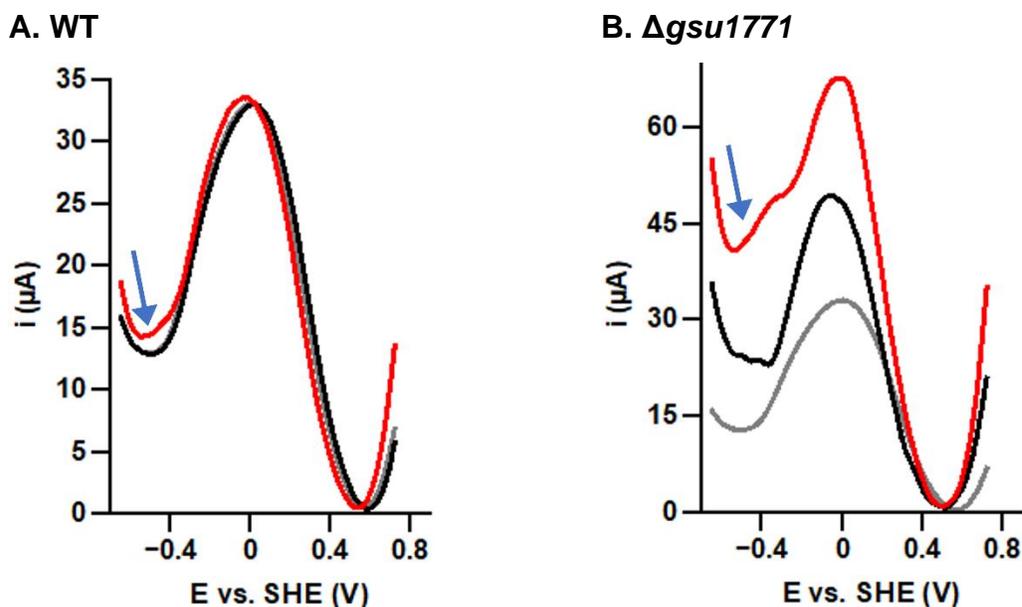


Figura 30. Voltamperometría de onda cuadrada a 0.001 V/s, 30 Hz y 0.01 V de amplitud de las cepas WT y mutante $\Delta gsu1771$ sobre acero inoxidable. A. Cepa WT en Fe_2O_3 sobre FTO a 48 horas. B. Cepa mutante $\Delta gsu1771$ en Fe_2O_3 sobre FTO a 48 horas. La línea gris representa al material del soporte (control), la línea negra representa a la biopelícula y la línea roja representa a la biopelícula al momento de agregarle acetato.

Los resultados obtenidos en las pruebas electroquímicas indican que *G. sulfurreducens* tiene un comportamiento electroquímico que varía según el material conductor sobre el que está creciendo. Recientes trabajos acerca de citocromos tipo-c multi-hemo de *Geobacter* apuntan a un comportamiento de tipo "switching", en el que el potencial redox de una superficie externa puede influir en la vía precisa de EET utilizada (Levar *et al.*, 2017). Esta postura se sostiene con los siguientes hallazgos: para la reducción de aceptores de electrones extracelulares de alto potencial redox se requiere el citocromo de membrana interna ImcH (Levar *et al.*, 2014), mientras que el citocromo de membrana interna CbcL se requiere para la reducción de aceptores de electrones de bajo potencial (Zacharoff *et al.*, 2016). Además, el citocromo de membrana interna CbcBA controla la transferencia de electrones y el crecimiento cerca del límite energético de la respiración (Joshi *et al.*, 2021); sin embargo, la bacteria conserva estas

funciones para reducir una amplia variedad de minerales en un ambiente que se encuentra en constante cambio. Así que la bacteria puede evaluar el potencial redox de las superficies de cada uno de los materiales sobre los que crece y determinar la vía precisa de EET utilizada por la bacteria como se ha observado en las diferentes respuestas voltamperométricas de las biopelículas que crecen sobre los diferentes materiales conductores.

Expresión de genes involucrados en la transferencia de electrones extracelular y en la formación de biopelícula

Para determinar si ocurría un cambio en la expresión relativa de genes involucrados en la transferencia extracelular de electrones y en la formación de biopelícula de las biopelículas de las cepas WT y la mutante $\Delta gsu1771$ formadas sobre los diferentes materiales (vidrio, Fe₂O₃-vidrio, FTO, Fe₂O₃-FTO, grafito y acero inoxidable), se llevó a cabo un análisis de expresión relativa de los diferentes genes de interés mediante transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR) (Hernández-Eligio *et al.*, 2022).

Previamente, en nuestro grupo de trabajo se realizó un análisis transcriptómico global de la biopelícula de la cepa mutante $\Delta gsu1771$ sobre vidrio y grafito. Se encontraron 467 genes diferencialmente expresados sobre vidrio y 119 genes diferencialmente expresados sobre grafito en comparación con las biopelículas de la cepa WT (Jaramillo-Rodríguez *et al.*, 2023). De entre esos genes, se seleccionaron 13 genes involucrados en la EET y la formación de biopelícula (*acnA*, *dcuB*, *epsH*, *ftsX*, *omcB*, *omcC*, *omcE*, *omcF*, *omcM*, *omcS*, *omcZ*, *pilA* y *pgcA*) para analizar su expresión relativa en la biopelícula formada por las cepas de *G. sulfurreducens* sobre los diferentes materiales (Figura 31).

Genes involucrados en la transferencia de electrones extracelular

Los citocromos tipo *c* de membrana externa (Yang *et al.*, 2012) se han estudiado ampliamente en *G. sulfurreducens* por la función que desempeñan en la EET (Ueki, 2021).

En este proyecto se encontró una mayor expresión de los siguientes genes que codifican citocromos tipo *c* en la cepa Δ *gsu1771* en comparación con la cepa WT de *G. sulfurreducens* DL1 sobre todos los materiales utilizados (Figura 31): *omcF*, *omcM*, *omcS* y *pgcA*. OmcF es un citocromo tipo *c* monohemo de membrana externa que es requerido para la reducción de Fe(III) y la producción de corriente eléctrica (Kim *et al.*, 2005; Dantas *et al.*, 2017), además, estudios genéticos muestran que OmcF tiene un papel clave en la regulación de genes que codifican proteínas necesarias para la reducción de Fe(III) (OmcB y OmcC) (Kim *et al.*, 2005) y en la producción de electricidad en celdas microbianas de combustible (OmcE y OmcS) (Kim *et al.*, 2008). OmcM es un citocromo tipo *c* tetrahemo de membrana externa que se expresa durante la reducción de Fe(III) y Pd(II) (Aklujkar *et al.*, 2013; Hernández-Eligio *et al.*, 2020). OmcS es un citocromo tipo *c* hexahemo de membrana externa asociado al geopili esencial para la reducción de óxidos de Fe(III) y Mn(IV) insolubles (Leang *et al.*, 2010; Qian *et al.*, 2011) y un reporte reciente indica que OmcS podría formar nanocables involucrados en la EET de larga distancia (Filman *et al.*, 2019). PgcA es un citocromo tipo *c* trihemo extracelular que facilita la reducción de óxidos de Fe(III) y de Mn(IV) (Zacharoff *et al.*, 2017), el cual fue el citocromo tipo *c* con mayor expresión de los seleccionados en este trabajo, lo que podría deberse a que este citocromo contribuyó a la reducción de varios aceptores de electrones por sus características estructurales y bioquímicas (Fernandes *et al.*, 2023), donde presentó una mayor expresión en materiales que contienen Fe, que son los materiales cubiertos por hematita y el acero inoxidable (Figura 30). Esto corrobora lo que se encontró en nuestro grupo de trabajo en el que se observó una sobreexpresión de los genes que codifican los citocromos tipo *c*: *omcM*, *omcS* y *pgcA* (Jaramillo-Rodríguez *et al.*, 2023). No obstante, el gen que codifica el citocromo tipo *c* OmcF no se encontró como un gen diferencialmente expresado en el transcriptoma de la cepa mutante

Δgsu1771, en este trabajo se encontró como un gen sobre expresado, por lo que se recomienda estudiar este gen en trabajos posteriores. Los resultados de este trabajo indicaron una mayor presencia de especies electroactivas en la biopelícula de esta cepa mutante, lo que se reflejó en una mayor producción de corriente.

Otros genes de citocromos tipo *c* de membrana externa que se encontraron diferencialmente expresados sobre cada uno de los materiales utilizados fueron: *omcB*, *omcC*, *omcE* y *omcZ*. *OmcB* es un citocromo tipo *c* dodecahemo involucrado en la reducción de Fe(III) soluble y que, junto con otras dos proteínas, forma un complejo porina-citocromo que transfiere electrones a través de la interfase electrodo/biopelícula (Leang *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2014). *OmcC* es un citocromo tipo *c* dodecahemo homólogo a *OmcB*, probablemente resultado de una duplicación genética (Leang & Lovley, 2005). *OmcE* es un citocromo tipo *c* tetrahemo involucrado en la reducción de óxidos de Fe(III) (Mehta *et al.*, 2005) y un trabajo reciente indica que *OmcE* podría formar nanocables involucrados en la EET de larga distancia (Wang F. *et al.*, 2021). En este trabajo, se observó que *omcB*, *omcC* y *omcE* están más expresados en los materiales cubiertos por hematita, FTO y acero inoxidable; pero se encontraron menos expresados en vidrio y grafito en biopelículas de la cepa mutante en comparación con las de la cepa WT. Por otro parte, *OmcZ* es un citocromo tipo *c* octahemo necesario para la transferencia de electrones a electrodos y a lo largo de la biopelícula (Richter *et al.*, 2009) y un reporte reciente indica que *OmcZ* podría formar nanocables esenciales para la formación de biopelículas de altas densidades de corriente que requieren grandes distancias (Gu *et al.*, 2023). En este trabajo, se encontró que *omcZ* está mayormente expresado en los materiales conductores (Nevin *et al.*, 2009; Franks *et al.*, 2012) y cubiertos por hematita, lo que sugiere que este citocromo es necesario para la conductividad de biopelículas crecidas sobre electrodos; pero se encontró que está menos expresado sobre vidrio, esto puede deberse a que se trata de un material no conductor en biopelículas de la cepa mutante en comparación con las de la cepa WT.

Además, el pili tipo IV conductivo, también llamado geopili (Reguera *et al.*, 2005), ha sido estudiado ampliamente en *G. sulfurreducens* por el papel que desempeña en la EET (Steidl *et al.*, 2016). En este trabajo se encontró que hay una menor expresión del gen *pilA* (gen esencial en la formación del geopili) en la cepa mutante $\Delta gsu1771$ en comparación con la cepa WT sobre cada uno de los materiales utilizados (Figura 31). Esto corrobora que el gen *pilA* está menos expresado en la mutante $\Delta gsu1771$, lo cual se observó previamente en nuestro grupo de trabajo (Jaramillo-Rodríguez *et al.*, 2023).

Por otro lado, se analizó la expresión de otros genes que se encontraron diferencialmente expresados en la cepa mutante $\Delta gsu1771$ (Jaramillo-Rodríguez *et al.*, 2023) y que podrían estar involucrados en la formación de biopelícula, los cuales fueron: *acnA* (gen que codifica la enzima aconitato hidrolasa I), *dcuB* (gen que codifica el antiportador fumarato/succinato DcuB), *epsH* (gen que codifica una exosortasa involucrada en la síntesis de exopolisacáridos) y *ftsX* (gen que codifica una proteína involucrada en la división celular).

Gen involucrado en la producción de exopolisacáridos

El gen *epsH* pertenece al grupo de genes *eps*, los cuales controlan la biosíntesis de polisacáridos extracelulares (Zhao *et al.*, 2023). Se ha predicho la función de la proteína que codifica el gen *epsH*, la cual va variando según la especie en que se investigue: una acetiltransferasa putativa en *Streptococcus thermophilus* Sfi6 (Stingele *et al.*, 1996), una flipasa o polimerasa en *Methylobacillus* sp. cepa 12S (Yoshida *et al.*, 2003), una polimerasa de polisacáridos en *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461 (Dabour & LaPointe, 2005; Zeidan *et al.*, 2017). Posteriormente, por medio de análisis bioinformático de varias especies, se encontró que la proteína EpsH se trataría de una proteína de membrana al presentar múltiples segmentos transmembranales y que podría estar involucrada en la proteólisis y transpeptidación de proteínas con el péptido señal PEP-CTERM, similar a una sortasa (Haft *et al.*, 2006). El gen *epsH* de *G. sulfurreducens* codifica

entonces una proteína H de membrana de síntesis de exopolisacárido (exosortasa). En este trabajo, se encontró una mayor expresión del gen *epsH* en la cepa mutante $\Delta gsu1771$ sobre todos los materiales, lo que sugiere que este gen se relaciona con la producción de una biopelícula más gruesa por parte de la cepa mutante en comparación con la cepa WT (Figura 31).

Genes involucrados en sistemas de transporte

Otro grupo de genes que se encontró diferencialmente expresado en las biopelículas de la cepa mutante $\Delta gsu1771$ son aquellos involucrados en sistemas de transporte. Para este proyecto se analizaron dos genes: *dcuB* y *ftsX*.

Se ha identificado que el gen *dcuB* de *G. sulfurreducens* codifica el intercambiador fumarato/succinato (transportador de dicarboxilato C4) (Butler *et al.*, 2006), lo que le permite a la bacteria captar fumarato y exportar succinato, por lo que es esencial para el crecimiento celular con fumarato como aceptor final de electrones (Leang *et al.*, 2009). En trabajos previos, se observó que la expresión de *dcuB* aumentó cuando se mutó el gen *pilR*, esto sugiere que PilR probablemente reprime al gen *dcuB* (Juárez *et al.*, 2009). Además, se encontró que el gen *dcuB* estaba subexpresado en biopelículas de celdas microbianas de combustible (Nevin *et al.*, 2009) y se encuentra subexpresado cuando forma biopelícula sobre vidrio (Jaramillo-Rodríguez *et al.*, 2023), mientras que este gen se encuentra sobre expresado en la cepa mutante $\Delta gsu1771$ durante crecimiento planctónico (Hernández-Eligio *et al.*, 2022). En este trabajo se encontró que el gen *dcuB* estaba más expresado en las biopelículas de la cepa mutante $\Delta gsu1771$ que crecieron sobre acero inoxidable, grafito, Fe₂O₃-vidrio y Fe₂O₃-FTO que en la cepa silvestre (Figura 31), lo que podría indicar que la cepa mutante estaba consumiendo fumarato para utilizarlo como aceptor de electrones, además de los propios materiales; pero este gen estaba menos expresado sobre las biopelículas de la cepa mutante que crecieron sobre vidrio y FTO (Figura 31), lo que podría indicar que la cepa mutante no estaba utilizando el fumarato como aceptor de electrones. No obstante, se recomiendan más pruebas experimentales para

estudiar y explicar el papel que desempeña DcuB en las biopelículas de *G. sulfurreducens*.

El gen *ftsX* es uno de varios genes *fts* (filamentación sensible a temperatura) (Kempf & McBride, 2000). Este gen codifica un transportador ABC (Casete de unión a ATP) FtsE/FtsX necesario para la formación del anillo Z y en la división celular en *Escherichia coli* (Schmidt *et al.*, 2004). Además, se encontró que FtsX está presente en *Myxococcus xanthus* (bacteria perteneciente a la clase de las δ -proteobacterias, de la que también forma parte *G. sulfurreducens*) dentro de la familia de proteínas FtsX/FtsE llevando a cabo la función de septación (división o partición de la célula por un septo) (Getsin *et al.*, 2013). El gen *ftsX* de *G. sulfurreducens* codifica entonces una proteína de membrana transportadora ABC de división celular FtsX. En este trabajo se encontró que el gen *ftsX* estaba más expresado en las biopelículas de la cepa mutante Δ *gsu1771* que crecieron sobre acero inoxidable, Fe₂O₃-vidrio y Fe₂O₃-FTO (Figura 31), lo que nos podría indicar que estaría ocurriendo una mayor división celular (Schmidt *et al.*, 2004) y habría mas células dentro de estas biopelículas sobre estos materiales en comparación con las de la cepa WT; pero este gen estuvo menos expresado sobre las biopelículas de la cepa mutante que crecieron sobre vidrio, FTO y grafito (Figura 31), esto nos podría indicar que el proceso de división celular sería menor sobre estos materiales en comparación con las biopelículas de la cepa WT. Sin embargo, para que ocurra la división celular se requiere de diferentes tipos de proteínas (Dai & Lutkenhaus, 1992; Haeusser & Margolin, 2016) por lo que un pequeño aumento o disminución en la expresión del gen *ftsX* podría no implicar necesariamente una mayor o menor división celular dentro de las biopelículas analizadas, respectivamente. No obstante, se observó una expresión muy alta del gen *ftsX* sobre el acero inoxidable (Figura 31), lo que podría relacionarse con una mayor división celular en presencia de este material, lo cual se vió reflejado en un mayor biovolumen (Tabla 14) sobre el acero inoxidable de la biopelícula de la cepa mutante en comparación con la de la cepa WT.

Gen involucrado en metabolismo central

Para este proyecto se trabajó con un sólo gen involucrado en metabolismo central: *acnA*. Se ha identificado que el gen *acnA* codifica la enzima aconitato hidratasa I o aconitasa (EC 4.2.1.3), la cual es una deshidratasa-hidratasa que cataliza la isomerización reversible del citrato e isocitrato mediante cis-aconitato en los ciclos del ácido cítrico y del glioxilato (Gruer & Guest, 1994). El gen *acnA* de *G. sulfurreducens* codifica entonces la enzima aconitato hidratasa. Además, se encontró que el gen *acnA* tenía una expresión baja en células planctónicas de las cepas mutantes $\Delta ihfA-1$ y $\Delta ihfB-2$ en comparación con la cepa WT de *G. sulfurreducens* (Andrade *et al.*, 2021). En este trabajo se encontró que el gen *acnA* no cambió su expresión sobre el vidrio como se observó previamente en nuestro grupo de trabajo (Jaramillo-Rodríguez *et al.*, 2023). Sin embargo, este gen estuvo más expresado en las biopelículas de la cepa mutante $\Delta gsu1771$ que crecieron sobre acero inoxidable y Fe_2O_3 -FTO (Figura 31), lo que podría indicar un efecto positivo sobre el metabolismo de los ácidos tricarbónicos de la cepa mutante, aumentando su crecimiento en presencia de un aceptor o donador de electrones basado en hierro en comparación con la cepa WT. Y este gen estuvo menos expresado sobre las biopelículas de la cepa mutante que crecieron sobre FTO, grafito y Fe_2O_3 -vidrio (Figura 31), lo que podría indicar un efecto negativo sobre el metabolismo de los ácidos tricarbónicos de la cepa mutante, disminuyendo su crecimiento en presencia de estos materiales en comparación con la cepa WT. No obstante, se recomiendan más pruebas experimentales para estudiar y explicar el papel que podría desempeñar la enzima aconitato hidratasa en las biopelículas de *G. sulfurreducens*.

Los genes normalizadores que se utilizaron para los materiales fueron el gen *recA* (vidrio, FTO y grafito) y *gsu2822* (Fe_2O_3 -vidrio, Fe_2O_3 -FTO y acero inoxidable). Se consideró que el gen normalizador se puede ir modificando, dependiendo del material de soporte sobre el que crezca la biopelícula de *G. sulfurreducens* DL1.

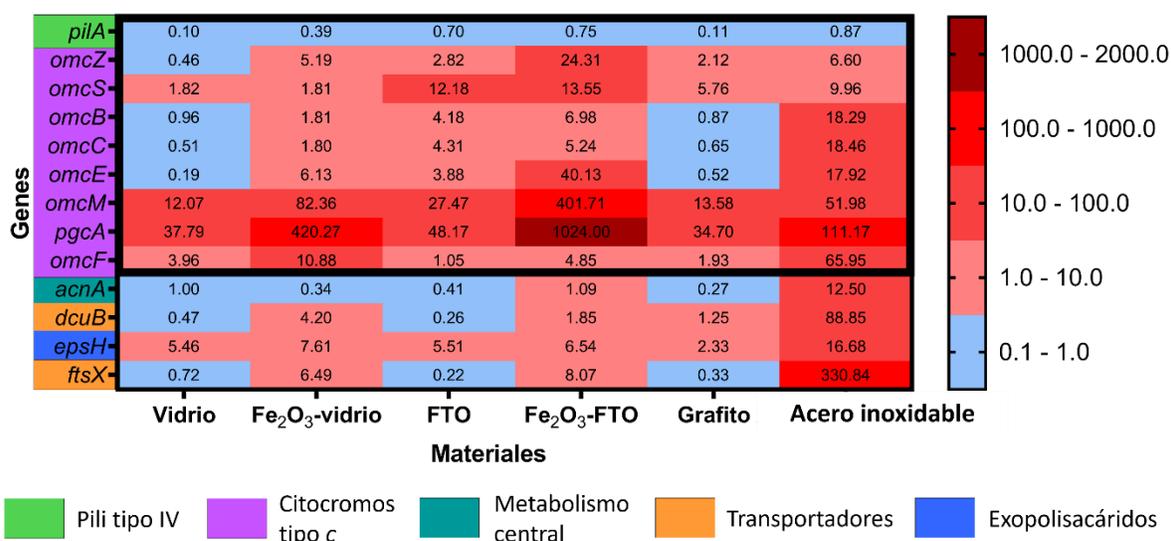


Figura 31. Heat map de la expresión relativa de los genes *pilA*, *omcZ*, *omcS*, *omcB*, *omcC*, *omcE*, *omcM*, *omcF*, *pgcA*, *acnA*, *dcuB*, *epsH* y *ftsX* de biopelícula de la cepa mutante $\Delta gsu1771$ en comparación con la cepa WT de *G. sulfurreducens* DL1 sobre vidrio, Fe₂O₃-vidrio, FTO, Fe₂O₃-FTO, grafito y acero inoxidable por RT-qPCR. Biopelículas sobre vidrio, Fe₂O₃-vidrio, FTO, Fe₂O₃-FTO, grafito y acero inoxidable a 48 horas. Las celdas de color rojo indican una mayor expresión relativa, mientras que las celdas de color azul indican una menor expresión relativa. El error estándar de cada una de las expresiones se encuentra en la Tabla S1.

Los resultados de expresión relativa indicaron que la mutante $\Delta gsu1771$ tuvo una mayor expresión de genes que codifican citocromos tipo c (*omcF*, *omcM*, *omcS* y *pgcA*) y un gen involucrado en la producción de exopolisacárido (*epsH*) que la cepa WT, sobre todos los diferentes materiales probados en este estudio, lo que concuerda con los resultados previos en el que se observó una mayor producción de corriente y la formación de una biopelícula más gruesa que las biopelículas que forma la cepa WT (Hernández-Eligio *et al.*, 2022).

Es posible que el uso de diferentes materiales conductores, especialmente aquellos que contienen metales (FTO, capas de hematita y acero inoxidable) puedan estar promoviendo la expresión de algunos citocromos tipo c en las

biopelículas de $\Delta gsu1771$ en comparación con las biopelículas de WT, ya que estas bacterias podrían evaluar el potencial redox de las superficies de cada material y determinar la ruta EET precisa (Levar *et al.*, 2014; Zacharoff *et al.*, 2016; Joshi *et al.*, 2021), que podría reflejarse en los diferentes procesos redox obtenidos por voltamperometría de las biopelículas cultivadas en cada material de electrodo (Figuras 26-29). Entonces, *G. sulfurreducens* podría reducir el Fe(III) contenido en las capas de hematita a través de citocromos tipo c de la membrana externa (Leang *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005; Leang *et al.*, 2010; Aklujkar *et al.*, 2013; Zacharoff *et al.*, 2017). El acero inoxidable contiene varios metales (hierro, níquel, cromo y molibdeno, entre otros) con los que estas bacterias podrían estar interactuando y favoreciendo su crecimiento, utilizándolo como un cátodo (Tang *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2021). Además, *G. sulfurreducens* podría estar interactuando con el FTO de una manera que nos es completamente desconocida hasta este momento.

Conclusiones

El uso de diferentes materiales de soporte para estudiar las biopelículas de dos cepas de *Geobacter sulfurreducens*, WT y $\Delta gsu1771$, permitió confirmar la característica intrínseca de la cepa mutante $\Delta gsu1771$ para desarrollar una biopelícula más gruesa con estructuras características sobre todos los materiales probados, tanto conductores como no conductores, en comparación con la cepa WT. Además, se confirmó la sobreexpresión de algunos genes que intervienen en la transferencia de electrones extracelulares (como *pgcA*, *omcS*, *omcM* y *omcF*), así como del gen *epsH*, que participa en la producción de exopolisacáridos. Se observó una sobreexpresión considerable de los genes *pgcA* y *omcM*, principalmente en materiales con Fe, lo que sugiere alguna interacción proteína-metal que podrían estar llevando a cabo estos citocromos tipo c. Por otra parte, se identificaron que ambas cepas presentan procesos redox asociados a los diferentes materiales conductores (FTO, Fe₂O₃-FTO, grafito y acero inoxidable), y se confirmó que la cepa mutante produce más corriente que la cepa WT en todos ellos.

Perspectivas

- Evaluar otros materiales conductores o materiales modificados para la formación de biopelícula de *G. sulfurreducens*.
- Utilizar nuevas técnicas (microscópicas, moleculares, electroquímicas, entre otras) que permitan analizar otros aspectos de la biopelícula generada por *G. sulfurreducens*.
- Utilizar nuevas técnicas (microscópicas, electroquímicas, entre otras) que permitan analizar otros aspectos de los materiales de soporte sobre los que crece la biopelícula de *G. sulfurreducens*.

Bibliografía

- Aklujkar, M., Coppi, M. V., Leang, C., Kim, B. C., Chavan, M. A., Perpetua, L. A., . . . Holmes, D. E. (2013). Proteins involved in electron transfer to Fe(III) and Mn(IV) oxides by *Geobacter sulfurreducens* and *Geobacter uraniireducens*. *Microbiology*, *CLIX*(3), 515–535. doi:10.1099/mic.0.064089-0
- Andrade, A., Hernández-Eligio, A., Tirado, A. L., Vega-Alvarado, L., Olvera, M., Morett, E., & Juárez, K. (2021). Specialization of the Reiterated Copies of the Heterodimeric Integration Host Factor Genes in *Geobacter sulfurreducens*. *Frontiers in Microbiology*, *XII*(626443). doi:10.3389/fmicb.2021.626443
- Babauta, J. T., & Beyenal, H. (2015). Biofilm electrochemistry. En H. Beyenal, & J. T. Babauta (Edits.), *Biofilms in Bioelectrochemical Systems: From Laboratory Practice to Data Interpretation* (Primera ed., págs. 121-175). John Wiley & Sons, Inc.
- Babauta, J., Renslow, R., Lewandowski, Z., & Beyenal, H. (2012). Electrochemically active biofilms: facts and fiction. A review. *Biofouling*, *XXVIII*(8), 789-812. doi:10.1080/08927014.2012.710324
- Belianinov, A., Halsted, M. C., Burch, M. J., Songkil, K., & Retterer, S. T. (2017). Biofilm Structure of *Geobacter sulfurreducens* by Helium Ion Microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, *XXIII*, 1152 - 1153. doi:10.1017/S1431927617006420
- Bjarnsholt, T., Alhede, M., Alhede, M., Eickhardt-Sørensen, S. R., Moser, C., Kühl, M., . . . Høiby, N. (2013). The *in vivo* biofilm. *Trends in Microbiology*, *XXI*(9), 466-474. doi:10.1016/j.tim.2013.06.002
- Bonanni, P. S., Bradley, D. F., Schrott, G. D., & Busalmen, J. P. (2013). Limitations for current production in *Geobacter sulfurreducens* biofilms. *ChemSusChem*, *VI*(4), 711-720. doi:10.1002/cssc.201200671
- Bond, D. R., & Lovley, D. R. (2003). Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Electrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, *LXIX*(3), 1548–1555. doi:10.1128/AEM.69.3.1548-1555.2003
- Borghol, N., Mora, L., Jouenne, T., Jaffézic-Renault, N., Sakly, N., Duncan, A. C., . . . Othmane, A. (2010). Monitoring of *E. coli* immobilization on modified gold electrode: A new bacteria-based glucose sensor. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *XV*, 220–228. doi:10.1007/s12257-009-0146-4
- Butler, J. E., Glaven, R. H., Esteve-Núñez, A., Núñez, C., Shelobolina, E. S., Bond, D. R., & Lovley, D. R. (2006). Genetic Characterization of a Single Bifunctional Enzyme for Fumarate Reduction and Succinate Oxidation in *Geobacter sulfurreducens* and Engineering of Fumarate Reduction in

- Geobacter metallireducens*. *Journal of Bacteriology*, CLXXXVIII(2), 450–455. doi:10.1128/JB.188.2.450-455.2006
- Caccavo, F. J., Lonergan, D. J., Lovley, D. R., Davis, M., Stolz, J. F., & McInerney, M. J. (1994). *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Applied and Environmental Microbiology*, LX(10), 3752–3759.
- Chadwick, G. L., Jiménez Otero, F., Gralnick, J. A., Bond, D. R., & Orphan, V. J. (2019). NanoSIMS imaging reveals metabolic stratification within current-producing biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, CXVI(41), 20716-20724. doi:10.1073/pnas.1912498116
- Champigneux, P., Renault-Sentenac, C., Bourrier, D., Rossi, C., Delia, M.-L., & Bergel, A. (2018). Effect of surface nano/micro-structuring on the early formation of microbial anodes with *Geobacter sulfurreducens*: Experimental and theoretical approaches. *Bioelectrochemistry*, CXXI, 191–200. doi:10.1016/j.bioelechem.2018.02.005
- Chan, C. H., Levar, C. E., Jiménez-Otero, F., & Bond, D. R. (2017). Genome Scale Mutational Analysis of *Geobacter sulfurreducens* Reveals Distinct Molecular Mechanisms for Respiration and Sensing of Poised Electrodes versus Fe(III) Oxides. *Journal of Bacteriology*, CXCIX(19), e00340-17. doi:10.1128/JB.00340-17
- Chao, L., Rakshe, S., Leff, M., & Spormann, A. M. (2013). PdeB, a Cyclic Di-GMP-Specific Phosphodiesterase That Regulates *Shewanella oneidensis* MR-1 Motility and Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*, CXCIV(17), 3827-3833. doi:10.1128/JB.00498-13
- Cologgi, D. L., Speers, A. M., Bullard, B. A., Kelly, S. D., & Reguera, G. (2014). Enhanced Uranium Immobilization and Reduction by *Geobacter sulfurreducens* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, LXXX(21), 6638-6646. doi:10.1128/AEM.02289-14
- Coppi, M. V., Leang, C., Sandler, S. J., & Lovley, D. R. (2001). Development of a Genetic System for *Geobacter sulfurreducens*. *Applied and Environmental Microbiology*, LXVII(7), 3180–3187. doi:10.1128/AEM.67.7.3180–3187.2001
- Dabour, N., & LaPointe, G. (2005). Identification and Molecular Characterization of the Chromosomal Exopolysaccharide Biosynthesis Gene Cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461. *Applied and Environmental Microbiology*, LXXI(11), 7414–7425. doi:10.1128/AEM.71.11.7414–7425.2005

- Dai, K., & Lutkenhaus, J. (1992). The proper ratio of FtsZ to FtsA is required for cell division to occur in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *CLXXIV*(19), 6145-6151. doi:10.1128/jb.174.19.6145-6151.1992
- Dantas, J. M., Campelo, L. M., Duke, N. E., Salgueiro, C. A., & Pokkuluri, P. R. (2015). The structure of PccH from *Geobacter sulfurreducens* – a novel low reduction potential monoheme cytochrome essential for accepting electrons from an electrode. *The FEBS Journal*, *CCLXXXII*(11), 2215–2231. doi:10.1111/febs.13269
- Dantas, J. M., Silva, M. A., Pantoja-Uceda, D., Turner, D. L., & Bruix, M. (2017). Solution structure and dynamics of the outer membrane cytochrome OmcF from *Geobacter sulfurreducens*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *MDCCCLVIII*(9), 733-741. doi:10.1016/j.bbabi.2017.03.007
- Dumas, C., Basseguy, R., & Bergel, A. (2008). Electrochemical activity of *Geobacter sulfurreducens* biofilms on stainless steel anodes. *Electrochimica Acta*, *LIII*(16), 5235–5241. doi:10.1016/j.electacta.2008.02.056
- Feliciano, G. T., Steidl, R. J., & Reguera, G. (2015). Structural and functional insights into the conductive pili of *Geobacter sulfurreducens* revealed in molecular dynamics simulations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *XVII*(34), 22217-22226. doi:10.1039/C5CP03432A
- Fernandes, T. M., Silva, M. A., Morgado, L., & Salgueiro, C. A. (2023). Hemes on a string: insights on the functional mechanisms of PgcA from *Geobacter sulfurreducens*. *Journal of Biological Chemistry*, *CCXCIX*(10), 105167. doi:10.1016/j.jbc.2023.105167
- Filman, D. J., Marino, S. F., Ward, J. E., Yang, L., Mester, Z., Bullitt, E., . . . Strauss, M. (2019). Cryo-EM reveals the structural basis of long-range electron transport in a cytochrome-based bacterial nanowire. *Communications Biology*, *II*, 219. doi:10.1038/s42003-019-0448-9
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, *VIII*(9), 623-633. doi:10.1038/nrmicro2415
- Franks, A. E., & Nevin, K. P. (2010). Microbial Fuel Cells, A Current Review. *Energies*, *III*(5), 899-919. doi:10.3390/en3050899
- Franks, A. E., Glaven, R. H., & Lovley, D. R. (2012). Real-time spatial gene expression analysis within current-producing biofilms. *ChemSusChem*, *V*(6), 1092-1098. doi:10.1002/cssc.201100714
- Frühauf, H. M., Holtmann, D., & Stöckl, M. (2022). Influence of electrode surface charge on current production by *Geobacter sulfurreducens* microbial anodes. *Bioelectrochemistry*, *CXLVII*(108213). doi:10.1016/j.bioelechem.2022.108213

- Füeg, M., Borjas, Z., Estevez-Canales, M., Esteve-Núñez, A., Pobelov, I. V., Broekmann, P., & Kuzume, A. (2019). Interfacial electron transfer between *Geobacter sulfurreducens* and gold electrodes via carboxylate-alkanethiol linkers: Effects of the linker length. *Bioelectrochemistry*, CXXVI, 130–136. doi:10.1016/j.bioelechem.2018.11.013
- Gao, L., Lu, X., Liu, H., Li, J., Li, W., Song, R., . . . Zhu, J. (2019). Mediation of Extracellular Polymeric Substances in Microbial Reduction of Hematite by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Frontiers in Microbiology*, X, 575. doi:10.3389/fmicb.2019.00575
- Getsin, I., Nalbandian, G. H., Yee, D. C., Vastermark, A., Papparoditis, P. C., Reddy, V. S., & Saier Jr, M. H. (2013). Comparative genomics of transport proteins in developmental bacteria: *Myxococcus xanthus* and *Streptomyces coelicolor*. *BMC Microbiology*, XIII(279). doi:10.1186/1471-2180-13-279
- Gralnick, J. A., & Bond, D. R. (2023). Electron Transfer Beyond the Outer Membrane: Putting Electrons to Rest. *Annual Review of Microbiology*, LXXVII, 517-539. doi:10.1146/annurev-micro-032221-023725
- Gruer, M. J., & Guest, J. R. (1994). Two genetically-distinct and differentially-regulated aconitases (AcnA and AcnB) in *Escherichia coli*. *Microbiology*, CXL(Pt 10), 2531-2541. doi:10.1099/00221287-140-10-2531
- Gu, Y., Guberman-Pfeffer, M. J., Srikanth, V., Shen, C., Giska, F., Gupta, K., . . . Malvankar, N. S. (2023). Structure of *Geobacter* cytochrome OmcZ identifies mechanism of nanowire assembly and conductivity. *Nature Microbiology*, VIII(2), 284–298. doi:10.1038/s41564-022-01315-5
- Haeusser, D. P., & Margolin, W. (2016). Splitsville: structural and functional insights into the dynamic bacterial Z ring. *Nature Reviews Microbiology*, XIV(5), 305-319. doi:10.1038/nrmicro.2016.26
- Haft, D. H., Paulsen, I. T., Ward, N., & Selengut, J. D. (2006). Exopolysaccharide-associated protein sorting in environmental organisms: the PEP-CTERM/EpsH system. Application of a novel phylogenetic profiling heuristic. *BMC Biology*, IV(29). doi:10.1186/1741-7007-4-29
- Heijne, A. t., Liu, D., Sulonen, M., Sleutels, T., & Fabregat-Santiago, F. (2018). Quantification of bio-anode capacitance in bioelectrochemical systems using Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Journal of Power Sources*, CD, 533-538. doi:10.1016/j.jpowsour.2018.08.003
- Hernández-Eligio, A., Huerta-Miranda, G. A., Martínez-Bahena, S., Castrejón-López, D., Miranda-Hernández, M., & Juárez, K. (2022). GSU1771 regulates extracellular electron transfer and electroactive biofilm formation in

- Geobacter sulfurreducens*: Genetic and electrochemical characterization. *Bioelectrochemistry*, CXLV(108101). doi:10.1016/j.bioelechem.2022.108101
- Hernández-Eligio, A., Pat-Espadas, A. M., Vega-Alvarado, L., Huerta-Amparán, M., Cervantes, F. J., & Juárez, K. (2020). Global transcriptional analysis of *Geobacter sulfurreducens* under palladium reducing conditions reveals new key cytochromes involved. *Applied Microbiology and Biotechnology*, CIV(9), 4059-4069. doi:10.1007/s00253-020-10502-5
- Herrera, L. K., & Videla, H. A. (2009). Role of iron-reducing bacteria in corrosion and protection of carbon steel. *International Biodeterioration & Biodegradation*, LXIII(7), 891-895. doi:10.1016/j.ibiod.2009.06.003
- Heydorn, A., Nielsen, A. T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B. K., & Molin, S. (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*, CXLVI, 2395-2407.
- Hu, S., Wu, Y., Ding, Z., Shi, Z., Li, F., & Liu, T. (2020). Facet-dependent reductive dissolution of hematite nanoparticles by *Shewanella putrefaciens* CN-32. *Environmental Science: Nano*, VII(9), 2522-2531. doi:10.1039/D0EN00555J
- Huerta-Miranda, G. A., Arroyo-Escoto, A. I., Burgos, X., Juárez, K., & Miranda-Hernández, M. (2019). Influence of the major pilA transcriptional regulator in electrochemical responses of *Geobacter sulfurreducens* PilR-deficient mutant biofilm formed on FTO electrodes. *Bioelectrochemistry*, CXXVII, 145–153. doi:10.1016/j.bioelechem.2019.02.006
- Huerta-Miranda, G. A., Rodríguez-Torres, L. M., Martínez-García, A. L., Mazón-Montijo, D. A., Hernández-Eligio, A., Miranda-Hernández, M., & Juárez, K. (2023). *Geobacter sulfurreducens* electroactive biofilms on Fe₂O₃/FTO support-electrodes for developing a sodium acetate electrochemical biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*: X, XIV(100370). doi:10.1016/j.biosx.2023.100370
- Jain, A., Gazzola, G., Panzera, A., Zanoni, M., & Marsili, E. (2011). Visible spectroelectrochemical characterization of *Geobacter sulfurreducens* biofilms on optically transparent indium tin oxide electrode. *Electrochimica Acta*, LVI(28), 10776-10785. doi:10.1016/j.electacta.2011.02.073
- Jana, P. S., Katuri, K., Kavanagh, P., Kumar, A., & Leech, D. (2014). Charge transport in films of *Geobacter sulfurreducens* on graphite electrodes as a function of film thickness. *Physical Chemistry Chemical Physics*, XVII(19), 9039-9046. doi:10.1039/c4cp01023j
- Jaramillo-Rodríguez, J. B., Vega-Alvarado, L., Rodríguez-Torres, L. M., Huerta-Miranda, G. A., Hernández-Eligio, A., & Juárez, K. (2023). Global transcriptional analysis of *Geobacter sulfurreducens* *gsu1771* mutant biofilm

- grown on two different support structures. *PLoS One*, XVIII(10), e0293359. doi:10.1371/journal.pone.0293359
- Jiménez Otero, F., Chadwick, G. L., Yates, M. D., Mickol, R. L., Saunders, S. H., Glaven, S. M., . . . Bond, D. R. (2021). Evidence of a Streamlined Extracellular Electron Transfer Pathway from Biofilm Structure, Metabolic Stratification, and Long-Range Electron Transfer Parameters. *Applied and Environmental Microbiology*, LXXXVII(17), e00706-21. doi:10.1128/AEM.00706-21
- Jin, J., & Guan, Y. (2014). The mutual co-regulation of extracellular polymeric substances and iron ions in biocorrosion of cast iron pipes. *Bioresource Technology*, CLXIX, 387–394. doi:10.1016/j.biortech.2014.06.059
- Johs, A., Shi, L., Droubay, T., Ankner, J. F., & Liang, L. (2010). Characterization of the decaheme c-type cytochrome OmcA in solution and on hematite surfaces by small angle x-ray scattering and neutron reflectometry. *Biophysical Journal*, XCVIII(12), 3035-3043. doi:10.1016/j.bpj.2010.03.049
- Joshi, K., Chan, C. H., & Bond, D. R. (2021). *Geobacter sulfurreducens* inner membrane cytochrome CbcBA controls electron transfer and growth yield near the energetic limit of respiration. *Molecular Microbiology*, CXVII(4), 1124–1139. doi:10.1111/mmi.14801
- Juárez, K., Kim, B.-C., Nevin, K., Olvera, L., Reguera, G., Lovley, D. R., & Methé, B. A. (2009). PilR, a Transcriptional Regulator for Pilin and Other Genes Required for Fe(III) Reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, XVI(3-4), 146-158. doi:10.1159/000115849
- Kane, A. L., Bond, D. R., & Gralnick, J. A. (2013). Electrochemical Analysis of *Shewanella oneidensis* Engineered To Bind Gold Electrodes. *ACS Synthetic Biology*, II(2), 93–101. doi:10.1021/sb300042w
- Kato, S., Hashimoto, K., & Watanabe, K. (2012). Microbial interspecies electron transfer via electric currents through conductive minerals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, CIX(25), 10042–10046. doi:10.1073/pnas.1117592109
- Katuri, K. P., Rengaraj, S., Kavanagh, P., O'Flaherty, V., & Leech, D. (2012). Charge transport through *Geobacter sulfurreducens* biofilms grown on graphite rods. *Langmuir*, XXVIII(20), 7904–7913. doi:10.1021/la2047036
- Kempf, M. J., & McBride, M. J. (2000). Transposon insertions in the *Flavobacterium johnsoniae* *ftsX* gene disrupt gliding motility and cell division. *Journal of Bacteriology*, CLXXXII(6), 1671-1679. doi:10.1128/JB.182.6.1671-1679.2000

- Kim, B.-C., Leang, C., Ding, Y.-H. R., Glaven, R. H., Coppi, M. V., & Lovley, D. R. (2005). OmcF, a Putative *c*-Type Monoheme Outer Membrane Cytochrome Required for the Expression of Other Outer Membrane Cytochromes in *Geobacter sulfurreducens*. *Journal of Bacteriology*, *CLXXXVII*(13), 4505–4513. doi:10.1128/JB.187.13.4505–4513.2005
- Kim, B.-C., Postier, B. L., DiDonato, R. J., Chaudhuri, S. K., Nevin, K. P., & Lovley, D. R. (2008). Insights into genes involved in electricity generation in *Geobacter sulfurreducens* via whole genome microarray analysis of the OmcF-deficient mutant. *Bioelectrochemistry*, *LXXIII*(1), 70-75. doi:10.1016/j.bioelechem.2008.04.023
- Kim, J., Wong, S., Kim, G., Park, Y.-B., van Embden, J., & Della Gaspera, E. (2020). Transparent electrodes based on spray coated fluorine-doped tin oxide with enhanced optical, electrical and mechanical properties. *Journal of Materials Chemistry C*, *VIII*(41), 14531-14539. doi:10.1039/d0tc03314f
- Korjenic, A., & Raja, K. S. (2019). Electrochemical Stability of Fluorine Doped Tin Oxide (FTO) Coating at Different pH Conditions. *Journal of The Electrochemical Society*, *CLXVI*(6), 169-184. doi:10.1149/2.0811906jes
- Kuzume, A., Zhumaev, U., Li, J., Fu, Y., Füg, M., Esteve-Nuñez, A., & Wandlowski, T. (2013). An in-situ surface electrochemistry approach toward whole-cell studies: Charge transfer between *Geobacter sulfurreducens* and electrified metal/electrolyte interfaces through linker molecules. *Electrochimica Acta*, *CXII*, 933–942. doi:10.1016/j.electacta.2013.02.073
- Leang, C., & Lovley, D. R. (2005). Regulation of two highly similar genes, *omcB* and *omcC*, in a 10 kb chromosomal duplication in *Geobacter sulfurreducens*. *Microbiology*, *CLI*(6), 1761–1767. doi:10.1099/mic.0.27870-0
- Leang, C., Coppi, M. V., & Lovley, D. R. (2003). OmcB, a *c*-Type Polyheme Cytochrome, Involved in Fe(III) Reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Journal of Bacteriology*, *CLXXXV*(7), 2096–2103. doi:10.1128/JB.185.7.2096–2103.2003
- Leang, C., Krushkal, J., Ueki, T., Puljic, M., Sun, J., Juárez, K., . . . Lovley, D. R. (2009). Genome-wide analysis of the RpoN regulon in *Geobacter sulfurreducens*. *BMC Genomics*, *X*(331). doi:10.1186/1471-2164-10-331
- Leang, C., Qian, X., Mester, T., & Lovley, D. R. (2010). Alignment of the *c*-Type Cytochrome OmcS along Pili of *Geobacter sulfurreducens*. *Applied and Environmental Microbiology*, *LXXVI*(12), 4080–4084. doi:10.1128/AEM.00023-10

- Ledezma, P., Donose, B. C., Freguia, S., & Keller, J. (2015). Oxidised stainless steel: a very effective electrode material for microbial fuel cell bioanodes but at high risk of corrosion. *Electrochimica Acta*, *CLVIII*, 356–360. doi:10.1016/j.electacta.2015.01.175
- Levar, C. E., Chan, C. H., Mehta-Kolte, M. G., & Bond, D. R. (2014). An Inner Membrane Cytochrome Required Only for Reduction of High Redox Potential Extracellular Electron Acceptors. *mBio*, *V*(6), e02034-14. doi:10.1128/mBio.02034-14
- Levar, C. E., Hoffman, C. L., Dunshee, A. J., Toner, B. M., & Bond, D. R. (2017). Redox potential as a master variable controlling pathways of metal reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *The ISME Journal*, *XI*(3), 741–752. doi:10.1038/ismej.2016.146
- Li, D.-B., Cheng, Y.-Y., Li, L.-L., Li, W.-W., Huang, Y.-X., Pei, D.-N., . . . Yu, H.-Q. (2014). Light-driven microbial dissimilatory electron transfer to hematite. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *XVI*(42), 23003-23011. doi:10.1039/C4CP04065A
- Li, S., & Chen, G. (2018). Factors Affecting the Effectiveness of Bioelectrochemical System Applications: Data Synthesis and Meta-Analysis. *Batteries*, *IV*(3), 34. doi:10.3390/batteries4030034
- Liang, Y., Feng, H., Shen, D., Li, N., Long, Y., Zhou, Y., . . . Dai, Q. (2016). A high-performance photo-microbial desalination cell. *Electrochimica Acta*, *CCII*, 197-202. doi:10.1016/j.electacta.2016.03.177
- Liu, Y., Kim, H., Franklin, R. R., & Bond, D. R. (2011). Linking spectral and electrochemical analysis to monitor c-type cytochrome redox status in living *Geobacter sulfurreducens* biofilms. *ChemPhysChem*, *XII*(12), 2235–2241. doi:10.1002/cphc.201100246
- Liu, Y., Wang, Z., Liu, J., Levar, C., Edwards, M. J., Babauta, J. T., . . . Shi, L. (2014). A trans-outer membrane porin-cytochrome protein complex for extracellular electron transfer by *Geobacter sulfurreducens* PCA. *Environmental Microbiology Reports*, *VI*(6), 776–785. doi:10.1111/1758-2229.12204
- Lloyd, J. R. (2003). Microbial reduction of metals and radionuclides. *FEMS Microbiology Reviews*, *XXVII*(2-3), 411–425. doi:10.1016/S0168-6445(03)00044-5
- Loera Muro, A., Ramírez Castillo, F. Y., Avelar González, F. J., & Guerrero Barrera, A. L. (2012). Biopelículas multi-especie: asociarse para sobrevivir. *Investigación y Ciencia*, *XX*(54), 49-56. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67424408007>

- Lovley, D. R., & Holmes, D. E. (2022). Electromicrobiology: the ecophysiology of phylogenetically diverse electroactive microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, *XX*(1), 5-19. doi:10.1038/s41579-021-00597-6
- Madjarov, J., Popat, S. C., Erben, J., Götze, A., Zengerle, R., & Kerzenmacher, S. (2017). Revisiting methods to characterize bioelectrochemical systems: The influence of uncompensated resistance (iR_u -drop), double layer capacitance, and junction potential. *Journal of Power Sources*, *CCCLVI*, 408-418. doi:10.1016/j.jpowsour.2017.03.033
- Maestro, B., Ortiz, J. M., Schrott, G., Busalmen, J. P., Climent, V., & Feliu, J. M. (2014). Crystallographic orientation and electrode nature are key factors for electric current generation by *Geobacter sulfurreducens*. *Bioelectrochemistry*, *XCVIII*, 11–19. doi:10.1016/j.bioelechem.2014.02.001
- Malvankar, N. S., Tuominena, M. T., & Lovley, D. R. (2012). Biofilm conductivity is a decisive variable for high-current-density *Geobacter sulfurreducens* microbial fuel cells. *Energy & Environmental Science*, *V*(2), 5790-5797. doi:10.1039/C2EE03388G
- Marsili, E., Rollefson, J. B., Baron, D. B., Hozalski, R. M., & Bond, D. R. (2008). Microbial Biofilm Voltammetry: Direct Electrochemical Characterization of Catalytic Electrode-Attached Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, *LXXIV*(23), 7329-7337. doi:10.1128/AEM.00177-08
- Matsuda, S., Liu, H., Kato, S., Hashimoto, K., & Nakanishi, S. (2011). Negative Faradaic Resistance in Extracellular Electron Transfer by Anode-Respiring *Geobacter sulfurreducens* Cells. *Environmental Science & Technology*, *XLV*(23), 10163–10169. doi:10.1021/es200834b
- Matsumoto, A., Koga, R., Kanaly, R. A., Kouzuma, A., & Watanabe, K. (2021). Identification of a Diguanylate Cyclase That Facilitates Biofilm Formation on Electrodes by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, *LXXXVII*(9), e00201-21. doi:10.1128/AEM.00201-21
- Matveeva, E. (2005). Electrochemistry of the Indium-Tin Oxide Electrode in 1 M NaOH Electrolyte. *Journal of The Electrochemical Society*, *CLII*(9), H138-H145. doi:10.1149/1.1984348
- Meitl, L. A., Eggleston, C. M., Colberg, P. J., Khare, N., Reardon, C. L., & Shi, L. (2009). Electrochemical interaction of *Shewanella oneidensis* MR-1 and its outer membrane cytochromes OmcA and MtrC with hematite electrodes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *LXXIII*(18), 5292-5307. doi:10.1016/j.gca.2009.06.021
- Méthé, B. A., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Paulsen, I. T., Nelson, W., Heidelberg, J. F., . . . Selengut, J. (2003). Genome of *Geobacter sulfurreducens*: Metal

- Reduction in Subsurface Environments. *Science*, CCCII(5652), 1967-1969. doi:10.1126/science.1088727
- Mischler, S., & Munoz, A. I. (2018). Tribocorrosion. En K. Wandelt (Ed.), *Encyclopedia of Interfacial Chemistry* (págs. 504-514). Elsevier Inc.
- Molenaar, S. D., Sleutels, T., Pereira, J., Iorio, M., Borsje, C., Zamudio, J. A., . . . Heijne, A. t. (2018). In situ Biofilm Quantification in Bioelectrochemical Systems by using Optical Coherence Tomography. *ChemSusChem*, XI(13), 2171-2178. doi:10.1002/cssc.201800589
- Neu, J., Shipps, C. C., Guberman-Pfeffer, M. J., Shen, C., Srikanth, V., Spies, J. A., . . . Malvankar, N. S. (2022). Microbial biofilms as living photoconductors due to ultrafast electron transfer in cytochrome OmcS nanowires. *Nature Communications*, XIII(1), 5150. doi:10.1038/s41467-022-32659-5
- Nevin, K. P., Kim, B.-C., Glaven, R. H., Johnson, J. P., Woodard, T. L., Methé, B. A., . . . Lovley, D. R. (2009). Anode Biofilm Transcriptomics Reveals Outer Surface Components Essential for High Density Current Production in *Geobacter sulfurreducens* Fuel Cells. *PLOS ONE*, IV(5), e5628. doi:10.1371/journal.pone.0005628
- Nevin, K. P., Richter, H., Covalla, S. F., P., J., Woodard, T. L., Orloff, A. L., . . . Lovley, D. R. (2008). Power output and columbic efficiencies from biofilms of *Geobacter sulfurreducens* comparable to mixed community microbial fuel cells. *Environmental Microbiology*, X(10), 2505–2514. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01675.x
- Osteryoung, J. G., & Osteryoung, R. A. (1985). Square wave voltammetry. *Analytical Chemistry*, LVII(1), 101–110. doi:10.1021/ac00279a004
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, LIV(1), 49-79. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.49
- Pant, D., Singh, A., Bogaert, G. V., Olsen, S. I., Nigam, P. S., Diels, L., & Vanbroekhoven, K. (2012). Bioelectrochemical systems (BES) for sustainable energy production and product recovery from organic wastes and industrial wastewaters. *RSC Advances*, II, 1248-1263. doi:10.1039/C1RA00839K
- Paquete, C. M., Morgado, L., Salgueiro, C. A., & Louro, R. O. (2022). Molecular Mechanisms of Microbial Extracellular Electron Transfer: The Importance of Multiheme Cytochromes. *Frontiers in Biosciences*, XXVII(6), 174. doi:10.31083/j.fbl2706174
- Pereira, J., Mediyati, Y., Veelen, H. P., Temmink, H., Sleutels, T., Hamelers, B., & Heijne, A. t. (2022). The effect of intermittent anode potential regimes on the

- morphology and extracellular matrix composition of electro-active bacteria. *Biofilm*, IV, 100064. doi:10.1016/j.bioflm.2021.100064
- Pinck, S., Martínez Ostormujof, L., Teychené, S., & Erable, B. (2020). Microfluidic Microbial Bioelectrochemical Systems: An Integrated Investigation Platform for a More Fundamental Understanding of Electroactive Bacterial Biofilms. *Microorganisms*, VIII(11), 1841. doi:10.3390/microorganisms8111841
- Pinto, S. M., Pinzón, E. F., Corzo, S. P., & Miranda, D. A. (2019). Effect of the electrode surface on the tetrapolar impedance measurements of Hela Cells in suspension. *Journal of Physics: Conference Series*, MCCLXXII(1), 012015. doi:10.1088/1742-6596/1272/1/012015
- Pocaznoi, D., Calmet, A., Etcheverry, L., Erable, B., & Bergel, A. (2012). Stainless steel is a promising electrode material for anodes of microbial fuel cells. *Energy & Environmental Science*, V(11), 9645-9652. doi:10.1039/c2ee22429a
- Pu, K.-B., Ma, Q., Cai, W.-F., Chen, Q.-Y., Wang, Y.-H., & Li, F.-J. (2018). Polypyrrole modified stainless steel as high performance anode of microbial fuel cell. *Biochemical Engineering Journal*, CXXXII, 255-261. doi:10.1016/j.bej.2018.01.018
- Puentes-Cala, E., Tapia-Perdomo, V., Espinosa-Valbuena, D., Reyes-Reyes, M., Quintero-Santander, D., Vasquez-Dallos, S., . . . Castillo-Villamizar, G. (2022). Microbiologically influenced corrosion: The gap in the field. *Frontiers in Environmental Science*, X, 924842. doi:10.3389/fenvs.2022.924842
- Qian, F., Wang, H., Ling, Y., Wang, G., Thelen, M. P., & Li, Y. (2014). Photoenhanced Electrochemical Interaction between *Shewanella* and a Hematite Nanowire Photoanode. *Nano Letters*, XIV(6), 3688–3693. doi:https://doi.org/10.1021/nl501664n
- Qian, X., Mester, T., Morgado, L., Arakawa, T., Sharma, M. L., Inoue, K., . . . Lovley, D. R. (2011). Biochemical characterization of purified OmcS, a *c*-type cytochrome required for insoluble Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochimica et Biophysica Acta*, MDCCCVII(4), 404–412. doi:10.1016/j.bbabi.2011.01.003
- Reardon, P. N., & Mueller, K. T. (2013). Structure of the Type IVa Major Pilin from the Electrically Conductive Bacterial Nanowires of *Geobacter sulfurreducens**. *The Journal of Biological Chemistry*, CCLXXXVIII(41), 29260–29266. doi:10.1074/jbc.M113.498527
- Reguera, G., & Kashefi, K. (2019). The electrifying physiology of *Geobacter* bacteria, 30 years on. *Advances in Microbial Physiology*, LXXIV, 1-96. doi:10.1016/bs.ampbs.2019.02.007

- Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T., & Lovley, D. R. (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, *CDXXXV*(7045), 1098-1101. doi:10.1038/nature03661
- Reguera, G., Pollina, R. B., Nicoll, J. S., & Lovley, D. R. (2007). Possible nonconductive role of *Geobacter sulfurreducens* pilus nanowires in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, *CLXXXIX*(5), 2125-2127. doi:10.1128/JB.01284-06
- Ren, G., Sun, Y., Sun, M., Li, Y., Lu, A., & Ding, H. (2017). Visible Light Enhanced Extracellular Electron Transfer between a Hematite Photoanode and *Pseudomonas aeruginosa*. *Minerals*, *VII*(12), 230. doi:10.3390/min7120230
- Ren, G., Wang, Z., Zhang, B., Liu, X., Ye, J., Hu, Q., & Zhou, S. (2021). A facile and sustainable hygroelectric generator using whole-cell *Geobacter sulfurreducens*. *Nano Energy*, *LXXXIX*(106361). doi:10.1016/j.nanoen.2021.106361
- Richter, H., McCarthy, K., Nevin, K. P., Johnson, J. P., Rotello, V. M., & Lovley, D. R. (2008). Electricity Generation by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Gold Electrodes. *Langmuir*, *XXIV*(8), 4376–4379. doi:10.1021/la703469y
- Richter, H., Nevin, K. P., Jia, H., Lowy, D. A., Lovley, D. R., & Tender, L. M. (2009). Cyclic voltammetry of biofilms of wild type and mutant *Geobacter sulfurreducens* on fuel cell anodes indicates possible roles of OmcB, OmcZ, type IV pili, and protons in extracellular electron transfer. *Energy & Environmental Science*, *II*(5), 506-516. doi:10.1039/B816647A
- Richter, L. V., Franks, A. E., Weis, R. M., & Sandler, S. J. (2017). Significance of a Posttranslational Modification of the PilA Protein of *Geobacter sulfurreducens* for Surface Attachment, Biofilm Formation, and Growth on Insoluble Extracellular Electron Acceptors. *Journal of Bacteriology*, *CXCIX*(8), e00716-16. doi:10.1128/jb.00716-16
- Robuschi, L., Tomba, J. P., & Busalmen, J. P. (2017). Proving *Geobacter* biofilm connectivity with confocal Raman microscopy. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *DCCXCIII*, 99–103. doi:10.1016/j.jelechem.2016.11.005
- Saifuddin, F. H., Arzaee, N. A., Noh, M. F., Bakar, M. H., Teridi, M. A., Takriff, M. S., & Ibrahim, M. A. (2022). Existence of sodium bicarbonate enhanced bioelectricity generation on *Chlorella sp.* biofilm in a Biophotovoltaic (BPV) system. *Journal of Applied Phycology*, *XXXIV*(5), 2423–2436. doi:10.1007/s10811-022-02814-y
- Scarabotti, F., Bühler, K., Schmidt, M., & Harnisch, F. (2022). Thickness and roughness of transparent gold-palladium anodes have no impact on growth kinetics and yield coefficients of early-stage *Geobacter sulfurreducens*

- biofilms. *Bioelectrochemistry*, CXLIV(108043).
doi:10.1016/j.bioelechem.2021.108043
- Scarabotti, F., Rago, L., Bühler, K., & Harnisch, F. (2021). The electrode potential determines the yield coefficients of early-stage *Geobacter sulfurreducens* biofilm anodes. *Bioelectrochemistry*, CXL(107752).
doi:10.1016/j.bioelechem.2021.107752
- Schmidt, K. L., Peterson, N. D., Kustus, R. J., Wissel, M. C., Graham, B., Phillips, G. J., & Weiss, D. S. (2004). A predicted ABC transporter, FtsEX, is needed for cell division in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, CLXXXVII(3), 785-793. doi:10.1128/jb.186.3.785-793.2004
- Schrott, G. D., Bonanni, P. S., & Busalmen, J. P. (2019). Open circuit potentiometry reports on internal redox states of cells in *G. Sulfurreducens* biofilms. *Electrochimica Acta*, CCCIII, 176-182.
doi:10.1016/j.electacta.2019.02.078
- Semene, L., & Franks, A. E. (2015). Delving through electrogenic biofilms: from anodes to cathodes to microbes. *Bioengineering*, II(3), 222-248.
doi:10.3934/bioeng.2015.3.222
- Shamsuddin, R. A., Bakar, M. H., Daud, W. R., Hong, K. B., & Jahim, J. M. (2019). Can electrochemically active biofilm protect stainless steel used as electrodes in bioelectrochemical systems in a similar way as galvanic corrosion protection? *International Journal of Hydrogen Energy*, XLIV(58), 30512-30523. doi:10.1016/j.ijhydene.2019.03.089
- Shimizu, K., Lasia, A., & Boily, J.-F. (2012). Electrochemical Impedance Study of the Hematite/Water Interface. *Langmuir*, XXVIII(20), 7914-7920.
doi:10.1021/la300829c
- Speers, A. M., & Reguera, G. (2015). Theoretical and practical considerations for culturing *Geobacter* biofilms in microbial fuel cells and other bioelectrochemical systems. En H. Beyenal, & J. T. Babauta (Edits.), *Biofilms in Bioelectrochemical Systems: From Laboratory Practice to Data Interpretation* (Primera ed., págs. 37-59). John Wiley & Sons, Inc.
- Sridharan, D., Karthikeyan, C., Maruthamuthu, S., & Palaniswamy, N. (2022). Electrochemical investigation of freshwater biofilm on FTO surface: Oxide film perspective. *ChemistrySelect*, VII(48), e202202955.
doi:10.1002/slct.202202955
- Steidl, R. J., Lampa-Pastirk, S., & Reguera, G. (2016). Mechanistic stratification in electroactive biofilms of *Geobacter sulfurreducens* mediated by pilus nanowires. *Nature Communications*, VII, 12217. doi:10.1038/ncomms12217

- Stingele, F., Neeser, J. R., & Mollet, B. (1996). Identification and characterization of the *eps* (Exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of Bacteriology*, *CLXXVIII*(6), 1680–1690. doi:10.1128/jb.178.6.1680-1690.1996
- Strycharz, S. M., Glaven, R. H., Coppi, M. V., Gannon, S. M., Perpetua, L. A., Liu, A., . . . Lovley, D. R. (2011). Gene expression and deletion analysis of mechanisms for electron transfer from electrodes to *Geobacter sulfurreducens*. *Bioelectrochemistry*, *LXXX*(2), 142–150. doi:10.1016/j.bioelechem.2010.07.005
- Summers, Z. M., Fogarty, H. E., Leang, C., Franks, A. E., Malvankar, N. S., & Lovley, D. R. (2010). Direct Exchange of Electrons Within Aggregates of an Evolved Syntrophic Coculture of Anaerobic Bacteria. *Science*, *CCCXXX*(6009), 1413-1415. doi:10.1126/science.1196526
- Sun, D., Chen, J., Huang, H., Liu, W., Ye, Y., & Cheng, S. (2016). The effect of biofilm thickness on electrochemical activity of *Geobacter sulfurreducens*. *International Journal of Hydrogen Energy*, *XLI*(37), 16523-16528. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.04.163
- Tabares, M., Dulay, H., & Reguera, G. (2019). *Geobacter sulfurreducens*. *Trends in Microbiology*, *XXVIII*(4), 327-328. doi:10.1016/j.tim.2019.11.004
- Tang, H.-Y., Holmes, D. E., Ueki, T., Palacios, P. A., & Lovley, D. R. (2019). Iron Corrosion via Direct Metal-Microbe Electron Transfer. *mBio*, *X*(3), e00303-19. doi:10.1128/mBio.00303-19
- Tang, H.-Y., Yang, C., Ueki, T., Pittman, C. C., Xu, D., Woodard, T. L., . . . Lovley, D. R. (2021). Stainless steel corrosion via direct iron-to-microbe electron transfer by *Geobacter* species. *The ISME Journal*, *XV*(10), 3084–3093. doi:10.1038/s41396-021-00990-2
- Thormann, K., Saville, R., Shukla, S., Pelletier, D., & Spormann, A. (2004). Initial Phases of Biofilm Formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Journal of Bacteriology*, *CLXXXVII*(23), 8096-8104. doi:10.1128/JB.186.23.8096-8104.2004
- Thorne, R., Hu, H., Schneider, K., Bombelli, P., Fisher, A., Peter, L. M., . . . Cameron, P. J. (2011). Porous ceramic anode materials for photo-microbial fuel cells. *Journal of Materials Chemistry*, *XXI*(44), 18055-18060. doi:10.1039/C1JM13058G
- Tremblay, P.-L., Summers, Z. M., Glaven, R. H., Nevin, K. P., Zengler, K., Barrett, C. L., . . . Lovley, D. R. (2011). A c-type cytochrome and a transcriptional regulator responsible for enhanced extracellular electron transfer in

- Geobacter sulfurreducens*. *Environmental Microbiology*, XIII(1), 13–23. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02302.x
- Ueki, T. (2021). Cytochromes in Extracellular Electron Transfer in *Geobacter*. *Applied and Environmental Microbiology*, LXXXVII(10), e03109-20. doi:10.1128/AEM.03109-20
- Ueoka, N., Kouzuma, A., & Watanabe, K. (2018). Electrode plate-culture methods for colony isolation of exoelectrogens from anode microbiomes. *Bioelectrochemistry*, CXXIV, 1-6. doi:10.1016/j.bioelechem.2018.06.008
- Vargas, M., Malvankar, N. S., Tremblay, P.-L., Leang, C., Smith, J. A., Patel, P., . . . Lovley, D. R. (2013). Aromatic Amino Acids Required for Pili Conductivity and Long-Range Extracellular Electron Transport in *Geobacter sulfurreducens*. *mBio*, IV(2), e00105-13. doi:10.1128/mbio.00105-13
- Vorregaard, M. (2008). *Comstat2 - a modern 3D image analysis environment for biofilms*. (T. U. Denmark, Ed.) Kongens Lyngby, Dinamarca.
- Wang, F., Mustafa, K., Suciu, V., Joshi, K., Chan, C. H., Choi, S., . . . Bond, D. R. (2022). Cryo-EM structure of an extracellular *Geobacter* OmcE cytochrome filament reveals tetrahaem packing. *Nature Microbiology*, VII(8), 1291-1300. doi:10.1038/s41564-022-01159-z
- Wang, Q., Jones III, A.-A. D., Gralnick, J. A., Lin, L., & Buie, C. R. (2019). Microfluidic dielectrophoresis illuminates the relationship between microbial cell envelope polarizability and electrochemical activity. *Science Advances*, V(1), eaat5664. doi:10.1126/sciadv.aat5664
- Wang, Y., Zhang, R., Duan, J., Shi, X., Zhang, Y., Guan, F., . . . Hou, B. (2022). Extracellular Polymeric Substances and Biocorrosion/Biofouling: Recent Advances and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, XXIII(10), 5566. doi:10.3390/ijms23105566
- Wen, L., Huang, L., Wang, Y., Yuan, Y., & Zhou, L. (2022). Facet-engineered hematite boosts microbial electrogenesis by synergy of promoting electroactive biofilm formation and extracellular electron transfer. *Science of the Total Environment*, DCCCXIX, 153154. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.153154
- Yang, Y., Xu, M., Guo, J., & Sun, G. (2012). Bacterial extracellular electron transfer in bioelectrochemical systems. *Process Biochemistry*, XLVII(12), 1707–1714. doi:10.1016/j.procbio.2012.07.032
- Yasri, N. G., & Gunasekaran, S. (2017). Electrochemical Technologies for Environmental Remediation. En N. A. Anjum, S. S. Gill, & N. Tuteja (Edits.), *Enhancing Cleanup of Environmental Pollutants* (Primera ed., Vol. II, págs. 5-73). Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-55423-5_2

- Yates, M. D., Golden, J. P., Roy, J., Strycharz-Glaven, S. M., Tsoi, S., Erickson, J. S., . . . Tender, L. M. (2015). Thermally activated long range electron transport in living biofilms. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *XVII*(48), 32564-32570. doi:10.1039/c5cp05152e
- Yi, H., Nevin, K. P., Kim, B.-C., Franks, A. E., Klimes, A., Tender, L. M., & Lovley, D. R. (2009). Selection of a variant of *Geobacter sulfurreducens* with enhanced capacity for current production in microbial fuel cells. *Biosensors and Bioelectronics*, *XXIV*(12), 3498-3503. doi:10.1016/j.bios.2009.05.004
- Yoshida, T., Ayabe, Y., Yasunaga, M., Usami, Y., Habe, H., Nojiri, H., & Omori, T. (2003). Genes involved in the synthesis of the exopolysaccharide methanolan by the obligate methylotroph *Methylobacillus sp.* strain 12S. *Microbiology*, *CXLIX*, 431–444. doi:10.1099/mic.0.25913-0
- Zacharoff, L. A., Morrone, D. J., & Bond, D. R. (2017). *Geobacter sulfurreducens* Extracellular Multiheme Cytochrome PgcA Facilitates Respiration to Fe(III) Oxides But Not Electrodes. *Frontiers in Microbiology*, *VIII*. doi:10.3389/fmicb.2017.02481
- Zacharoff, L., Chan, C. H., & Bond, D. R. (2016). Reduction of low potential electron acceptors requires the CbcL inner membrane cytochrome of *Geobacter sulfurreducens*. *Bioelectrochemistry*, *CVII*, 7–13. doi:10.1016/j.bioelechem.2015.08.003
- Zeidan, A. A., Poulsen, V. K., Janzen, T., Buldo, P., Derkx, P. M., Øregaard, G., & Neves, A. R. (2017). Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications. *FEMS Microbiology Reviews*, *XLI*(Supp_1), S168-S200. doi:10.1093/femsre/fux017
- Zhang, B., Cheng, H. Y., & Wang, A. (2021). Extracellular electron transfer through visible light induced excited-state outer membrane c-type cytochromes of *Geobacter sulfurreducens*. *Bioelectrochemistry*, *CXXXVIII*(107683). doi:10.1016/j.bioelechem.2020.107683
- Zhang, F., Yu, S., Li, J., Li, W., & Yu, H. (2016). Mechanisms behind the accelerated extracellular electron transfer in *Geobacter sulfurreducens* DL-1 by modifying gold electrode with self-assembled monolayers. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, *X*, 531–538. doi:10.1007/s11783-015-0793-y
- Zhao, X., Liang, Q., Song, X., & Zhang, Y. (2023). Whole genome sequence of *Lactiplantibacillus plantarum* MC5 and comparative analysis of *eps* gene clusters. *Frontiers in Microbiology*, *XIV*, 1146566. doi:10.3389/fmicb.2023.1146566

- Zhou, S., Tang, J., & Yuan, Y. (2015). Conduction-band edge dependence of carbon-coated hematite stimulated extracellular electron transfer of *Shewanella oneidensis* in bioelectrochemical systems. *Bioelectrochemistry*, *CII*, 29-34. doi:10.1016/j.bioelechem.2014.11.005
- Zhuang, Z., Yang, G., & Zhuang, L. (2022). Exopolysaccharides matrix affects the process of extracellular electron transfer in electroactive biofilm. *Science of the Total Environment*, *DCCCVI*, 150713. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.150713

Anexos

Medio de cultivo NBAF (1 litro)

Agua grado Mili-Q	800 mL
Fumarato de sodio [1 M]	40 mL
NB Sales [100X]	10 mL
NB Minerales Elixir [100X]	10 mL
DL-Vitaminas	15 mL
CaCl ₂ [0.4 %]	10 mL
MgSO ₄ - 7H ₂ O [1.0%]	10 mL
Na ₂ SeO ₄ [1 mM]	1 mL
NaHCO ₃	1.8 g
Na ₂ CO ₃ - H ₂ O	0.5 g
C ₂ H ₃ NaO ₂ - 3H ₂ O	2.04 g
Resazurina [0.1%]	0.5 mL

Aforar a 1 L con agua grado Mili-Q

1. Pesar todos los reactivos.
2. En una parrilla de agitación colocar un vaso de precipitados de vidrio con capacidad de 1000 mL y una barra de agitación, agregar 800 mL de agua grado Mili-Q.
3. En constante agitación, agregar uno a uno y en orden todos los reactivos listados.
4. Ajustar el volumen a 1000 mL con agua Mili-Q.
5. Distribuir en tubos o botellas para burbujear con la mezcla de gases N₂:CO₂ (80:20), primero la fase líquida y luego la fase gaseosa, y esterilizar en autoclave (120 °C, 15 psi, 15 minutos).

No es necesario ajustar el pH, ya que el medio debe quedar en un pH de 7.0 por el buffer de carbonatos.

6. Antes de inocular, agregar 0.1 mL de extracto de levadura [5%] y 0.1 mL de cisteína [100 mM] por cada 10 mL de cultivo y esperar a que desaparezca el tono rosado del medio de cultivo.

Análisis de imágenes obtenidas en el microscopio confocal

1) Tener instalados los programas Fiji, Comstat y el código de %VIVAS Y MUERTAS

2) Abrir el archivo de imágenes

Meterse a Comstat – ImageJ – File – Open - (Se busca el documento a analizar) – Abrir - Ok

3) Asignar los canales

Image – Color - Channels Tool:

- Channel 1 – More – Green
- Channel 2 – More - Red

Color-Composite

4) Mejorar la imagen (ajustar el brillo)

Image – Adjust - Color Balance - (Guardar imagen)

5) Guardar la imagen

File - Save As - PNG

6) Guardar el archivo de imágenes en el formato que Comstat puede leerlo

Plugins – BioFormats - BioFormats Exporter - (es el formato OME-TIFF, se selecciona carpeta y se guarda) – Ok – Seleccionar ‘Write each channel to a separate file’ – Ok - Uncompressed - Ok

7) Obtener el grosor máximo y el biovolumen.

Plugins - Comstat2 (aceptar y se abren varias pantallas) - (En el cuadro de Observed Directories) – Add - (se selecciona la carpeta donde se guarda el formato OMETIFF, sin abrir) - (sale otra ventana y se ve que estan los dos canales) - (se selecciona en el cuadro de Comstat2.1) – (Dejar activado los parámetros de Automatic Thresholding (Otsu's Method) y Connected Volume Filtering si son requeridos) - BioMass – Maximum Thickness - Go (sale cuadro con valores).

8) Preparar un documento en Excel y seleccionar los siguientes valores por canal, primero sale el verde y después el rojo, que se encuentra más abajo.

- Biovolume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$).
- Maximum thickness (μm).

9) Sacar promedios y error estándar

10) Visualizar imagen lateral (se realizan pasos del 2 al 4 en Fiji)

Plugins - 3D viewer - Resampling factor: 1 (se quita canal azul) - Ok

Edit - show bonding (se ajusta la imagen moviéndola hacia abajo con la flecha (teclado) y después se le quita el show bonding).

11) Obtener el porcentaje de vivas y muertas

Tener el block de notas con el código (% VIVAS Y MUERTAS):
`for (i =1; i <X; i++)
{run ("Find Maxima...", "noise=180 output=Count exclude"); run ("Next Slice [>]);}`

Seleccionar en el valor de X el número de stacks (cortes) más grande que se obtuvo y sumarle uno más.

12) Abrir el programa Fiji (ImageJ)

Fiji – Plugings – BioFormats - BioFormats importer

Image – Color – Channel Tool - (Se seleccionan los canales Ch1 - verde y Ch2 - rojo y se fija que la barra de abajo se encuentre desde el stack inicial)

Image – Color - Split Channels (separar los canales)

Plugins – Macros – Install - (se selecciona el archivo con el código) (solo se realiza la primera vez).

Plugging – Macros - %VIVAS Y MUERTAS (lo que sale es del canal que se tiene seleccionado).

Sale una ventana con muchos números (son el número de pixeles por capa), se selecciona desde el primero hasta el número antes de que se repita.

Edit - Copy (se pega en Excel), por cada canal y por cada imagen.

Se suman los pixeles por canal de vivas y de muertas y se saca el total. Con esto se obtiene el % de vivas y el de muertas, se saca promedio y el error estándar.

Electrolitos utilizados para las pruebas electroquímicas

Medio basal para pruebas electroquímicas de *Geobacter sulfurreducens*

- 30 mM de NaHCO₃
- 5 mM de NH₄Cl
- 50 µM de NaH₂PO₄ H₂O
- 1 mM de KCl

Medio basal para pruebas electroquímicas de *Geobacter sulfurreducens* en acero inoxidable

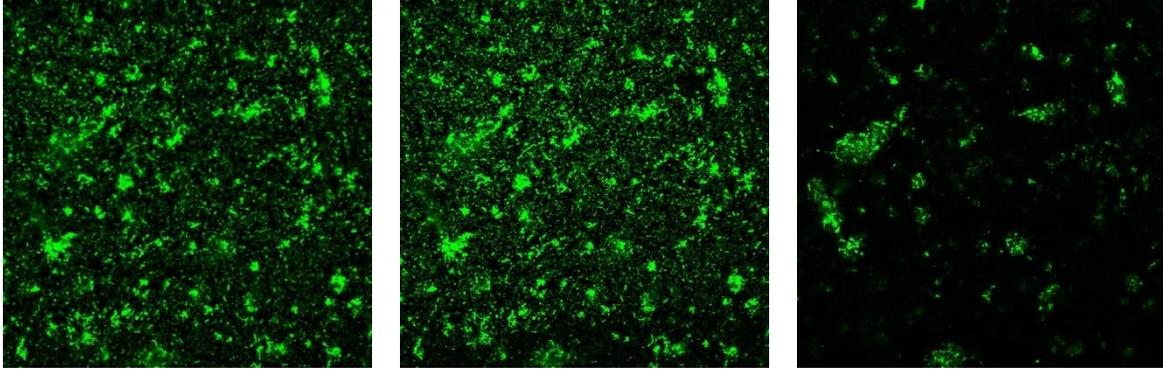
- 30 mM de NaHCO₃
- 5 mM de NH₄NO₃
- 50 µM de NaH₂PO₄ H₂O
- 1 mM de KNO₃

Medio ferri/ferrocianuro de potasio para pruebas electroquímicas

- 1 mM de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
- 1 mM de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
- 0.1 M de KCl

Material suplementario

Canal 1



Canal 2

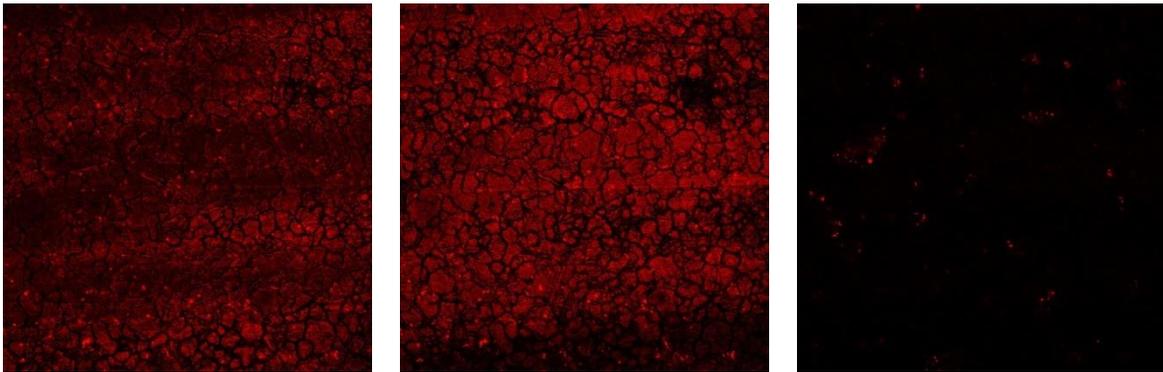
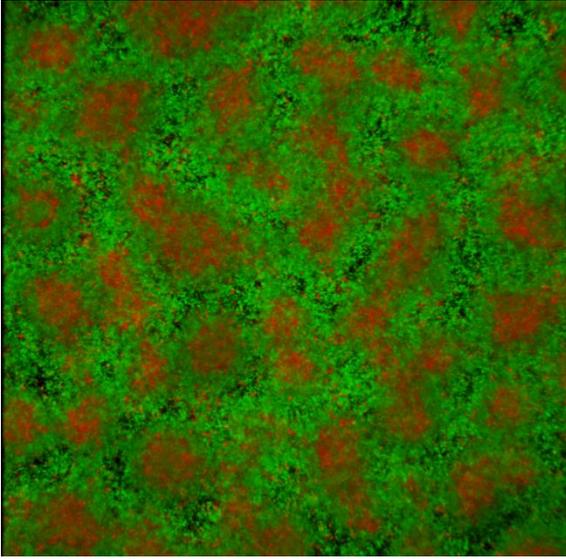
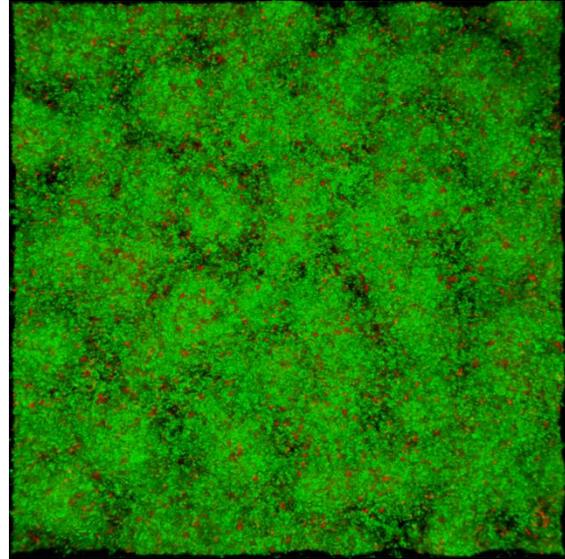


Figura S1. Imágenes de microscopía confocal sobre acero inoxidable con los canales separados (vista superior). Cepa *G. sulfurreducens* DL1 a 72 horas. La biopelícula fue teñida con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD. Las células vivas se tiñeron de color verde (Canal 1) y las células muertas de color rojo (Canal 2). Los cultivos se incubaron a 25°C.

Vista inferior



Vista superior



Vistas laterales

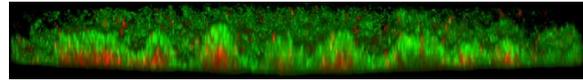
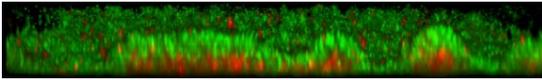


Figura S2. Imágenes de microscopía confocal en Fe_2O_3 sobre FTO (Vistas inferior, superior y laterales). Cepas *G. sulfurreducens* $\Delta\text{gsu1771}$ a 144 horas. La biopelícula fue teñida con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD. Las células vivas se tiñeron de color verde y las células muertas de color rojo. Los cultivos se incubaron a 25°C.

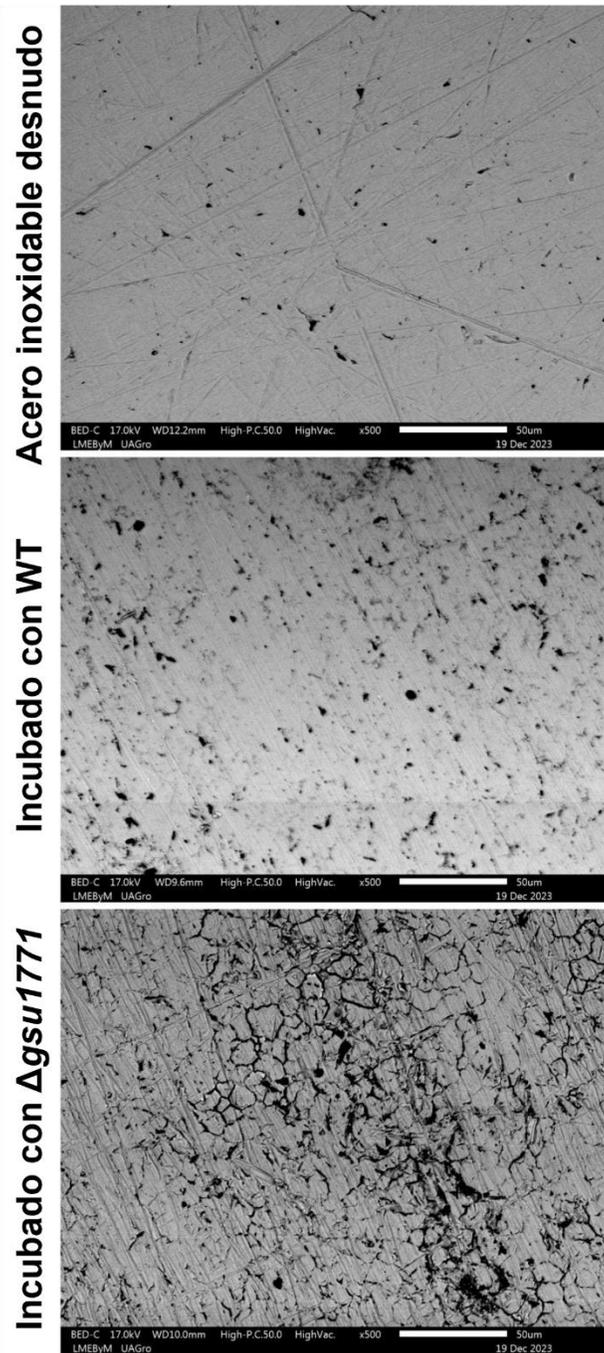


Figura S3. Imágenes SEM del electrodo de acero inoxidable. Acero inoxidable desnudo sin ningún tratamiento y los electrodos después de 40 días de incubación con las cepas de *G. sulfurreducens*.

	Vidrio	Fe ₂ O ₃ - vidrio	FTO nuevo	Fe ₂ O ₃ -FTO	Grafito	Acero inoxidable
<i>pilA</i>	0.1 ± 0.03	0.39 ± 0.12	0.7 ± 0.14	0.75 ± 0.17	0.11 ± 0.06	0.87 ± 0.4
<i>omcZ</i>	0.46 ± 0.22	5.19 ± 0.86	2.82 ± 0.92	24.31 ± 3.09	2.12 ± 0.14	6.6 ± 3.88
<i>omcS</i>	1.82 ± 0.82	1.81 ± 1.09	12.18 ± 3.72	13.55 ± 5.56	5.76 ± 1.47	9.96 ± 4.29
<i>omcB</i>	0.96 ± 0.14	1.81 ± 0.74	4.18 ± 1.07	6.98 ± 2.37	0.87 ± 0.22	18.29 ± 8.04
<i>omcC</i>	0.51 ± 0.18	1.80 ± 0.74	4.31 ± 1.86	5.24 ± 1.55	0.65 ± 0.11	18.46 ± 10.65
<i>omcE</i>	0.19 ± 0.01	6.13 ± 2.13	3.88 ± 0.59	40.13 ± 8.73	0.52 ± 0.06	17.92 ± 6.46
<i>omcM</i>	12.07 ± 1.7	82.36 ± 38.58	27.47 ± 2.39	401.71 ± 186.79	13.58 ± 2.76	51.98 ± 24.41
<i>pgcA</i>	37.79 ± 16.14	420.27 ± 145.66	48.17 ± 15.56	1024 ± 121.8	34.7 ± 2.18	111.17 ± 25.54
<i>omcF</i>	3.96 ± 0.23	10.88 ± 1.93	1.05 ± 0.53	4.85 ± 0.9	1.93 ± 0.12	65.95 ± 24.21
<i>acnA</i>	0.98 ± 0.06	0.34 ± 0.18	0.41 ± 0.34	1.09 ± 0.27	0.27 ± 0.02	12.5 ± 0.34
<i>dcuB</i>	0.47 ± 0.06	4.20 ± 1.38	0.26 ± 0.06	1.85 ± 0.19	1.25 ± 0.23	88.85 ± 19.45
<i>epsH</i>	5.46 ± 0.9	7.61 ± 2.69	5.51 ± 1.98	6.54 ± 1.68	2.33 ± 0.27	16.68 ± 6.14
<i>ftsX</i>	0.72 ± 0.14	6.49 ± 1.47	0.22 ± 0.06	8.07 ± 1.26	0.33 ± 0.06	330.84 ± 112.31

Tabla S1. Expresión relativa de cada uno de los genes estudiados de la biopelícula de la cepa mutante *Δgsu1771* en comparación con la biopelícula de la cepa WT de *G. sulfurreducens* DL1 sobre los seis materiales de estudio con su respectivo error estándar. Biopelículas sobre vidrio, Fe₂O₃-vidrio, FTO, Fe₂O₃-FTO, grafito y acero inoxidable a 48 horas a 25 °C.