



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR**

**CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES EN REGULADORES  
GLOBALES INVOLUCRADOS EN LA EXPRESIÓN DE  
GENES IMPLICADOS EN LA GENERACIÓN DE  
BIOELECTRICIDAD EN *Geobacter sulfurreducens***

## **TESIS**

PRESENTA:

**DULCE BERENICE CASTREJÓN LÓPEZ**

PARA OBTENER EL GRADO DE

**LICENCIADO EN CIENCIAS CON ÁREA TERMINAL DE BIOQUÍMICA Y  
BIOLOGÍA MOLECULAR**

Director de Tesis:

**Dra. Katy Juárez López**

Sinodales:

**Presidente.** Dr. Ramón González García Conde, *CIDC-UAEM*

**Secretario.** Dr. Armando Hernández Mendoza, *CIDC-UAEM*

**Vocal.** Dra. Katy Juárez López, *IBT-UNAM*

**Suplente 1.** Dra. Sonia Dávila Ramos, *CIDC-UAEM*

**Suplente 2.** Dr. Ramón Antonio Batista García, *CIDC-UAEM*

CUERNAVACA, MORELOS

ENERO, 2020



Instituto de Biotecnología  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México campus Cuernavaca, en el laboratorio de la Dra. Katy Juárez López del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a DGAPA-PAPIIT PROYECTO:IN210017 por OTORGAR BECA para financiar este trabajo.

A la Dra. Katy Juárez López, por permitirme ser parte de su grupo de laboratorio y dejarme aprender de ella para llevar a cabo este trabajo, por sus enseñanzas, observaciones y consejos en lo profesional y personal, por mostrar gran interés en el desarrollo de este trabajo y en mí y por apoyarme cuando fue necesario. Por aceptar ser mi directora de tesis, confiar en mis capacidades y generar una grata experiencia en el transcurso de la realización de este proyecto.

Al Dr. José Alberto Hernández Eligio, por apoyarme en muchos aspectos, compartir sus conocimientos conmigo, enseñarme a desenvolverme mejor en el trabajo del laboratorio y brindarme consejos en lo profesional y personal.

A mi amiga Daniela Mejía por ser una gran compañera de trabajo, realizar algunos experimentos en conjunto conmigo y por apoyarnos y aconsejarnos mutuamente.

A mis amigos y compañeros del laboratorio. Eliel, mi gran amigo del laboratorio, a Liz, Alan, Fanny, Cesar, Adrián, Manuel y Paloma. Por este tiempo que pasamos juntos dentro y fuera del laboratorio, por siempre apoyarme cuando lo necesite, por dejarme aprender de ellos y generarme muchos buenos recuerdos en este tiempo que estuvimos juntos.

Gracias a todos ellos por hacer que mi tiempo en el laboratorio fueran una muy buena experiencia, con un ambiente único y agradable, donde no solo conocí a personas muy capaces en su trabajo, sino también a grandes personas y amistades.

A mi comité tutorial por orientarme, aconsejarme y evaluar mi proyecto de tesis.

## DEDICATORIA

A mis padres, Fausto Castrejón Castillo y Elizabeth López Castillo.

Quienes siempre me han apoyado y estado conmigo en todo momento, por enseñarme cada día a ser una mejor persona y darnos la mejor vida posible a mí y a mis hermanos, por ser un ejemplo de que todo es posible con esfuerzo y dedicación y que, aunque haya malos momentos en la vida, siempre se sigue adelante estando juntos y apoyándonos. Gracias por creer en mí y darme valores, disciplina, amor, una buena educación y todo lo que estuvo en sus manos. Por sacrificar tanto por nosotros para formarnos como personas y futuros profesionales, por ustedes soy quien soy ahora y quiero dedicarles este logro de mi vida, porque sin su apoyo no hubiera sido posible, estoy orgullosa de ser su hija y muy agradecida de todo lo que me han dado, los amo mucho.

A mis hermanos, Luisa Lizbeth y Alan Brandon

Por apoyarme en mis metas y locuras, por siempre estar cuando se necesita en los buenos y malos momentos. Aunque algunas veces tuvimos desacuerdos, siempre logramos salir adelante juntos, gracias por estar conmigo todo este tiempo y recuerden que yo también estoy para ustedes, los amo.

A mis abuelitas, María Luisa Castillo Santana y Emilia Castillo Rojas. Por dar lo mejor que pudieron a nuestra familia todo este tiempo y enseñarles a mis papas a ser personas con valores y trabajadoras. Quiero que sepan que siempre las tengo en mi corazón y que juntos afrontaremos todo lo que está pasando, sé que la edad les ha traído momentos difíciles últimamente y que se frustran por eso, pero mientras nosotros estemos aquí, nunca estarán solas, las amo y gracias por todo.

A mi abuelito Arnulfo López Tapia. Que a pesar de que ya no estés con nosotros desde hace mucho tiempo, siempre te tengo presente en mi corazón desde mi niñez, recuerdo que me enseñaste a disfrutar de las pequeñas cosas y a siempre reír y disfrutar la vida, el amor por las plantas y a llevar una vida saludable. Todo esto que aprendí de ti a pesar de ser muy pequeña, fueron cruciales en mi vida y te agradezco por eso, te extraño.

A mi familia paterna (Castrejón) y materna (López). Por siempre apoyarnos cuando se necesitaba y crear juntos buenos momentos. A mis tías Alicia y Aurora, por ser mis tías más cercanas, ser muy trabajadoras y siempre ayudarnos en lo posible. A mis primos Beto y Moni, porque a pesar de que viven lejos, siempre están en

contacto y regresan a casa cuando tienen, aunque sea un par de horas libres. Son grandes profesionistas y un ejemplo de perseverancia. A mi tía Esther y mi tío Miguel, porque siempre que nos vemos pasamos buenos y divertidos momentos de convivencia familiar. A todos mis demás tíos, primos y sobrinos, gracias por lo que me enseñaron para ser quien soy ahora.

A mis amigas más cercanas de carrera. Mi mejor amiga Diana, por siempre estar conmigo, apoyarme y pasar muchos momentos de risas interminables juntas. A Carito, porque es una persona increíble que siempre está en todo momento para uno, te escucha y aconseja. A Tania, por ser una chica muy linda e inteligente, las quiero mucho y sé que son amistades que perduraran para siempre.

A mis amigas del cele Alei y Ángeles, por todas esas platicas interminables que hemos tenido juntas, aconsejarnos y simplemente disfrutar de la vida.

Y gracias a mis muchos otros amigos que he formado a lo largo de mi vida, en Técnicos Laboratoristas, amistades de lo más bonitas (Lili, Eli, Dham, Zezu, Raúl, Dona...) a mis amigos de Ritmos Latinos, puro amor al baile y diversión interminable con ellos y a mis amigos de muchísimos más años.

## ÍNDICE GENERAL

<b>I.</b>	<b>RESUMEN</b> -----	<b>10</b>
<b>II.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> -----	<b>11</b>
<b>III.</b>	<b>MARCO TEÓRICO</b> -----	<b>13</b>
	1. <i>Geobacter sulfurreducens</i> -----	13
	2. <i>Transferencia directa de electrones</i> -----	13
	3. <i>Citocromos involucrados en la transferencia de electrones</i> -----	14
	4. <i>Pili tipo IV</i> -----	15
	5. <i>Biopelícula</i> -----	16
	6. <i>Reguladores homólogos a GSU1771</i> -----	17
<b>IV.</b>	<b>ANTECEDENTES</b> -----	<b>18</b>
	1. <i>Geobacter sulfurreducens</i> -----	18
	2. <i>Modelo de transferencia de electrones</i> -----	18
	3. <i>Pili eléctricamente conductivo o geopili</i> -----	19
	4. <i>Regulador GSU1771</i> -----	20
	5. <i>SARP</i> -----	20
<b>V.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> -----	<b>21</b>
<b>VI.</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> -----	<b>21</b>
<b>VII.</b>	<b>HIPÓTESIS</b> -----	<b>21</b>
<b>VIII.</b>	<b>OBJETIVOS</b> -----	<b>21</b>
	1. <i>Objetivo General</i> -----	21
	2. <i>Objetivos particulares</i> -----	21
<b>IX.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> -----	<b>22</b>
	1. <i>Cepas y plásmidos utilizados</i> -----	22
	2. <i>Medios de cultivo</i> -----	22
	3. <i>Desplazamiento del O<sub>2</sub> para obtener un ambiente anaerobio</i> -----	23

4.	<i>Aditivos para los medios de cultivo y antibióticos</i>	24
5.	<i>Oligonucleótidos empleados para construcciones moleculares</i>	25
6.	<i>Caracterización de la mutante GSU1771 de G. sulfurreducens</i>	25
6.1	<i>Reducción de diferentes aceptores de electrones solubles</i>	25
6.1.1	<i>Cinética de crecimiento empleando fumarato como aceptor de electrones</i>	25
6.1.2	<i>Cinética de crecimiento empleando Fe(III) soluble como aceptor de electrones</i>	26
6.1.2.1	<i>Determinación de Fe(II) por un método colorimétrico</i>	26
6.2	<i>Caracterización de la biopelícula</i>	28
6.2.1	<i>Desarrollo de la biopelícula y observación de su estructura empleando microscopia confocal mediante la tinción vivas y muertas</i>	28
6.2.1.1	<i>Preparación de cultivos y colorantes</i>	28
6.2.1.2	<i>Procedimiento</i>	29
6.2.1.3	<i>Análisis de imágenes</i>	29
6.2.2	<i>Ensayo de Aglutinación</i>	30
6.2.3	<i>Tinción con cristal violeta de biopelícula de Geobacter sulfurreducens</i>	31
6.2.3.1	<i>Formación de biopelícula en el soporte FTO</i>	31
6.2.3.2	<i>Formación de biopelícula en vidrio</i>	32
6.3	<i>Inmunodetección o “western blot” de PilA en mutante GSU1771</i>	32
7.	<i>Complementación de la mutante GSU1771</i>	33
7.1	<i>Diseño de oligonucleótidos</i>	33
7.2	<i>Células competentes XLB</i>	34
7.3	<i>Reacción de PCR para la amplificación del gen gsu1771 de DL1</i>	34
7.4	<i>Clonación en pjet1.2/blunt</i>	35

7.5	<i>Selección con Ampicilina</i>	36
7.6	<i>Extracción de plásmido, digestión y secuenciación</i>	36
7.7	<i>Clonación del gen <i>gsu1771</i> en el plásmido a pRG5 para la complementación</i>	37
<b>X.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>38</b>
1.	<i>Caracterización de la mutante GSU1771</i>	38
1.1	<i>Reducción de aceptores de electrones solubles</i>	38
1.1.1	<i>Cinéticas de crecimiento con fumarato y Fe(III) como aceptores de electrones (NBAF y en Citrato Férrico)</i>	38
1.2	<i>Caracterización de biopelícula</i>	41
1.2.1	<i>Desarrollo de la biopelícula y observación de su estructura empleando microscopía confocal</i>	41
1.2.2	<i>Aglutinación</i>	49
1.2.3	<i>Cuantificación de la formación de Biopelícula</i>	50
1.3	<i>Inmunodetección de PilA</i>	51
2.	<i>Complementación de la mutante GSU1771</i>	52
2.1	<i>Complementación</i>	52
2.2	<i>Caracterización de la mutante GSU1771 complementada</i>	54
<b>XI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>57</b>
<b>XII.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>57</b>
<b>XIII.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>58</b>
<b>XIV.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>62</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Morfología de Geobacter sulfurreducens</i> -----	13
<i>Figura 2. Modelo propuesto para la transferencia extracelular de electrones mediante el pili en G. sulfurreducens</i> -----	19
<i>Figura 3. Procedimiento para la preparación de los medios de cultivos anaeróbicos</i> -----	23
<i>Figura 4. Procedimiento para la suplementación e inoculación del medio NBAF</i> ---	24
<i>Figura 5. Procedimiento para la suplementación e inoculación del medio Citrato férrico</i> -----	25
<i>Figura 6. Curva de crecimiento en NBAF de DL1 y mutante GSU1771</i> -----	39
<i>Figura 7. Curva de reducción de Fe(III) a Fe(II) de DL1 y mutante GSU1771</i> -----	40
<i>Figura 8. Imágenes de microscopía confocal de DL1 y mutante GSU1771 a diferentes tiempos (corte inferior)</i> -----	42
<i>Figura 9. Imágenes de microscopía confocal de mutante GSU1771 a diferentes tiempos (corte superior)</i> -----	44
<i>Figura 10. Vista lateral de la biopelícula de DL1 y mutante GSU1771 a diferentes tiempos</i> -----	46
<i>Figura 11. Porcentaje y diferencia de aglutinación en DL1 y mutante GSU1771</i> ---	49
<i>Figura 12. Determinación de Biopelícula con cristal violeta de DL1 y mutante GSU1771</i> -----	50
<i>Figura 13. Inmunodetección de PilA</i> -----	51
<i>Figura 14. PCR del fragmento que contiene al gen gsu1771</i> -----	52
<i>Figura 15. Clonación</i> -----	53
<i>Figura 16. Subclonación</i> -----	54
<i>Figura 17. Curva de crecimiento en NBAF con mutante GSU1771 complementada</i> -----	55
<i>Figura 18. Curva de Reducción de Fe(III) con mutante GSU1771 complementada</i> -----	56

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo</i>	22
<i>Tabla 2. Medios de cultivo utilizados</i>	22
<i>Tabla 3. Mezcla de gases para generar medio anaerobio</i>	23
<i>Tabla 4. Aditivos para los medios y antibióticos</i>	24
<i>Tabla 5. Oligonucleótidos</i>	25
<i>Tabla 6. Concentraciones para curva estándar 1</i>	27
<i>Tabla 7. Concentraciones para curva estándar 2</i>	27
<i>Tabla 8. Concentraciones para curva estándar 3</i>	27
<i>Tabla 9. Condiciones de PCR</i>	35
<i>Tabla 10. Reacción de ligación</i>	35
<i>Tabla 11. Reacción de digestión por colonia</i>	36
<i>Tabla 12. Viabilidad de las células que constituyen la biopelícula</i>	47
<i>Tabla 13. Características de la biopelícula formadas por DL1 y la mutante GSU1771-</i>	48
<i>Tabla 14. Factor de cambio en la cantidad de pilina producida</i>	52

## I. RESUMEN

*G. sulfurreducens* presenta características metabólicas que le permiten la generación de electricidad debido a su capacidad de transferir extracelularmente electrones mediante la oxidación de compuestos orgánicos.

La transferencia de electrones en esta bacteria involucra numerosos componentes entre los que encontramos citocromos tipo *c* y el pili tipo IV con propiedades conductivas. Este pili está constituido por la proteína PilA (Reguera *et al.*, 2005). La regulación de esta proteína es muy compleja y la investigación muy escasa, se sabe que participan varios reguladores globales, siendo el sistema de dos componentes PilR/PilS y el factor sigma 54 los principales reguladores. Sin embargo, se ha observado que el gen *gsu1771* que codifica para una proteína homóloga a SARP, también tiene un papel importante en la expresión de *pilA*.

En el laboratorio se construyó la cepa mutante GSU1771 mediante la delección del gen *gsu1771*, en esta se observó una mayor expresión de *pilA* y al parecer de algunos citocromos involucrados en la transferencia a Fe(III) (Almazán, 2018; Martínez, 2018).

En este trabajo se caracterizó fenotípicamente dicha mutante y se realizó su respectiva complementación. Se comparó la cepa silvestre DL1 de *G. sulfurreducens* con la mutante y la mutante complementada en los diferentes medios de cultivo (NBAF y Citrato férrico), empleando como donador de electrones acetato y los diversos aceptores de electrones. En el medio NBAF, el cual tiene como aceptor de electrones al fumarato, se observó un retraso en el crecimiento de la cepa mutante GSU1771, este retraso se relaciona con la posibilidad de que el regulador GSU1771 controle algunos genes implicados en el transporte y metabolismo del fumarato (Almazán, 2018; Martínez, 2018), mientras que la mutante complementada presenta un crecimiento retardado debido a la carga metabólica que se le atribuye al plásmido pRG5 (Juárez *et al.*, 2009; Burgos-Gamez., 2018). En la cinética de reducción de Fe(III) soluble a Fe(II), la mutante GSU1771 presenta una reducción más rápida que la DL1, esto puede deberse al posible incremento en la producción de citocromos tipo *c* en esta cepa (Almazán, 2018; Martínez, 2018), mientras que la mutante complementada presenta una reducción similar a DL1. Se realizó la caracterización de la biopelícula de la mutante, se evaluó el grosor, la estructura, el porcentaje de células vivas, entre otros parámetros con el microscopio confocal, empleando el kit vivas y muertas. La mutante GSU1771 presentó una mayor formación de biopelícula que la cepa silvestre y una estructura característica, con pilares y canales que no se observan en DL1. En la cuantificación de la biomasa mediante la tinción por cristal violeta, la mutante genera más biomasa que la DL1 y en el ensayo de aglutinación, el porcentaje de aglutinación de la mutante es mayor que la cepa silvestre. Todo esto se le atribuye entre otras cosas a la sobreexpresión de *pilA* (proteína estructural del

Pili) (Tremblay PL, 2011; Almanza, 2018; Martinez, 2018), la cual podemos ver en la Inmunodetección de PilA realizada a diferentes tiempos.

## II. INTRODUCCIÓN

*G. sulfurreducens* es una *Deltaproteobacteria*, anaerobia abundante en los suelos y sedimentos, capaz de acoplar la oxidación de compuestos orgánicos a la reducción de Fe(III) y Mn(IV), participando así en los ciclos biogeoquímicos de estos elementos (Leang *et al.*, 2003; Methé *et al.*, 2003). Este tipo de microorganismos presentan ciertas características metabólicas que le permiten ser empleados en aplicaciones biotecnológicas como la generación de bioelectricidad en celdas microbianas de combustible (MFC), la biorremediación de ambientes contaminados con metales pesados, halogenados u aromáticos, en suelos como en sedimentos acuosos (Lovley and Nevin, 2011; Shi *et al.*, 2016).

*G. sulfurreducens* puede transferir extracelularmente los electrones generados en el metabolismo a aceptores externos como electrodos y un gran número de metales pesados como uranio, vanadio, paladio entre muchos más, llevando a cabo la respiración desasimilatoria de los mismos (Lovley *et al.*, 2004; Lovley, 2008; White *et al.*, 2016). En el mecanismo de transferencia de electrones se sabe que participa un gran número de citocromos tipo *c* codificados en su genoma, alrededor de cien y un pili tipo IV, que se ha demostrado que tiene propiedades conductivas (Reguera *et al.*, 2005; Hernández-Eligio, 2017; Filman DJ. *et al.*, 2019; Shu C. *et al.*, 2019).

La regulación de la expresión de los genes involucrados en la transferencia de electrones no es del todo conocida. La proteína PilA o pilina es la proteína estructural del pili y para su expresión participan diversos reguladores transcripcionales, en donde el principal es el sistema de dos componentes (TCS) PilR/PilS. Además, en la regulación transcripcional del gen *pilA* participa un promotor dependiente de sigma 54 (RpoN) (Hernández *et al.*, 2016, 2017). El factor sigma 54, dirige la transcripción de varios genes involucrados en diversos procesos como son la producción de electricidad, biosíntesis de pili, citocromos tipo *c*, etc. (Buck y Cannon, 1992; Lovley, 2011). Los estudios de regulación genética de *pilA* son escasos (Juárez *et al.*, 2009; Tremblay *et al.*, 2011; Hernández-Eligio *et al.*, 2017) es por eso que es muy importante estudiar la regulación de transferencia de electrones y la reducción de metales pesados en *G. sulfurreducens*, ya que mediante manipulación genética se podrían mejorar dichos procesos.

En el grupo donde se desarrolló este trabajo, nos hemos enfocado en el estudio e identificación de nuevos reguladores que estén involucrados en el proceso de transferencia de electrones y reducción de metales (Juárez *et al.*, 2009; Hernández-Eligio *et al.*, 2017; Burgos-Gamez, 2018; González-Gutiérrez, 2018; Martínez, 2018). Por un lado, la regulación de la expresión de *pilA*, es muy compleja, se ha

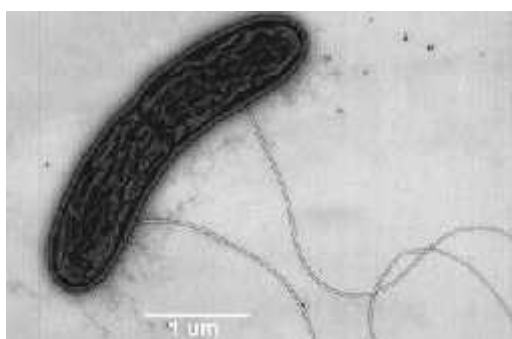
visto que intervienen varios reguladores que se describirán posteriormente. Uno de ellos que podría estar jugando un papel determinante en su expresión y que se ha identificado recientemente, es el producto del gen *gsu1771*. El gen *gsu1771* inicialmente se identificó como un regulador transcripcional por una mutación en este gen que aumentó la capacidad de *G. sulfurreducens* de reducir Fe(III) a Fe(II) insoluble, por lo que se relaciono a la expresión del gen *pilA* (Tremblay *et al.*, 2011). En nuestro laboratorio se construyó la mutante GSU1771 (Martinez, 2018) y se ha observado que presenta un fenotipo interesante en cuanto a la sobreexpresión del gen *pilA* y de algunos citocromos importantes en la transferencia extracelular. Es por ello que este proyecto se planteó para realizar la caracterización de algunos de los fenotipos interesantes observados. Como el comportamiento en la generación de una biopelícula más gruesa que la WT (DL1) y una sobreexpresión de la pilina. Se hizo un estudio de la estructura de la biopelícula empleando técnicas cuantitativas como tinción por cristal violeta, ensayo de aglutinación, observaciones y mediciones por medio de microscopía confocal empleando un kit de dos colorantes, la tinción vivas y muertas. Y posteriormente empleando los programas Fiji y Comstat, se analizaron las imágenes y se determinó su estructura.

### III. MARCO TEÓRICO

#### 1. *Geobacter sulfurreducens*

*Geobacter* pertenece a la familia *Geobacteraceae*, se encuentra clasificada dentro del dominio bacteria, phylum *Proteobacteria*, clase *Deltaproteobacteria* y el orden *Desulfuromonadales* (Holmes *et al.*, 2004; Lovley *et al.*, 2011). Son bacilos gram negativos anaeróbicos que habitan en suelos y sedimentos acuosos (Holmes *et al.*, 2004). Fueron los primeros organismos que se pudieron aislar que llevaran a cabo la reducción de óxidos metálicos insolubles junto con la oxidación del acetato, un producto primario en ambientes anaerobios debido al metabolismo fermentativo (Lovley and Lonergan, 1990). Además, se sabe que estos organismos pueden oxidar el acetato y emplear óxidos de hierro insolubles (Fe(III)), como único aceptor de electrones, participando en el ciclo biogeoquímico de este elemento (Lovley DR. *et al.*, 1995). De igual manera, pueden oxidar completamente compuestos orgánicos hasta llegar al CO<sub>2</sub>, mediante la reducción de varios aceptores de electrones extracelulares además del Fe(III) como son el Mn(IV), U(VI), V(V) entre otros (Lovley *et al.*, 2011).

*G. sulfurreducens* se aisló por primera vez en sedimentos contaminados con hidrocarburos (Figura 1) (Caccavo *et al.*, 1994) y su crecimiento anaeróbico puede estar mediado por aceptores de electrones solubles o insolubles (Lovley *et al.*, 2011). Su genoma es de un único cromosoma circular de 3.8 Mega pares de bases con la característica de que codifica más que otros organismos las proteínas citocromos tipo *c*, alrededor de 100, por ello la gran diversidad de aceptores de electrones que puede utilizar y los procesos de transferencia de electrones que puede realizar (Methé *et al.*, 2003; Mehta *et al.*, 2005).



**Figura 1. Morfología de *Geobacter sulfurreducens*.** Se observan los flagelos y pili que presenta esta *Deltaproteobacteria* anaeróbica. Obtenida de <http://blogs.nature.com>

#### 2. Transferencia directa de electrones

La transferencia extracelular de electrones en *G. sulfurreducens* es generalmente de tipo directa, en donde se establece un contacto directo entre la célula bacteriana y el aceptor de electrones, esto mediado por proteínas tipo redox como los citocromos tipo *c* o el pili bacteriano. En este proceso los electrones derivados de la

oxidación de compuestos orgánicos son transferidos a la superficie externa de la célula para reducir un aceptor de electrones extracelular, como los óxidos insolubles de Fe(III) y Mn(IV). Este proceso es de importancia biogeoquímica global, debido a que estos sustratos insolubles se encuentran en muchos suelos y sedimentos (Lovley D. R., 2000; Mehta *et al.*, 2005; Lovley *et al.*, 2011).

### 3. Citocromos involucrados en la transferencia de electrones

Los citocromos tipo *c* son proteínas importantes involucradas en muchas funciones biológicas, entre ellas la transferencia de electrones. Contienen grupos hemo, los cuales amplían sus funciones al combinarlos con otros cofactores como iones metálicos o flavinas (Bowman and Bren, 2008).

En *G. sulfurreducens*, se sabe que de los más de 100 citocromos solo algunos son esenciales para la transferencia a Fe(III), Mn(IV) y electrodos (Lovley DR., 2006). Entre ellos se describirán los más estudiados:

- Omc S. Es un citocromo tipo *c* con seis grupos hemo y un peso molecular de 50 kDa, está anclado al pili de *G. sulfurreducens*, el cual facilita la transferencia de electrones del pili a los óxidos de Fe(III), en lugar de promover la conducción de electrones a lo largo de este (Mehta *et al.*, 2005; Holmes DE. *et al.*, 2006; Leang *et al.*, 2010; Filman DJ. *et al.*, 2019; Lovley DR. and Walker DJF., 2019), ya que se sabe que el pili es conductivo por si solo y también realiza la transferencia de electrones (Aklujkar *et al.*, 2013).
- Omc Z. Tiene ocho grupos hemo y un peso molecular de 30kDa. No se asocia con el pili y sus patrones de expresión sugieren que su función podría ser promover la reducción de aceptores de electrones extracelulares solubles (Lovley and Nevin, 2011; Semenek L. *et al.*, 2019).
- Omc E. Tiene seis grupos hemo y un peso molecular de 30kDa, es de la membrana externa y es importante para el crecimiento con aceptores insolubles como el óxido de Fe(III) y Mn(IV), se ha visto que las cepas mutantes *omcE*, pueden superar la delección del gen y volver a reducir estos aceptores insolubles (Lovley *et al.*, 2004; Mehta *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005).
- Omc B. Con un peso de 89 kDa y 12 grupos hemo, esta en membrana externa y su mutante disminuye la reducción de Fe(III) soluble e insoluble, pero en cuanto a la reducción soluble, la cepa se puede adaptar al crecimiento de esta (Leang *et al.*, 2003; Ueki T. *et al.*, 2017).

- Mac A. Es un citocromo tipo *c* ubicado en el periplasma, con dos grupos hemo y un peso molecular de 36kDa. Este es un intermediario clave en la transferencia de electrones a Fe(III), podría ser como un transportador intermedio en la membrana interna y externa de este proceso (Lovley, 2011; Butler *et al.*, 2004; Dantas JM. *et al.*, 2017).

Y las proteínas trihemo conservadas en periplasma (Ppc), en *G.sulfurreducens* son una familia conservada de citocromos tipo *c* con 3 grupos hemo localizadas en el periplasma. PpcA es de 9.6kDa, tiene 3 grupos hemo y posee 4 homólogos, PpcB, PpcC, PpcD y PpcE. Los citocromos PpcA, PpcB y PpcD se detectaron en cultivos con Fe(III) soluble e insoluble y PpcE solo en citrato Fe(III). PpcB es de 9.3kDa con 2 grupos hemo, en un estudio se vio que la expresión de PpcB estaba regulada positivamente en células que reducen citrato Fe(III), mientras que PpcA se expresaba constitutivamente en ambas condiciones y PpcD abundaba más en células crecidas con óxidos de Fe(III). Se sabe que PpcA sirve como un portador de electrones intermediario de acetato hasta Fe(III) y también está involucrado en la transferencia de electrones de acetato a U(VI), entre otros (Lloyd *et al.*, 2003; Lovley DR., 2004; Ding *et al.*, 2008).

#### 4. Pili tipo IV

Los pili son estructuras en forma de pelo, más cortas y finas que los flagelos y se encuentran en la superficie de muchas bacterias y generalmente participan en adhesión. Los estudios de células cultivadas en óxidos de Fe(III) revelaron que el gen *pilA*, que codifica para la proteína estructural pilina o PilA del pili, se expresaba más durante el crecimiento en óxidos de Fe(III) que en Fe(III) soluble. Estructuralmente el pili tipo IV de *G. sulfurreducens* está constituido por monómeros de pilina y tiene anclado a lo largo de este al citocromo tipo *c* Omc S, que facilita la transferencia de electrones del pili a los óxidos de Fe(III). *G. sulfurreducens* tiene la capacidad de producir pili eléctricamente conductivos, por ello su importancia en la transferencia extracelular de electrones y para la reducción de sustratos insolubles como óxidos metálicos, ya que el análisis de sus propiedades conductivas indica su funcionamiento como un nanocable para promover el contacto eléctrico entre la célula y los óxidos de Fe(III) de la superficie (Reguera *et al.*, 2005; Mehta *et al.*, 2005; Filman DJ., 2019; Shu C., 2019; Lovley DR. and Walker DJF., 2019; Huerta-Miranda GA. *et al.*, 2019). El pili tipo IV de *G. sulfurreducens* es importante para la interacción metal-bacteria, la interacción con electrodos y también forma un rol determinante para la formación de biopelícula (Reguera *et al.*, 2007). Este pili es importante para la formación de una buena biopelícula, que se relaciona con la



conductividad eléctrica de este (Reguera *et al.*, 2005; Lovley DR. and Walker DJF., 2019).

## 5. Biopelícula

La biopelícula es la formación de comunidades bacterianas complejas adheridas a una superficie, ya sea viva o inerte, con características funcionales y estructuras complejas, como son los vidrios semiconductores de óxido de estaño dopados con flúor, mejor conocidos como FTO o más simple, el vidrio plano. La formación de la biopelícula comienza con la interacción de las células planctónicas con una superficie en respuesta a las señales ambientales apropiadas, estas se adhieren a la superficie y generan señales químicas para coordinar diferenciación y formación de estructura, además de presentar un andamiaje de exopolisacáridos y otras sustancias poliméricas extracelulares. *G. sulfurreducens* puede desarrollar biopelículas multicapa altamente estructuradas en la superficie anódica de una celda microbiana de combustible (CMC), que convierte el acetato en electricidad. Los estudios genéticos demostraron que la transferencia eficiente de electrones a través de la biopelícula requería la presencia de pili conductores de electricidad. Estos pili pueden representar una red electrónica que impregna la biopelícula y puede promover la transferencia eléctrica de largo alcance de una manera eficiente energéticamente, aumentando la producción de electricidad más de 10 veces (Reguera *et al.*, 2006). Se sabe que *G. sulfurreducens* requiere la expresión de pili conductores de electricidad para formar biopelículas en las superficies de óxido de Fe(III), pero los pili también son esenciales para el desarrollo de biopelículas en vidrio plano cuando el fumarato es el único receptor de electrones, por lo que se vio que el pili es necesario para el crecimiento máximo de la biopelícula, incluso cuando no se requiere la transferencia de electrones a una superficie aceptora de electrones. También se demostró que el pili es necesario para la agregación celular en los estudios de aglutinación, lo que nos sugiere que los pili de *G. sulfurreducens* igualmente tienen un papel estructural en la formación de biopelículas (Reguera *et al.*, 2007). De forma estructural en *G. sulfurreducens* sabemos que el pili está recubierto con el citocromo Omc S, el citocromo Omc Z se encuentra consistentemente en el material entre las células y su matriz extracelular producida es rica en citocromos y polisacáridos. Cabe resaltar que la carga superficial de una célula bacteriana y las interacciones electrostáticas son factores importantes en la formación de biopelículas, ya que la carga de la superficie es crítica en la etapa inicial de unión para la formación de biopelícula. La superficie de *G. sulfurreducens* de tipo salvaje es electronegativa y puede explicar por qué muchas cepas de *Geobacter* se adhieren fácilmente a superficies anódicas usadas (Rollefson *et al.*, 2011; Bartolini M., *et al.*, 2018; Reguera G. and Kashefi K., 2019; Tippapha Pisithkul, *et al.*, 2019).

## 6. Reguladores homólogos a GSU1771

El regulador GSU1771 se sabe que es homólogo a los reguladores tipo SARP de *Streptomyces* (Tremblay *et al.*, 2011). *Streptomicetos* son el grupo más extenso de actinobacterias, un grupo de bacterias gram positivas de contenido GC generalmente alto, la mayoría de ellas se encuentran en el suelo y juegan un rol importante en la descomposición de materia orgánica, como la celulosa y quitina. *Streptomyces* son la fuente más abundante de antibióticos. Normalmente, cada especie produce varios antibióticos (Gang Liu *et al.*, 2013).

Se descubrió SARP como una nueva familia de proteínas que regula la producción de antibióticos en los *Streptomicetos*. Los SARP son proteínas de unión a ADN que comparten similitudes de secuencia con varios miembros de la familia OmpR de dominios de unión a ADN (Wietzorrek and Bibb, 1997; Bertrand Aigle *et al.*, 2005).

## **IV. ANTECEDENTES**

### **1. *Geobacter sulfurreducens***

El nombre *Geobacter* en latín significa, "una varilla de la tierra", la cual hace una referencia adecuada a la ubicuidad y la presencia generalizada de este género en una variedad de ambientes, particularmente en suelos y sedimentos donde la reducción de metales es un proceso activo e importante en sus ciclos biogeoquímicos. *G. sulfurreducens* PCA, se aisló por primera vez en sedimentos contaminados con hidrocarburos (Caccavo *et al.*, 1994). La cepa PCA fue la primera especie de *Geobacter* susceptible de manipulación genética (Coppi *et al.*, 2001) y de secuenciar su genoma (Méthé *et al.*, 2003). Estos desarrollos proporcionaron por primera vez herramientas moleculares para explorar el notable potencial respiratorio de estas bacterias e impulsar la investigación con esta cepa y en el campo de los microorganismos eléctricamente activos en general. (Reguera G. and Kashfi K., 2019). Los primeros blancos estudiados para la transferencia extracelular de electrones de este organismo fueron los citocromos tipo *c*, éstos se localizan embebidos en su membrana interna, externa y en el periplasma (Lovley *et al.*, 2004). Al mismo tiempo se estudió el crecimiento de *G. sulfurreducens* en Fe(III) y Mn(IV) insolubles y solubles. El crecimiento de la bacteria en los insolubles expresaba una mayor cantidad de pilina, la cual es la proteína estructural del pili tipo IV y es codificada por el gen *pilA*, mientras que en los solubles era menor la expresión de pilina (Childers *et al.*, 2002). Con esto se sugirió que el pili de este organismo tenía un papel directo en la transferencia de electrones a aceptores extracelulares insolubles (Reguera *et al.*, 2005). En la superficie celular externa de *G. sulfurreducens* se piensa que es reducido el Fe(III) soluble y es menos complejo este proceso que el insoluble (Coppi *et al.*, 2001). Se sabe que el pili tipo IV tiene como una de sus funciones establecer contacto directo con las superficies y determina la importancia para la transferencia extracelular de electrones. En estudios se realizó una mutación en el gen *pilA* y se observó que ya no podía reducir óxidos de Fe(III) (Reguera *et al.*, 2005), además *G. sulfurreducens* tiene la capacidad de oxidar acetato con Fe(III) como único aceptor de electrones, lo cual es importante para la degradación anaeróbica de la materia orgánica por ser un intermediario extracelular clave (Lovley DR., 1995).

### **2. Modelo de transferencia de electrones**

La transferencia de electrones en *G. sulfurreducens* ocurre mediante la oxidación de compuestos orgánicos, principalmente acetato, el cual se oxida por medio de reacciones del ciclo de Krebs (Galushko and Schink, 2000), estos electrones resultantes se transfieren al ambiente extracelular donde se encuentran iones metálicos que se reducen. Dichos electrones que se producen son transferidos a

través de la membrana interna, el periplasma y finalmente a través de la membrana externa mediante los citocromos tipo *c* y con ayuda del pili conductivo se hace contacto con los óxidos de Fe(III) (Figura 2) (Galushko *et al.*, 2000).

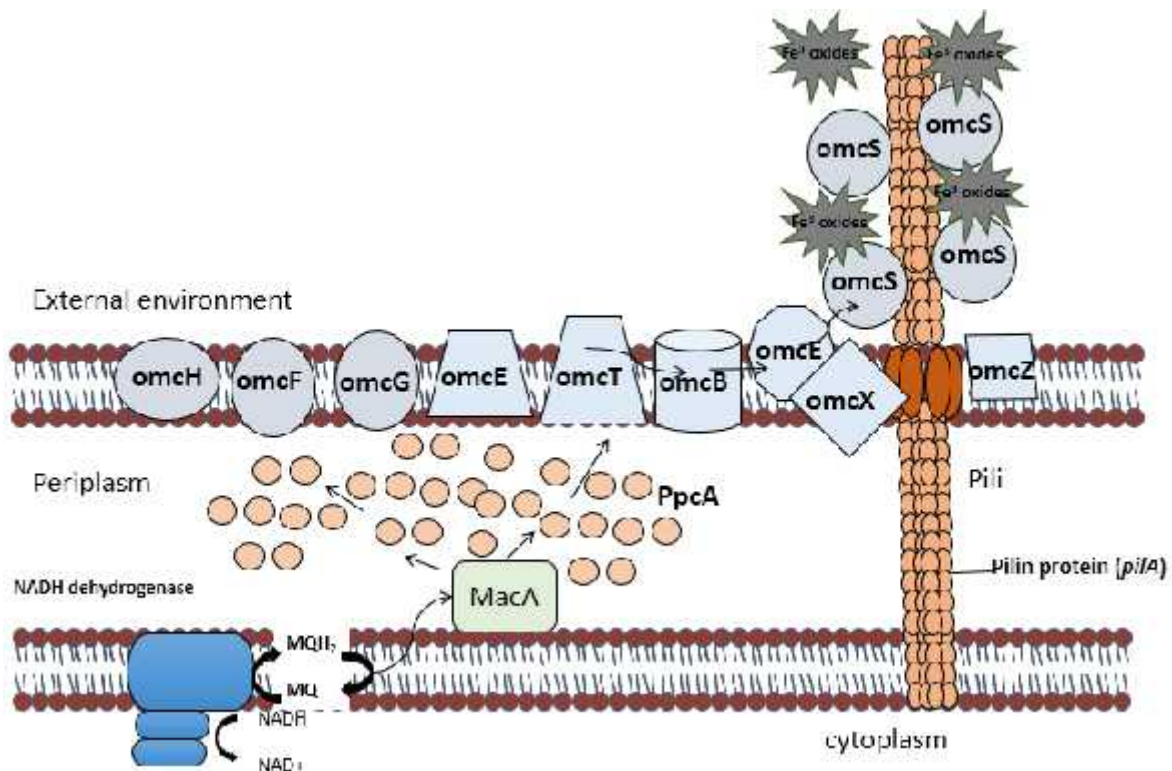


Figura 2. Modelo propuesto para la transferencia extracelular de electrones mediante el pili en *G. sulfurreducens*. Modificado de Lovley (2006).

### 3. Pili eléctricamente conductivo o geopili

Se descubrió que el pili tenía un papel en la reducción de óxidos de Fe(III) al observar a *G. metallireducens*, el cual producía flagelos y pili durante su crecimiento con óxidos de Fe(III) o Mn(IV), pero no durante el soluble. Gracias a esto junto con otros análisis, se reveló que el gen *pilA* responsable de codificar la proteína estructural pilina, se expresaba más en el crecimiento con óxidos de Fe(III) que Fe(III) soluble. La cepa mutante *pilA* de *G. sulfurreducens* no puede reducir los óxidos de Fe(III) por lo que presentaba una deficiencia en el transporte de electrones, además de verse afectado también el intercambio de electrones interespecies y el desarrollo de biopelículas conductivas (Reguera *et al.*, 2005). En uno de los análisis de microscopía de fuerza atómica, se propuso que la transferencia de electrones de largo alcance a los óxidos de Fe(III) podría ser por los filamentos de pilina (Reguera *et al.*, 2005), aunque hasta ahora todavía no se tiene muy en claro como ocurre la transferencia de electrones a lo largo del pili conductivo, se sigue estudiando este proceso y existen diferentes hipótesis de como

ocurre, entre ellas está la de salto de electrón entre citocromos, pero también se sugiere que los citocromos no median esto (Reguera *et al.*, 2005). Entre las últimas propuestas para la transferencia de electrones a lo largo del pili en *G. sulfurreducens* está que es por los aminoácidos aromáticos de la proteína PilA, mediante un salto de electrón (Lovley, 2012; Tan *et al.*, 2016; Filman DJ. *et al.*, 2019; Shu C, 2019).

#### **4. Regulador GSU1771**

Tremblay y sus colaboradores en el 2011 desarrollaron un experimento de evolución adaptativa, donde se modificó las condiciones ambientales para generar una presión selectiva a una cepa silvestre de *G. sulfurreducens* (PCA) y ver si esta cepa podría reducir con una mayor eficiencia óxido de Fe(III). En los resultados se aislaron dos cepas derivadas de esta WT y podían reducir más rápido Fe(III) insoluble, las denominada V1 y V2, las cuales como era de esperar presentaban mutaciones en su genoma, pero las mutaciones de mayor interés fueron las que presentaron ambas cepas en sus genes, la *pgcA*, que codifica para un citocromo tipo *c* y *gsu1771*, para un regulador transcripcional. También construyeron una cepa mutante en el gen *gsu1771* para verificar si el fenotipo positivo obtenido para la reducción de Fe(III) insoluble era por este gen y se encontró que en la cepa el gen *pilA* estaba sobreexpresado (Elena and Lenski, 2003; Tremblay *et al.*, 2011).

En el laboratorio se contruyó la mutante GSU1771 debido a que se desconocían los mecanismos de regulación transcripcional de la proteína GSU1771 sobre el gen *pilA* en *G. sulfurreducens* y su función en el control de expresión de otros blancos (Almanza, 2018). Se cuantificó mediante RT-qPCR la expresión de los genes *omcB*, *omcC*, *pilA*, *omcE*, *omcS* y *omcZ*, importantes en la transferencia de electrones, se encontró que están sobreexpresados y los genes *dcuB* y *frdCAB* reprimidos. Además, mediante ensayos de unión ADN-proteína tipo EMSA determinaron que la proteína GSU1771 se unía a la región promotora de *pilA*, *omcE*, *omcZ*, *dcuB* y *frdCAB* de forma directa (Martinez, 2018).

#### **5. SARP**

Como se mencionó anteriormente en los experimentos de Tremblay de evolución dirigida, se generó una cepa mutante con una inserción de un elemento IS en la región codificante del gen *gsu1771*. Se sabe que la proteína que codifica para GSU1771 es una proteína miembro de los reguladores transcripcionales tipo SARP (Proteína reguladora antibiótica de *Streptomyces*) y no se había reportado anteriormente en las *Deltaproteobacterias*, solo en *Streptomyces*, el cual se encuentra muy alejado filogenéticamente y tiene que ver con la síntesis de metabolitos secundarios, como antibiótico. Estos reguladores en algunas especies de *Streptomyces* son activadores y/o represores de la transcripción de genes

implicados en la biosíntesis de antibióticos (Tremblay *et al.*, 2011; Gang Liu *et al.*, 2013).

## **V. JUSTIFICACIÓN**

El proceso de transferencia extracelular de electrones en *G. sulfurreducens* es importante por sus aplicaciones biotecnológicas en la biorremediación y en la producción de electricidad. La generación de mutantes involucradas en la transferencia de electrones, podría mejorar dicho proceso y tener un gran potencial de aplicación en celdas microbianas de combustible, además de contribuir al entendimiento del proceso de transferencia de electrones.

## **VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La mutante GSU1771 es capaz de reducir óxidos de Fe(III) y sobreexpresar *pilA*, es por eso que su caracterización a nivel de la formación de la biopelícula y reducción de Fe(III) es muy importante ya que podría tener una mayor transferencia de electrones, además de complementarla in trans para comprobar que la mutación es la responsable del fenotipo observado.

## **VII. HIPÓTESIS**

GSU1771 codifica para un regulador transcripcional que afecta negativamente la producción del *pili*, al mutarlo se obtiene una biopelícula más gruesa por una sobreproducción de *pilA* lo que repercutirá en una mayor transferencia de electrones.

## **VIII. OBJETIVOS**

### **1. Objetivo General**

Caracterizar la estructura de la biopelícula en la mutante GSU1771 y complementar la mutante con el gen silvestre.

### **2. Objetivos particulares**

- Caracterización del crecimiento de la mutante GSU1771 en diferentes donadores y aceptores de electrones.
- Caracterizar la estructura de la biopelícula.
- Complementar in trans la mutante GSU1771.

## IX. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Cepas y plásmidos utilizados

En este trabajo se utilizó las cepas bacterianas y los plásmidos que se encuentran en la siguiente tabla (Tabla 1):

**Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo**

Cepa	Características	Referencias
<i>G. sulfurreducens</i>	Cepa silvestre DL1	Colección del laboratorio (Juárez <i>et al.</i> , 2009)
<i>G. sulfurreducens</i> mutante GSU177	Derivada de <i>G. sulfurreducens</i> DL1 con una <i>deleción</i> del gen <i>gsu1771</i>	Almazán(2018)
<i>E. coli</i> XLBlue	Cepa transformable a eficiencias altas y deficiente en los sistemas de recombinación homóloga	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
Plásmidos	Características	Referencias
<i>Pjet1.2/blunt</i>	Vector de clonación linealizado. Contiene un gen letal que es interrumpido por la ligación del inserto de DNA en el sitio de clonación. Tiene cassette de resistencia a Ampicilina, su tamaño es de 2974pb	Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit
<i>pRG5</i>	Vector para la subclonación. Tiene un amplio rango de hospedero, tiene origen de replicación en <i>Geobacter</i> . Cuenta con cassette de resistencia a Espectomicina y un tamaño de 7293pb	(Byoung-Chan Kim <i>et al.</i> , 2005)

### 2. Medios de cultivo

Los medios de cultivos utilizados durante los experimentos, junto con sus características principales, son las siguientes (Tabla 2):

**Tabla 2. Medios de cultivo utilizados**

Nombre	Uso	Características	Referencias
NBAF	Crecimiento de las cepas de <i>G. sulfurreducens</i>	El donador de electrones es el acetato. El aceptor de electrones es el fumarato. Burbujea y esteriliza el medio. Medio líquido y solido	Ver anexo, (Coppi <i>et al.</i> , 2001)
Citrato férrico	Ver reducción de Fe(III) a Fe(II) para crecimiento indirecto	El donador de electrones es el acetato de sodio. El aceptor de electrones es el Fe(III).	Ver anexo, Coppi <i>et al.</i> , 2001

Burbujea y esteriliza el medio.

Luria Bertani (LB)	Crecimiento de <i>E. coli</i> XLB. Transformación en <i>E. coli</i> . XLB Selección de mutantes y cultivos.	Nutricionalmente rico diseñado para el crecimiento cultivos. Medio líquido y sólido.	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
--------------------	--	---	-------------------------------

Nota: En el anexo se encuentra la composición de cada medio y su forma de preparación.

El medio LB se complementó con o sin antibiótico Ampicilina.

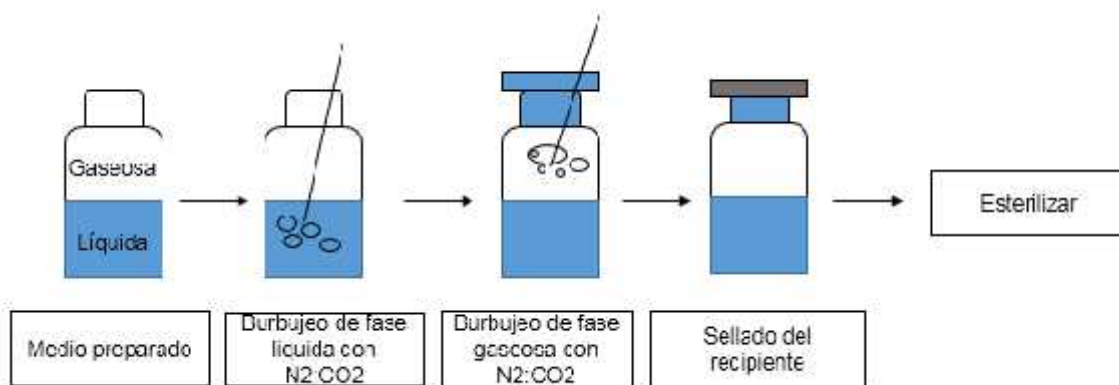
### 3. Desplazamiento del O<sub>2</sub> para obtener un ambiente anaerobio

En el intercambio gaseoso la mezcla de gases se generó con una presión, para disolver el oxígeno presente (Tabla 3) (Figura 3):

**Tabla 3. Mezcla de gases para generar medio anaerobio**

Gas	Cantidad	Referencias
N <sub>2</sub>	80%	Coppi <i>et al.</i> , 2001
CO <sub>2</sub>	20%	Coppi <i>et al.</i> , 2001

La estación de gaseo cuenta con una columna con cobre en su interior, la cual se calienta y reduce para eliminar humedad del ambiente y rastros de oxígeno. Los medios (NBAF y citrato férrico), las inoculaciones y tomas de muestra se realizaron con jeringas y agujas estériles, las cuales fueron purgadas (limpiadas con el flujo de la mezcla de gases) para eliminar todo rastro de oxígeno que contuvieran.



**Figura 3. Procedimiento para la preparación de los medios de cultivos anaeróbicos.** El medio NBAF y el medio citrato férrico se burbujean en tubos o frascos con una mezcla de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (80:20) durante 8 minutos la fase líquida por cada 10 ml de medio de cultivo y 8 minutos la fase gaseosa por cada 10 ml de medio de cultivo, se sellan bien colocando sobre los tapones de goma butílica un casquillo y finalmente se esterilizan en autoclave a 121 °C por 20 minutos. El citrato férrico es de coloración café parduzca y se forran sus recipientes con aluminio durante todo el proceso para evitar la exposición a la luz.



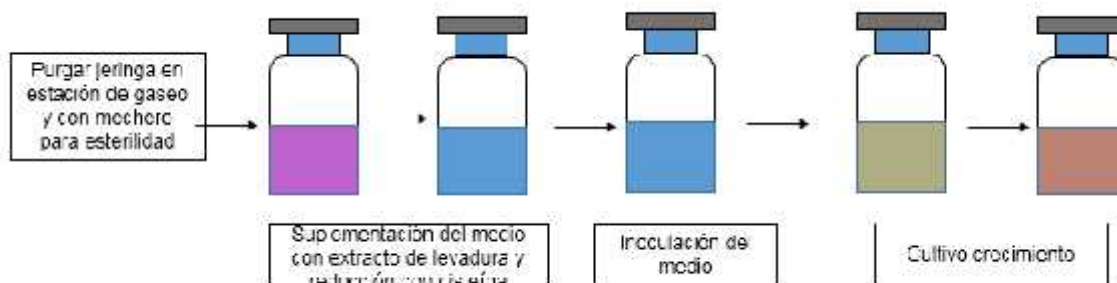
#### 4. Aditivos para los medios de cultivo y antibióticos

La siguiente tabla contiene los aditivos que se le ponen a los medios y los antibióticos utilizados con su función (Tabla 4):

**Tabla 4. Aditivos para los medios y antibióticos**

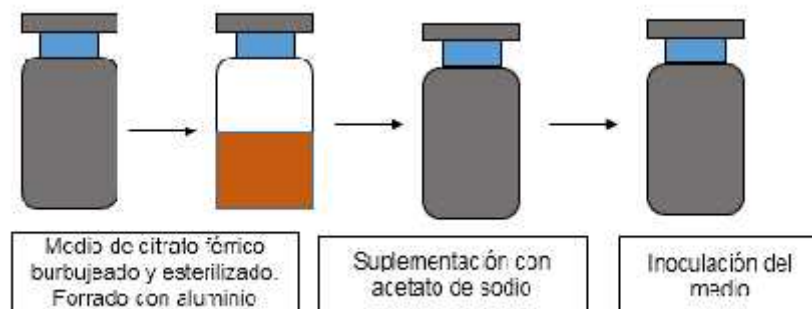
Stocks	Características	Función	Referencias
Extracto de levadura al 5%	Burbujeado y esterilizado	Nutriente adicional al medio NBAF	Coppi <i>et al.</i> , 2001
Cisteína 100 mM	Burbujeado y esterilizado	Actúa como reductor en caso de ser necesario	Coppi <i>et al.</i> , 2001
Acetato 2.5 M [100X]	Burbujeado y esterilizado	Es el donador de electrones en el medio citrato férrico	Coppi <i>et al.</i> , 2001
Ampicilina (Amp) 200 mg/ml	Se esteriliza por filtros	Es el antibiótico para la resistencia en el pjet1.2	Coppi <i>et al.</i> , 2001
Tetraciclina (Tc) 10 mg/ml	Se esteriliza por filtros	Es el antibiótico para las cepas competentes de XLB	Coppi <i>et al.</i> , 2001
Espectinomocina (Sp) 50mg/ml en XLB y 75 µg/ml en <i>Geobacter</i>	Se esteriliza por filtros	Es el antibiótico para la selección de la subclonación	Coppi <i>et al.</i> , 2001
XGAL e IPTG	Se esteriliza por filtros	Se utilizan en la subclonación para seleccionar las colonias que tengan el inserto.	Coppi <i>et al.</i> , 2001

El NBAF se complementó con extracto de levadura y cisteína por separado (Figura 4).



**Figura 4. Procedimiento para la suplementación e inoculación del medio NBAF.** Antes de inocular el medio, se espera unos minutos a que regrese a su color original. Se suplementa con 0.1 ml de extracto de levadura [5%] y se reduce con 0.1 ml de cisteína [100 mM] por cada 10 ml de medio de cultivo.

El citrato férrico se complementó por separado con acetato de sodio y se evitó la luz forrando los tubos o frascos con aluminio (Figura 5).



**Figura 5. Procedimiento para la suplementación e inoculación del medio Citrato férrico.** Durante toda su preparación el medio se encuentra protegido de la luz. Se suplementa con 0.1 ml de acetato de sodio 2.5 M [100X].

## 5. Oligonucleótidos empleados para construcciones moleculares

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se muestran a continuación (Tabla 5):

**Tabla 5. Oligonucleótidos**

Oligonucleótido (clave-año)	Secuencia	Observación
gsu1771UpFw (2640-2019)	Secuencia (5'→3'): ATGAATTCCATATCCGCGAGAAAGACCT	Oligo FW EcoR1
Comp71Rev (442-2018)	Secuencia (5'→3'): ATAAGCTTACAGATATACTGCATGAGACG	Oligo RV HindIII

Juntos amplifican un fragmento de 1014pb que tiene al gen *gsu1771* (WT1771).

## 6. Caracterización de la mutante GSU1771 de *G. sulfurreducens*

### 6.1. Reducción de diferentes aceptores de electrones solubles

Los medios utilizados son para monitorear el crecimiento de las cepas empleadas y medir su reducción, mediante cinéticas de crecimiento en NBAF con acetato como donador y fumarato como aceptor de electrones y cinéticas de reducción de Fe(III) soluble, con acetato como donador y Fe(III) soluble como aceptor de electrones.

#### 6.1.1 Cinética de crecimiento empleando fumarato como aceptor de electrones

El NBAF tiene como donador de electrones acetato y como aceptor de electrones fumarato. Este medio permitió monitorear el crecimiento de *G. sulfurreducens* por turbidez (Densidad óptica) en el espectrofotómetro. Se dividió en frascos de 20 ml y/o tubos de 10 ml. Antes de inocularlos se complementaron con 0.2 ml y 0.1 ml de

extracto de levadura respectivamente y se redujeron con 0.2 ml y 0.1 ml de cisteína respectivamente, a las concentraciones mencionadas anteriormente (Tabla 4).

Para iniciar la curva se necesitó cultivos frescos, por lo que se preparó un nuevo cultivo en un tubo, se inoculó con 0.3 ml para que estuviera a una densidad óptica (D.O) de 0.4 aproximadamente dentro de 24 horas (depende de la cepa) y de ahí se realizaron cálculos para inocular en los frascos de 20 ml, la concentración idónea para iniciar la curva a una D.O de 0.02, se incubaron a 30°C.

Se analizó las cepas por duplicado: Cepa silvestre (WT) DL1 de *G. sulfurreducens* y la mutante GSU1771.

Después de complementar la mutante GSU771 se realizó otra cinética por triplicado, que incluía la WT, la mutante GSU1771, la mutante GSU1771 complementada (GSU1771/WT1771), la GSU1771 con el pRG5 solo (GSU1771/pRG5) y la DL1 con el pRG5 solo (WT/pRG5).

Se les tomó muestra en la estación de gaseo en el tiempo cero y cada 12 horas con una incubación de 30°C. Las lecturas de las muestras fueron analizadas en el espectrofotómetro con una absorbancia de 600 nm y se graficaron los resultados.

### **6.1.2 Cinética de crecimiento empleando Fe(III) soluble como aceptor de electrones**

El medio citrato férrico tiene como donador de electrones acetato de sodio y como aceptor de electrones Fe(III) soluble. Se dividió en tubos de 10 ml, antes de inocularlos se complementaron con 0.1 ml de acetato de sodio.

Para iniciar curva se necesitó cultivos frescos en NBAF, por lo que se pusieron nuevos cultivos en tubos y se inocularon con 0.3 ml para que estuviera a una densidad óptica alrededor de 0.4 dentro de 24hrs (depende de la cepa) y de ahí se realizaron cálculos para inocular en los tubos de citrato férrico de 10 ml a la concentración para iniciar curva a una D.O inicial de 0.02.

#### **6.1.2.1 Determinación de Fe(II) por un método colorimétrico**

El reactivo ferrozina propuesto por Stookey (1970), reacciona con Fe divalentes para formar una especie de complejo magenta estable. La ferrozina es un reactivo para la determinación de hierro. Aumenta el potencial de reducción del hierro formando complejos preferentemente con el Fe(II) e induciendo la reducción del Fe(III) durante el análisis. El compuesto de ferroína forma una solución estable de color magenta con el ion ferroso. El complejo tiene un pico de absorción a 562 nm

y se utiliza como reactivo e indicador para el hierro (Viollier E. *et al.*, 2000; Nguyen T.H. and Waterhouse A.L., 2019).

### Curva estándar de Fe(II)

Se preparó una solución patrón para hacer diluciones seriadas y obtener las diluciones a diferentes concentraciones mM de Fe(II) (Tabla 6) (Ver anexo).

**Tabla 6. Concentraciones para curva estándar 1**

1 mM
5 mM
10 mM
20 mM
40 mM

Se realizó diluciones de Fe(II), para la curva estándar. Se colocó en tubos falcón envueltos con aluminio las anteriores concentraciones y se hizo diluciones con 0.5 N de HCl (Tabla 7):

**Tabla 7. Concentraciones para curva estándar 2**

Concentración	Dilución 1:50
0 mM	0 mM
1 mM	0.02 mM
5 mM	0.1 mM
10 mM	0.2 mM
20 mM	0.4 mM
40 mM	0.8 mM

Se tomaron 2.45 ml de ferrozina en un eppendorf y se le adicionaron 50  $\mu$ l de las diluciones 1:50 (ver anexo). Las diluciones finales fueron las siguientes (Tabla 8):

**Tabla 8. Concentraciones para curva estándar 3**

Dilución final
0 mM
0.0004 mM
0.002 mM
0.004 mM
0.008 mM
0.016 mM

Se leyó en el espectrofotómetro a 562 nm, las lecturas se graficaron para determinar el punto de referencia de las muestras a analizar, se obtuvo la ecuación de la recta,

se despejo “X” para obtener la concentración y “Y” es la D.O obtenida, además se multiplicaron dichas concentraciones por sus respectivas diluciones y se graficaron.

Fueron inoculadas por duplicado (primera cinética) y triplicado (segunda cinética), la cepa silvestre DL1 y la mutante GSU1771 (primera cinética), la DL1, la mutante GSU1771, la mutante GSU1771 complementada y la mutante GSU1771 con pRG5 (segunda cinética). Se tomó muestra (0.1 ml) en el tiempo cero y cada 12 horas en tubos eppendorf que contenían previamente 0.9 ml de HCl 0.5 N. El ml resultante sufrió diluciones para poder ser leído por el espectrofotómetro a 562 nm, mediante ensayo con ferrozina (entre más concentrada estuviera la muestra con Fe(II), la ferrozina se ponía más morada) (Coppi *et al.*, 2001).

## **6.2 Caracterización de biopelícula**

### **6.2.1 Desarrollo de la biopelícula y observación de su estructura empleando microscopia confocal mediante la tinción vivas y muertas**

La tinción vivas y muertas permite diferenciar las células vivas de las muertas al observarse en el microscopio confocal, con esto podemos ver la viabilidad y estructura de la biopelícula entre otros aspectos, esto es posible de observarse mediante una serie de cortes que se realizan en la biopelícula con ayuda de este microscopio.

#### **6.2.1.1 Preparación de cultivos y colorantes**

Para realizar la tinción de vivas y muertas de la biopelícula formada por *G. sulfurreducens*, se partió de cultivos en medio NBAF en botellas. Primeramente, se preparó el medio NBAF, se vertió en tubos a los cuales previamente se les agregó el soporte FTO en el cual crece la biopelícula. Se marcó el lado no conductor para su posterior identificación. Posteriormente, se burbujeó el medio de cultivo y se esterilizó. Al momento de inocular, se partieron de preinóculos con una D.O de 0.3 aprox. a 600 nm para que la cuantificación fuera comparable y se inoculó a una concentración inicial de 0.02, el lado conductor del FTO queda hacia arriba para que se forme la biopelícula sobre este. Los cultivos de la DL1 y la mutante GSU1771 se incubaron a 25 °C, con sus duplicados, para los tiempos de 24, 48, 72 (DL1 y GSU1771) y 120 (solo GSU1771) horas.

El kit LIVE/DEAD “BacLight Bacterial Viability” utilizó una mezcla del colorante Syto 9 (colorante de ácidos nucleicos fluorescente verde) y yoduro de propidio (colorante de ácidos nucleicos fluorescente rojo). Estos colorantes difieren en sus características espectrales y en su habilidad para penetrar la membrana de células bacterianas. El colorante Syto 9 tiñe todas las bacterias presentes en la muestra (bacterias con membranas intactas y dañadas). En contraste, el Yoduro de propidio penetra solamente la membrana de bacterias dañadas causando una reducción en

la fluorescencia del colorante Syto 9 cuando ambos colorantes están presentes. Por lo tanto, se observaron las células vivas en color verde y las células muertas en color rojo.

Para visualizar las células de la biopelícula generadas por *G. sulfurreducens* se utilizó la siguiente mezcla de colorantes:

15 µl Syto 9

15 µl Yoduro de propidio

150 µl Solución salina burbujeada y estéril

150 µl Cisteína burbujeada y estéril

### **6.2.1.2 Procedimiento**

En el cuarto del microscopio confocal con poca luz, se retiró con cuidado el soporte (FTO) del medio de cultivo y se colocó en una caja Petri. Se tomó solución salina más cisteína con una jeringa y se enjuagó el biofilm con 3 o 4 gotas, se levantó con cuidado y se secó el exceso con un papel absorbente. Se agregó 25 µl de la mezcla de colorante a la muestra, asegurándose de que se cubriera toda la superficie del soporte donde estaba el biofilm. Se incubó la muestra por 10 minutos, cubriendo la caja Petri con papel aluminio, asegurándose de que la muestra no se secase, si se observa seca se agrega 1 o 2 gotas de solución salina más cisteína. Después de los 10 minutos de incubación, se lavó el soporte con solución salina más cisteína. Se colocó el soporte (FTO) en la tapa de una caja Petri, se cubrió con dos gotas de solución salina más cisteína y se observó al microscopio. Se utilizó el microscopio confocal Olympus FV1000 Multi-fotónico tipo Upright BX61WI y el objetivo de 60X, al final se analizaron las imágenes con los programas Fiji y Comstat como se muestra a continuación.

### **6.2.1.3 Análisis de imágenes**

- 1) Tener instalados los programas Fiji, Comstat y el código de %VIVAS Y MUERTAS
- 2) Para abrir imagen  
Meterse a Comstat – ImageJ – File – Open - (Se buscó el documento a analizar) – Abrir - Ok
- 3) Para asignar los canales  
Image – Color - Channels Tool - Channel 1 – More - Green  
Channel 2 – More - Red  
Color-Composite
- 4) Para mejorar imagen (se ajustó el brillo)  
Image – Adjust - Color Balance - (Guardar imagen)
- 5) Para guardar imagen  
File - Save As - PNG
- 6) Para guardar en el formato que lee Comstat la imagen

Plugins – BioFormats - BioFormats Exporter - (es el formato OME-TIFF, se seleccionó carpeta y guardó) – Ok – Uncompressed - Ok

**7) Para sacar el grosor y cobertura del sustrato.**

Plugins - Comstat2 (aceptar y se abren varias pantallas) - (En el cuadro de Observed Directories) – Add - (se seleccionó la carpeta donde se guardó el formato OME-TIFF, sin abrir) - (sale otra ventana y se ve que estén los dos canales) - (se seleccionó en el cuadro de Comstat2.1) - Area Occupied in Layers - Maximum Thickness - Go (salió cuadro con valores)

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

-AREA OCCUPIED BY CELLS IN DIFFERENT LAYERS (Percent del 3)

-Maximum thickness ( $\mu\text{m}$ )

9) Sacó promedios y desviación estándar

**10) Para visualizar imagen lateral** (se hizo paso del 2 al 4 en Fiji)

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

Edit - show bonding (se ajustó la imagen moviéndola hacia abajo con la flecha (teclado) y después se le quitó el show bonding)

**11) Para sacar 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) Se abrió Fiji (ImageJ)

Fiji – Plugings – BioFormats - BioFormats importer

Image - Color (se seleccionó canales ch1 verde y ch2 rojo y se fijó que la barra de abajo se encontrara desde el stack inicial)

Image – Color - Split Channels (separa los canales)

Plugins – Macros – Install - (se seleccionó el archivo con el código) (solo se hizo la primera vez)

Plugging – Macros - %VIVAS Y MUERTAS (lo que salió era del canal que se tuviera seleccionado)

Salió una ventana con muchos números (son el número de pixeles por capa), se seleccionó desde el primero hasta el número antes de que se repitieran.

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

Se sumó los pixeles por canal de vivas y de muertas y se sacó el total. Con esto se obtuvo el % de vivas y el de muertas, se sacó promedio y la desviación estándar.

## 6.2.2 Ensayo de Aglutinación

Los ensayos de aglutinación son para poder cuantificar la cantidad de agregados que se forman en el soporte, en comparación con las células plantónicas que quedan en el medio y así relacionarlo con la formación de biopelícula.

Se preparó cultivos en tubos de 10 ml de NBAF con sus respectivos aditivos y se incubaron a 25°C durante 48, 72 y 120 horas (3 tubos para aglutinación y 2 de control por cepa) de DL1 y la mutante GSU1771. Después se tomó su D.O a 600 nm ladeando el tubo con mucho cuidado de que no se despegaran las células del fondo (D.O células en suspensión "S"). A continuación, se agitaron con fuerza los controles y se les tomó su D.O (D.O total "T"). Se obtuvo la aglutinación al restar la T-S, después se sacó el porcentaje, su diferencia y su desviación estándar (Reguera *et al.*, 2007).

### **6.2.3 Tinción con cristal violeta de biopelícula de *Geobacter sulfurreducens***

Esta técnica cuantifica la formación de biopelícula empleando cristal violeta como colorante para teñir toda la biomasa celular, es decir, células vivas, muertas, los exopolisacáridos, entre otros componentes, para proseguir con su medición en celda para espectrofotómetro a una absorbancia a 550 nm.

#### **6.2.3.1 Formación de biopelícula en el soporte FTO**

La preparación de cultivos fue igual que la preparación de cultivos que se ocupó para ver el desarrollo de la biopelícula y observación de su estructura empleando microscopia confocal mediante la tinción vivas y muertas, igualmente incubados a 25°C, pero por triplicados y dos controles de 48, 72 y 120 horas de DL1 y la mutante GSU1771. Los controles se agitaron con fuerza y se les tomó su D.O a 600 nm. De los tubos para la tinción se les retiró con cuidado el soporte (FTO) del medio de cultivo y se colocó en una caja Petri. Se tomó PBS 1X con una jeringa y se enjuagó la biopelícula con 3 o 4 gotas de PBS, se levantó con cuidado y se secó el exceso con un papel absorbente. Se agregó con una jeringa 10 gotas de PBS 1X- Metanol 50% (la solución debía cubrir completamente la superficie del soporte donde se encontraba la biopelícula). Se dejó reposar por 2 minutos y posteriormente se descartó el PBS 1X- Metanol 50 %. Se secó el exceso con una sanita. Se adicionó con una jeringa 10 gotas de Metanol (cubriendo perfectamente la superficie del soporte) y se dejó reposar por 10 minutos. asegurándose de que no se secase la muestra (si esto pasa se agrega un poco más de metanol). Se descartó el metanol y se secó perfectamente el soporte, se colocó el soporte a 37 °C para secar más rápidamente. Se agregó con una jeringa cristal violeta suficiente para cubrir toda la superficie del soporte. Se dejó reposar por 10 minutos verificando que no se secará la muestra (si esto sucede se debe agregar más cristal violeta). Se eliminó el exceso de colorante enjuagando el soporte (FTO) con agua grado mili Q y se dejó secar. Si el soporte tenía aún alguna marca del lado no conductor (el lado donde no está la biopelícula) se quitaba con etanol o acetona. Se colocó el soporte dentro de un tubo falcón y se agregó 1 ml de ácido acético al 30%. Se colocó el ml en una celda para



espectrofotómetro y se midió la absorbancia a 550 nm, utilizando como blanco ácido acético al 30%. Se realizaron diluciones con el ácido acético si el resultado de la tinción era visiblemente intenso (morado oscuro) o si la lectura en el espectrofotómetro era mayor o igual a 1. Se analizaron los resultados tomando en cuenta las diluciones y dividiendo la D.O de la muestra entre el promedio de los controles, se sacó el promedio, desviación estándar y la diferencia entre la cepa mutante GSU1771 y la DL1.

### **6.2.3.2 Formación de biopelícula en vidrio**

Se preparó los cultivos como en el ensayo de aglutinación para DL1 y la mutante GSU1771, se agitaron con fuerza los 2 controles y se les tomó la D.O a 600 nm, se destaparon con cuidado los otros tres tubos para la tinción y se desechó el medio, se escurrieron los tubos en un papel absorbente y se esperó a que se secaran completamente, se metieron a la incubadora a 37°C para acelerar el proceso de secado. Se adiciono 20 µl de cristal violeta por tubo y se dejó reposar por 20 minutos (evitar salpicar las paredes del tubo), posteriormente se escurrieron del cristal violeta por 10 minutos y después 20 minutos a 37°C. Se lavó el exceso con agua grado mili Q sin adicionar el chorro de agua directo, hasta que dejara de salir colorante, se pusieron a secar los tubos durante 1 hora a 37°C y se les adicionó 1 ml de ácido acético puro. Por último, se midió en una celda en el espectrofotómetro a 550 nm y se realizaron diluciones correspondientes si eran requeridas. Se analizó los resultados tomando en cuenta las diluciones y dividiendo la D.O de la muestra entre el promedio de los controles, se sacó el promedio, desviación estándar y la diferencia entre la cepa mutante GSU1771 y la DL1.

### **6.3 Inmunodetección o “western blot” de PilA en mutante GSU1771**

Se pusieron cultivos a 24, 48, 72 y 120 horas de las cepas DL1 y la mutante GSU1771. Se lisaron y se les extrajo proteína, se les midió su concentración en el nanodrop y se realizaron las diluciones correspondientes. Se hizo un gel de poliacrilamida al 15%, para la inmunodetección y otro para el control de carga. Se corrieron en una electroforesis SDS-PAGE, uno de los geles se transfirió a una membrana mediante una cámara de electroforesis (Biorad) a 40 V y 100 Ma por una hora y media. Después se retiró la membrana y se sumergió en PBS 1X durante 15 minutos. Se preparó la solución bloqueadora y se bloqueó la membrana toda la noche en el cuarto frío. Al siguiente día se hicieron los lavados correspondientes y se le adicionó el anticuerpo primario (anti-pilina) a una dilución 1:1000, preparado en PBS-BSA 0.3% y se incubó por 4 horas, se repitieron los lavados correspondientes y se agregó el anticuerpo secundario (Anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa) a una dilución 1:5000 preparado en PBS-BSA 0.3% y se dejó

toda la noche en el cuarto frío, se realizaron sus lavados y se adicionó 1 ml de reactivo (1-Step NBT/BCIP) para la reacción de la enzima acoplada al segundo anticuerpo, en cuanto se visualizaron las bandas se paró la reacción con agua. Para determinar la expresión de la proteína PilA, se realizó un análisis con el programa ImageJ para determinar la intensidad y el área de cada una de las bandas observadas en el Western Blot de cada tiempo, al final se obtuvo el factor de cambio en la cantidad de pili.

## 7. Complementación de la mutante GSU1771

### 7.1 Diseño de oligonucleótidos

Se usó NCBI para obtener la secuencia del genoma de *G. sulfurreducens* y del gene *gsu1771*, se diseñaron los oligonucleótidos con el programa Primer3 Input (versión 0.4.0) y se le añadió al oligonucleótido FW el sitio de restricción **EcoR1 (GAATTC)** y al RV el sitio de restricción **HindIII (AAGCTT)**. Ya se contaba en el laboratorio con el oligonucleótido RV, por lo que solo se mandó a sintetizar el oligonucleótido FW a la unidad de síntesis y secuenciación del IBT.

FW Secuencia (5'->3'): AT**GAATTC**CATATCCGCGAGAAAGACCT Tm (1): 67.96

Clave: *gsu1771UpFw*

RV Secuencia (5'->3'): AT**AAGCTT**ACAGATATACTGCATGAGACG Tm (1): 66.78

Clave: *Comp71Rev*

El genoma de *G. sulfurreducens* mide 3.8 Mb, el gen *gsu1771* mide 648pb y la región amplificada con los oligonucleótidos es de 1014pb como se observa a continuación:

**Oligo FW**, **Oligo RV**, **gene *gsu1771***

**CATATCCGCGAGAAAGACCT**TGAGAATCATTTTCGATTCCGACTCGAAGGACG  
GATCGGACAACAAACAAAAAGGAACAGATAAAGGTGCTTCGGCAGCATCCAA  
GGTCGATGAGCAGTTGAAGAGCGATTATCAGGTGATGCGCGCGCTGGATCTC  
CTGAAAGGGTGGGAAATCCTGAAAACAATAAGCAAATGAGAGGATGACTTAC  
GCCAAAAGGGGGGGCTCGGGCCCCCCTTTTTTTATGTAAATCCGATAAGTT  
CTATATTTGTATTGACACTCCCGTAACGATGTAGTATTCAGTAGGTAAATTAAT  
CACAGTTAAGGTAAGGGTGTATCGCG**ATGGTTGCACATAGAAAAATAACGAC**  
**GACAGATGAGAGGGGAGAAGAGGGGCTGCTTTACATATCAACTCGTTTGG**  
**CGGTCTTTCCATTTCTTACCACGGCGCTCCCATAGCATTGTCTGGGAAAGC**  
**CAGAAAGCCAGGATACTTTTCTGTTATCTCCTTATCTCTTATGATCAGTGGCT**  
**GCACAGGGACAACTGATTGAAATGATTTGGCCCGGATGTGATCTTTCTCTCC**

GGTGCCAAGAACTTCAAGACTACCCTGAGCAGGCTGCGCAAGTCATTTTCC  
GGTCCTCGCACCGTGAATCCCGTGTTGAGCTTGGGAGAGGCCATTCGGCTC  
GATTACTCCGTTTTCTCGCTTGATTCCAGCCAGTTTAAATATCATGCCTCTTC  
AGGGATAAAAATGCTGGCCCGCGGCGAGATTTCCGTGGCAAGAAAGTATCT  
GGAAACTGCCCAGGATCTTTACAGTGGGCCCTTTTTGCCTGAAGAACCATT  
GATCCCTATATTACCGCGGAACGCAATGAACTGGAGAACTTCACGCGTCC  
GTTCTGTCTTCACTTGAAAAGGTATATCAAATTGAAGGGAATCAGGATGCCG  
TCGAGGCTATAACTCTCCTGAAGAATGTTGCGGGGATGGCTCATCAATCTTG  
ATGAGCCGTCTCATGCAGTATATCTGT

Se usó el programa ApE, para ver y analizar la secuencia con los oligonucleótidos.

### **7.2 Células competentes XLB**

Para hacer las células calcio competentes XLB, en un tubo se adicionó 5 ml de LB con 5 µl de antibiótico Tetraciclina (10 mg/ml), se inoculó con la cepa XLBlue de *E. coli* y se dejó incubar toda la noche en agitación (200 rpm) a 37°C. Se prepararon dos cajas de LB con el antibiótico Tetraciclina (10 mg/ml) y se estrío con el cultivo, se dejó toda la noche a 37°C y después se metieron a 4°C para conservarse, además en un matraz de 500 ml se adicionó 99 ml de LB con 1 ml del cultivo obtenido, se dejó incubar a 37°C en agitación durante dos horas y media y se tomó la densidad óptica a 600 nm hasta tener un crecimiento de 0.4. Se dividió el cultivo en dos tubos falcón de 50 ml y se metieron en hielo por 20 minutos, se centrifugaron a 4°C a 4000 rpm por 15 minutos, se desechó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 20 ml de CaCl<sub>2</sub> (100 Mm) y se dejó en hielo por 30 minutos, se centrifugó en las mismas condiciones anteriores, pero por 10 minutos, se volvió a retirar el sobrenadante y se resuspendió el pellet en CaCl<sub>2</sub> 100 Mm 14% Glicerol 5 ml. Por último, se generaron alícuotas de 200 µl en tubos eppendorf y se almacenaron a -80°C.

### **7.3 Reacción de PCR para la amplificación del gen *gsu1771* de DL1**

De un cultivo de NBAF con la cepa silvestre DL1 de *G. sulfurreducens* se tomó 5 ml en la estación de gaseo y se extrajo el pellet de células por centrifugación a 14000 rpm por un minuto desechando el sobrenadante. Se extrajo el DNA mediante el kit "Genomic DNA Purification kit de Thermo scientific" y por electroforesis se corrió un gel de agarosa al 1%, para confirmar la extracción del DNA. Se midió en el nanodrop la concentración y se hizo una PCR para amplificar la región del gen *gsuU1771* (esta región mide 648pb, pero con los oligonucleótidos es de 1014pb).

Para la PCR se usó la enzima DNA polimerasa Phusion y los oligonucleótidos diseñado (FW: *gsu1771UpFw* y el RV: *Comp71Rev*), junto con un control negativo.

Se emplearon las siguientes condiciones para un volumen final de 50  $\mu$ l (Tabla 9):

**Tabla 9. Condiciones de PCR**

98°C	30s.
<b>98°C</b>	<b>10s</b>
<b>58°C</b>	<b>40s</b>
<b>72°C</b>	<b>30s</b>
<b>Repetir</b>	<b>X30</b>
72°C	5min.
4°C	

Se corrió un gel de agarosa al 1% para observar la banda de 1014pb del fragmento amplificado que contiene al gen *gsu1771* y se purificó la PCR por banda con el kit “Gene JET PCR Purification kit #K0701”, se corrió otro gel para observar la banda específica de 1014pb y se midió su concentración en el nanodrop.

#### **7.4 Clonación en *pjet1.2/blunt***

Se clono con el kit “Clone JET PCR Cloning kit #K1231 de Thermo Scientific”, con la siguiente reacción para la ligación:

**Tabla 10. Reacción de ligación**

Buffer de reacción	10 $\mu$ l
PCR purificada	2 $\mu$ l
<i>pjet1.2/blunt</i> cloning vector(50 ng/ $\mu$ l )	1 $\mu$ l
Agua libre de nucleasas	6 $\mu$ l
T4 DNA ligasa	1 $\mu$ l
Vf=	20 $\mu$ l
A 22°C por 2horas	

Para la transformación, a un vial de 200  $\mu$ l de células calcio competentes de XLBlue generadas con anterioridad, se le adicionó 10  $\mu$ l de la ligación obtenida y se incubó en hielo por 30 minutos, después se le proporcionó un choque de calor a 42°C por 2 minutos y se regresó al hielo, se le adicionó 1 ml de LB estéril y se llevó a agitación a 200 rpm durante 1 hora a 37°C. Previamente se prepararon 4 cajas de LB con Amp (200 mg/ml) (1  $\mu$ l de Amp por 1ml de LB) y se plaquearon con 250  $\mu$ l cada caja con las células transformadas resultantes, por último se dejó incubando a 37°C toda la noche.

### 7.5 Selección con Ampicilina

En las cajas de LB con Amp (200 mg/ml) que se plaquearon con las XLB transformadas, crecieron colonias blanquecinas pequeñas a las 12 horas, estas se picaron con un palillo estéril diferente cada una y en una caja nueva de LB con Amp (200 mg/ml) se les hizo una resiembra, enumerándolas y se dejaron crecer a 37°C durante toda la noche, esto para evitar que se tomaran colonias que no se transformaron.

### 7.6 Extracción de plásmido, digestión y secuenciación

Se seleccionaron algunas de las colonias crecidas después de las 12 horas, se picaron cada una con un palillo diferente y en 5 ml de LB con Amp se metió un palillo de una colonia y así con las otras colonias seleccionadas, se dejaron a 37°C toda la noche en agitación a 200 rpm. Se extrajo plásmido con protocolo del laboratorio que usa perclorato (Ver anexo) y se resuspendió en 100 µl de H<sub>2</sub>O con RNAasa (50 µg/ml).

Se realizó una digestión con HindIII (Tabla 11) y se corrió gel de agarosa al 1% para verificar la posición que tenía el inserto (1014pb), ya que el inserto tiene en su extremo 3' el sitio HindIII y el vector *pjet1.2/blunt* tiene otro sitio HindIII (entre las dos HindIII, hay 252pb), por lo que las posibles bandas a obtener teniendo en cuenta que el vector mide 2974pb son de:

En la dirección 5' - 3': 3736pb + 252pb

En la dirección 3' - 5': 2722pb + 1266pb

**Tabla 11. Reacción de digestión por colonia**

H <sub>2</sub> O	6.7µl
Buffer IX (R)	1 µl
HindIII	0.3µl
plásmido	2µl
	Vf= 10µl
A 37°C por una hora	
Y a 80°C por 20 minutos para inactivar enzima	

Una vez obtenidas las cepas con su dirección del inserto, se picaron de nuevo las colonias que lo tenían y se colocaron en 5 ml de LB más Amp cada palillo y se dejaron crecer toda la noche a 37°C en agitación a 200 rpm. A continuación, se extrajo el pellet de células, se purificó el plásmido con el "Kit Plasmid Miniprep II", obteniendo un volumen final de 70 µl y se midió en el nanodrop la concentración. Se realizó otra digestión con HindIII y se corrió un gel para ver las bandas

correspondientes, por último, se mandó a secuenciar por Sanger y se analizó la secuencia con el software ApE.

### **7.7 Clonación del gen *gsu1771* en el plásmido a *pRG5* para la complementación**

Al plásmido Pjet1.2/GSU1771 obtenido se le realizó una doble digestión con EcoR1 y HindIII para obtener el inserto con el gen *gsu1771* y después se usó la enzima Blunting enzima del *kit del PJET.1* para reparar el DNA y generarle extremos romos, durante 5 minutos a 70°C, el vector *pRG5* fue digerido con SmaI de *Thermo Scientific* a 30°C durante 2 horas para dejarle extremos romos, se purificó por banda la digestión con el “*Gene JET PCR Purification kit*” y se desfosforilo durante 1 hora a 37°C con la enzima fosfatasa alcalina (FastAP), para quitar el fosfato del extremo 5´ y evitar que se religara el plásmido, a continuación, se le hizo una ligación del inserto con el vector *pRG5* y se transformaron las células de la mutante GSU1771 electro competentes generadas con anterioridad, se inocularon frascos de NBAF solido que contenían el antibiótico Espectinomocina (75 µg/ml) y se realizaron una selección de colonias. Colonias rojizas pequeñas.

Se realizó el mismo procedimiento, pero a otras células de la mutante GSU1771 electro competentes, con solo el plásmido *pRG5* sin el inserto.

La cepa mutante GSU1771 complementada (GSU1771/WT1771) y la mutante con el *pRG5* (GSU1771/*pRG5*) se crecieron en NBAF líquido y se les hizo su caracterización fenotípica (cinéticas de crecimiento en NBAF y de Reducción de Fe(III)) junto con la cepa DL1, la mutante GSU1771 y la cepa silvestre con el *pRG5* solo (GSU1771/*pRG5*) como otro control, se les realizó la cinética de crecimiento en NBAF.

## **X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **1. Caracterización de la mutante GSU1771**

La caracterización de la cepa mutante GSU1771 consistió en evaluar la capacidad que presenta de reducir los aceptores de electrones solubles como son el fumarato y el Fe(III). Además de la caracterización de la estructura de su biopelícula empleando la tinción vivas y muertas mediante microscopia confocal, la cuantificación de su biopelícula por tinción con cristal violeta, entre otros parámetros.

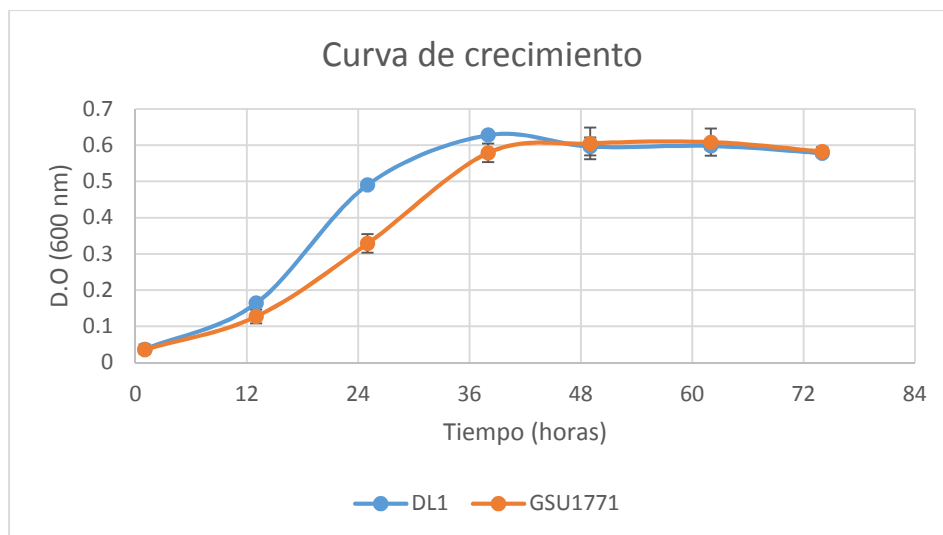
#### **1.1 Reducción de aceptores de electrones solubles**

Como lo determinó Reguera *et al.*, en el 2005, el pili no es necesario para la reducción de aceptores de electrones solubles, a diferencia de la reducción de aceptores de electrones insolubles como óxidos metálicos que si lo requieren (Reguera G. *et al.*, 2005; Juárez *et al.*, 2009). Por ello se decidió caracterizar esta mutante empleando dichos aceptores.

##### **1.1.1 Cinéticas de crecimiento con fumarato y Fe(III) como aceptores de electrones (NBAF y en Citrato Férrico)**

#### **Crecimiento empleando fumarato como aceptor de electrones**

Para evaluar la reducción de fumarato se utilizaron los cultivos en medio NBAF, el cual tiene acetato como donador de electrones y fumarato como aceptor de electrones. El acetato es el principal donador de electrones para *G. sulfurreducens* y el fumarato se usa en el laboratorio como aceptor de electrones alternativo y porque al ser intracelular le permite un crecimiento más rápido (Caccavo F. *et al.*, 1994). El medio NBAF se emplea para monitorear el crecimiento mediante la absorbancia a 600 nm y para obtener una mayor biomasa. La siguiente figura representa la curva de crecimiento obtenida de la cepa silvestre DL1 y la cepa mutante GSU1771 (Figura 6):



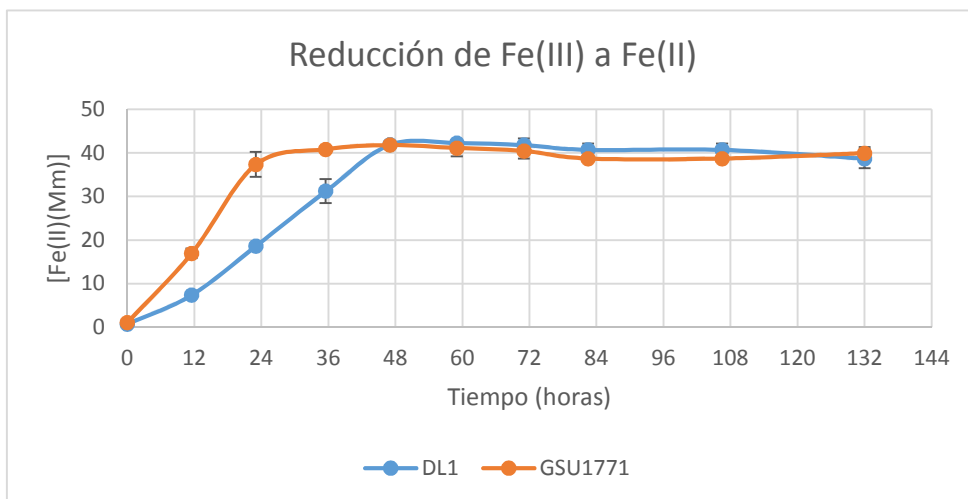
**Figura 6. Curva de crecimiento en NBAF de DL1 y mutante GSU1771.** Se hacen mediciones cada 12 horas a 600 nm. Toma por duplicado.

Como se puede ver en la gráfica anterior (Figura 6), se observó un retraso en el crecimiento de la cepa mutante GSU1771, este retraso se podría relacionar con que el regulador GSU1771 estuviera involucrado en la regulación de genes implicados en el transporte y metabolismo del fumarato. Sin embargo, se requieren otros experimentos para poder elucidar que origina el retraso en este medio de cultivo (Almazán, 2018; Martínez, 2018).

### Reducción de Fe(III) soluble como aceptor de electrones

Para evaluar esta reducción de este óxido metálico soluble se ocupó el medio citrato férrico, el cual tiene acetato como donador de electrones y Fe(III) soluble como aceptor de electrones. Como se mencionó en la introducción, los óxidos de hierro son el principal aceptor de electrones de *Geobacter* en el ambiente, por lo que es importante estudiarlos en el laboratorio (Coppi *et al.*, 2001). Se ha observado que la reducción de Fe(III) a Fe(II) está acoplada al crecimiento, por lo que se determinó la reducción de Fe(III) a Fe(II) como una medida indirecta del crecimiento celular de *G. sulfurreducens*. Los resultados obtenidos se muestran a continuación (Figura 7):





**Figura 7. Curva de reducción de Fe(III) a Fe(II) de DL1 y mutante GSU1771.** Se hacen mediciones cada 12 horas a 550 nm. Toma por duplicado.

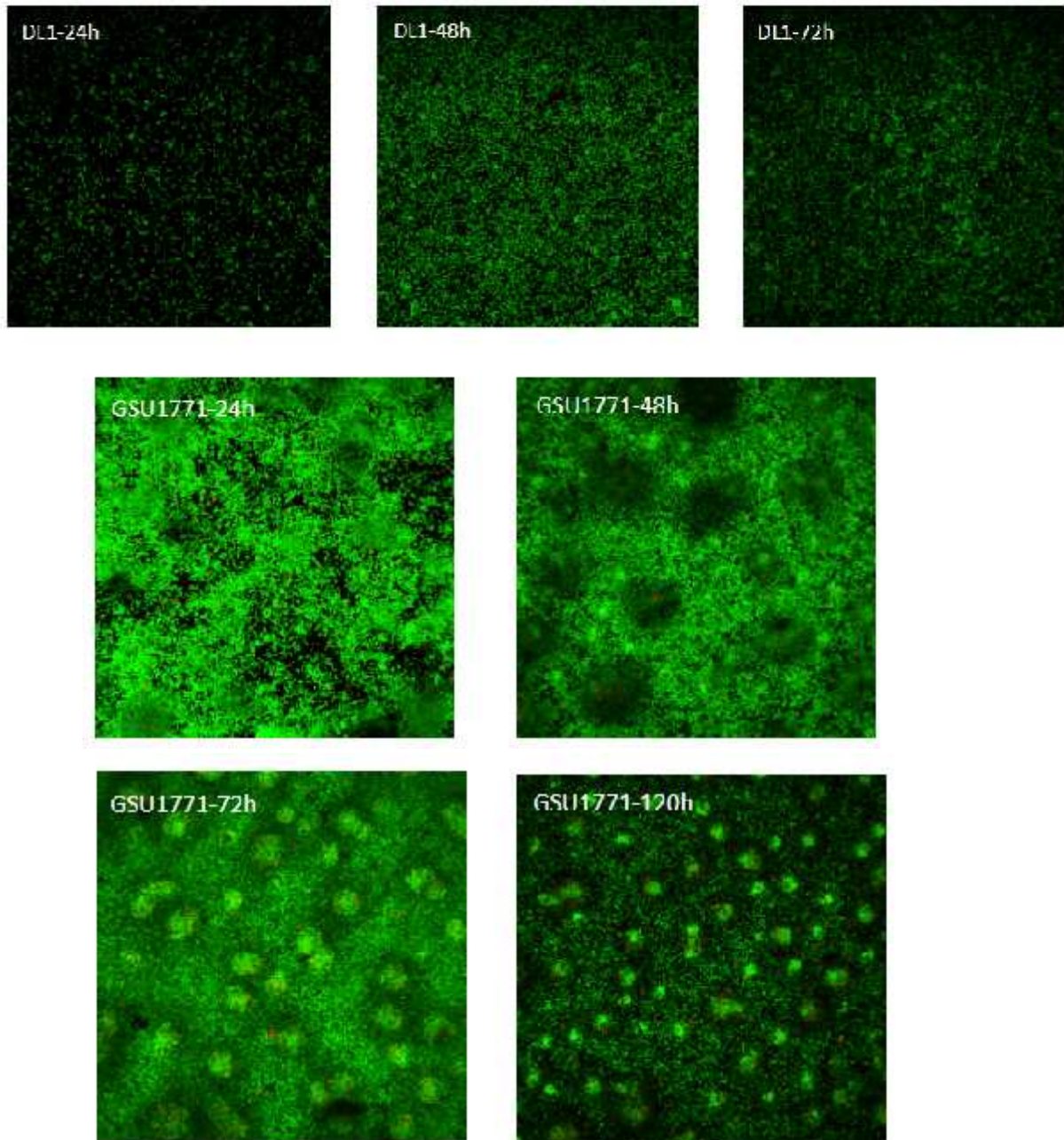
Como se observa en la gráfica anterior (Figura 7), en la reducción de Fe(III) soluble a Fe(II), la mutante GSU1771, presentó una reducción más rápida que la cepa silvestre (DL1), esto podría estar relacionada al incremento en la expresión de algunos de los citocromos tipo *c* involucrados en la reducción de Fe(III) como se demostró en los trabajos de Almazán, 2018 y Martínez, 2018, en los que se observó que la cepa mutante GSU1771 producía más citocromos tipo *c* y más proteína PiliA que la cepa silvestre, esto mediante el estudio del regulador GSU1771 en el control de la expresión de genes implicados en el proceso de transferencia extracelular de electrones, mediante el análisis por RT-qPCR. En el cual se observó la sobreexpresión de los genes *omcB* (su mutante disminuye la reducción de Fe(III) soluble e insoluble), *omcC* (no es fundamental en reducción de Fe(III) soluble), *pilA* (codifica para la proteína estructural del pili, importante en la transferencia extracelular de electrones y para la reducción de sustratos insolubles), *omcE* (importante para el crecimiento con aceptores insolubles), *omcS* (está anclado a lo largo del pili y facilita la transferencia de electrones del pili a los óxidos de Fe(III)) y *omcZ* (podría promover la reducción de aceptores de electrones extracelulares solubles) y por ensayos de unión ADN-proteína tipo EMSA entre sus regiones promotoras, se determinó si la proteína GSU1771 regulaba directamente la transcripción de los genes evaluados, viendo que la proteína GSU1771 se unía a las regiones promotoras de forma directa de *pilA*, *omcE*, *omcS*, *omcZ*. Todos genes que codifican proteínas involucradas en la reducción de metales, lo cual nos indica que en efecto GSU1771 codifica para un regulador transcripcional que afecta negativamente la producción del pili y la reducción de Fe(III) soluble e insoluble, por eso al mutarlo, se ve incrementada la reducción de Fe(III) soluble como pudimos observar en la gráfica.

## **1.2 Caracterización de biopelícula**

La caracterización de la biopelícula es importante porque sirve para entender mejor los posibles mecanismos de crecimiento de las bacterias en diferentes sustratos. También ayuda a entender las contribuciones del pili y otros componentes de la célula externa en la formación de la estructura de la biopelícula y con ello poder optimizar si es posible, la transferencia de electrones a las superficies que aceptan electrones (Reguera *et al.*, 2007).

### **1.2.1 Desarrollo de la biopelícula y observación de su estructura empleando microscopia confocal.**

Se analizó la formación de biopelícula a diferentes tiempos empleando las cepas WT (DL1) y la mutante GSU1771. Para su observación en el microscopio confocal se utilizó el objetivo 60X y se observó cómo se generaron cortes longitudinales de la biopelícula formada en el FTO, desde la parte inferior más unida al sustrato hasta la parte más superior-externa de la biopelícula, la cantidad de los cortes dependen del grosor de la biopelícula y en este tipo de tinción se pueden observar las células vivas en color verde y las muertas en rojo. Con ello se puede determinar si dicha biopelícula es metabólicamente activa y puede servir para el transporte de electrones o no. En nuestro caso se empleó el KIT LIVE/DEAD (como se describe en material y métodos), con esta tinción se analizó la producción de la biopelícula, se evaluó su estructura, se estimó el porcentaje de células vivas, su grosor y cobertura del sustrato, mediante la obtención de imágenes por microscopia confocal y con los programas Fiji y Comstat (Heydorn, *et al.*, 2000; Methods, 2012) para su análisis correspondiente. Para teñir las células que forman la biopelícula sobre el FTO (vidrios semiconductores de óxido de estaño dopado con flúor), los cuales son películas delgadas ópticamente transparentes y eléctricamente conductoras, se usó el kit LIVE/DEAD “BacLight Bacterial Viability”. Los cultivos se crecieron a 25°C, temperatura que favorece la formación de biopelícula, se analizaron tres tiempos de cultivo por duplicado, en el caso de DL1, 24, 48 y 72 horas y de GSU1771 a cuatro tiempos, 24, 48, 72 y 120 horas, las imágenes fueron tomadas en la parte central del FTO para que la biopelícula fuera lo más uniforme posible y cada imagen estaba formada por varios “slide” (cortes), planos del eje Z dependiendo del grosor de la biopelícula. A continuación, se muestran las imágenes obtenidas (Figura 8):

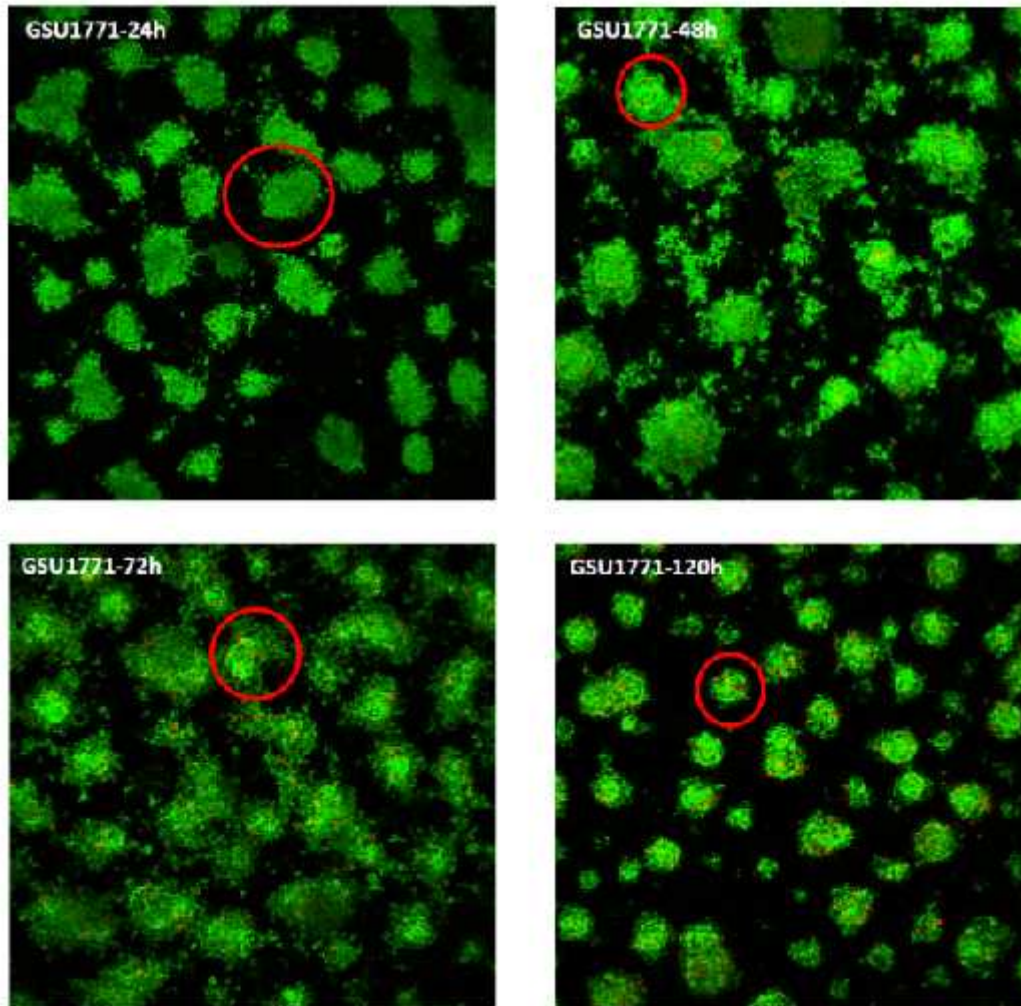


**Figura 8. Imágenes de microscopía confocal de DL1 y mutante GSU1771 a diferentes tiempos (corte inferior).** DL1 a 24, 48 y 72 horas. GSU1771 a 24, 48, 72 y 120 horas. La biopelícula fue teñida con el kit LIVE/DEAD®. Las células vivas en color verde y las células muertas en rojo. Cultivos incubados a 25°C, los programas utilizados para su análisis son Fiji y Comstat.

Con el kit LIVE/DEAD y la microscopia confocal puede determinar la cantidad de celulas metabolicamente activas, para poder tener la tasa general de transferencia

de electrones a una superficie que acepta electrones, ya que esta depende del número de células metabólicamente activas que pueden apilarse en la superficie. También las altas tasas de transferencia de electrones a una superficie aceptora de electrones requieren no solo la conductividad de los pili, sino también sus atributos estructurales que permiten que las células se acumulen a altas densidades en una superficie dada. Lo que nos dice que no solo el pili es necesario para la formación de la estructura de la biopelícula, sino que hay más elementos involucrados y con más estudios se pueda optimizar la transferencia de electrones a los aceptores de electrones (Reguera *et al.*, 2007).

Con las imágenes de la Figura 8 podemos ver notoriamente la diferencia en el crecimiento de la biopelícula de la cepa DL1, la cepa mutante GSU1771 y de sus respectivos tiempos. En DL1 se observa un crecimiento homogéneo que aumenta en el tiempo (Richter LV, *et al.*, 2017), mientras que en la mutante GSU1771 se observa una distribución del crecimiento localizada en ciertas partes, las cuales presentan aglomeraciones, pero con una biopelícula mucho mayor que la cepa silvestre DL1. Se ha visto que el pili tipo IV de *Geobacter sulfurreducens* es esencial para lograr una máxima biopelícula, incluso en superficies que nos sirven como aceptores de electrones (Richter LV. *et al.*, 2017; Reguera G. *et al.*, 2007), como se ha podido observar aquí con la mutante GSU1771, donde se ha visto que se sobreexpresa pilA (Martinez B., 2018). Además de las imágenes de los cortes inferiores (“slides” inferiores) de la mutante GSU1771, también se analizaron los cortes superiores para poder apreciar mejor la estructura en forma de columnas con canales que se forman en su biopelícula y que no están presentes en DL1, en estas se observa cómo se aglomeran la mayor cantidad de células en ciertas zonas. Las imágenes obtenidas se muestran a continuación (Figura 9):



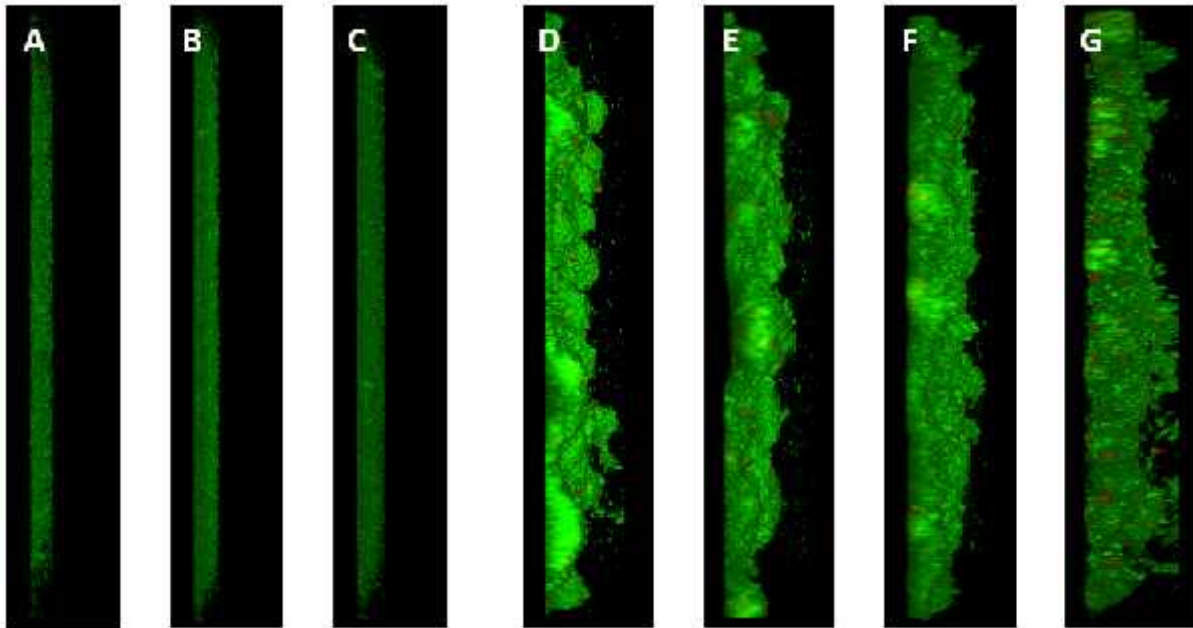
**Figura 9. Imágenes de microscopía confocal de mutante GSU1771 a diferentes tiempos (corte superior).** GSU1771 a 24, 48, 72 y 120 horas. Se señalan algunos de los canales mencionados. La biopelícula fue teñida con el kit LIVE/DEAD®. Las células vivas en color verde y las células muertas en rojo. Cultivos incubados a 25°C, los programas utilizados para su análisis son Fiji y Comstat.

Con estas imágenes del corte superior de la mutante GSU1771 podemos observar que el crecimiento localizado en las imágenes de los cortes inferiores, se ve reflejado en estos cortes superiores y se logran apreciar estructuras características de pilares y la formación de canales, los cuales se propone que podrían participar en el transporte de líquido o nutrientes, para la formación de la biopelícula como se ha observa en reportes de otras bacterias que tienen canales en su biopelícula (Palsdottir, 2009; Wilking JN. *et al.*, 2013; Gingichashvili *et al.*, 2019), estos canales y estructuras de pilares no se han visto en *Geobacter*, por lo que se buscó otro tipo de bacterias con estructuras de biopelículas parecidas que pudieran dar posibles explicaciones de la función y forma de estas estructuras. Se encontró que *Myxococcus xanthus*, la cual es una gram negativa, delta proteobacteria, que se encuentra en el suelo, tiene un crecimiento que se asemeja al de la mutante

GSU1771, donde al inicio empieza a crecer a lo largo. En este caso, la bacteria *M. xanthus* tiene este tipo de crecimiento para acceder a los nutrientes de un amplio espectro de microorganismos de los que se alimenta, es una bacteria depredadora y forma biopelículas delgadas, donde las células trabajan juntas para colonizar nuevos territorios, invadir colonias de presas y lisar las células de presa (Keane R., 2016; Zhou T., 2017), pero la diferencia estructural con la mutante GSU1771, es que en lugar de formar pilares en su crecimiento como se observó en la mutante GSU1771 (Figura 10 D-G), esta bacteria igualmente empieza a crecer hacia arriba (verticalmente) cuando los nutrientes escasean y se agregan en grandes cuerpos fructíferos, donde las células se diferencian en esporas al final (Kaimer and Thiery, 2020; Philipp F.Popp, 2019), por lo que una propuesta sería que el crecimiento vertical de la mutante podría ser para buscar más nutrientes. También se ha visto en bacterias como *Bacillus subtilis*, que el crecimiento de la biopelícula depende del transporte de nutrientes y desechos. Se cree que la difusión es la principal fuente de transporte, pero se sabe que la difusión es ineficaz para el transporte a grandes distancias, por lo tanto, debería limitar el crecimiento, pero eso no explicaría porque existen biopelículas que pueden llegar a ser muy grandes, lo que nos lleva a la bacteria mencionada que es modelo para estudiar la biopelícula, *Bacillus subtilis* (Tippapha Pisithkul *et al.*, 2019; Mielich-Süss and Lopez D., 2014; Vlamakis H. *et al.*, 2013), en esta se observa un crecimiento a lo largo de la superficie que solo se detiene con un factor de transcripción de estrés esencial para detener el crecimiento excesivo perjudicial de la biopelícula y para desencadenar la dispersión cuando los nutrientes se vuelven limitados (Bartolini M. *et al.*, 2018; Philipp F.Popp, 2019), pero lo más relevante de la bacteria *B. subtilis* es que presencia una notable red de canales bien definidos que se forman en su biopelícula de tipo salvaje y proporcionan un sistema para un transporte mejorado. Sus canales tienen una alta permeabilidad al flujo de líquido y facilitan el transporte de líquido a través de la biopelícula (Wilking JN. *et al.*, 2013; Mielich-Süss and Lopez D., 2014), lo cual es importante para su crecimiento y podría ser una explicación para la función de los canales que podemos ver en la mutante GSU1771 (Figura 9), para la distribución de nutrientes a todas sus células. Otra suposición para la formación de las estructuras verticales en forma de pilares en la mutante GSU1771, podría ser por la formación de canales de agua en su estructura, como se observa en las biopelículas de la bacteria es *Pseudomonas aeruginosa*, la cual es Gram-negativa, del filo de las *Proteobacterias*, patógeno oportunista en humanos y conocida por formar biopelículas robustas y resistentes a antibióticos (Lee K, 2017; Costerton JW. *et al.*, 1994).

Con el análisis realizado con el programa Fiji se obtuvieron imágenes de la vista lateral de la biopelícula de cada imagen tomada de la cepa DL1 y la mutante GSU1771. La función específica para obtener estas imágenes es “3D viewer”. Los

cortes (“slides”) utilizados para generar las vistas laterales varían dependiendo del grosor de la biopelícula. A continuación se muestran las imágenes obtenidas (Figura 10):



**Figura 10. Vista lateral de la biopelícula de DL1 y mutante GSU1771 a diferentes tiempos.** Las imágenes son una vista lateral con un ángulo de 45° reconstruidas a partir de todos los planos en el eje Z colectados por microscopía confocal. A) DL1 a 24 horas, B) DL1 a 48 horas, C) DL1 a 72 horas, D) GSU1771 a 24 horas, E) GSU1771 a 48 horas, F) GSU1771 a 72 horas y G) GSU1771 a 120 horas. Los programas utilizados para el análisis de las imágenes son Fiji y Comstat.

Con las imágenes expuestas anteriormente podemos ver notoriamente las diferencias estructurales de la biopelícula en la cepa DL1 y la mutante GSU1771 y la variación que hay en la estructura y el grosor con respecto al tiempo. Para un mayor análisis se utilizó los programas Fiji y Comstat para poder determinar algunos parámetros que son necesarios para una mejor discusión de las diferencias que se observaron. Estos son, el porcentaje de células vivas y muertas, el cual requiere de un código para su obtención, mostrado anteriormente en su procedimiento, en este caso tuvo una  $i < 52$ , donde 52 es por el máximo número de “slides” que se obtuvo más una imagen extra. También se analizó el grosor y cobertura del sustrato.

El porcentaje de células vivas y muertas de la biopelícula nos permitió determinar las células metabólicamente activas al momento de tomar nuestras imágenes con el microscopio confocal Olympus FV1000 Multi-fotónico tipo Upright BX61WI y el objetivo 60X, el cual se puede adentrar en la parte líquida (solución salina con cisteína) que se le pone a la muestra para tomar las imágenes y que genera un medio reductor en lo que dura la toma de imágenes, evitando así la muerte de

muchas más células. La obtención de este porcentaje es posible por la mezcla de colorantes del kit LIVE/DEAD, los cuales pueden distinguir entre células vivas y muertas por la permeabilidad de la membrana de las células, el colorante Syto 9 se une a la membrana de las células vivas emitiendo una fluorescencia verde y el yoduro de propidio se une a ácidos nucleicos de bacterias con daños en la membrana, es decir, bacterias muertas, emitiendo una fluorescencia roja. Con el programa Fiji se visualizó cada canal por separado (imágenes distintas), canal 1-verde para vivas y canal 2-rojo para muertas y con el código de % VIVAS y MUERTAS se obtuvieron los valores numéricos que indicaban la cantidad de pixeles que representaban las células por cada “slide”, para poder realizar las operaciones y obtener el porcentaje de vivas y después de muertas para cada biopelícula. Los resultados se muestran a continuación (Tabla 12):

**Tabla 12. Viabilidad de las células que constituyen la biopelícula**

Viabilidad de las células que constituyen la biopelícula		
Cepa	DL1	GSU1771
%Células vivas a 24 horas	96.29±1.83	89.43±5
%Células vivas a 48 horas	97.2±0.038	87.67±1.53
%Células vivas a 72 horas	92.27±5.18	84.28±3.07
%Células vivas a 120 horas		84.84±1.78

Como sabemos *G. sulfurreducens* es un microorganismo anaeróbico, por lo que trabajar con él es un poco más complicado, ya que al entrar en contacto con el oxígeno se empiezan a morir las células. En este experimento es necesario sacar el FTO de su medio de cultivo anaeróbico para teñirlo y tomar sus “slides” en el microscopio confocal, por lo que se intenta disminuir la cantidad de células muertas al adicionarle solución salina con cisteína 100 Mm (generando un medio reductor) en su preparación de las muestras, evitando que se sequen y trabajando rápidamente. Los porcentajes de células vivas de las biopelícula de la cepa DL1 se encuentran arriba del 90%, mientras que en GSU1771, están arriba del 80%, estas son buenas proporciones que nos indican que se fue eficiente al procesar las muestras y que esta proporción de células se encuentra viable y están metabólicamente activas en ese momento, lo que es importante ya que nos indican que la biopelícula generada es buena para el transporte de electrones a una superficie que acepta electrones, ya que como mencionamos antes, esta transferencia de electrones depende en parte del número de células metabólicamente activas que pueden apilarse en la superficie. Estos datos se complementan con la observación de las imágenes tomadas de las Figuras 8, 9 y 10, en los cuales casi no se aprecian células muertas y predomina la fluorescencia verde.



La diferencia en el porcentaje de células vivas entre DL1 y la mutante GSU1771, pudo haber sido por la estructura particular de la mutante GSU1771, la cual es en forma de pilares, por lo que tiene una mayor zona de exposición al oxígeno que la cepa silvestre, la cual solo es plana, también se piensa que pudo haber sido por el mayor tiempo de exposición al oxígeno que sufrió la mutante GSU1771, ya que al tener una biopelícula más gruesa, el tiempo de tomar sus cortes fue más largo que la cepa DL1.

A continuación, con el programa Comstat (Heydorn A. et al, 2000) se calcularon los parámetros anteriormente mencionados: el grosor y la cobertura del sustrato de DL1 y de la mutante GSU1771 de las imágenes obtenidas por microscopia confocal. Los resultados se muestran en la siguiente tabla (Tabla 13):

**Tabla 13. Características de la biopelícula formadas por DL1 y la mutante GSU1771**

Cepa	Grosor ( $\mu\text{m}$ )		% de cobertura del sustrato	
	DL1	GSU1771	DL1	GSU1771
24 horas	6.88 $\pm$ 0.23	20.31 $\pm$ 1.15	1.37 $\pm$ 0.51	21.32 $\pm$ 5.96
48 horas	8.48 $\pm$ 0.68	24.56 $\pm$ 0.27	9.47 $\pm$ 1.23	18.37 $\pm$ 2.39
72 horas	9.75 $\pm$ 2.02	24.63 $\pm$ 1.24	8.64 $\pm$ 0.36	23.18 $\pm$ 1.73
120 horas		26.82 $\pm$ 6.74		25.43 $\pm$ 7.07

Se calculó el grosor debido a que es de los parámetros más importantes que se reportan cuando se caracteriza la biopelícula. Los grosores más altos corresponden a la mutante GSU1771 en el tiempo de 120 horas. A 72 horas la mutante es 2.7 veces más gruesa que la DL1, a 48 horas es 2.9 veces y a 24 horas es 2.95 veces, con esto podemos ver que desde las 24 horas la cepa mutante genera una biopelícula mucho mayor que la DL1, esto se puede relacionar con la sobreexpresión de PilA (proteína estructural del pili) y de algunos citocromos en la cepa mutante (Tremblay *et al*, 2011; Martinez, 2018), además de la estructura que se observó con anterioridad, que es la que le ayuda a crecer verticalmente y con ello tener un mayor grosor. Estos resultados se pueden comparar visualmente con las imágenes obtenidas del microscopio confocal y por tal grosor, esta podría ser una mutante altamente conductiva.

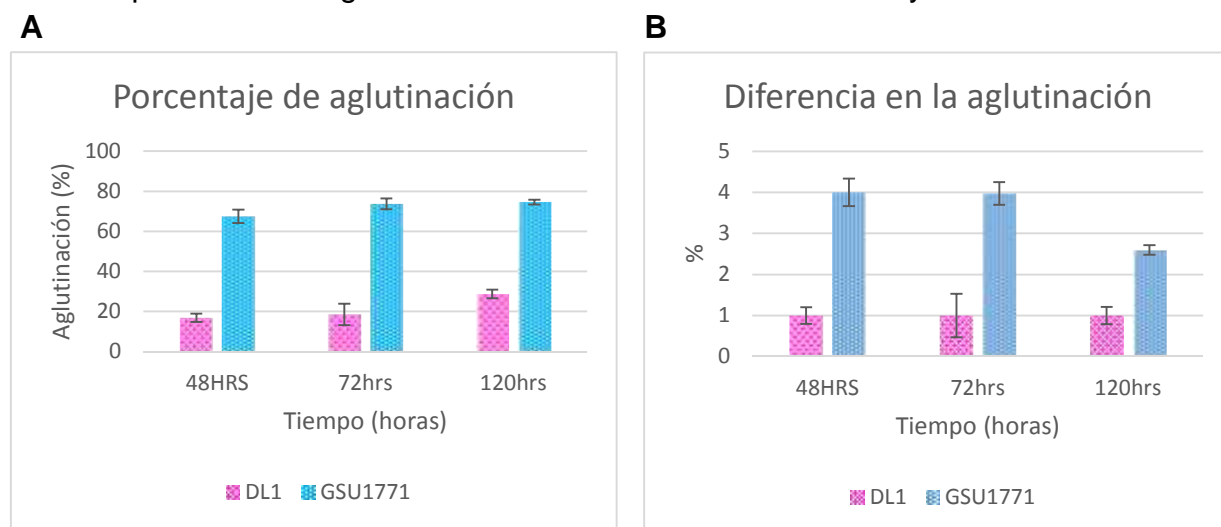
El parámetro de cobertura del sustrato nos dice que porcentaje del área del soporte o sustrato esta cubierta por biomasa de la biopelícula y también nos dice que tan eficiente es dicho sustrato para ser colonizado por la cepa estudiada. Como se observó en la Tabla 13, el porcentaje de cobertura del sustrato es relativamente

bajo, menor al 30%, el porcentaje de cobertura aumenta en el tiempo, pero no pasa del valor mencionado. La cepa DL1 tiene una cobertura mucho menor que la mutante, por lo que aunque son bajas las proporciones de la mutante, son mucho mejores que la cepa silvestre, donde también podemos observar que a 24 horas la mutante tiene 15.6 veces mejor cobertura que la DL1, después la cobertura de GSU1771 se mantiene entre 2 y 3 veces mejor que DL1 a 48 y 72 horas. Solo se ha reportado una cobertura del 60% de la cepa silvestre sobre la superficie de una celda microbiana de combustible (Richter LV. et al, 2012). Sería interesante probar esta mutante en MFC, para ver que tanto se ve aumentada su cobertura, por lo mencionado anteriormente.

### 1.2.2 Aglutinación

La aglutinación es una característica de las células bacterianas y consiste en la formación de agregados en la base del soporte, el fenotipo de aglutinación está relacionado con la formación del pili en *G. sulfurreducens* (Reguera et al., 2005, 2007).

Como se ha mencionado antes, el pili juega un papel importante para la formación óptima de la biopelícula electroactiva, pero también es necesario para la agregación de las células, (Reguera G. et al., 2007; Juárez et al., 2009), con este ensayo podemos cuantificar la cantidad de agregados que se forman en comparación con las células en suspensión que quedan en el medio y así relacionarlo a la formación de la biopelícula. La Figura 11 muestra los resultados del ensayo:



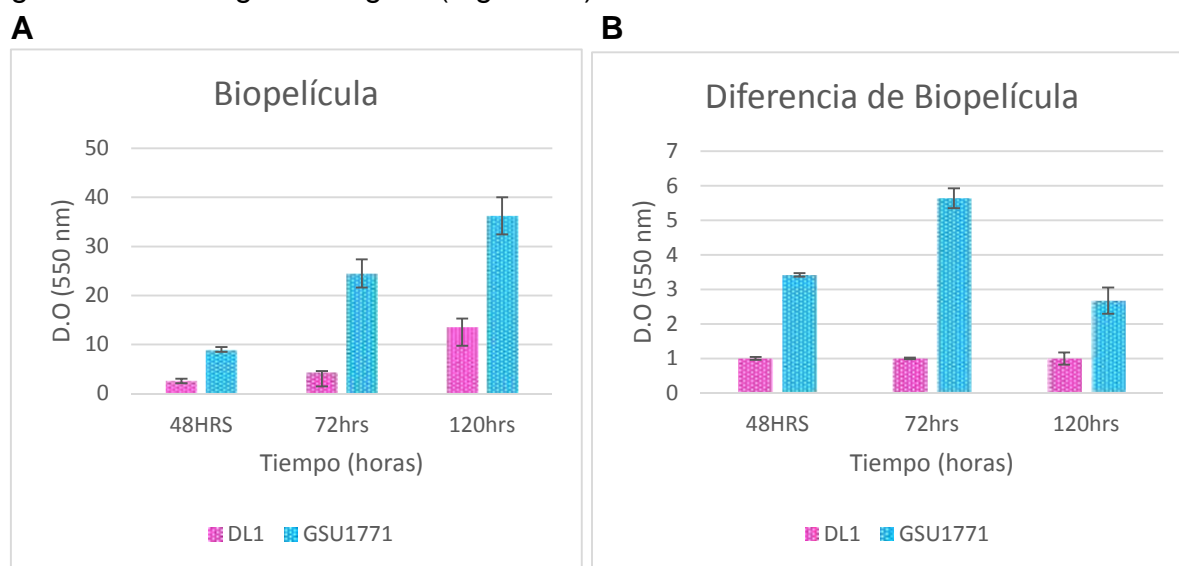
**Figura 11. Porcentaje y diferencia de aglutinación en DL1 y mutante GSU1771.** Se cuantificó la aglutinación a 48, 72 y 120 horas. En cultivos a 25°C. A) Porcentaje de aglutinación B) Diferencia de aglutinación.

La mutante GSU1771 y la cepa DL1 fueron crecidas en fumarato como aceptor de electrones a 25°C, condición de temperatura que favorece la formación del pili (Reguera *et al*, 2005). La mutante GSU1771 presenta un mayor porcentaje de células aglutinadas que la cepa DL1, hasta 400% más que la DL1 a las 48 y 72 horas, a las 120 horas este porcentaje disminuye porque la DL1 se comienza a sedimentar y la lectura de las células en suspensión por consiguiente es menor. Como se mencionó, el fenotipo de la aglutinación está relacionado con la formación del pili (Reguera *et al*, 2005), por lo que con este ensayo podemos ver que la mutante GSU1771 forma una mayor cantidad de biopelícula y por consiguiente se esperaba que tenga una mayor expresión de *pilA*, forme más pili y sea más conductivo, también se piensa que la aglutinación de alguna forma se ve favorecida por el tipo de estructura que observamos anteriormente en la mutante GSU1771, lo que hace que se aglutinen más las células.

### 1.2.3 Cuantificación de la formación de Biopelícula

Esta cuantificación se realizó empleando una tinción con cristal violeta como se menciona en material y métodos.

Con la tinción vivas y muertas podemos analizar la estructura de la biopelícula, su porcentaje de células vivas para determinar su viabilidad, entre otras características, pero para determinar la biopelícula total es necesario realizar el ensayo con cristal violeta (Pantarella F. *et al.*, 2013), con esto podemos cuantificar la cantidad de biopelícula que se forma. Los resultados de la determinación de la biopelícula se gráficán en la siguiente figura (Figura 12):



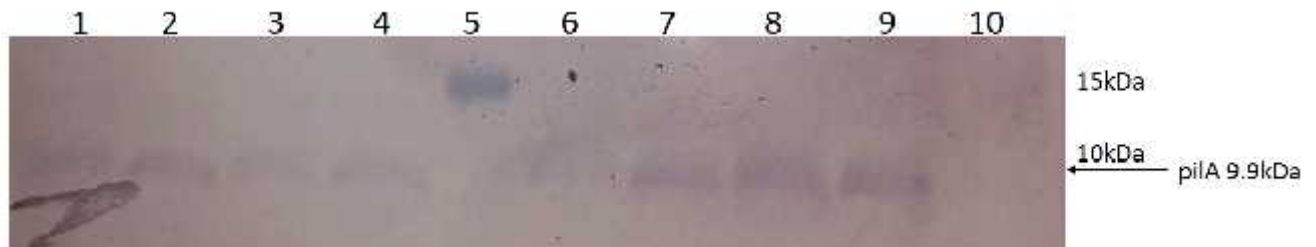
**Figura 12. Determinación de Biopelícula con cristal violeta de DL1 y mutante GSU1771.** Se cuantifico la biopelícula a 48, 72 y 120 horas. En cultivos a 25°C. A) Biopelícula B) Diferencia de Biopelícula.

En la figura anterior (Figura 12) se puede observar que la mutante GSU1771, tiene una producción mucho mayor de biopelícula que la cepa silvestre DL1, complementando con estos resultados, los resultados obtenidos en la tinción de vivas y muertas, donde claramente se observa por el grosor y las imágenes obtenidas con el microscopio confocal, que la mutante GSU1771, forma una mayor biopelícula que la DL1. La mutante GSU1771 aumenta la cantidad de biopelícula en el tiempo, mientras que la DL1 aumenta, pero lentamente y sin tanta diferencia.

La diferencia que se encuentra a las 72 horas de GSU1771 con respecto a DL1 es de 6.4 veces más cantidad de biopelícula, esta gran cantidad de biopelícula generada por la mutante GSU1771, se le puede atribuir a la sobreexpresión de PilA (proteína estructural del pili) que genera la mutante y se ve reflejada en la mayor producción de biopelícula (Tremblay PL., 2011; Almanza, 2018; Martinez, 2018). Como ya se mencionó, los FTOs están hechos con óxidos metálicos, por lo que son más adhesivos y mejores para la formación de biopelícula, pero debido a factores como el tamaño disparejo de estos, se cambió a vidrio plano, en tubos.

### 1.3 Inmunodetección de PilA

Para confirmar lo planteado anteriormente, se realizó un Western blot o inmunodetección, para ver la expresión de PilA a diferentes tiempos. Ya que se había reportado que se encontraba sobreexpresada en la mutante que realizó Tremblay (2011) y en los trabajos hechos por Martínez (2018) de GSU1771, donde mediante una RTqPCR observó la sobreexpresión de *pilA*. La PilA tiene una gran importancia en los procesos de transferencia extracelular de electrones y para la formación de biopelícula en *G. sulfurreducens* (Tremblay PL., 2011; Almanza, 2018; Martinez, 2018). En la siguiente figura se presenta la inmunodetección de PilA (Figura 13):



**Figura 13. Inmunodetección de PilA.** La proteína PilA o pilina tiene 90 aminoácidos que corresponden a un tamaño de 9.9kDa. Carril 1. DL1 a 24 horas, Carril 2. GSU1771 a 24 horas, Carril 3. DL1 a 48 horas, Carril 4. GSU1771 a 48 horas, Carril 5. Marcador Page Ruler, Carril 6. DL1 a 72 horas, Carril 7. GSU1771 a 72 horas, Carril 8. DL1 a 120 horas, Carril 9. GSU1771 a 120 horas, Carril 10. pilA. Se utilizaron 5 µg de proteína de cada una de las muestras.

**Tabla 14. Factor de cambio en la cantidad de pilina producida**

Factor de cambio en la cantidad de pilina producida	
DL1	1
GSU1771-24 horas	1.4
GSU1771-48 horas	1.9
GSU1771-72 horas	2.3
GSU1771-120 horas	1.2

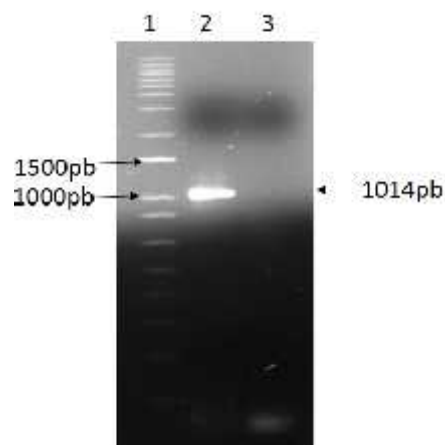
Podemos observar que efectivamente la proteína PilA se sobreexpresa en la mutante GSU1771, en todos los tiempos se ve una banda más intensa en donde se encuentra la mutante GSU1771, siendo a 72 horas donde se ve una mayor diferencia en la sobreexpresión de PilA de 2.3 veces mayor GSU1771 que la DL1 (Tabla 14), con esto podemos corroborar los anteriores resultados, que confirmaban la sobreexpresión de PilA en el tiempo.

## 2. Complementación de la mutante GSU1771

La complementación de una mutante se realiza para comprobar que el fenotipo observado se debe a la mutación que se está estudiando.

### 2.1 Complementación

Después de haber caracterizado a la mutante GSU1771, se complementó la mutante para corroborar que el fenotipo presentado por esta mutación era debido a la delección del gen *gsu1771*. Se generaron los oligonucleótidos de la Tabla 5 para que se amplificaran un fragmento de 1014pb que tiene al gen *gsu1771* (WT1771) de 648pb (Figura 14).

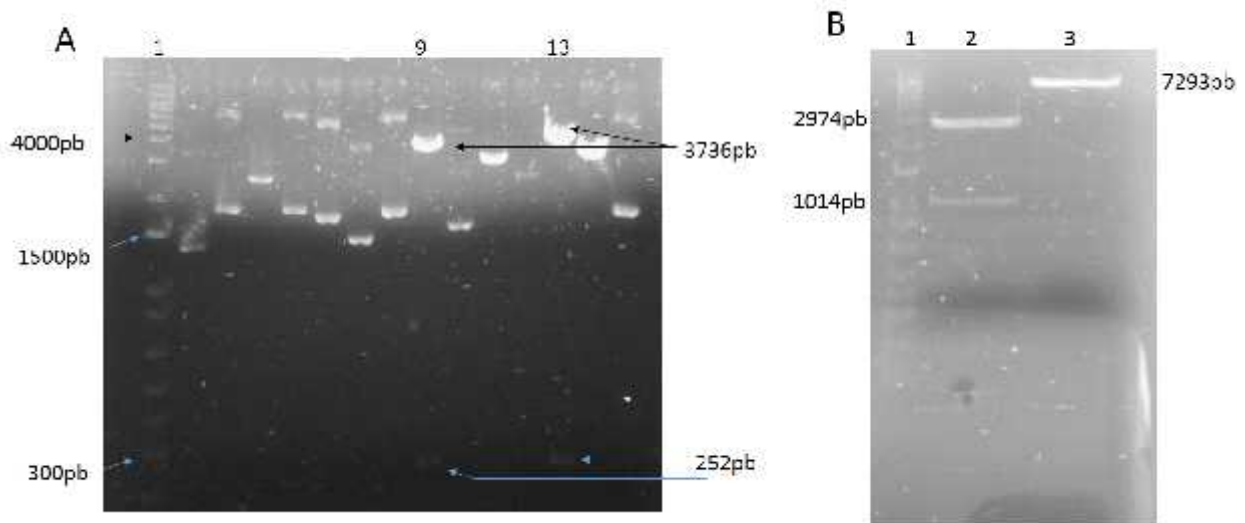


**Figura 14. PCR del fragmento que contiene al gen *gsu1771*.** Carril 1. Ladder, Carril 2. Fragmento de 1014pb, Carril 3. Control -

Se hizo clonación del fragmento WT1771 en el plásmido *pjet1.2* con resistencia a Ampicilina y se realizó digestión con HindIII, para observar las bandas correspondientes (Figura 15 A) que tuvieran el fragmento WT1771 y para determinar la dirección del fragmento WT1771 (5'→3'). Se obtuvo la secuencia de la clona PCLD1 realizada en la Unidad de Síntesis Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología, UNAM y se analizaron las secuencias en los programas ApE y BioEdit.

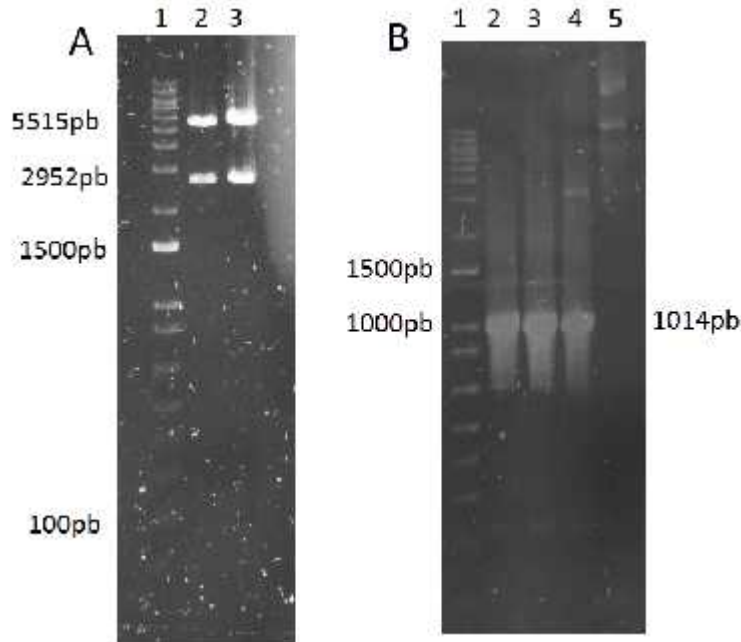
En el análisis de las secuencias se detectó un cambio de una base G a A (TTG a TTA), en ambos casos es una Leucina, se analizó la secuencia con el programa Softberry, y la mutación no se encontraba dentro del gen ni de la posible región promotora, por lo que se prosiguió con la subclonación (Figura 15 B).

La clona obtenida se nombró como PCLD1=XLB/pjet1.2/WT1771



**Figura 15. Clonación.** El *pjet1.2* es 2974pb, el fragmento WT1771 es de 1014pb y el *pRG5* es de 7293pb. A) Restricción enzimática con HindIII para encontrar al plásmido *pjet1.2/WT1771* (clona PCLD1), HindIII genera dos bandas (3736pb y 252pb). Carril 1. Ladder, Carril 9. PCLD1(1), Carril 13. PCLD1(2) B) Restricción enzimática con HindIII a plásmido pre digerido con EcoR1, para empezar a subclonar. Carril 1. Ladder, Carril 2. PCLD1, Carril 3. *pRG5*.

Se subclonó en XLB+*pRG5* y se seleccionaron colonias blanquecinas en IPTG+XGAL+Sp+Tc, para corroborar que efectivamente se encontraba el fragmento WT1771 en el plásmido *pRG5* se hizo digestión con SacII (Figura 16 A), ya que esta enzima parte el fragmento WT1771 en uno de sus cortes y genera un bandeo de tres bandas al tener el fragmento. Después se realizó una PCR con los oligonucleótidos que se usaron en un principio para corroborar que seguía el fragmento WT1771(Figura 16 B), en el carril 2 y 3 se encuentra el *pRG5* con el fragmento WT1771, en el carril 4 está la clona PCLD1 como control positivo y en el carril 5 el solo el *pRG5* como control negativo, lo que nos indica que en efecto se subclonó correctamente nuestro fragmento del WT1771 en el *pRG5*.



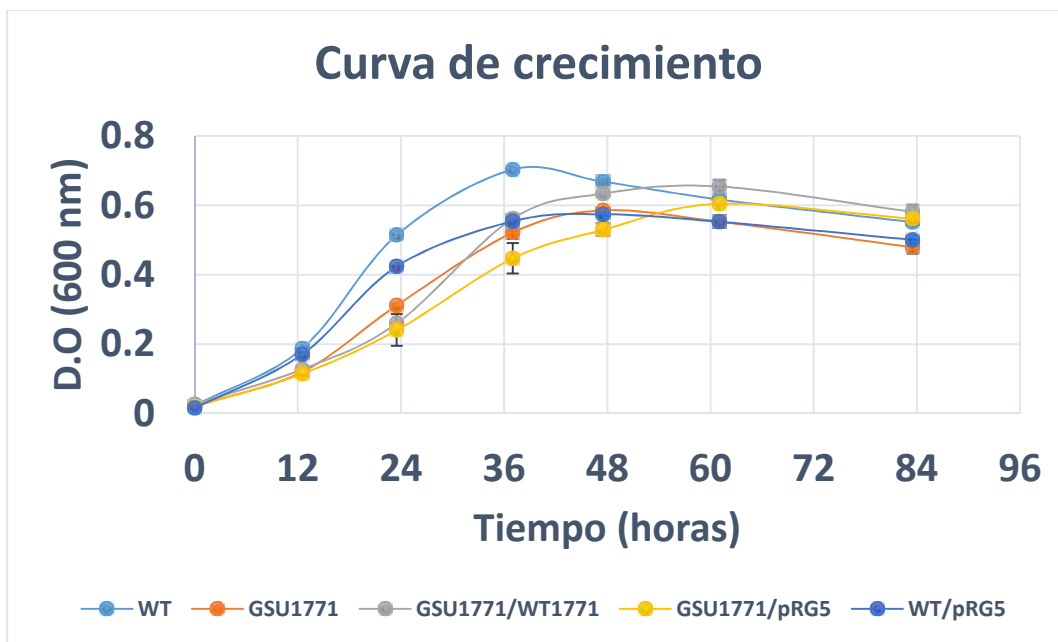
**Figura 16. Subclonación.** El *pRG5* es 7293pb, el fragmento WT1771 es de 1014pb. A) Restricción enzimática con *SacI* del plásmido *pRG5/WT1771*, *SacI* genera tres bandas (5515pb, 2952pb y 100pb) y corta al fragmento WT1771. Carril 1. Ladder, Carril 2. *pRG5/WT1771*(1), Carril 3. *pRG5/WT1771*(2). B) PCR para corroborar la presencia del fragmento WT1771 Carril 1. Ladder, Carril 2. *pRG5/WT1771*(1), Carril 3. *pRG5/WT1771*(2), Carril 4. Control + (*PCLD1*), Carril 5. Control - (*pRG5*).

Se clonó en las células electro competentes previamente generadas de la mutante *GSU1771*, la *GSU1771/WT1771* (mutante complementada) y la *GSU1771/pRG5* (mutante con solo el plásmido *pRG5*) y se sembraron en medio sólido de NBAF con Espectinomicina.

## 2.2 Caracterización de la mutante *GSU1771* complementada

### Crecimiento empleando fumarato como aceptor de electrones

Al obtener colonias crecidas en medio NBAF con la resistencia a Espectomicina, se empezaron las curvas respectivas para observar su fenotipo y determinar si se complementaron correctamente. Para evaluar la reducción de fumarato se utilizaron los cultivos en medio NBAF, el cual tiene acetato como donador de electrones y fumarato como aceptor, como anteriormente se mencionó. Se ve el crecimiento por triplicado de la WT (*DL1*), la mutante *GSU1771*, la mutante *GSU1771* complementada (*GSU1771/WT1771*), la *GSU1771* con el *pRG5* solo (*GSU1771/pRG5*) y la *DL1* con el *pRG5* solo (*WT/pRG5*) (Figura 17):



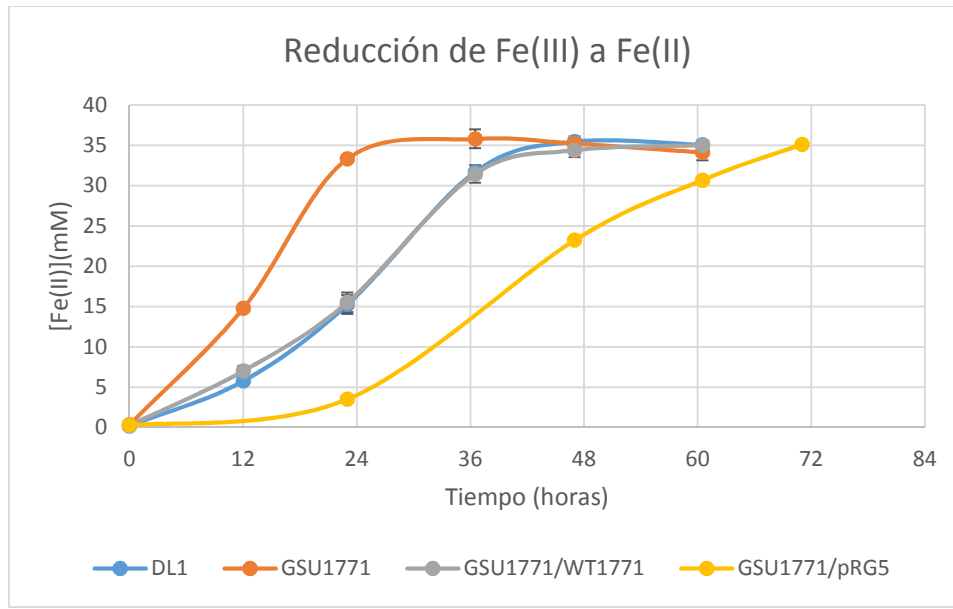
**Figura 17. Curva de crecimiento en NBAF con GSU1771 complementada.** Se tomó muestra cada 12 horas por triplicado a 600 nm

Se observó el mismo comportamiento que la anterior cinética en la mutante, el retraso en el crecimiento relacionado con la posibilidad de que el regulador GSU1771 controle algunos genes implicados en el transporte y metabolismo del fumarato (Almazán, 2018; Martínez, 2018). Mientras que la mutante complementada presenta un crecimiento menor que la cepa DL1, pero a las 36 horas mayor que la mutante GSU1771, este retraso es debido a la carga metabólica que se le atribuye al plásmido *pRG5*, como se ha observado en otros trabajos con este plásmido (Juárez, *et al*, 2009; Burgos-Gamez, 2018) y como controles se puso a la mutante con el *pRG5* solo y a la cepa silvestre con el *pRG5* solo, donde se vio que efectivamente se presenta el mismo retraso en el crecimiento con sus respectivas cepas, la GSU1771 y la WT respectivamente.

### Reducción de Fe(III) soluble como aceptor de electrones

Por último, se evaluó la reducción de Fe(III) a Fe(II) con el medio citrato férrico, para ver si la mutante complementada presenta el mismo fenotipo que la cepa DL1, ya que se le regresó su gen que se le deletó, el gen *gsu1771* (Almanza, 2018), como ya se mencionó, el acetato como donador de electrones y Fe(III) soluble como aceptor. Los resultados de la cinética se muestran en la siguiente figura (Figura 18):





**Figura 18. Curva de Reducción de Fe(III) con mutante GSU1771 complementada.** Se tomó muestra cada 12 horas por triplicado a 600 nm

En la cinética de reducción de Fe(III) soluble a Fe(II), la mutante GSU1771 presenta la reducción en menor tiempo que la DL1, esto como ya se mencionó podría deberse al incremento en la producción de citocromos tipo *c* en esta cepa (Almazán, 2018; Martínez, 2018), la mutante con solo el plásmido *pRG5* presenta una reducción retardada debido a la carga metabólica que se le atribuye al plásmido *pRG5* (Juárez, *et al*, 2009; Xadeni, 2018) y la mutante complementada presenta una reducción similar a DL1, lo que nos diría que en efecto se completó la mutante.

Como ya se había visto en estudios pasados, la sobreexpresión del gen *pilA* en la mutante GSU1771, se vio reflejada a lo largo de este trabajo. En la caracterización de la biopelícula, donde se observó en la microscopia confocal un grosor mucho mayor que en la cepa silvestre, además de una estructura característica que no se había visto antes en *Geobacter* en forma de pilares con canales, y una gran viabilidad que nos sugiere que la biopelícula de la mutante GSU1771 es capaz de ser más electroactiva que la DL1. También en el ensayo de aglutinación, los resultados indicaron una mayor aglutinación en la mutante, donde se sabe que la aglutinación está relacionada con la formación de pili. En la tinción con cristal violeta se determinó que la mutante igual generaba una mayor biomasa atribuyéndoselo a la sobreexpresión de *pilA* para la formación del pili, se sabe que el pili es primordial para la formación mayor de biopelícula. En la cinética de reducción de Fe(III) soluble se observó que ocurre más rápido que en la DL1, lo cual se atribuyó a la sobreexpresión de algunos citocromos relacionados en la reducción de Fe(III), vistos en estudios previos y de igual forma las cinéticas de reducción de Fe(III) con

la mutante complementada, nos indican que el gen *gsu1771* es responsable del fenotipo mutante observado y que la complementación fue un éxito.

## **XI. CONCLUSIONES**

- El gen *pilA* se sobreexpresa en la mutante GSU1771, favoreciendo la formación una biopelícula electroactiva más gruesa.
- La reducción de Fe(III) soluble a Fe(II) ocurre más rápido en la mutante GSU1771 que en DL1, lo cual podría estar relacionado al incremento en la producción de citocromos tipo *c* observado en estudios previos.
- La estructura de la biopelícula de la mutante GSU1771 tiene un grosor mucho mayor que la DL1 y se incrementa en el tiempo, se forman estructuras características como pilares con canales.
- La mutante se complementó exitosamente. El fenotipo observado en la reducción de Fe(III) de la DL1, se ve similar en la mutante GSU1771 complementada, confirmando que el gen *gsu1771* es responsable del fenotipo mutante observado.

## **XII. PERSPECTIVAS**

- ❖ Analizar la estructura de la biopelícula de la mutante GSU1771, mediante otras técnicas.
- ❖ Analizar la transferencia de electrones de la biopelícula generada por la mutante, empleando técnicas electroquímicas.
- ❖ Ver si la mutante es una mejor reductora de otros metales pesados.
- ❖ Ver la transferencia de electrones en CMC.

### XIII. ANEXOS

#### Medio de cultivo NBAF (litro)

Agua grado milli Q	8000 ml
Fumarato de sodio [1 M]	40 ml
NB Sales [100X]	10 ml
NB Minerales Elixir [100X]	10 ml
DL-Vitaminas	15 ml
CaCl <sub>2</sub> [0.4 %]	10 ml
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O [1.0%]	10 ml
NaHCO <sub>3</sub>	1.8 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O	0.5 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> [1 mM]	1 ml
C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> -3H <sub>2</sub> O	2.04 g
Aforar a 1L	
Resazurina [0.1%]	0.5 ml

1. Pesar todos los reactivos.
2. En una parrilla de agitación colocar un vaso de precipitado de vidrio con capacidad de 1000 ml y una barra de agitación, agregar 800 ml de agua grado milli Q.
3. En constante agitación, agregar uno a uno y en orden todos los reactivos listados.
4. Ajustar el volumen a 1000 ml.
5. Alicuotar en tubos o botellas para anaerobiosis (burbujear) y esterilizar.
6. No es necesario ajustar el pH, ya que por el buffer de carbonatos del medio debería quedar en un pH de 7.0.
7. Antes de inocular y de ser necesario, 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 que se produzca en el medio de cultivo.

Nota: se le adiciona después de burbujear la parte líquida 15 g de agar por litro en caso de ser medio NBAF sólido.

#### Medio de citrato férrico (litro)

Citrato férrico	13.7 g
Hidróxido de sodio [0.15 N]	500 ml
DL-Vitaminas	10 ml
DL-Minerales	10 ml
NaHCO <sub>3</sub>	2.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	0.25 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O	0.06 g

KCl	0.1 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> [1 mM]	1.0 ml

1. Pesar todos los reactivos, procurar que el citrato férrico no se exponga a la luz.
2. Prepara 500 ml de NaOH [0.15 N] y poner en hielo con anterioridad.
3. En una parrilla de calentamiento con agitación, colocar un vaso de precipitado de vidrio con capacidad de 1000 ml y agregar 400 ml de agua grao milli Q y una barra de agitación. Es importante cubrir completamente el vaso de precipitado con papel aluminio antes de iniciar y no removerlo hasta concluir.
4. Calentar el agua hasta el punto de ebullición, una vez que empiece a burbujear se trasladara el vaso de precipitado, con ayuda de guantes o una franela, a una parrilla de agitación sin calor. Rápidamente y con precaución se verterá el citrato férrico mientras se agita.
5. Una vez que el citrato férrico se haya disuelto, se colocará sobre la parrilla de agitación un recipiente que contenga agua con hielo, y dentro de este se pondrá el vaso de precipitado con el citrato férrico disuelto. Aún en agitación, se agregarán lentamente los 500 ml de NaOH [0.15 N] previamente preparado y enfriado.
6. Colocar un termómetro en la solución hasta que esta llegue a una temperatura de entre 20 a 25 °C, posteriormente se retira el del agua con hielo y se sigue agitando sin el termómetro.
7. Realizar la medición del pH con ayuda de un potenciómetro, llevar la solución a un pH de 7.0.
8. Sin detener la agitación, agregar en orden las soluciones y los reactivos restantes, DL-Vitaminas, DL-Minerales, NaHCO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O, KCl y Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>.
9. Agitar por 5 minutos más para asegurar la homogenización de la mezcla.
10. Ajustar el volumen a 1000 ml.
11. Alicuotar en tubos o botellas para anaerobiosis y esterilizar.
12. Antes de inocular y de ser necesario, agregar 0.1 ml de acetato de sodio 2.5 M [100X] por cada 10 ml de cultivo.

### Medio LB (litro)

Triptona	10 g
Levadura	5 g
NaCl	5 g
Agar (sólido)*	2 g

\* El agar solo es para el medio sólido

1. Pesar todos los reactivos.
2. En un frasco colocar 800 ml de agua Milli y agregar uno a uno y en orden todos los reactivos listados.

3. Ajustar el volumen a 1000 ml y esterilizar.
4. Medio LB (litro)

### Curva estándar de Fe(II)

Solución de Ferrozina (2 mM ferrozina en 50 Mm de HEPES)

Agua grado milli Q	8000 ml
HEPES	11.96 g
Ferrozina	1 g
Ajustar pH a 7	
Aforar	1 L

Solución de HCl 0.5 N

Solución patrón 40Mm:

Sulfato de etileno diamonio ferroso (SEDF)	0.153 g
HCl 0.5 N	10 ml

### Extracción de Plásmido/ Perclorato

1. Centrifugar en un tubo eppendorf hasta completar los 5 ml del cultivo de la colonia transformada crecida en LB con su antibiótico a 14000 rpm por 1 minuto.
2. Resuspender en 175 µl de TES
  - TES 15% Sacarosa
  - 50 mM TRIS pH 8.5
  - 50 mM EDTA pH 8.0
3. 25 µl de lisozima (10 mg/ml)
4. 20 minutos en hielo
5. 400 µl de agua helada
6. 15 minutos a 73°C
7. Centrifugar 20 minutos a 14000 rpm
8. Tirar pellet con palillo
9. 60 µl 5 M NaClO<sub>4</sub>
10. 600 µl isopropanol, mezclar y se ve opaco

11. Centrifugar 15 minutos y quitar sobrenadante
12. Lavar pellet con 1 ml de etanol al 70% dos veces
13. Secar a 37°C por 20 minutos con tubo destapado y resuspender en 50-100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O de acuerdo al tamaño del pellet.

#### XIV. BIBLIOGRAFÍA

- Aklujkar M., C. M. (2013). Proteins involved in electron transfer to Fe(III) and Mn(IV) oxides by *Geobacter sulfurreducens* and *Geobacter uraniireducens*. *Microbiology*, 515-35.
- Almanza, R. V. (2018). Construcción y caracterización de la mutante GSU177 en *Geobacter sulfurreducens* y su relación con la transferencia extracelular de electrones. *Tesis*, 1-.
- Bartolini M., C. S. (2018). Regulation of Biofilm Aging and Dispersal in *Bacillus subtilis* by the Alternative Sigma Factor SigB. *Journa Bacteriology*, vol201 p.14.
- Bertrand Aigle., X. P. (2005). Involvement of AlpV, a New Member of the Streptomyces Antibiotic Regulatory Protein Family, in Regulation of the Duplicated Type II Polyketide Synthase alp Gene Cluster in *Streptomyces ambofaciens*. *J Bacteriol.*, 2491–2500.
- Bowman SE., B. K. (2008). The chemistry and biochemistry of heme c: functional bases for covalent attachment. *Nat Prod Rep*, 1118-30.
- Burgos Gamez, X. (2018). Caracterización de la mutante PilRD53N del sistema de dos componentes PilS-PilR en *Geobacter sulfurreducens*. *Tesis de maestría en ciencias, IBT-UNAM*, 1-56.
- Butler JE., K. F. (2004). MacA, a diheme c-type cytochrome involved in Fe(III) reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *J Bacteriol*, 4042-5.
- Byoung-Chan Kim, C. L.-H. (2005). OmcF, a Putative c-Type Monoheme Outer Membrane Cytochrome Required for the Expression of Other Outer Membrane Cytochromes in *Geobacter sulfurreducens*. *J Bacteriol.*, 4505–4513.
- Caccavo F Jr., L. D. (1994). *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl Environ Microbiol.*, 3752-9.
- Childers SE., C. S. (2002). *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis. *Nature*, 767-9.
- Coppi MV., L. C. (2001). Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol.*, 3180-7.
- Costerton JW., L. Z. (1994). Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol.*, (8): 2137–2142.
- Dantas JM, B. A. (2017). NMR studies of the interaction between inner membrane-associated and periplasmic cytochromes from *Geobacter sulfurreducens*. *FEBS Lett.* , (12):1657-1666.
- Ding, Y.-H. R. (2008). Proteome of *Geobacter sulfurreducens* grown with Fe(III) oxide or Fe(III) citrate as the electron acceptor. *Biochim Biophys Acta*, 1935-41.
- DJF, L. D. (2019). *Geobacter* Protein Nanowires. *Front Microbiol.*, 10:2078.
- Elena SF., L. R. (2003). Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nat Rev Genet*, 457-69.
- Filman DJ, M. S. (2019). Cryo-EM reveals the structural basis of long-range electron transport in a cytochrome-based bacterial nanowire. *Commun Biol.*, 2(1):219.

- Galushko AS., S. B. (2000). Oxidation of acetate through reactions of the citric acid cycle by *Geobacter sulfurreducens* in pure culture and in syntrophic coculture. *Arch Microbiol*, 314-21.
- Gang Liu., K. F. (2013). Molecular Regulation of Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 112–143.
- Gingichashvili S, D.-A. D. (2019). The Adaptive Morphology of *Bacillus subtilis* Biofilms: A Defense Mechanism against Bacterial Starvation. *Microorganisms.*, 30;8(1).
- González Gutiérrez, M. G. (2018). Identificación de sRNAs en *Geobacter sulfurreducens* durante la reducción de fumarato y Fe(III). *Tesis de doctorado en ciencias*, 1-60.
- Hernández-Eligio, A., Andrade, Á., Soto, L., Morett, E., & Katy, J. (2017). The unphosphorylated form of the PilR two-component system regulates pilA gene expression in *Geobacter sulfurreducens*. *Environ Sci Pollut Res*, 25693-25701.
- Heydorn A., N. A. (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology.*, ( Pt 10):2395-2407.
- Heydorn, A., Nielsen, A., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B., & Molin, S. (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. . *Microbiology* , 146, 2395–2407.
- Hildur Palsdottir, J. P. (2009). Three-Dimensional Macromolecular Organization of Cryofixed *Myxococcus xanthus* Biofilms as Revealed by Electron Microscopic Tomography. *Microbial Cell Biology*, 2077-82.
- Holmes DE., C. S. (2006). Microarray and genetic analysis of electron transfer to electrodes in *Geobacter sulfurreducens*. *Environ Microbiol.*, 8(10):1805-15.
- Holmes DE., N. K. (2004). Comparison of 16S rRNA, nifD, recA, gyrB, rpoB and fusA genes within the family Geobacteraceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 1591-9.
- Huerta-Miranda GA, A.-E. A.-H. (2019). Influence of the major pilA transcriptional regulator in electrochemical responses of *Geobacter sulfurreducens* PilR-deficient mutant biofilm formed on FTO electrodes. *Bioelectrochemistry.*, 127:145-153.
- 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*, 146-158.
- Kaimer, S. T. (2020). The Predation Strategy of *Myxococcus xanthus*. *Front. Microbiol.*,, vol.11 art.2.
- Keane R, B. J. (2016). The predatory life cycle of *Myxococcus xanthus*. *Microbiology.* , (1):1-11.
- Kim BC., L. C. (2005). OmcF, a putative c-Type monoheme outer membrane cytochrome required for the expression of other outer membrane cytochromes in *Geobacter sulfurreducens*. *J Bacteriol.*, 4505-13.
- Leang C., C. M. (2003). OmcB, a c-type polyheme cytochrome, involved in Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *J Bacteriol.*, 2096-103.
- Leang C., Q. X. (2010). Alignment of the c-type cytochrome OmcS along pili of *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol.*, 4080-4.



- Lee K, Y. S. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J Microbiol Biotechnol.* , (6):1053-1064.
- Lloyd, J. R. (2003). Biochemical and genetic characterization of PpcA, a periplasmic c-type cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochemical Journal*, 153-161.
- Lovley. (2011). Powering microbes with electricity: direct electron transfer from electrodes to microbes. *Environ Microbiol Rep.*, 27-35.
- Lovley. (2012). Long-range electron transport to Fe(III) oxide via pili with metallic-like conductivity. *Biochem Soc Trans.* , 1186-90.
- Lovley DR, H. D. (2004). Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) Reduction. *Advances in Microbial Physiology*, 219-286.
- Lovley DR., L. D. (1990). Anaerobic Oxidation of Toluene, Phenol, and p-Cresol by the Dissimilatory Iron-Reducing Organism, GS-15. *Appl Environ Microbiol.*, 1858-64.
- Lovley DR., N. K. (2011). A shift in the current: new applications and concepts for microbe-electrode electron exchange. *Curr Opin Biotechnol.*, 441-8.
- Lovley DR., P. E. (1995). Fe(III) and SO reduction by *Pelobacter carbinolicus*. *Appl Environ Microbiol*, 2132–2138.
- Lovley DR., U. T. (2011). *Geobacter*: the microbe electric's physiology, ecology, and practical applications. *Adv Microb Physiol.*, 1-100.
- Lovley, D. (1995). Bioremediation of organic and metal contaminants with dissimilatory metal reduction. *J Ind Microbiol.*, (2):85-93.
- Lovley, D. (2006). Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nat Rev Microbiol.*, 4(7):497-508.
- Lovley, D. R. (2000). Fe(III) and Mn(IV) reduction. Lovley, D. R. 2000. *Fe(III) and MEnvironmental microbe-metal interactions*. ASM Press, Washington, D.C., p. 3–30.
- Martinez B., S. A. (2018). Estudio de la regulación transcripcional mediada por la proteína GSU1771 sobre los genes relevantes en la transferencia de electrones en *Geobacter sulfurreducens*. *Tesis*, 1-77.
- Mehta T., C. M. (2005). Outer membrane c-type cytochromes required for Fe(III) and Mn(IV) oxide reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol*, 8634-41.
- Méthé BA., N. K. (2003). Genome of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments. *Science* 302, 1967-1969.
- Methods, N. (2012). With the aid of informatics, microscopy is in the midst of a crucial evolution into a more quantitative and powerful technique. *Focus on Bioimage Informatics* , 9, 627.
- Mielich-Süss B., L. D. (2014). Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation. *Environ Microbiol.*, (3):555-65.
- Nguyen, T. a. (2019). A Production-Accessible Method: Spectrophotometric Iron Speciation in Wine Using Ferrozine and Ethylenediaminetetraacetic Acid. *J. Agric. Food Chem*, 680-687.
- Pantarella F, V. P. (2013). Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann Ig.*, 1):31-42.

- Philipp F.Popp, T. (2019). Coordinated Cell Death in Isogenic Bacterial Populations: Sacrificing Some for the Benefit of Many? *Journal of Molecular Biology*, Pages 4656-4669.
- Reguera G., a. K. (2019). The electrifying physiology of Geobacter bacteria, 30 years on. *Adv Microb Physiol*, 74, 1-96.
- Reguera G., M. K. (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, 1098-101.
- Reguera, G. N. (2006). Biofilm and nanowire production leads to increased current in Geobacter sulfurreducens fuel cells. *Appl. Environ. Microbiol.* , 72:7345-7348.
- Reguera, G. P. (2007). Possible nonconductive role of Geobacter sulfurreducens pilus nanowires in biofilm formation. *J Bacteriol.*, (189):2125-2127.
- Richter LV, F. A. (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. *J Bacteriol.* , 199(8).
- Richter LV, S. S. (2012). Two isoforms of Geobacter sulfurreducens PilA have distinct roles in pilus biogenesis, cytochrome localization, extracellular electron transfer, and biofilm formation. *J Bacteriol.* , 4(10):2551-63.
- Rollefson, J. b. (2011). Identification of an Extracellular Polysaccharide Network Essential for Cytochrome Anchoring and Biofilm Formation in Geobacter sulfurreducens. *Journal of Bacteriology*, 193, 1023-1033.
- Semenec L, V. I. (2019). Enhanced Growth of Pilin-Deficient Geobacter sulfurreducens Mutants in Carbon Poor and Electron Donor Limiting Conditions. *Microb Ecol.*, (3):618-630.
- Shu C, Z. Q. (2019). Direct Extracellular Electron Transfer of the Geobacter sulfurreducens Pili Relevant to Interaromatic Distances. *Biomed Res Int.*, 12p.
- Tan Y., A. R.-W. (2016). The Low Conductivity of Geobacter uraniireducens Pili Suggests a Diversity of Extracellular Electron Transfer Mechanisms in the Genus Geobacter. *Front Microbiol.*, 7:980.
- Tippapha Pisithkul, J. W.-N. (2019). Metabolic Remodeling during Biofilm Development of Bacillus subtilis. *American Society for Microbiology*, vol.10 e00623-19.
- Tremblay PL., S. Z. (2011). A c-type cytochrome and a transcriptional regulator responsible for enhanced extracellular electron transfer in Geobacter sulfurreducens revealed by adaptive evolution. *Environ Microbiol.*, 13-23.
- Ueki T, D. L. (2017 ). Toward establishing minimum requirements for extracellular electron transfer in Geobacter sulfurreducens. *FEMS Microbiol Lett.* , 364(9).
- Viollier, E. I. (2000). The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters. *Applied Geochemistry* , 785-790.
- Vlamakis H., C. Y. (2013). Sticking together: building a biofilm the Bacillus subtilis way. *Nat Rev Microbiol.*, (3):157-68.
- Wietzorrek A, B. M. (1997). A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Mol Microbiol.*, 1181-4.

- Wilking JN, Z. V. (2013). Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* , 110(3):848-52.
- Zhou T., N. B. (2017). Exopolysaccharides promote *Myxococcus xanthus* social motility by inhibiting cellular reversals. *Mol Microbiol.*, (4):729-743.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



## INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

### VOTOS DE APROBATORIOS

Presidente del Consejo Directivo del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **CASTREJÓN LÓPEZ DULCE BERENICE** con número de matrícula **20154001804** cuyo título es:

**Caracterización de mutantes en reguladores globales involucrados en la expresión de genes implicados en la generación de bioelectricidad en *Geobacter sulfurreducens*.**

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **Licenciado Ciencias Área Terminal de Bioquímica y Biología Molecular.**

Cuernavaca, Mor a 10 de junio del 2020

Atentamente

Por una Universidad Culta

SE ADICIONA PÁGINA CON LAS EFIRMAS DE LOS SIGUIENTES:

DR. RAMON ANTONIO GONZÁLEZ GARCIA-CONDE  
DR. ARMANDO HERNÁNDEZ MENDOZA  
DRA. KATY JUÁREZ LÓPEZ  
DR. RAMON ALBERTO BATISTA GARCÍA  
DRA. SONIA DÁVILA RAMOS

PRESIDENTE  
SECRETARIO  
VOCAL  
PRIMER SUPLENTE  
SEGUNDO SUPLENTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA** | Fecha:2020-06-10 11:20:34 | Firmante

qSbd1D6ZgtfXIPmHMoZ3XR6XyDCvui8/DmDqvge+9XMjAUwhk803XiOCFBFVXvVCJ8MeQeNhw2vrOHQkvHZgsS8+4zmB2tNL06LFCnNdLgDgrwMNI/qvxJxtU1XJ+7LhujBiw9pZqyRzwlPnDZJEuvysTDbvK4vGX7FOv0HORol4vqLgDviuBFdUo/LRwjNNWU+zDZMNRgvXSTXR/a3siSuFisr4euVKsk+1N/ouko6mSDp1xEb24R7yCn7OF0/RJQVxs9/DK+UKyS1QRdgF68JbRu9Y3wzKUSdwnizoiR4xGmw9eqWduPF/eAXS8Jj09Gi75QxwVe+10Gkc+5kug==

**SONIA DAVILA RAMOS** | Fecha:2020-06-10 15:14:08 | Firmante

nXaQe7Qx9dJnrCo8SE0O4vH77WL780W6lqzntbKt9iFKdaC4vo4MUOMdRPGlHcx+ZwGKe8dbs7zENXfxMWEM+ynrda0jhZm8OZnHsHhA6WH2j7Mq1TmWlMHHrw/nksurZ3q9rNvnkFOzb615VtXVmA27NHymSqxH1pgXfgym56SXfLfh0TjQVyoIE/oDJo/EzjFBluocvzAKQlnDtOclG3dW82D+ngNZK8AKwjpvinOurjMGA/+Yns2aYHB/EN2eBM3Ce2/mf/4xfyj/vYhq7WXz+wxUEC5Ot5oZs8rS3AUw3alb9nUVD5CxW6FJE9WPFJzD0knwVp+8EE6wgD+w==

**RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE** | Fecha:2020-06-10 15:44:20 | Firmante

WKKhnhVjr6DEETRSJfTcqpqnOUORSgpUO3YBCwq0ryMc+zIP1K5JnSaYOEYRKpCOX/5+pAmmh4h6h/rEK8YrR9yvwLSZagTsrBTLAY2I+8fEEIFJ/htMILDaCi24tNrvhGQOeK6JBGAA+UnNPAFGdE7ORBK9ek/BWU8pSFsYHU/bLR4hhwnRJM6EEe3RJCbW9Q4biZcmKWHR3aQsHppz5w3AT7w+RNq9eTKno9gftJWtQ8nx1+KEcbzyU6xYBkXUjD4H9E/U+3nzW0sShIVRg0Bvu4STJY0Nqs3OzcP396YByg12mtFEc0gPWIAbGWiGJ/LsO8Uu/4jL0LvtwNCZmQ==

**KATY JUÁREZ LÓPEZ** | Fecha:2020-06-10 16:13:00 | Firmante

ba21cUwHtYUtd1hO+rAMAXM5cZYtneCMJqbkzNH6Xf48qYWRXhBqGhGt4kUkgFZyW6GDnvCSFVPRbgSnk9k4LhTO3A46KgHFbeBmEAgLwGwW56grbKBdF38bELmfOp3Kobnz7zWjyy4nIrqCvIFUIA2qog/upY9khK1CBExMODTPKhljzxxEz8kEbV/HX2XkntVvvnqph6rQY+EINEWQTTBDatNWhTh3KIYjTz/h5sX+9VFZ11VhFfP0H7pC/KI6H/JtgglpA0p+1NgjJM7NkLtmPbmExYmplvJaQUEOLXn5otBqZ+zZWsecHyLHmg55wqWLTQbMLuSfyD92OK9/tg==

**ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA** | Fecha:2020-06-10 23:09:07 | Firmante

ogbZx/w41K5xN9yEb3VjQzMMtz/kjHlweUOmpbsLp/bxuddWqXibhcgYpWNdOESwGOilowk5uSuaLZP93WAXkRNBdHQpJvnCHpXRssNX510azn+y8D7ofz6Rt6XgNN7ZxN6zXost+zZvGLy3YsDTGbzceynK1dsT911CAMo9hayYjrHkPSzFBA1GmWRcN1g83v2heUmUPuxR/K+BnlmHJHMinW7bRT7YAu6ipeXqyl7PWPAY1hRySPRgyi//emqAPJvtiPpWHMzmIfKliwnT5rA52B03+7E3kO8uywMMRj51oxSkecfY/TsJAFQFA1NDd67u9+JrYZ/Vn+Ku5CGg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**pjzWqN**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/wzQQq8EqJctr7EpjgiOqOkxNsquymxNv>

