



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

ESCUELA DE ESTUDIOS SUPERIORES DEL JICARERO

**“Construcción y caracterización de la cepa mutante Δ GSU1771 de
Geobacter sulfurreducens y su relación con la transferencia
extracelular de electrones”**

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

P R E S E N T A

VÍCTOR HUGO ALMANZA REBOLLAR

DIRECTORES DE TESIS

DR. JOSÉ ALBERTO HERNÁNDEZ ELIGIO

MC TATIANA ITZEL CATALÁN RAMÍREZ

JOJUTLA, MORELOS

FEBRERO, 2022

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biorremediación y Producción de Bioelectricidad del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Cuernavaca, bajo la dirección del Dr. José Alberto Hernández Eligio.

El presente proyecto fue financiado por CONACyT y UNAM
Proyecto Ciencia Básica 255476
PAPIIT IN210017

Agradecimientos

Primero que nada, tengo que agradecer al gran arquitecto del universo por la sabiduría obtenida y que obtendré a lo largo de mi vida.

A mis tutores: Dr. José Alberto Hernández Eligio y M. en C. Tatiana Itzel Catalán Ramírez, que sin su paciencia, virtudes y constancia este trabajo no hubiera sido posible. Sus consejos fueron siempre útiles cuando las ideas no salían de mi pensamiento, ustedes formaron parte importante de esta historia con sus aportes profesionales. Muchas gracias por sus múltiples palabras de aliento cuando más lo necesite, por sus regaños que me levantaron en momentos de desmotivación, muchas gracias por sus orientaciones.

A mis padres: María Antonia y Álvaro, ustedes siempre han sido el motor que me impulsa, siempre han estado a mi lado en los días y noches más difíciles, siempre han sido mis mejores guías de vida, orgulloso de haberlos tenido como mis padres. Gracias por ser quienes son y creer en mí.

A la Dra. Katy Juárez por permitirme incorporarme a su grupo de trabajo del Instituto de Biotecnología, UNAM.

A la IQ Leticia Olvera Rodríguez por su apoyo técnico.

Agradezco al comité que revisó este trabajo y realizó las evaluaciones pertinentes en cada Seminario de Investigación. Los académicos: MC Tatiana Itzel Catalán Ramírez, MC Emma Liliana Arévalo Salina, Biol. Fanny Arminda Flores Gallegos, MC Humberto Flores Bustamante y Dr. José Alberto Hernández Eligio.

Finalmente, agradezco al sínodo de la Escuela de Estudios Superiores del Jicarero que participó en la evaluación final. Los académicos: Dr. Juan Manuel Rivas González, Biol. José Ernesto Gaspar Domínguez, Dr. José Alberto Hernández Eligio, Biol. Gerardo Valois Juárez e Ing. Jorge Aurelio Manzo Espín.

Dedicatorias

Dedico con todo mi corazón mi tesis a mi madre, pues no lo habría logrado sin ella. Tu bendición a diario a lo largo de mi vida me protege y me lleva por el camino del bien, tú me has forjado como la persona que soy en la actualidad y me motivas para convertirme en alguien mejor, muchos de mis logros te los debo a ti, incluyendo este. Por eso te doy mi trabajo en ofrenda por tu paciencia y amor, te amo madre mía.

Abreviaturas y definiciones

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

Co: Cobalto

CO₂: Bióxido de carbono

Fe: fierro

IS: secuencia de inserción

mA: miliamperes

mM: milimolar

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pH: Potencial de hidrógeno

Pili: son estructuras proteicas en forma de pelo más finas y cortas que los flagelos

Pilina: proteína estructural de los pili presentes en algunas bacterias

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio

U: Uranio

V: Vanadio.

V: Volts

WT: cepa silvestre o cepa parental

Índice

	Página
Resumen	10
Introducción	11
Antecedentes	13
Generalidades de <i>Geobacter sulfurreducens</i>	13
Importancia biotecnológica	14
Reducción de metales y producción de electricidad	14
Mecanismo de transferencia extracelulares de electrones	15
Características del pili	16
Regulación de la expresión genética del gen <i>pilA</i>	17
Antecedentes del gen <i>gsu1771</i>	18
Características generales del plásmido pK18mobsacB	18
Hipótesis	20
Objetivo general	20
Objetivos particulares	20
Materiales y métodos	21
Medio de cultivo NBAF	21
Medio de cultivo citrato férrico	23
Construcción de la cepa mutante Δ <i>gsu1771</i>	24
Protocolo para la construcción de la cepa Δ <i>gsu1771</i> de <i>G. sulfurreducens</i> usando el plásmido pk18mobsacB	24
Contraselección con sacarosa	25
Extracción de ADN cromosomal	25
PCR	25
Electroforesis de proteínas tipo SDS-PAGE	26
Cinéticas de crecimiento	27
Cuantificación de Fe(II)	27
Inmunodetección Western Blot	28
Preparación de fracciones membranales	29
Tinción hemo	30
Resultados	31
Construcción de la cepa mutante Δ <i>gsu1771</i>	32

Verificación de la cepa Δ <i>gsu1771</i> por PCR	32
Cinética de crecimiento	33
Cinética de reducción de Fe (III)	34
Contenido de citocromos tipo-c	35
Contenido de proteína PilA	36
Discusión	37
Conclusión	39
Perspectivas	39
Bibliografía	40

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Micrografía de <i>Geobacter sulfurreducens</i>	13
Figura 2. Modelo de transferencia extracelular de electrones en <i>G. sulfurreducens</i>	16
Figura 3. Estructuras secundarias de las proteínas pilinas (PilA) de <i>Pseudomonas</i> (izquierda) y de <i>G. sulfurreducens</i> (derecha)	17
Figura 4. Proceso de evolución adaptativa de <i>G. sulfurreducens</i>	18
Figura 5. Mapa del plásmido pK18mobsacB	19
Figura 6. Generación de condiciones anóxicas en los medios de cultivo	21
Figura 7. Preparación del medio de cultivo citrato férrico	24
Figura 8. Curva estándar usada para cuantificar la reducción de Fe(II)	28
Figura 9. NBAF sólido anaeróbico, con colonias de <i>G. sulfurreducens</i> resistentes a kanamicina	31
Figura 10. Estrategia de construcción de la cepa Δ <i>gsu1771</i> de <i>G. sulfurreducens</i>	32
Figura 11. Electroforesis de gel de agarosa con los fragmentos de PCR generados	33
Figura 12. Crecimiento en medio NBAF de las cepas de <i>G. sulfurreducens</i>	34
Figura 13. Fenotipo de reducción de Fe(III) de las cepas de <i>G. sulfurreducens</i>	34
Figura 14. Contenido de citocromos tipo- <i>c</i> de las diferentes fracciones membranales	35
Figura 15. Producción de pilina (PilA) en las cepas de <i>G. sulfurreducens</i>	36

Resumen

Atendiendo la problemática ambiental y dado el perfil profesional de la carrera de Licenciatura en Ciencias Ambientales, el presente trabajo de laboratorio se aborda como una “Alternativa biotecnológica” de “tratamiento de contaminantes”, en específico un proceso biotecnológico de bioremediación de metales pasados en el subsuelo, mantos acuíferos y en la generación de bioelectricidad funcionando como herramienta para la modelación de sistemas ambientales, siendo un apoyo para la preservación, remediación, restauración de los elementos y sistemas ambientales, así como el manejo de los recursos naturales, la gestión de energías renovables y limpias, todo esto como una estrategia de planeación ante el cambio climático.

En este trabajo se uso a *Geobacter sulfurreducens* como modelo de estudio. *G. sulfurreducens* una bacteria muy eficiente en los procesos la reducción de metales pasados y la producción de bioelectricidad, realizando estos procesos a través de la transferencia extracelular de electrones. Para este proceso, están involucradas una estructura conductiva tipo pili, varios citocromos tipo-*c* y, la formación biopelícula. En este trabajo, se estudió al regulador GSU1771 y su participación en la transferencia extracelular de electrones. Para lo anterior, primero se construyó una cepa mutante con una delección de la región codificante del gen *gsu1771* mediante el uso del sistema pK18mobsacB. La cepa Δ *gsu1771* presentó un incremento en la reducción de Fe(III) a Fe (II) soluble comparado a la cepa silvestre; sin embargo, presentó un retraso en el crecimiento en medio NBAF con respecto a la cepa silvestre. El incremento en la velocidad de reducción de Fe(III) soluble por la cepa silvestre, se debe a que produce más cantidad de citocromos tipo-*c* con respecto a la cepa silvestre, dato que fue verificado mediante purificación fraccionada de citocromos tipo-*c* y tinción hemo. Por otro lado, al realizar pruebas de inmunodetección tipo western blot se observó que la cepa Δ *gsu1771* produce más proteína estructural del pili, PilA. Basados en los resultados antes mencionados, este trabajo sugiere que el gen *gsu1771* codifica para la proteína GSU1771 que funciona como represor de la transcripción del gen *pilA*, así como para varios citocromos tipo-*c*. Al sobreproducir la proteína PilA y citocromos tipo-*c*, la cepa mutante Δ GSU1771, posee un potencial enorme en la biorremediación de sitios contaminados con metales pesados y la producción de bioelectricidad.

Introducción

Los usos desmedidos de los recursos naturales por la humanidad han provocado serios problemas de contaminación ambiental, impactando severamente a los ecosistemas y ocasionando el calentamiento de la tierra. Por esta razón, numerosos grupos de investigación a nivel mundial se han enfocado en la búsqueda de fuentes alternativas de energía y tratamientos para descontaminar los suelos y las aguas, al mismo tiempo que contribuyan de manera sustentable a mitigar los daños ocasionados al planeta. En México, la biotecnología tomó notable importancia en las últimas décadas, dando como resultado la formación de centros de investigación especializados en biotecnología ambiental, en estos centros de investigación se han desarrollado múltiples investigaciones referente a la biorremediación y producción de energía amigables con el ambiente y de fuentes renovables (Erazo, 2008).

Una de las consideraciones más importantes en la búsqueda de fuentes alternativas de energía, es la liberación de CO₂ a la atmósfera; ya que algunas de ellas, como la combustión de los hidrocarburos, liberan grandes cantidades de CO₂, favoreciendo problemas de contaminación por la liberación de gases de efecto invernadero. Debido a lo anterior, se busca que las nuevas tecnologías de producción de energía sean carbono-neutrales, es decir, que solo liberen el carbono recién fijado a la atmósfera. En los últimos años, se han desarrollado diversas tecnologías que se enfocan en la utilización de la energía acumulada en la biomasa de desechos, para ser redirigida a otras formas de energía que la humanidad pueda utilizar, como son: la metanogénesis (CH₄), el biohidrógeno (H₂) y la bioelectricidad (Logan et al., 2006).

Uno de estos procesos es la generación de energía eléctrica por medio de microorganismos, los cuales habitan en el subsuelo. Estos microorganismos, generalmente aerobios, oxidan la materia orgánica y utilizan los metales pesados como aceptores extracelulares de electrones, transfiriendo así los electrones generados de su metabolismo a los óxidos de hierro presentes en el suelo. Algunos de los géneros de bacterias con especies electrogénicas activas son *Geobacter*, *Shewanella* y *Clostridium*. Para poder aprovechar el proceso de transferencia extracelular de electrones, se cultivan las bacterias en dispositivos llamados celdas microbianas de combustible, donde los

microorganismos oxidan la materia orgánica y, los electrones generados son trasferidos a un electrodo (Logan et al., 2006).

Geobacter sulfurreducens es una bacteria muy eficiente en la generación de bioelectricidad, así como en la biorremediación de sitios contaminados por metales pasados, esto se debe a que es capaz de transferir de manera extracelular los electrones resultantes de la oxidación de compuestos orgánicos a electrodos o metales. En *G. sulfurreducens* la transferencia extracelular de electrones esta mediada por una estructura conductiva tipo Pili y varios citocromos tipo-*c* localizados en membrana interna, periplasma y membrana externa (Lovley et al., 2006).

En un estudio reciente, mediante evolución adaptativa, se generaron unas cepas de *G. sulfurreducens* que presentan un incremento considerable en la reducción de óxidos de Fe(III) insolubles, comparada con la cepa silvestre. Al secuenciar el genoma de estas cepas, se observó que presentaban diferentes mutaciones, entre las que destacan la inserción de una base (Guanina) dentro de la región 5'-no traducida del gen *pgcA* y la inserción de un elemento IS dentro del gen *gsu1771* (Tremblay et al., 2011). Datos extras de ese trabajo, mostraron que en estas cepas se incrementaba la presencia de ARN mensajero del gen *pilA*, sugiriendo que el producto del gen *gsu1771* pudiera estar controlando la transcripción del gen *pilA* (Tremblay et al., 2011). Sin embargo, no se ha caracterizado los mecanismos de regulación, ni el efecto de la mutación en el gen *gsu1771* sobre la expresión de los genes que codifican para citocromos tipo-*c* involucrados en la transferencia extracelular de electrones.

Antecedentes

Características de *Geobacter sulfurreducens*

Uno de los géneros de bacterias con mayor abundancia e importancia en los procesos biogeoquímicos es *Geobacter*. Es de gran ayuda para la investigación el hecho de que esta bacteria es cultivable y, que ya se ha desarrollado las herramientas genéticas para estudios fisiológicos (Coppi et al., 2001). *Geobacter sulfurreducens* pertenece a la familia de las Geobacteraceae, las especies de esta familia habitan en sedimentos marinos, en sedimentos de agua dulce, ambientes subterráneos y acuíferos (Fig. 1). La característica principal de estos ambientes es la abundancia de nitratos y sulfatos, óxidos de hierro y manganeso, y al mismo tiempo que son espacios anóxicos. En estos sitios la reducción de Fe (III) es un proceso importante, por lo que *Geobacter sulfurreducens* es, por lo general, el microorganismo reductor de Fe(III) predominante de esos ambientes.

Geobacter sulfurreducens pertenece a la familia de las Geobacteraceae que están dentro del dominio de Phylum Proteobacteria, clase Deltaproteobacteria, y el orden Desulfuromonadales. Esta orden, ramifica filogenéticamente entre los órdenes Syntrophobacterales y Desulfarculales. La familia Geobacteraceae se puede dividir en tres grupos distintos: *Geobacter*, *Desulfuromonas* y *Desulfuromusa* (Holmes et al., 2004). Además, las especies de *Geobacter* se pueden clasificar en 3 clados: "sub-superficie clado 1", "subsuelo clado 2", y "*G. metallireducens* clado 3" (Holmes et al., 2007). *Geobacter sulfurreducens* pertenece al reino de las bacterias en la división de las protobacterias, de la clase delta, en la familia Geobacteraceae del género *Desulfuromonas*, predomina en los ambientes subsuperficiales reductores de Fe (III) por lo que corresponde al "clado 1 subsuperficial" o "clado subterráneo 2" (Holmes et al., 2007).

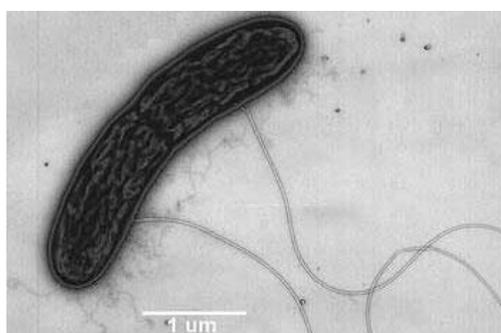


Figura 1. Micrografía de *Geobacter sulfurreducens*. Imagen tomada de Lovley et al., 2006.

Las condiciones óptimas para el crecimiento de *G. sulfurreducens* son: temperatura de 30 °C, pH óptimo de crecimiento de 7.7 a 7.5 aunque puede vivir a pH de entre 6.5 a 8.5 y puede crecer a bajas concentraciones de oxígeno (Lin et al., 2004). Aunque en un principio esta bacteria fue descrita como anaerobia estricta, estudios fisiológicos y de genoma han demostrado que es capaz de soportar o inclusive crecer a exposiciones bajas de oxígeno de hasta el 5%.

Importancia biotecnológica

La primera especie de *Geobacter* para la cual se desarrollaron métodos de manipulación genética fue *Geobacter sulfurreducens* (Coppi et al., 2001). Por tal razón, *G. sulfurreducens* es el modelo de elección para estudios genómicos funcionales, cuyo objetivo principal ha sido elucidar el metabolismo, la regulación de genes y la transferencia extracelular de electrones. En general, esta bacteria produce las densidades de corriente más altas en celdas microbianas de combustible, a comparación de otros microorganismos; además, son colonizadores muy comunes en los electrodos que recogen la electricidad de desechos orgánicos y sedimentos acuáticos (Bond et al., 2005). La principal importancia radica en su capacidad de facilitar la precipitación de radio núcleos y metales solubles, volviéndola una bacteria muy efectiva en la remediación de aguas residuales. Adicionalmente, en estos ambientes existe un intercambio directo de electrones interespecies, entre especies de *Geobacter* y socios sintróficos, procesos que pueden favorecer la remediación de agua residuales. Además de lo anteriormente descrito, las especies de *Geobacter* son unas herramientas muy eficientes para realizar el diagnóstico del estado fisiológico in situ durante la remediación de aguas subterráneas contaminadas, esto es demostrado por medio de la cuantificación de genes clave y proteínas de las comunidades de *Geobacter* (Blothe et al., 2008).

Reducción de metales y generación de electricidad

Unas de las capacidades más importantes de *Geobacter sulfurreducens* es la reducción de metales y la generación de bioelectricidad. Esta bacteria es capaz de reducir iones metálicos, obteniendo así la energía necesaria para soportar el crecimiento a partir de la reducción de estos elementos (Finneran et al., 2002). Esta bacteria, también es capaz de reducir metales tales como U(VI), V(V) y Co(III) (Lovley et al., 1993; Caccavo et al., 1994; Ortiz-Bernad et al., 2004a). En la mayoría de los casos, la reducción del metal

ocasiona que éste pierda solubilidad, precipitándose de forma sólida. Para la transferencia extracelular de electrones es necesario varios citocromos de tipo-*c* y el pili conductivo y la formación de una biopelícula (Lovley et al., 2006). Una biopelícula es una comunidad microbiana de uno o más microorganismos organizados y asociados a una estructura viva o inerte que secretan polisacáridos, los cuales les ayudan a mantener la estabilidad estructural, adherencia celular a la superficie y protección ante diferentes tipos de estrés, algunos antibióticos y radiación (Flemming et al. 2010). En *Geobacter sulfurreducens* la producción de biopelícula es esencial para la generación de electricidad, dichas biopelículas están constituidas por citocromos tipo-*c*, pilis y el exopolisacárido xap (polisacárido extracelular de anclaje). Algunos estudios han demostrado que cepas mutantes de *G. sulfurreducens* que no producen alguno de estos factores, tienen una deficiencia en el transporte de electrones y por consiguiente en la producción de bioelectricidad (Rollefson et al. 2011; Bonani et al. 2012).

Mecanismo de transferencia extracelular de electrones

Los nitratos, fumaratos y compuestos clorados son aceptores de electrones que algunas especies de *Geobacter* pueden reducir intracelularmente. Estudios bioquímicos de fracciones de *Geobacter* han identificado fracciones proteicas con actividad nitrato y nitrito reductasa (Murillo et al., 1999; Senko and Stolz, 2001). En esta bacteria el proceso de transferencia extracelular de electrones sucede de manera coordinada, ya que depende de una estructura de tipo pili, biopelículas y diversos citocromos tipo-*c* (Hernández et al. 2012). En el genoma de *G. sulfurreducens*, se encuentran 111 genes que codifican para citocromos tipo-*c* que están localizados en la membrana interna, periplasma y membrana externa. Como producto del metabolismo anaerobio de *G. sulfurreducens*, los electrones que se generan son transferidos del interior de la célula a la cadena respiratoria, generando un pool de electrones. El pool de electrones reduce a las menaquinonas presentes en membrana interna, las cuales transfieren los electrones a los citocromos localizados en membrana interna, entre los que se encuentra Cbc y ImcH (Ueki, 2021). Cbc y ImcH transfieren los electrones a una serie de citocromos periplásmicos de la familia Ppc, entre los que destacan PpcA. Los citocromos periplásmicos transfieren sus electrones a citocromos que se encuentran embebidos en la membrana externa, sobre la membrana externa, en el espacio extracelular y hacia el pili, hasta que finalmente, los electrones son dirigidos hacia metales, electrodos o a otras células (Fig. 2). Entre los citocromos de

membrana externa mas estudiados, están OmcS, OmcB, OmcC, OmcE y OmcZ (Ueki, 2021).

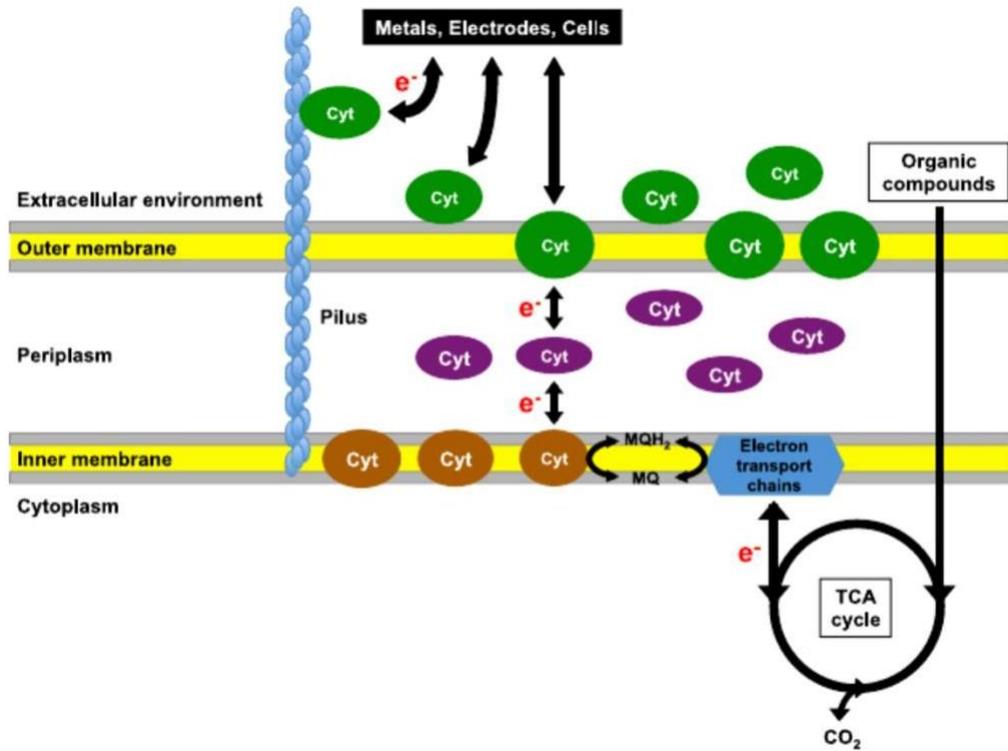


Figura 2. Modelo de transferencia extracelular de electrones en *G. sulfurreducens*. Imagen tomada de Ueki, 2021. Los compuestos orgánicos con oxidados (TCA cycle) y los electrones (e^-) son transferidos a varios citocromos (Cyt) localizados en membrana interna periplasma, membrana externa y pili (pilus) hacia metales, electrodos o células.

Características del pili

En *G. sulfurreducens* el pili participa en la transferencia extracelular de electrones hacia los óxidos de Fe(III), así como en la transferencia de electrones a un ánodo dentro de una celda microbiana de combustible y así generar bioelectricidad (Reguera et al., 2005, 2006; Krushkal et al., 2010). El pili de *G. sulfurreducens* esta formado por la proteína estructural pilina, PilA, cuyo gen *pilA* es sumamente regulado (Juárez et al., 2009; Hernández-Eligio et al. 2016). La proteína PilA de *G. sulfurreducens*, a diferencia de pilinas de otras bacterias, carece de un dominio globular presente en el C-terminal. Adicionalmente, la proteína PilA, a lo largo de su secuencia de aminoácidos presenta varios residuos aromáticos, los cuales favorecen la transferencia de electrones a través del pili hacia su aceptor final (Fig. 3). Una cepa mutante de *G. sulfurreducens* en el gen

pilA, no produce pili y, la bacteria es incapaz de reducir metales insolubles y producir bioelectricidad (Reguera et al., 2005). Por otro lado, el cambio de los aminoácidos aromáticos en la proteína PilA de *G. sulfurreducens*, hace que la bacteria produzca un pili, pero defectuoso en los procesos de transferencia extracelular de electrones (Vargas et al., 2013).

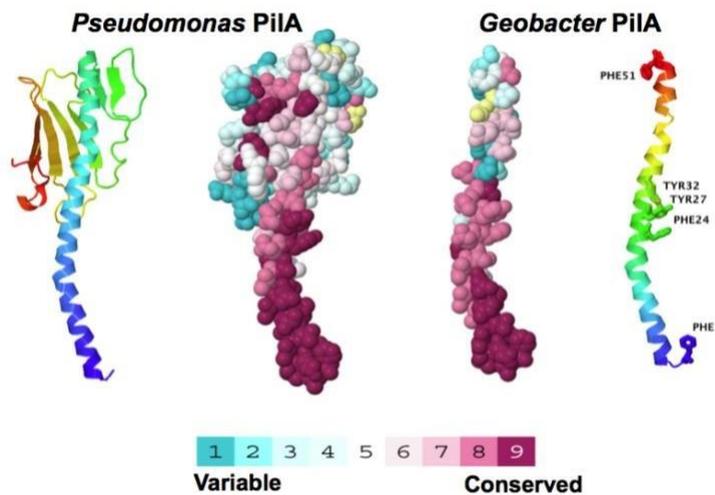


Figura 3. Estructuras secundarias de las proteínas pilinas (PilA) de *Pseudomonas* (izquierda) y de *G. sulfurreducens* (derecha). Imagen tomada de Vargas et al., 2013. Se muestran los modelos en listones y globulares de las proteínas pilinas. En la secuencia de aminoácidos de la proteína PilA de *G. sulfurreducens* se muestran la posición de los aminoácidos aromáticos (PHE1, 24, 51; TYR27, 32) responsables de la transferencia extracelular de electrones.

Regulación de la expresión genética del gen *pilA*

En *G. sulfurreducens* la expresión del gen *pilA* ocurre a partir de dos inicios de transcripción, el más importante de ellos depende de los reguladores σ_{54} y PilR. La mutación en el gen *pilR* tiene un efecto negativo en la expresión del gen *pilA*, y por lo tanto en el fenotipo de aglutinación (relacionado con la formación del pili) y reducción de Fe(III) (Juárez et al., 2009). En la región de regulación de *pilA*, se localizó un fragmento de ADN importante para la transcripción dependiente de PilR. Esta región, presenta dos grupos de secuencias, las cuales son los sitios de reconocimiento y unión de PilR, para activar la expresión del *pilA* (Hernández-Eligio et al., 2016). También, se conoce que una sustitución del residuo fosforilable de PilR por un residuo no fosforilable, tiene un efecto positivo sobre la expresión de *pilA* (Hernández-Eligio et al., 2016).

Antecedentes del gen *gsu1771*

En un trabajo previo, a través de ensayos de evolución adaptativa donde se creció a *G. sulfurreducens* durante dos años en óxidos de Fe(III) insolubles, se logró aislar dos cepas (V1 y V2) las cuales presentaron un incremento en la reducción de óxidos de Fe(III) con respecto a la cepa silvestre (Fig. 4). El incremento en la reducción de Fe(III) se relacionó con una elevada transcripción de los genes *pilA* y *pgcA* (Tremblay et al., 2011). Al secuenciar el genoma de ambas cepas, se encontró que ambas presentaban mutaciones en el gen *gsu1771*, que codifica para una proteína perteneciente a la familia SARP (del inglés, **S**treptomyces **A**ntibiotic **R**egulatory **P**roteins) (Tremblay et al., 2011). Esta familia de proteínas ha sido descrita en diversas especies de *Streptomyces* donde controlan la biosíntesis de metabolitos secundarios (Wietzorrek and Bibb, 1997).

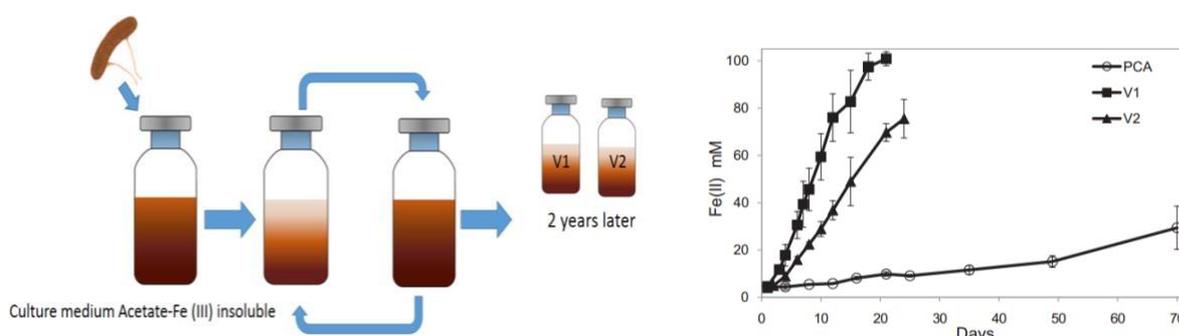


Figura 4. Proceso de evolución adaptativa de *G. sulfurreducens* (derecha). Cinética de reducción de óxidos de Fe(III) de las cepas generadas por evolución adaptativa (izquierda, imagen tomada de Tremblay et al., 2011). V1 y V2 son las cepas derivadas de la cepa silvestre. PCA es la cepa silvestre.

En *G. sulfurreducens*, el gen *gsu1771* está codificado en un monocistrón. El gen, codifica para una proteína de 215 aminoácidos. La proteína codificada por el gen *gsu1771*, al igual que los reguladores de la misma familia, posee un dominio de unión a ADN en la región N-terminal. En otras especies de *Geobacter*, se han encontrados homólogos del gen *gsu1771*; sin embargo, se desconoce su función y en ninguna especie se ha caracterizado su mecanismo de regulación y su participación en los mecanismos de transferencia extracelular de electrones (Tremblay et al., 2011).

Características generales del plásmido pK18mobsacB

El plásmido pK18mobsacB es un vector suicida de clonación, que permite su movilidad a una gran cantidad de bacterias Gramnegativas. El plásmido se puede

mantener por integración en el cromosoma de la célula hospedera por recombinación homóloga. Por otro lado, la eliminación del plásmido se lleva a cabo por un proceso de doble recombinación, la cual es facilitada por la contraselección en un medio de cultivo en presencia de sacarosa al 10%. El plásmido pK18mobsacB contiene el gen *sacB*, que codifica para una enzima Levan Sacarasa, la cual, en presencia de sacarosa produce los polímeros levanos (Fig. 5). Los levanos, en la mayoría de las bacterias gram-negativa es tóxico, incluyendo a *G. sulfurreducens*. Este plásmido ya se ha reportado para construir mutantes en *G. sulfurreducens*, por lo que en este trabajo se usará como herramienta para generar deleciones genéticas (Chan et al., 2015).

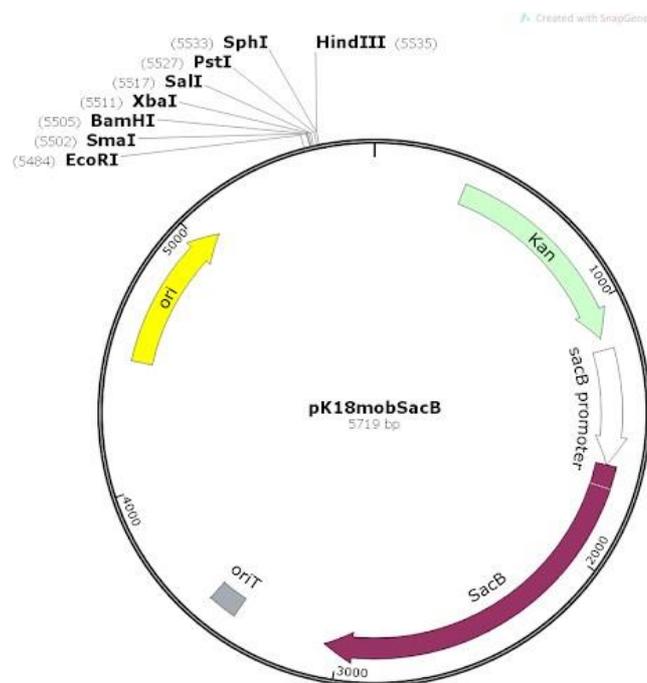


Figura 5. Mapa del plásmido pK18mobsacB. Ori, origen de replicación; kan, gen de resistencia kanamicina; *sacB*, gen que codifica a la enzima levan sacarasa; oriT, origen de transferencia.

Hipótesis

La mutación en el gen *gsu1771* de *G. sulfurreducens* aumentará la producción del pili, favoreciendo el incremento en la transferencia extracelular de electrones, lo cual resultará en aumento en la reducción de Fe(III) así como en la generación de bioelectricidad.

Objetivos

Objetivo general

Estudiar el mecanismo de control del regulador GSU1771 sobre el gen *pilA* y algunos genes que codifican para citocromos tipo-*c* relevantes en la transferencia extracelular de electrones

Objetivos particulares

- Utilizando el sistema pK18mobsacB, construir la cepa mutante Δ *gsu1771* en *Geobacter sulfurreducens*.
- Caracterizar la cepa mutante Δ *gsu1771* en cuanto a su capacidad de transferir electrones, en medio NBAF (acetato-fumarato) y citrato férrico (Acetato- Fe(III) soluble).
- Determinar la expresión de los genes importantes en la transferencia extracelular de electrones (*pilA*, *omcC*, *omcB*, *omcZ*, *omcE*) por western blot y perfil de citocromos.

Materiales y métodos

Medio de cultivo NBAF

Para crecer a las cepas de *G. sulfurreducens* se utilizó medio NBAF (Tabla 1). Es necesario que el medio se encuentre anóxico, por ello, usando una mezcladora de gases se burbujeo con una mezcla N_2 y CO_2 (en una relación 80:20) para desplazar el oxígeno tanto en la fracción soluble, como en la parte aérea (Fig. 6). Para un volumen de 10 mL, se burbujeo con la mezcla de gases por 8 minutos la parte soluble y 8 minutos la parte superior, seguido se sello el tubo con un tapón de goma y un casquillo de aluminio. Finalmente, se esterilizo el medio de cultivo. Al inocular las bacterias, al medio de cultivo se le agregaron aditivos como: cisteína [1] mM que sirve como amortiguador para el medio actuando como reductor de el oxígeno, y el extracto de levadura al 5% que actúa como fuente de nitrógeno.



Figura 6. Generación de condiciones anóxicas en los medios de cultivo.

Para garantizar un ambiente libre de oxígeno se utilizó una estación de gaseo la cual está equipada con una columna de cobre, que consiste en una columna de vidrio que en su interior contiene cobre que se utiliza para eliminar el oxígeno presente en el sistema, la inoculación de los cultivos se realizó con jeringas y agujas estériles, las cuales se purgaron del oxígeno con la mezcla de gases proveniente de la estación de gaseo.

Tabla 1 Reactivos para preparar 1 L de medio líquido NBAF

NBAF	100 ml
H2O Milli Q	800 ml
1M. Fumarato de sodio	40 ml
100x NB sales	10 ml
* 100x NB minerales elixir (Tabla 1.1)	10 ml
* DL vitaminas (Tabla 1.2)	15 ml
0.4 % CaCl ₂	10 ml
1.0% MgSO ₄ * 7H ₂ O	10 ml
NaHCO ₃	1.8 g
Na ₂ CO ₃ H ₂ O	0.5 g
1Mm Na ₂ SeO ₄	1 ml
Acetato de sodio 3H ₂ O	2.04 g
Resazurina 0.1 %	0.5 ml
Aforar al volumen	

Tabla 1.1 Reactivos para la preparación de minerales elixir para 1 L

*Mineral elixir:

Minerales elixir	1000 ml
H2O Mili Q	800ml
NTA Trisodium Salt (free acid)	1.5g
MgSO ₄	3.0g
MnSO ₄ * H ₂	0.5g
NaCl	1g
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0.1g
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0.1g
CaCl ₂ * 6 H ₂ O	0.1g
ZnCl ₂	0.13g
CuSO ₄ *5 H ₂ O	0.01g
AlK(SO ₄) *12 H ₂ O	0.01g
H ₃ BO	0.02g
Na ₂ MoO ₄ *2 H ₂ O	0.025g
NiCl ₂ * 6 H ₂ O	0.024g

Na₂WO₄ * 2 H₂O 0.025g

Aforar volumen

Tabla 1.2 Reactivos para la preparación de DL vitaminas para 1 L

H ₂ O Mili Q	800ml
Biotina	0.002g
Ácido pantoténico	0.005g
Vitamina B12	0.0001g
Acido p-aminobenzioco	0.005g
Ácido tioctico (alfa ipoico)	0.005g
Ácido nicótico	0.005g
Thiamine Hydrochloride	0.005g
Riboflavina	0.005g
Piridoxina HCl	0.01g
Ácido fólico	0.002g
Aforar volumen	

Medio citrato férrico

Se pesó 13.7 gramos de citrato férrico en un recipiente cubierto con papel aluminio para evitar el contacto con la luz, posteriormente se prepararon 500 ml de hidróxido de sodio al 0.5 N (NaOH) y se puso en hielo. Después, se colocaron 400 ml de agua y una barra de agitación en un vaso de precipitado de 2 L cubierto con papel aluminio para evitar contacto con la luz, se calentó el agua hasta el punto de ebullición en parrilla de agitación con temperatura. Por otro lado, se colocó hielo y agua en un recipiente sobre una parrilla de agitación sin temperatura. Cuando el agua llegó a ebullición se quitó el vaso de la parrilla y se colocó en el baño de agua con hielo y se puso en agitación adicionando rápidamente los 13.7 gramos de citrato férrico. Posteriormente, ya que la mezcla se homogenizó, se agregaron los 500 ml de NaOH al 0.15N frío (la mezcla estuvo en constante agitación), se colocó un termómetro en la solución esperando hasta que la temperatura llegó a los 25°C. Cuando el medio alcanzó la temperatura indicada, se retiró de la cama de hielo y se colocó en una bandeja de agitación, se realizó una medición de pH con ayuda de un potenciómetro y se fue agregando NaOH al 1 N lentamente, hasta llegar a pH 7 (Fig. 7). Se agrego al medio 10 ml de DL vitaminas, 10 ml de DL minerales, 2.5 gramos de bicarbonato de sodio (Na₂HCO₃), 0.25 gramos de cloruro de amonio

(NH₄Cl), 0.06 gramos de fosfato de sodio monobásico monohidratado (NH₂PO₄H₂O), 0.1 gramos de cloruro de potasio (KCl), 1.0 mililitros de 1mM de selenato de sodio (Na₂SeO₄) y se agito durante 5 minutos para asegurar una mezcla homogénea. Finalmente, se ajustó el volumen a 1 y una vez listo, se alícuota el medio en tubos de ensayo cubiertos con papel aluminio que se burbujearon como previamente se describió (Fig. 7).



Figura 7. Preparación del medio de cultivo citrato férrico (óxidos de Fe(III) solubles).

Construcción de la cepa mutante Δ gsu1771

Para construir la cepa mutante Δ gsu1771 de *G. sulfurreducens*, se utilizó el plásmido pK18mobsacB-GSU1771del, previamente construido en el laboratorio. Este plásmido previamente construido, contiene todos los genes del plásmido base (pK18mobsacB) y las regiones adyacentes al gen *gsu1771* (río arriba y río abajo al gen *gsu1771*). Por conjugación, el plásmido se introdujo en *G. sulfurreducens*, seleccionando aquellas células donde se integró mediante la resistencia a kanamicina. Finalmente, mediante una contraselección en presencia de sacarosa, se aisló la cepa mutante. Para caracterizar la transferencia de electrones, se creció a la cepa silvestre y mutante en diferentes medios de cultivo que contenían diversos donadores (acetato) y aceptores de electrones (fumarato, Fe(III)).

Protocolo para la construcción de la cepa Δ gsu1771 de *G. sulfurreducens* usando el plásmido pk18mobsacB

1 ml de cultivo crecido toda la noche de *E. coli* S17-1 con el plásmido pK18mobsacB-GSU1771del, se centrifugó 2000 rpm por 2 min y se eliminó el sobrenadante. Se adicionó 1 ml de cultivo de *G. sulfurreducens* (previamente crecidas hasta 0.4 OD₆₀₀) en una cámara anaerobia al tubo con la pastilla de células de *E. coli* y la mezcla se centrifugó a 2000 rpm por 3 min, el sobrenadante se desechó dejando 40 μ l

aproximadamente. Se resuspendió la mezcla de *E. coli*/*G. sulfurreducens* y se dejó la mezcla sobre un filtro de 0.22 μm (estéril) sobre una placa de NBAF sólido por 4 horas (proceso de conjugación). Al finalizar el tiempo de incubación, se levantó el filtro y se resuspendieron las células en NBAF líquido. Seguido, se plateo la mezcla de células en NBAF con 200 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina. En medio de cultivo se incubó a 30°C por una semana.

Contraelección con sacarosa

Se confirmó la integración del plásmido pK18mobsacB-GSU1771del en el cromosoma de *G. sulfurreducens* por PCR. Para eliminar el plásmido del cromosoma y buscar una cepa doble recombinante con la eliminación del gen *gsu1771*, se llevó a cabo una contraselección en medio NBAF sólido con 10% de sacarosa. De las colonias que fueron resistentes a la contraselección, se verificó la sensibilidad o resistencia a kanamicina y por PCR se seleccionó la cepa mutante.

Extracción de ADN cromosomal

Para identificar si la cepa mutante $\Delta\text{gsu1771}$ fue construida correctamente, se verificó la ausencia del gen *gsu1771*, para esto se extrajo ADN cromosomal de 4 colonias candidatas. Las células fueron crecidas en medio NBF e incubadas a 30°C durante 48 horas. Se centrifugó 5 mL de cultivo a 8000 rpm por 5 min. Seguido, se resuspendió la pastilla celular con 50 μL de agua y se adicionó 1 μL de proteinasa K y 300 μL de solución de lisis. Esta mezcla se incubó a 65 °C durante 15 minutos, mezclándola en el vortex cada 5 minutos. Los tubos, se enfriaron a temperatura ambiente y se añadió 5 μL de RNasa, incubando a 37 °C durante 30 min. Una vez pasado el tiempo, se añadió 175 μL de solución de precipitación a 300 μL de muestra lisada, y se agitó vigorosamente la mezcla en el vortex durante 10 segundos. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a máxima velocidad. Seguido, se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio y se añadió 500 μL de isopropanol, se agito varias veces, y el ADN precipitado se lavó con alcohol al 70 % y se dejó secar. El ADN se resuspendió en H₂O miliQ estéril y se verifico la integridad de la muestra en electroforesis de agarosa.

PCR

Para determinar si presencia o ausencia del gen *gsu1771* en el cromosoma de las cepas candidatas, se amplificó por PCR un fragmento de ADN usando como templado ADN cromosomal (Fig. 10, 11). Se preparó un mix de reacción con: oligos (forward y reverse), buffer, dNTPs, Taq polimerasa y H₂O, y se agregaron a las muestras de DNA. En la siguiente tabla se muestran las mezclas de reacción y el programa que se utilizó en el termociclador. Programa usado: 98 °C 3 min un ciclo; 98 °C 1 min, 60 °C por 45 seg, 72 °C por 30 seg, 30 ciclos; 72 °C 5 min.

Mezcla de reacción

2 µL oligo FW

2 µL oligo RV

5 µL Buffer 10x (MgCl₂)

2 µL dNTPS

0.2 µL Taq Polimerasa

34 µL H₂O

5 µL ADN

Vol. Final 50 µL

Electroforesis de proteínas tipo SDS-PAGE

Los geles de poliacrilamida resultan de la polimerización química de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida. Controlando la concentración de ambos compuestos, se obtienen geles de diferente grado de reticulación (diferentes diámetros de poro). El método de electroforesis más aplicado para proteínas es el que emplea geles de poliacrilamida (del inglés **PAGE** = **P**oliacrilamida **G**el **E**lectroforesis) en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS). Esta técnica es distinguida como SDS-PAGE. Para ello se realiza un gel en placa vertical.

Protocolo para hacer un gel de acrilamida

Gel separador			
12%	5ml	15%	5ml
H ₂ O	1.6ml	H ₂ O	1.1ml
Poliacrilamida 30%	2ml	Poliacrilamida 30%	2.5ml
1.5M Tris (pH8.8)	1.3ml	1.5M Tris (pH 8.8)	1.3ml
10%SDS1	0.05ml	10%SDS	0.05ml
10% APS2	0.05ml	10%APS	0.05ml
TEMED3	0.002ml	TEMED	0.002ml

Gel concentrador	
	1ml
H2O	0.68ml
Poliacrilamida 30%	0.17ml
1.0M Tris (Ph 6.8)	0.13 ml
10%SDS	0.01ml
10%APS	0.01ml
TEMED	0.001ml

Una vez que el gel este hecho, las muestras de proteína mezcladas con buffer de carga, se colocan en los carriles correspondientes y se somete a un voltaje (100 volts) por 1-2 horas aproximadamente. Finalmente, las proteínas son visualizadas con una tinción inespecífica (tinción coomassie) o específica (tinción hemo).

Cinéticas de crecimiento

Las cinéticas de crecimiento se realizaron en medio NBAF líquido anaerobio. Los cultivos en medio NBAF se incubaron a 30 °C, y cada 12 horas aproximadamente, se midió la absorbancia con espectrofotómetro Beckman Coulter DU 730 Life Science a 600nm. Al inicio de la cinética de crecimiento, se ajusto a la misma concentración de células cada cepa utilizando la siguiente fórmula:

$$V1=(Q2 V2)/Q1$$

Donde:

V1=Volumen de cultivo que se inoculará

Q2=Concentración inicial deseada, en este caso fue de 0.02 a 600nm.

V2=Volumen del cultivo final, en este caso 10 mL

Q1=Concentración a la que sea encuentra el inculo

Cuantificación de Fe(II)

La reducción de Fe(III) a Fe(II) se determinó mediante el método de la ferrozina. El medio citrato férrico se complemento con acetato (20 mM) y se inoculó por triplicado con células de *G. sulfurreducens*. Las muestras se incubaron a 30 °C. De cada ensayo se

tomaron alícuotas de 100 μ L de cultivo y se agregó 900 μ L de HCl a 0.5 N en tubos eppendorf cada 12 hrs, aproximadamente. Para cuantificar la reducción de Fe(III), con las muestras de cultivo que se tomaron cada 12 horas de cada cepa, se cuantificó la presencia de Fe(II) mediante la técnica de ferrozina (Ferrozina 2 mM en HEPES 50 mM). Se mezclaron 2.45 mL de ferrozina y 50 μ L de cultivo, y se leyó la absorbancia a una DO de 562. Para cuantificar la reducción de Fe(II) se corrió a la par una curva estándar con diferentes concentraciones de Fe(II) (Fig. 8).

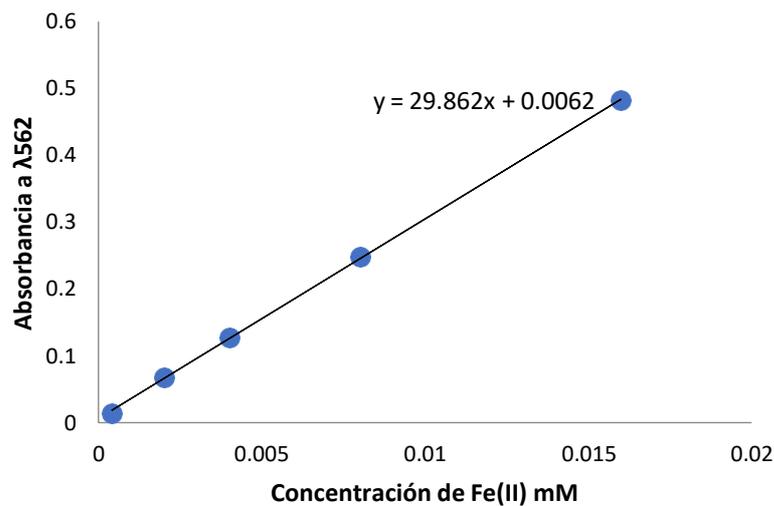


Figura 8. Curva estándar usada para cuantificar la reducción de Fe(II).

Inmunodetección Western Blot

Para la inmunodetección de la pilina de *G. sulfurreducens* se utilizó el gel de poliacrílamida al 15% previamente sometido a una electroforesis SDS-PAGE. El gel se transfirió a una membrana de Nylon (Merck Millipore) utilizando una cámara de electrotransferencia (Hoefer). A continuación, se describe el proceso de la transferencia e inmunodetección. Se cortó una pieza de la membrana (Membrana de Nylon Hybond) y cuatro piezas del papel filtro (3 mm Whatman) aproximadamente del mismo tamaño del gel, todas las piezas se humedecieron dentro del amortiguador de transferencia y se ensambló según las recomendaciones del fabricante de la cámara de transferencia. Se llenó el equipo con buffer de transferencia y se dejó a 40 V y 100 mA por aproximadamente una hora y media. Pasando este tiempo se retiró la membrana y se sumergió en PBS 1x (buffer de fosfato salino) durante 15 minutos.

Por otro lado, se preparó la solución bloqueadora (BSA 3% con PBS 1x). Se trasladó la membrana a la solución bloqueadora durante toda la noche en el cuarto frío. Al día siguiente se lavó tres veces con PBS 1x-Tween 0.3% con una duración de 5 minutos cada lavado, al terminar los lavados se volvió a lavar con PBS 1x tres veces con una duración de 5 minutos cada lavado. Seguido de esto, se añadió el anticuerpo primario (anti-pilina) a una dilución 1:1000 el cual se separó en una solución PBS-BSA 0.3%, y se incubó por 4 horas. Terminando el tiempo de incubación, se repitieron los lavados, primero tres con PBS-Tween 0.3% con duración de 5 minutos cada uno y en seguida otros tres con PBS 1x por 5 minutos cada lavado. Posterior a los lavados, se agregó el anticuerpo secundario (anti-IgG- conejo acoplado a fosfatasa) a una dilución 1:5000, el cual se preparó en una solución PBS BSA 0.3%, se incubó la mezcla con la membrana por 3 horas. Posteriormente, se lavó 3 veces con PBS-Tween 0.3% y tres veces con PBS 1x, con una duración de 5 minutos cada lavado. Por último, se incorporó 1 ml del reactivo (1-Step NBT/BCIP) para la reacción de la enzima acoplada al segundo anticuerpo, en cuanto se observó que la membrana muestra las bandas se detuvo la reacción con agua. Las proteínas corren de gel a membrana (de negativo a positivo).

Preparación de fracciones membranales

Cultivos de *G. sulfurreducens* (silvestre y mutante) en medio NBAF fueron cosechados en fase estacionaria por centrifugación a 5,000 rpm por 20 min a 4 °C. La pastilla celular obtenida se lavó con una solución de PBS (1X). Se recuperaron las células por centrifugación a 8,000 rpm por 10 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla en 3 mL de Tris-HCl 50 mM.

Las células se lisaron mecánicamente a través de someterlas a una presión de 1000 PSI mediante el uso de la prensa francesa. Los lisados celulares se sometieron a centrifugación a 8,000 rpm por 14 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y las pastillas se resuspendieron en 2 mL de Tris-HCl 50 mM. Seguido, las muestras se ultracentrifugaron a 45,000 rpm durante 45 minutos a 4°C. Se removió el sobrenadante, el cual se etiquetó como “fracción soluble”. La pastilla se resuspendió en 2 mL de Tris-HCl 50 mM y lauryl sarkosine 0.1%. Después, se ultracentrifugaron las muestras a 45,000 rpm durante 45 minutos a 4°C. Posteriormente, se removió el sobrenadante y se etiquetó

como “membrana interna”. Finalmente, la pastilla se resuspendió en Tris-HCl 50 mM y SDS 0.1%. La muestra se etiquetó como “membrana externa”.

Tinción Hemo

Se cargaron 20 µg de proteína total de las diferentes fracciones membranales en un gel de poliacrilamida al 15 % y corrió en una electroforesis SDS-PAGE. El gel se sumergió en una solución de Tetrametilbenzidina (TMB) con acetato de sodio al 0.25 M pH 5.0 por 1 hora (3:7). Después, para revelar las proteínas citocromo tipo-*c* se agregó peróxido de hidrógeno 30 mM y se dejó incubando 30 min. Al finalizar, se visualizaron las proteínas mediante el fotodocumentador Gel-Doc (BioRad).

Resultados

Construcción de la cepa mutante $\Delta gsu1771$

Para la construcción de la mutante $\Delta gsu1771$ en *G. sulfurreducens* se utilizó el plásmido pK18mobsacB-GSU1771 del previamente construido en el laboratorio de la Dra. Katy Juárez del Instituto de Biotecnología. Dicho plásmido se introdujo en *G. sulfurreducens* mediante conjugación utilizando a *E. coli* como cepa donadora. El plásmido se integro al cromosoma por recombinación homóloga, de las cuales de aisló varias colonias en presencia de kanamicina (Fig. 9) (Fig. 10).

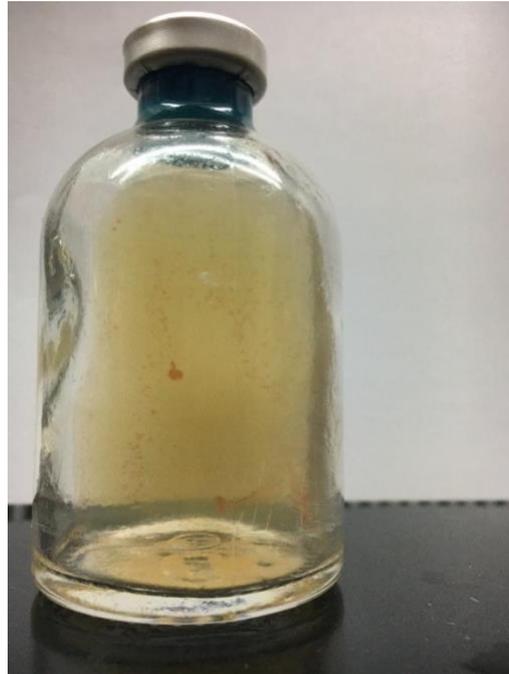


Figura 9. NBAF sólido anaeróbico, con colonias de *G. sulfurreducens* resistentes a kanamicina.

De las colonias que crecieron en presencia de kanamicina, se procedieron a cultivar en medio NBAF con sacarosa. En este paso de la selección de la cepa mutante $\Delta gsu1771$, la presencia de sacarosa selecciona células resistentes a levanos, por la eliminación del plásmido pK18mobsacB-GSU1771 del del cromosoma de la cepa silvestre (Fig. 10).

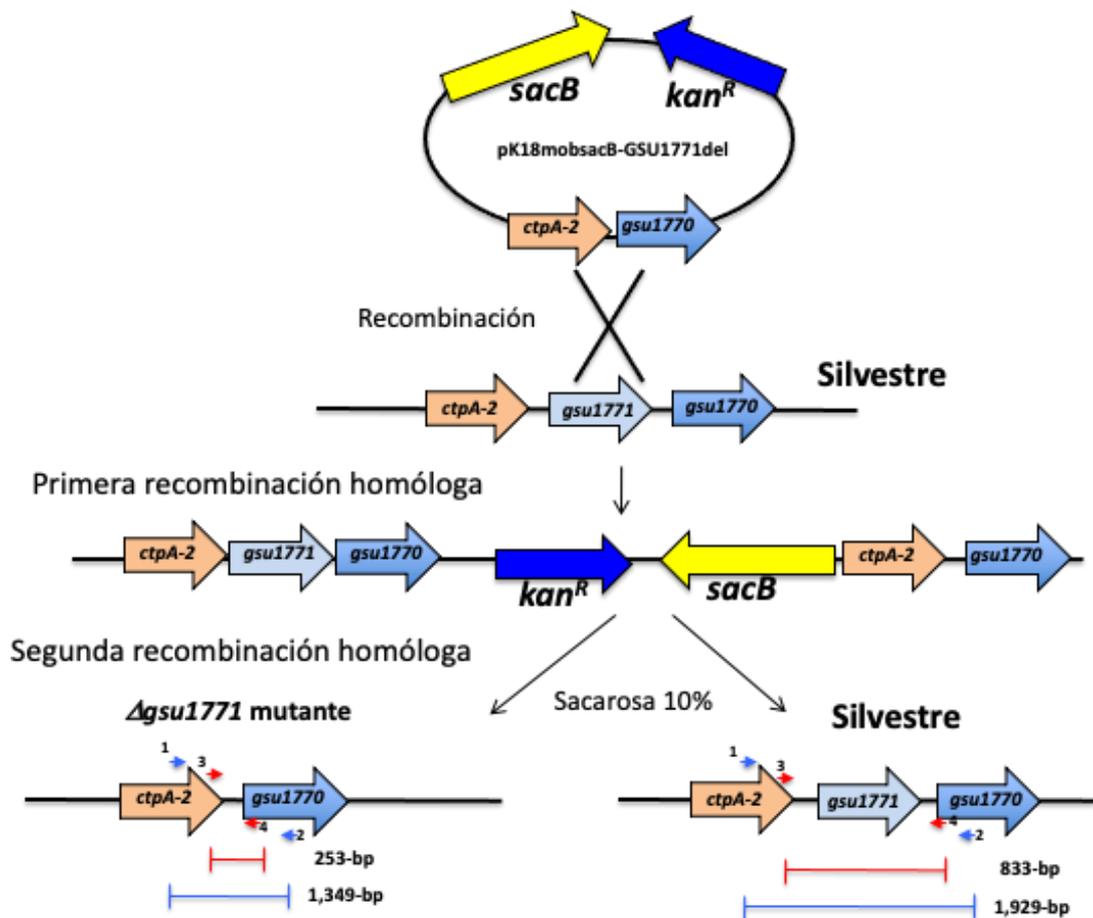


Figura 10. Estrategia de construcción de la cepa Δ *gsu1771* de *G. sulfurreducens*. El plásmido pk18mobsacB-GSU1771del se incorpora al cromosoma de la cepa silvestre por recombinación homóloga. Para eliminar el plásmido del cromosoma, se promueve un evento de doble recombinación, donde el plásmido sale del cromosoma en presencia de sacarosa al 10%. Finalmente, existe un rearrreglo genético en el cromosoma, donde en la cepa Δ *gsu1771* se elimina al gen *gsu1771*. Las flechas señalan el par de oligos usados en la PCR para confirmar eliminación o presencia del gen *gsu1771*. Usando los oligos 1 y 2 se amplifica un fragmento de 1,349 pares de bases en la cepa Δ *gsu1771*, mientras que el mismo par amplifica un fragmento de 1,929 pares de bases en la cepa silvestre. Usando los oligos 3 y 4 se amplifica un fragmento de 253 pares de bases en la cepa Δ *gsu1771*, mientras que el mismo par amplifica un fragmento de 833 pares de bases en la cepa silvestre.

Verificación de la cepa Δ *gsu1771* por PCR

De las colonias aisladas que crecen en medio NBAF con presencia de sacarosa al 10 %, se procedió a purificar su ADN cromosomal y verificar la ausencia del gen *gsu1771*. La verificación de la eliminación del gen *gsu1771* del cromosoma, se llevo a

cabo mediante PCR, usando ADN cromosomal y diversos pares de oligos (ver Fig. 10). Con los oligos 1 y 2, la PCR resulto en la amplificación de un fragmento de 1,349 pares de bases en la cepa $\Delta gsu1771$ (Fig. 11, carril 3), mientras que el mismo par amplificó un fragmento de 1,929 pares de bases en la cepa silvestre (Fig. 11, carril 4). Usando los oligos 3 y 4 se amplifica un fragmento de 253 pares de bases en la cepa $\Delta gsu1771$ (Fig. 11, carril 1), mientras que el mismo par amplificó un fragmento de 833 pares de bases en la cepa silvestre (Fig. 11, carril 2). Por lo anterior, se confirma que la cepa aislada es una cepa que carece el gen *gsu1771*.

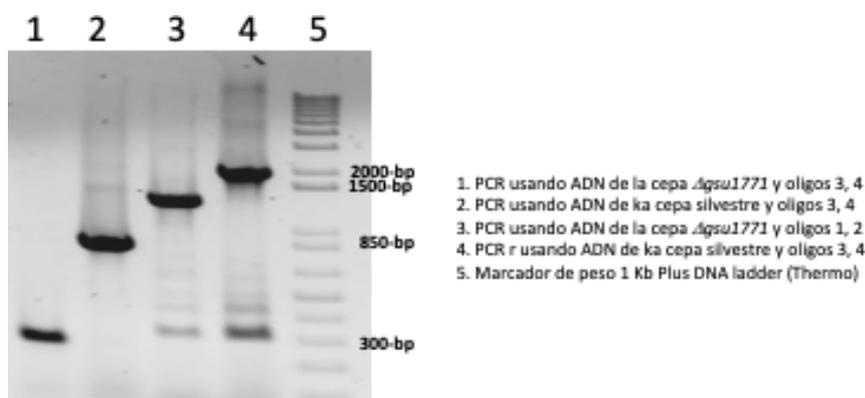


Figura 11. Electroforesis de gel de agarosa con los fragmentos de PCR generados. A la derecha se muestra el contenido de cada carril, los fragmentos generados con el par de oligos usados.

Cinética de crecimiento

Para determinar si la eliminación de gen *gsu1771* en *G. sulfurreducens* influye directamente en la transferencia extracelular de electrones, se realizaron experimentos de crecimiento en medio NBAF (acetato, fumarato) y reducción de Fe(III) (citrato férrico). En la figura 12, se muestra el crecimiento de la cepa silvestre y $\Delta gsu1771$. Como se muestra en la figura 12, la cepa silvestre (representada con la línea azul), se encuentra en la fase lag durante las primeras 12 horas, enseguida observamos el crecimiento exponencial hasta las 36 horas. Para continuar con la fase estacionaria hasta el final de la cinética. Para la cepa mutante (representada por la línea naranja), se observa un marcado retraso en el crecimiento, presentando una fase lag larga, hasta las 36 hrs; sin embargo, al final de la cinética alcanza un crecimiento similar a la cepa silvestre.

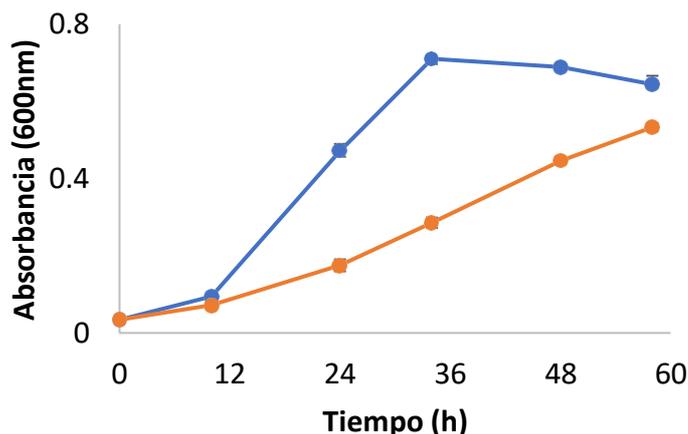


Figura 12. Crecimiento en medio NBAF de las cepas de *G. sulfurreducens*. Línea azul, cepa silvestre y línea naranja cepa mutante $\Delta gsu1771$. Cada punto, representa el promedio de tres replicas experimentales.

Cinética de reducción de Fe(III)

Se procedió a crecer las cepas de *G. sulfurreducens* en citrato férrico (Fe(III) soluble), para determinar si la cepa mutante $\Delta gsu1771$ presenta un fenotipo alterado en la reducción de Fe (III). La figura 13 muestra el fenotipo de la reducción de Fe(III). En esta se muestra una imagen con el fenotipo de la cepa silvestre de color café oscuro en citrato férrico a 30 horas de incubación, lo cual indica una ligera reducción de Fe (III) a Fe(II), en cambio, la cepa $\Delta gsu1771$, muestra un fenotipo claro, indicando una mayor reducción de Fe(III) a Fe (II), en las mismas 30 horas de incubación (Fig. 13, derecha).

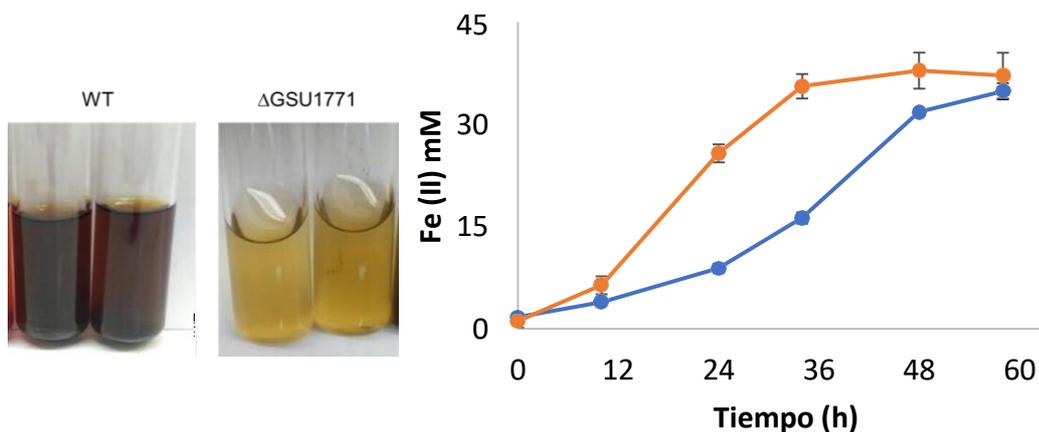


Figura 13. Fenotipo de reducción de Fe(III) de las cepas de *G. sulfurreducens*. a) Fenotipo en medio citrato férrico. b) Cinética de reducción de Fe(III) a Fe(II). Línea azul, cepa silvestre (WT) y línea naranja cepa mutante $\Delta gsu1771$. Cada punto, representa el promedio de tres replicas experimentales.

Lo anterior es confirmado en la cinética de reducción de Fe(III) (Fig. 13, izquierda), donde se observa que la cepa silvestre alcanza un máximo de reducción (33 mM de Fe(II)) hasta el final de la cinética (60 h). Sin embargo, la cepa $\Delta gsu1771$ reduce hasta 35 mM de Fe(III) a Fe(II) en las primeras 36 horas de la cinética. Lo anterior muestra que la cepa $\Delta gsu1771$ reduce más rápido Fe(III) a Fe(II) que la cepa silvestre, lo cual puede ser resultado del incremento en la expresión de citocromos tipo-*c*.

Contenido de citocromos tipo-*c*

Una vez comprobado el incremento de la velocidad en la reducción de Fe (III) a Fe (II) en la mutante $\Delta gsu1771$, se procedió a observar si dicho incremento en la velocidad se debe a una mayor producción de citocromos tipo-*c*. Para esto se procedió a purificar las proteínas membranales de las cepas silvestre y $\Delta gsu1771$ crecida en medio NBAF, como se describe en materiales y métodos. Las proteínas fueron separadas en geles de SDS-PAGE y fueron teñidas específicamente para revelar proteínas con grupos hemo. A la par, se montó una electroforesis por duplicado y las proteínas se tiñeron de manera inespecífica con azul de coomassie (control de carga). La figura 14 muestra el perfil de citocromos tipo-*c* de las cepas silvestre y mutante $\Delta gsu1771$ y , su control de carga.

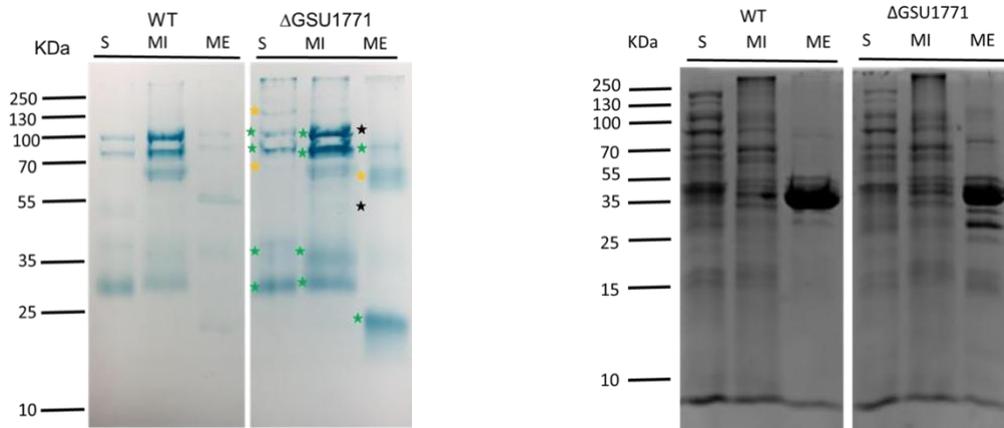


Figura 14. Contenido de citocromos tipo-*c* de las diferentes fracciones membranales. Derecha, tinción hemo. Izquierda, control de carga. S, fracción soluble; MI, membrana interna y ME, membrana externa. Las estrellas muestra la presencia o incremento de citocromos en la cepa $\Delta gsu1771$. A la izquierda de los geles, se muestra el marcador de peso.

Como se observa en la figura 14, existe un mayor contenido de citocromos tipo-*c* en la mutante $\Delta gsu1771$ que cepa silvestre. Es interesante notar que la mutante $\Delta gsu1771$ produce más citocromos tipo-*c* en la membrana interna y externa que la silvestre.

Contenido de proteína PilA

En estudios anteriores se reportó el incremento de la expresión del gen *pilA* las cepas V1 y V2 (Tremblay et al. 2011). No obstante, se desconocía si este incremento era generado por la mutación en la región 5' no traducida del gen *pgcA*, o por la inserción del elemento IS dentro del gen *gsu1771*. Por tal, se procedió a determinar la producción de la proteína pilina (PilA) en la cepa mutante $\Delta gsu1771$ por western blot (Figura 15).

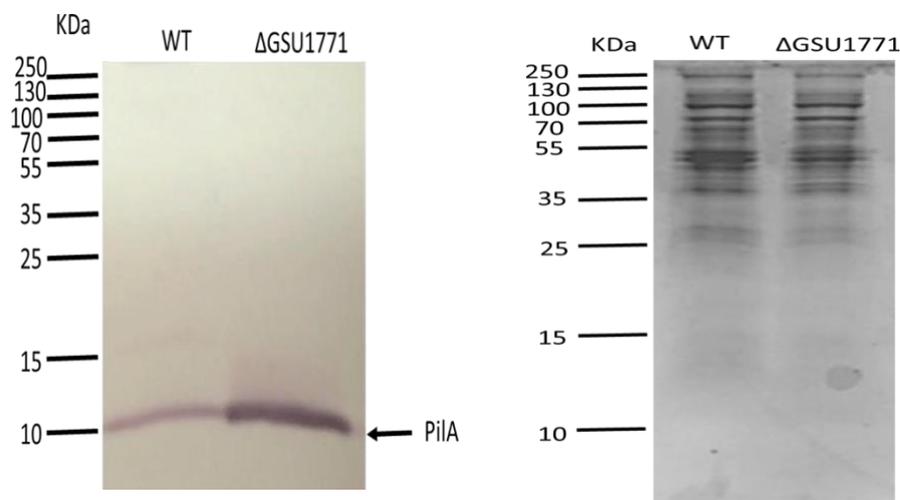


Figura 15. Producción de pilina (PilA) en las cepas de *G. sulfurreducens*. Izquierda, membrana del western blot. Derecha, gel de poliacrilamida teñido con azul de coomassie (control de carga). La flecha señala la proteína PilA.

Como podemos observar en la figura 15, hay mayor producción de pilina en la cepa mutante $\Delta gsu1771$ que en la cepa silvestre, comprobando así que la mutación en el gen *gsu1771* favorece la transcripción y traducción de *pilA*.

Discusión

En *G. sulfurreducens*, la transferencia extracelular de electrones es un proceso sumamente regulado. En este trabajo, se generó conocimiento en los mecanismos de regulación transcripcional ejercida por el regulador GSU1771 sobre algunos elementos importantes en la transferencia de electrones. Una estrategia para estudiar los mecanismos de regulación de un activador o represor transcripcional es eliminar el gen y caracterizar su fenotipo. Es por tal razón que en este trabajo se caracterizó la cepa mutante $\Delta gsu1771$ en cuanto a su capacidad de transferir electrones en diferentes medios de cultivo. Como se mostró en la figura 12, la cepa $\Delta gsu1771$ mostró un retraso en el crecimiento en medio NBAF, comparado a la silvestre. Este retraso en el crecimiento puede deberse a que el regulador GSU1771 controle algunos genes que están participando en el transporte y metabolismo de fumarato. En *G. sulfurreducens*, el gen *dcuB* codifica para una proteína transportadora de fumarato, y el gen es controlado por reguladores tipo IHF. Mutaciones en genes que codifican para el complejo IHF muestran un retraso en el crecimiento en medio NBAF, de manera similar que la mutante $\Delta gsu1771$, por lo que sugerimos que este regulador podría estar controlando la transcripción del transportador de fumarato.

Por otro lado, en cuanto a la reducción de Fe(III) soluble, se observó que la cepa $\Delta gsu1771$ reduce en menor tiempo de Fe(III) a Fe(II) que la cepa silvestre (Fig. 13). El incremento en la velocidad de reducción de Fe(III) en la cepa $\Delta gsu1771$ se debe al incremento de la producción de citocromos tipo-*c* en esta cepa, principalmente a los citocromos presentes en membrana interna y membrana externa (Fig. 14). Este resultado es interesante, ya que solo se había reportado que la cepa generada por evolución adaptativa podía sobreexpresar el gen *pilA* y no los citocromos tipo-*c* (Tremblay et al., 2011). También, estos resultados sugieren que GSU1771 es un represor de la transcripción de algunos citocromos; sin embargo, aún se desconoce específicamente sus blancos.

Por otro lado, mediante western blot observamos que la cepa $\Delta gsu1771$ produce una mayor cantidad de proteína PilA, que la cepa silvestre. Estos datos nos sugieren que el incremento en la reducción de Fe(III) insoluble observado previamente (Tremblay et al. 2011), se debe a un incremento en la producción de pili; reforzando la hipótesis de que GSU1771 es un represor de la transcripción de la pilina.

Finalmente, en este trabajo se describió la caracterización de la una cepa mutante que sobreproduce dos de los tres elementos clave en la transferencia extracelular de electrones. Esta cepa, sobreproduce pilina, la proteína estructural del pili, el cual es un elemento importante en la transferencia de electrones a electrodos en celdas microbianas de combustible. Además, esta cepa sobreexpresa proteínas citocromos tipo-*c*, cuya función esta estrechamente relacionada con la reducción directa de metales soluble e insolubles. Por su fenotipo, esta cepa $\Delta gsu1771$ es una buena candidata para ser caracterizada electroquímicamente ya que tiene potencial para ser usada en los procesos de producción de bioelectricidad y en la recuperación de ambientes contaminados por metales pesados.

Conclusiones

Usando el sistema pk18mobsacB, se construyó una cepa mutante de *G. sulfurreducens* en el gen *gsu1771*.

La cepa mutante Δ *gsu1771* presenta un retraso en el crecimiento comparado a la cepa silvestre; sin embargo, presenta un incremento en la reducción de Fe(III) que la cepa silvestre.

La cepa mutante Δ *gsu1771* presenta un incremento en la producción de citocromos tipo-c y proteína PilA, sugiriendo que la proteína GSU1771 es un regulador transcripcional de dichos genes.

Perspectivas

Clonar el gen *gsu1771* y expresar su proteína.

Purificar la proteína GSU1771 y realizar ensayos de interacción ADN-proteína, para determinar si el regulador controla de manera directa la expresión de sus genes blanco.

Cuantificar la expresión de los genes *pilA*, y principales citocromos de *G. sulfurreducens* en la cepa mutante Δ *gsu1771* por RT-qPCR.

Caracterizar electroquímicamente la producción de electricidad generada por la cepa Δ *gsu1771*.

Bibliografía

- Blothe, M., Akob, D. M., Kostka, J. E., Goschel, K., Drake, H. L. and Kusel, K. (2008). pH gradient-induced heterogeneity of Fe(III)-reducing microorganisms in coal mining-associated lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1019–1029.
- Bonani, P. S., Schrott, G. D., Busalmen, J. P. (2012). A long way to the electrode: how do *Geobacter* cells transport their electrons?. *Biochem. Soc. Trans.* 40(6):1274-1279.
- Bond, D.R., Mester, T., Nesbo, C.L., Izquierdo-Lopez, A.V., Collart, F.L. and Lovley, D.R. (2005). Characterization of citrate synthase from *Geobacter sulfurreducens* and evidence for a family of citrate synthases similar to those of eukaryotes throughout the Geobacteraceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3858–3865.
- Caccavo, F., Jr., Lonergan, D.J., Lovley, D.R., Davis, M., Stolz, J.F. and Mcinerney, M.J. (1994). *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3752–3759.
- Chan, C.H., Levar, C. E., Zacharoff, L., Badalamenti, J. P., Bond, D. R. (2015). Scarless Genome Editing and Stable Inducible Expression Vectors for *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81(20):7178-86.
- Coppi, M. V., Leang, C., Sandler, S. J., Lovley, D. R. (2001). Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol.* 67, 3180-3187.

Erazo, P. M. Ecología. (2008). Impacto de la problemática ambiental actual sobre la salud y el ambiente. ECOE Ediciones.

Hernández-Eligio A., Andrade A., Soto L., Morett E. and Juárez K. (2016). The unphosphorylated form of the PilR two-component system regulates *pilA* gene expression in *Geobacter sulfurreducens*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* February 2016.

Holmes, D. E., Nevin, K. P. and Lovley, D. R. (2004). Comparison of 16S rRNA, *nifD*, *recA*, *gyrB*, *rpoB* and *fusA* genes within the family Geobacteraceae fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1591.

Holmes, D. E., O'neil, R. A., Vrionis, H. A., N'guessan, L. A., Ortiz-Bernad, I., Larrahondo, M. J., Adams, L. A., Ward, J. A., Nicoll, J. S., Nevin, K. P., Chavan, M. A. Johnson, J. P., et al. (2007). Subsurface clade of Geobacteraceae that predominates in a diversity of Fe(III)-reducing subsurface environments. *ISME J.* 1, 663–677.

Finneran, K.T., Anderson, R.T., Nevin, K.P. and Lovley, D.R. (2002). Potential for bioremediation of uranium-contaminated aquifers with microbial U(VI) reduction. *Soil Sed. Contam.* 11, 339–357.

Juárez, K., Kim, B. Ch., 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*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 16:146-158.

Krushkal, J., Juárez, K., Barbe, J. F., Qu, Y., Andrade, A., Piljic, M., Adkins, R. M., Lovley, D. R., Ueki, T. (2010). Genome-wide survey for PilR recognition sites of the metal-reducing prokaryote *Geobacter sulfurreducens*. *Gene*. 469:31-44.

Lin, W.C., Coppi, M.V. and Lovley, D.R. (2004). *Geobacter sulfurreducens* can grow with oxygen as a terminal electron acceptor. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2525–2528.

Logan, B. E., Hamelers B., Rozendal R., Schro U., Freguia S., Aelterman P., Verstraete W., Rabaey K. (2006). Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environmental Science & Technology*. 40: 5181-92.

Lovley, D. R. (1993). Dissimilatory Metal. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:263-90

Lovley, D. R. (2006). Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 497-508.

Murillo, F.M., Gugliuzza, T., Senko, J., Basu, P. and Stolz, J.F. (1999). A heme-containing enzyme complex that exhibits nitrate and nitrite reductase activity from the dissimilatory iron-reducing bacterium *Geobacter metallireducens*. *Arch. Microbiol.* 172, 313–320.

Ortiz-Bernad, I., Anderson, R.T., Vrionis, H.A. and Lovley, D.R. (2004). Resistance of solid-phase U(VI) to microbial reduction during in situ bioremediation of uranium-contaminated groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7558–7560.

Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Touminem, M. T., Lovley, D. R. (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nat.* 435: 1098-1101.

Reguera, G., Nevin, K. P., Nicoll, J. S., Covalla, S. F., Woodart, T. L., Lovley, D. R. (2006). Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *App. Environ. Microbiol.* 72:7345-7348.

Rollefson, J. B., Stephen, C. S., Tien, M., Bond, D. R. (2011). Identification of an extracellular polysaccharide network essential for cytochrome anchoring and biofilm formation in *Geobacter sulfurreducens*. *J Bact.* 193(5):1023-1033.

JM Senko, JF Stolz. (2001). Evidence for Iron-Dependent Nitrate Respiration in the Dissimilatory Iron-Reducing Bacterium *Geobacter metallireducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (8), 3750-3752

Tremblay, P. L., Summers, Z., Glaven, R., Nevin, K., Zengler, K., Barrett, C., Qiu, Y., Palsson, B. and Lovley, D. R. (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(1):13–23.

Ueki T. (2021). Cytochromes in Extracellular Electron Transfer in *Geobacter*. *Appl Environ Microbiol.* Apr 27;87(10):e03109-20.

Vargas, M., Malvankar, N. S., Tremblay, P.-L., Leang, C., Smith, J. A., Patel, P., et al. (2013). Aromatic amino acids required for pili conductivity and long-range extracellular electron transport in *Geobacter sulfurreducens*. *mBio* 4, e00105–13.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



DIRECCIÓN DE ESTUDIOS SUPERIORES

Escuela de Estudios Superiores del Jicarero

Dirección

El Jicarero, Jojutla, Morelos, 25 de abril del 2022.

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
PRESENTE.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta el Pasante de Licenciado en Ciencias Ambientales: **C. VÍCTOR HUGO ALMANZA REBOLLAR**, con el título del trabajo: **Construcción y caracterización de la cepa mutante Δ GSU1771 de *Geobacter sulfurreducens* y su relación con la transferencia extracelular de electrones.**

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: _____ SI _____

VOTO EN CONTRA: _____

NECESITA ARREGLAR O ELIMINAR ALGO: _____

COMENTARIOS: _____

FIRMA

DR. JUAN MANUEL RIVAS GONZÁLEZ _____

BIOL. JOSÉ ERNESTO GASPAR DOMÍNGUEZ _____

DR. JOSÉ ALBERTO HERNÁNDEZ ELIGIO _____

BIOL. GERARDO VALOIS JUÁREZ _____

ING. JORGE AURELIO MANZO ESPÍN _____



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

JOSÉ ALBERTO HERNÁNDEZ ELIGIO | Fecha:2022-04-25 16:01:15 | Firmante

IU5dx1LvaEbmOQajY2TCqF2Jjvz0dGx8mCykQa5qdseDTXqrd54WuGHCNp0rd9/S8EgaiK71keuQJiaXfc5+byVGi9B8uYQ39nibNLKIBhvfqQb/XSrPn5WWORkL1gKCeZ7TOhPVPsdA9LGMzC2DbMof+RcJR2ha/GFBdqivkk2hkCVWb+ePJSd7YorGDbf28AoH5QWhf90mkNBdN5hbhGsD7uRinIZUF2v5ZkzqA+acNQbVRkic4jx99F40pdjyUCFZtR4m3Dr7gJi9AMMCh64Z4EvPqr9ei8WM33EGEW00bgkpmRnURIZbg6sMQ7wbZ4Z3IRb59NTA3I2NtghzA==

JORGE AURELIO MANZO ESPIN | Fecha:2022-04-25 17:14:26 | Firmante

KV93m84IRUOaytbvPuNpVHPsAQ7JSX8zdOW7Ung9hViN5JHy4nGwWcix0ocwo/mfv0572c50II5vMwTUrqJXyYaw0XF0IGZI4gVuLDA0Wzol6lfgYsi1g7XA2QiPvmiv8jyZubhQ08ckZqch9PTA8D5jyLlk6lElfhko8I89b3nAYoJS4ZEMDz2a9CFeSMejuNT0Y1eP5QcEGnB4FYsOOrMMSO9VaDqsoc9ciDE107ZH88cL1xqiaFgJxKtQS154STH3Shfmi9nsTP2F1h1Q+szWyBLZVxxcCdkfLRRRDA3Qv79BSD4PPI1ZKRMnXwgrxoofuhpKi8gHRIPIQ==

JUAN MANUEL RIVAS GONZALEZ | Fecha:2022-04-26 10:15:21 | Firmante

TdGSrE/hlF5u5cYPseb+bUHqznqzGoXz8G4LgMuG4RuPkuA7RdXsOh7ru2xSGPW9JS/wiRkr+NWyLBJarppZTFwRtv3yhiQquqFOXmbNTwpr7qEd+dj2KeCmBZwx0TDrR7khYHBwqgaoD+MBmCkNRa1lplptExarFPlgmReU7KhrhX1CasVHNkaxfvYvijS6ZT5Ngztw4kGkYeLagg0f9GJqbsjRAs+fszL5hv59lsgMyiP0wjQOF+ISj2DNFiyjLoo8YWkMK03MuL6ojofQTZRnms1xDZ8ZenTZ9amlgijcS/L2ReAaOyR2PA2U7SF6RTxkAOZwji66oWqVo3MQ==

JOSE ERNESTO GASPAS DOMINGUEZ | Fecha:2022-04-26 10:34:04 | Firmante

WTNAnzEZVJgxuVOp6mz/3axWk9Oa+5spCvx3NW++hptLOzUIQlksFPzRcr9ysG860DnhbEBNNv2G7pH8i89xe9ACOzAgY+xq2BDP6rczETogDhDaOXaA1+cGjbtzsYrSRWXAbJ4E0O+UJgzawCpgn6zpPurGtj9XtNu6coQvoYOE6JAwjip3X/6oMlwpFAP4kTebVdVruk+Wc4D22P224ZP0/tKINxNvErhtEU0Imx4yRINrO6xtC0UK356AqfJFxnAXJOkU99gZ5fPJ1REe6WV8SHw85ZaH4zsjiapZEt2SF3xJAiwXgMN4N6PMhB7DnuD7Bu43YNoneDrcFw==

GERARDO VALOIS JUAREZ | Fecha:2022-05-02 13:32:06 | Firmante

e/tuOuwaV1nVkdN6dd9mWASmHLqnOKSg71s/teJQJKWoJr4zADU8oLpKVUwtawULrvsnD5hVN2ijPCwaQUStWX8mbmgHvQLTgAgQ5t9z4szsCSscRvR6PdPpggmBTnIYfxgXWJjWnf0zCZ9vksE+itBae4G0YcBW8kKbBBL12gHCPOK16OxpuaWNxlPN0JInu5P/fvifzGUYDPOZEfTHj1rVRzUUWDQTCmEID+1a9equE9sy41WjuUrwU7KDO07Q1dDKDkkNe75ABh2GHOA5Aoa/Jh7vGz2D59fnilxNZA71KLqkxvW3BON5cfNnqX/CLi3rU1xQfe39auxg==

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



3a28yMARq

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/xEQugbM3kvYagBM10aXhStromBr0tsQ2>

