

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ACETATO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *GEOBACTER* *SULFURREDUCTENS* Y FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA

Adriana Araceli Macías Reynoso

Universidad de Guadalajara. Centro
Universitario de los Lagos. Departamento de
Ciencias de la Tierra y de la Vida. Lagos de
Moreno, Jalisco, México
ORCID 0000-0003-1384-0351

Juana Elizabeth Alba Cuevas

Universidad de Guadalajara. Centro
Universitario de los Lagos. Departamento de
Ciencias de la Tierra y de la Vida. Lagos de
Moreno, Jalisco, México.

Virginia Villa-Cruz

Universidad de Guadalajara. Centro
Universitario de los Lagos. Departamento de
Ciencias de la Tierra y de la Vida. Lagos de
Moreno, Jalisco, México
ORCID 0000-0002-1442-8548

Lily Xochilt Zelaya-Molina

Laboratorio de Recursos Genéticos
Microbianos. Centro Nacional de
Recursos Genéticos. Instituto Nacional
de Investigaciones Forestales, Agrícolas y
Pecuarias. Tepatitlán de Morelos, Jalisco,
México
ORCID 0000-0002-3474-3289

All content in this magazine is
licensed under a Creative Com-
mons Attribution License. Attri-
bution-Non-Commercial-Non-
Derivatives 4.0 International (CC
BY-NC-ND 4.0).



Héctor Pérez Ladrón de Guevara

Universidad de Guadalajara. Centro
Universitario de los Lagos. Departamento de
Ciencias de la Tierra y de la Vida. Lagos de
Moreno, Jalisco, México
ORCID 0000-0002-9499-117X

Resumen: En el presente estudio se determinó el efecto del acetato en el crecimiento de *Geobacter sulfurreducens* (atcc 51573). El acetato es una molécula que *Geobacter* puede oxidar, para realizar sus funciones biológicas, por lo cual es importante tener una mayor comprensión de su efecto sobre el crecimiento de la bacteria. Se utilizó el medio NBAF con diferentes concentraciones de acetato. El análisis del crecimiento se realizó en microplacas incubadas de 3 días a 36° c, sin agitación. Las lecturas se hicieron cada hora a 560 nm (multiskan go 1510-01413c, thermo scientific). La biopelícula se observó por microscopía de fuerza atómica (easyscan 2) y microscopía óptica. La diferencia de concentración de acetato afectó el crecimiento de *G. sulfurreducens*. Se observó formación de la biopelícula después de 3 días de incubación. Estos resultados muestran la importancia de la concentración de acetato en el crecimiento de *G. sulfurreducens*.

Palabras clave: Geobacter, crecimiento, biopelícula, acetato.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias son microorganismos que habitan en todos los ecosistemas. Estas han demostrado que ellas pueden consumir diferentes tipos de sustratos orgánicos e inorgánicos generando diferentes respuestas en su metabolismo, siendo esto punto clave para su interés biotecnológico. Existen un grupo de bacterias que son consideradas bioeléctricas, ellas pueden generar corriente eléctrica a partir de la oxidación y reducción de sustratos. En este grupo de bacterias se tiene el género *Geobacter*. Las especies de *Geobacter* pertenecen a la familia Geobacteraceae, que se encuentra dentro del dominio Bacteria, phylum Proteobacteria, clase Deltaproteobacteria, y orden Desulfuromonadales, son bacilos Gramnegativos, quimioorganótrofo anaerobio (Romero Mejía *et al.*, 2012). La morfología

externa de *Geobacter* muestra apéndices celulares, pili y flagelos. *Geobacter* sp. utiliza diferentes aceptores de electrones como: fumarato, manganeso (IV), tecnecio (VII), cobalto (III), uranio (VI), azufre elemental y oxida moléculas como el acetato, cromo (Cr), vanadio (V) e incluso hidrógeno (H₂) (Lovley y Phillips 1988; Lovley *et al.* 1993; Caccavo *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 2004; Lovley *et al.*, 2011). Tomando en cuenta al acetato como donador de electrones y fumarato o Fe (III), como aceptores de electrones, expresa una diferencia en su metabolismo. En presencia de acetato y fumarato, *Geobacter* tiende a generar más biomasa, mientras que en presencia de acetato y Fe (III), se tiene mayor respuesta en su metabolismo bioeléctrico (Esteve-Núñez 2005).

La bioelectrogénesis es la generación de electricidad por organismos vivos. En el caso de las bacterias electrogénicas, al oxidar materia orgánica, genera electrones y los transmite a una superficie conductora a través de acarreadores ya sea producidos por los mismos microorganismos o suministrados artificialmente, generando pequeñas corrientes eléctricas (Romero Mejía *et al.*, 2012). Para el caso de *G. sulfurreducens*, la bioelectricidad está relacionada con su genoma y morfología eléctrica. En su genoma contiene genes que codifican para citocromos tipo c (103 genes en total) y se menciona que cada uno de los citocromos se encuentra asociado a múltiples grupos hemo, pudiendo algunos citocromos llegar a presentar hasta 27 centros activos. Se considera entonces que *Geobacter* posee internamente, una red de citocromos tipo C multihemo (Butler y col., 2010; Ding y col. 2006; Méthé y col. 2003). Por otro lado, en su morfología presenta pilis, que a diferencia de los pilis comunes en las bacterias, estos actúan como estructuras eléctricas al transferir electrones desde la superficie externa de *Geobacter* sp. hasta

aquellos materiales que se logran reducir. Por lo que los pilis, facilitan la transferencia directa de electrones (Romero Mejía *et al.*, 2012), (Cornejo Martell, 2017). Otra característica de *Geobacter*, es la formación de biopelícula, la cual también está relacionada con su poder bioeléctrico. *Geobacter sulfurreducens* transfiere electrones de los pilis a través de biopelícula relativamente gruesa (> 50 µm), a electrodos que actúan como un único receptor de electrones (Nevin y col. 2009; Bond y Lovley, 2003; Lovley y col. 2011).

Por lo anterior, en este trabajo se analiza el efecto de la concentración de acetato sobre el crecimiento de *Geobacter sulfurreducens*. Además, se muestra que *Geobacter sulfurreducens* forma una agrupación o red de bacterias, que puede ser interpretado como una biopelícula.

METODOLOGÍA

Para el presente trabajo se utilizó la cepa biológica de *Geobacter sulfurreducens* (ATCC 51573). La cepa fue reactivada en solución salina estéril en relación 1:9.

Para el crecimiento de la bacteria, se utilizó el medio de cultivo "NBAF" reportado por O'Brien y Malvankar (2016), como medio para bacterias de tipo electrogénicas, que tiene una concentración de 2.0% de acetato de sodio. Con base a ello, se trabajó con variaciones en la concentración de acetato, quedando como: NBAF-0.5% de acetato (A), NBAF-2.0% de acetato (B) y NBAF-5.0% de acetato (C). Para la preparación del medio de cultivo todos los componentes se disolvieron con agua desionizada y se ajustó el pH a 7. Los medios se distribuyeron en viales con volumen de 2 mL. Posteriormente se esterilizaron a 121°C y 15 libras de presión por 15 minutos. Los medios fueron inoculados con 1x10⁴ cel/ml de *Geobacter sulfurreducens*, con flujo de CO₂ (10 kg/cm²). Posteriormente se les agregó a cada uno de los viales, un vidrio, con área de 1.25

cm², como soporte para la biopelícula (Figura 1). Los viales fueron incubados a 36°C por 3 días.



Figura 1. Viales con soporte de vidrio, como soporte para la formación de biopelícula de *Geobacter sulfurreducens*.

CINÉTICA MICROBIANA

La cinética se estableció en microplacas de 96 pozos, colocando en cada pozo 250 µl de los caldos de cultivo inoculados. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. El crecimiento se siguió espectrofotométricamente, las lecturas se tomaron a la densidad óptica de 580 nm, cada 30 min durante 3 días, en un espectrofotómetro de microplacas Multiskan GO (Thermo Scientific, IL, USA). Las microplacas se mantuvieron a 36 °C. Se consideró como control el medio no inoculado.

MICROSCOPIA ÓPTICA Y DE FUERZA ATÓMICA (AFM)

La biopelícula formada fue analizada usando la microscopía óptica y la microscopía de fuerza atómica (AFM). Los soportes de vidrio fueron secados por un día y posteriormente se observaron en microscopía óptica (Microscopio Leica, 40x/0.65) y Microscopía de Fuerza Atómica (NanoSurf EasyScan 2).

RESULTADOS Y DISCUSIONES CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Geobacter sulfurreducens*

En la figura 2, se muestran los resultados de la cinética de crecimiento de *Geobacter sulfurreducens* en los tres medios de cultivo A, B y C, a longitud de onda de 580 nm. En estos resultados se observa un comportamiento similar entre las cinéticas de los medios B y C, siendo diferente la respuesta de la cinética del medio C. En los medios B y C (medios con mayor concentración de acetato, 2.0% y 5.0 % respectivamente), se tiene el mayor crecimiento de *Geobacter sulfurreducens*, mientras que en el medio A se obtuvo el menor crecimiento (medio con menor concentración de acetato 0.5%). En trabajos previos, se ha mostrado la habilidad de *Geobacter sulfurreducens* para oxidar acetato (Caccavo *et al.*, 1994), tal como se muestran en estos resultados, pero además se agrega que la concentración de acetato, en el medio de cultivo, incide sobre una mayor o menor respuesta en el crecimiento de *Geobacter sulfurreducens*.

ANÁLISIS DE LA BIOPELÍCULA FORMADA SOBRE SOPORTE DE VIDRIO

En la figura 3, se muestran las imágenes obtenidas con microscopía óptica. Se aprecia claramente una agrupación y distribución homogénea de un conjunto de células de *Geobacter sulfurreducens*, en los medios B y C, sobre el soporte de vidrio. Con respecto al AFM, en la figura 4 (a, b y c), se confirma la agrupación del crecimiento de células de *Geobacter sulfurreducens*. Se puede considerar que este tipo de agrupamiento forma una red de bacterias unidas por sus pilis y sustancias poliméricas extracelulares. La agrupación que se observa en este trabajo es similar a lo reportado para esta bacteria, en donde mencionan que *Geobacter* tiende a agruparse y adherirse sobre los electrodos (Bond y Lovley, 2003; Dan Sun *et al.*, 2016), en este trabajo se adhirió y agrupó al soporte de vidrio.

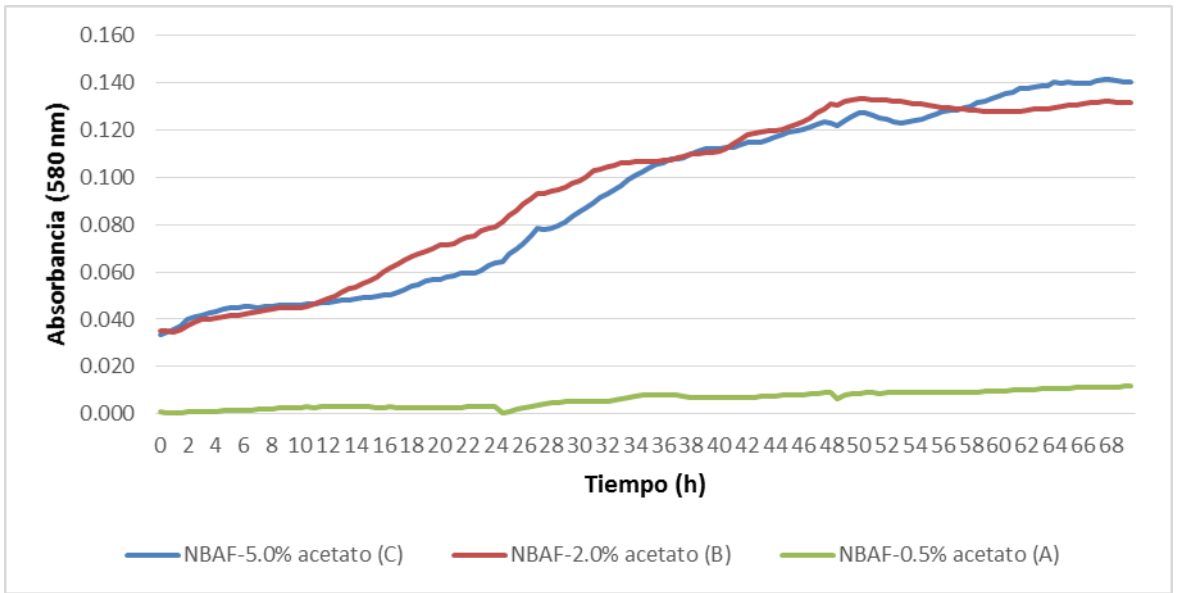


Figura 2. Cinética de crecimiento de *Geobacter sulfurreducens* a diferentes concentraciones de acetato.

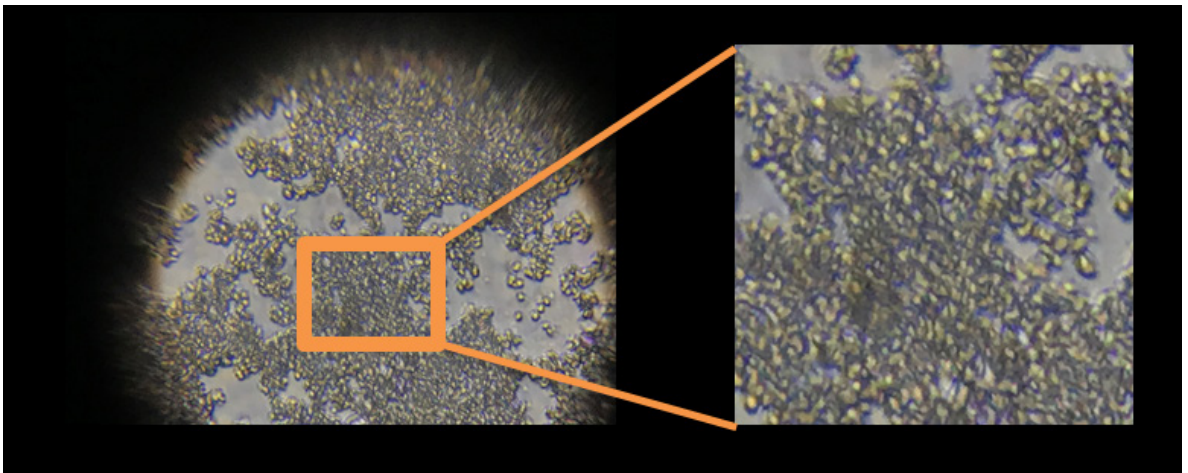


Figura 3. Agrupación de *Geobacter sulfurreducens* en medio NBAF con 2.0% de acetato. Microscopía óptica 40X.

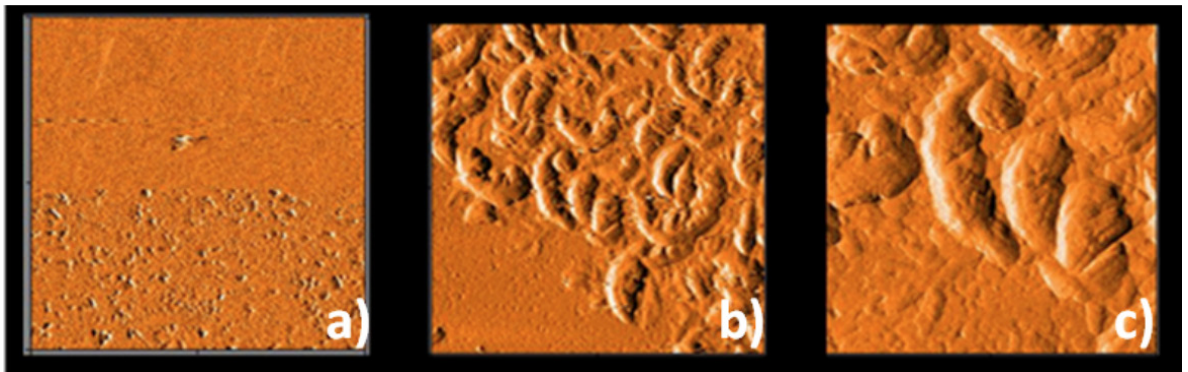


Figura 4. Topografía de la biopelícula de *Geobacter sulfurreducens* en medio NBAF con 2.0% de acetato (a), tamaño 10 Mm y (b), tamaño 11 Mm; con 5.0% de acetato (c), tamaño 5 Mm.

CONCLUSIONES

Este estudio enfatiza la importancia de la molécula de acetato para el crecimiento de *Geobacter sulfurreducens*. Siendo la concentración de acetato, un factor que incide sobre una baja o alta respuesta en el crecimiento de *Geobacter sulfurreducens*. Las topografías obtenidas por AFM nos confirman la agrupación o formación de red

de bacterias que comúnmente se presentan en el género *Geobacter*. Esta agrupación, que puede considerarse como una biopelícula, es requerido en la respuesta eléctrica de la bacteria, así concentraciones de acetato de 2.0% y 5.0%, inciden sobre el crecimiento de la bacteria, pero no sobre su agrupación sobre soporte de vidrio.

REFERENCIAS

- Bond, D.R., Lovley, D.R. (2003). **Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes**. Appl. Environ. Microbiol. 69(3), 1548-55. doi: 10.1128/AEM.69.3.1548-1555.2003.
- Butler, C.S., Clauwaert, P., Green, S.J., Verstraete, W. and Nerenberg, R. (2010). **Bioelectrochemical perchlorate reduction in a microbial fuel cell**. Environ. Sci. Technol. 44, 4685–4691.
- Caccavo, F. Jr., Lonergan, D. J., Lovley D. R., Davis, M., Stolz, J. F., McInerney, M. J (1994). ***Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a Hydrogen- and Acetate- Oxidizing Dissimilatory Metal-Reducing Microorganism**. Applied And Environmental Microbiology. 60(10), 3752-3759.
- Cornejo-Martell, A. J., Reyes-Vidal, M. Y. (2017). **Estudio del microbioma presente en celdas de combustible microbianas**. Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, S.C. 1-98.
- Díaz, C. (2011). **Adherencia y colonización de *Pseudomonas fluorescens* sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie**. Universidad Nacional de la Plata. 1 – 262.
- Ding, Y.H., Hixson, K.K., Giometti, C.S., Stanley, A., Esteve-Nunez, A., Khare, T., Tollaksen, S.L., Zhu, W., Adkins, J.N., Lipton, M.S., Smith, R. D. Mester, T., et al. (2006). **The proteome of dissimilatory metal-reducing microorganism *Geobacter sulfurreducens* under various growth conditions**. Biochim. Biophys. Acta 1764, 1198–1206.
- Esteve-Núñez, A., Rothermich, M., Sharma, M, and Lovley, D. (2005). **Growth of *Geobacter sulfurreducens* under nutrient-limiting conditions in continuous culture**. Environmental Microbiology, 7(5), 641–648. doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00731.x.
- 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(4): 2525.
- Lovley, D.R., Giovannoni, S.J., White, D.C., Champine, J.E., Phillips, E.J., Gorby, Y.A., and Goodwin, S. (1993). ***Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals**. Arch. Microbiol. 159(4) 336-344.
- Lovley, D.R., Phillips, E.J.P., Gorby, Y.A., Landa, E.R. (1988). **Novel Mode of Microbial Energy Metabolism: Organic Carbon Oxidation Coupled to Dissimilatory Reduction of Iron or Manganese**. Appl Environ Microbiol. 54(6): 1472–1480.
- Lovley, D. R., Ueki, T., Zhang, T., Malvankar, N. S., Shrestha, P. M., Flanagan, K. A., Aklujkar, M., Butler, J. E., Giloteaux, L., Rotaru, A. E., Holmes, D. E., Franks, A. E., Orellana, R., Risso, C., Nevin, K. P. (2011). ***Geobacter*: the microbe electric's physiology, ecology, and practical applications**. Adv Microb Physiol. 59:1-100.

Methé, B. A., Nelson, K. E. , Eisen, J. A. , Paulsen, I.T., Nelson, W., Heidelberg, J. F., Wu, D., Wu, M., Ward, N., Beanan, M.J., Dodson, R. J., Madupu, R., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., DeBoy, R. T., Durkin, A. S., Gwinn, M., Kolonay, J. F., Sullivan, S. A., Haft, D. H., Selengut, J., Davidsen, T. M., Zafar, N., White, O., Tran, B., Romero, C., Forberger, H. A., Weidman, J., Khouri, H., Feldblyum, T. V., Utterback, T. R. , Van-Aken S. E., Lovley, D. R., Fraser, C. M. (2003). **Genome of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments**. *Science*. 12;302(5652):1967-9. doi: 10.1126/science.1088727.

Muktak, A., Lovley, D. R. (2010). **Interference With histidyl-tRNA Synthetase by a CRISPR Spacer Sequence as a Factor in the Evolution of *Pelobacter Carbinolicus***. *BMC Evol Biol.*, 10, 1471.

Nevin, K.P., Kim, B.C., Glaven, R.H., Johnson, J.P., Woodard, T.L., Methe, B. A., Didonato, R.J., Covalla, S.F., Franks, A.E., Liu, A., Lovley, D.R. (2009). **Anode biofilm transcriptomics reveals outer surface components essential for high density current production in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells**. *PLoS ONE* 4(5): e5628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005628>.

O'Brien, J. P., Malvankar, N. S. (2016). **A simple and low-Cost procedure for growing *Geobacter sulfurreducens* cell cultures and biofilms in bioelectrochemical systems**. *Curr Protoco Microbiol.* 18(43): A.4K.1–A.4K.27. doi: 10.1002/cpmc.20.

Olalde-Portugal, V. y Aguilera-Gómez, L. I. (1998). **Microorganismos y biodiversidad**. *TERRA*. 16 (3); 289-292.

Read, S. T., Dutta, P., Bond, P. L., Keller, J., & Rabaey, K. (2010). **Initial development and structure of biofilms on microbial fuel cell anodes**. *BMC Microbiology*, 10(98), 1-10. doi:10.1186/1471-2180-10-98.

Romero-Mejía, A. A., Vásquez, J. A., Lugo-González, A. (2012). **Bacterias, fuente de energía para el futuro**. *Revista Tecnura*, 16(32), pp.118-143.

Ruvalcaba-Morales, R. (2009). **Desarrollo de un microscopio confocal para la obtención de imágenes en 3D de dispositivos desarrollados con microlitografía**. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 1-114. https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB_UNAM/TES01000649276.

Sun, D., Cen, J., Huang, H., Liu, W., Ye, Y., Cheng, S. (2016). **The effect of biofilm thickness on electrochemical activity of *Geobacter sulfurreducens***. *International Journal of Hydrogen Energy*. 41(37), 16523-16528.

Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K. H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo M., Schué, F. (2012). **Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012)**. *Pure Appl. Chem.* 84(2), pp 377–410.