



EDUCACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®

Instituto Tecnológico de Acapulco



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE ACAPULCO

Estudio de la reducción de Cr(VI) por diferentes cepas de
Geobacter sulfurreducens

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO BIOQUÍMICO

PRESENTA (N):

KAREN LEOBARDA MORALES RAMÍREZ

TUTOR:

DR. JOSÉ ALBERTO HERNÁNDEZ ELIGIO

ACAPULCO, GRO. MARZO 2024.

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 bajo la dirección del Dr. José Alberto Hernández Eligio. Este trabajo recibió financiamiento de PAPIIT-DGAPA, proyecto IN212022 otorgado a la Dra. Katy Juárez López.

Agradecimientos

Al Dr. José Alberto Hernández Eligio. Por el incondicional apoyo brindado desde el primer día hasta el último, en el que se realizó este proyecto. Muchas gracias, Beto, por formarme académicamente y por todo el conocimiento que me brindaste en el mundo de la ciencia. Lo admiro muchísimo, muchas gracias por todo.

A la Dra. Katy Juárez López. Por permitirme trabajar en su grupo de investigación y por sus observaciones en los seminarios. La admiro demasiado, Katy. Gracias por ser un ejemplo e inspiración para las mujeres en la ciencia.

A mi amigo que conocí en el Ibt... Juan Bernardo. Por brindarme su ayuda y apoyo en todo momento. Muchas gracias por tu paciencia, por todo el conocimiento que compartiste conmigo y también, por la sincera amistad que me brindaste. Tienes un corazón muy grande y bonito, Bernardo. Muchas gracias.

Dedicatorias

A mis padres: Jaime Morales y Guillermina Ramírez. Por todas las enseñanzas que me brindaron durante mi formación personal y académica. La vida no fue nada fácil para ambos, pero a pesar de las adversidades trabajaron mucho para que nada nos hiciera falta. Los admiro demasiado. Son mi inspiración y mi fuerza para afrontar día con día. Este logro es de ustedes. Gracias por todo, los amo y los extraño como no tienen idea.

A mi hermana: Beatriz Morales. Por el apoyo incondicional que me ha brindado desde que tengo memoria. Por siempre estar ahí. Te quiero mucho y te amo. Este logro es también por ti.

A mi hermanita pequeña: Guillermina. Desde que llegaste a mi vida todo cambio, ahora no solo pienso en mí, sino en ti. Eres ese rayo de luz que ilumina mis días. Mi motivación. El amor que siento por ti no se compara con nada, mina.

A mis hermanos: Jaime y Ricardo, que son un pilar muy importante en mi vida, así como también mis sobrinas; Aimet, Daniela, Sofia y Emiliano.

A mis primos, que siempre los vi como hermanos: Mariana, Jesús, Álvaro, Sahyra y José Ángel, los quiero mucho, gracias por siempre estar... En especial a José Ángel, gracias por todo el apoyo que me brindaste durante mi estancia en el laboratorio.

A mis tíos y tías: José, Patricia, Manuela, José Luis, Sara y Agripina, que son parte muy importante en mi vida, los quiero y respeto mucho.

A Esmeralda: Por nunca dejarme sola y apoyarme en todo momento de mi vida, por siempre estar a mi lado motivándome y confiando en mí. Te quiero mucho.

A mi otra familia en Cuernavaca: Ana, Sully, Sra Ibeth, Tia Mary y Abuela. Gracias por hacerme parte de su familia, por recibirme siempre con cariño y también por hacerme sentir siempre en casa. Las quiero mucho.

A mi mejor amigo: Alexander. Por motivarme día con día a ser mejor persona. Muchas gracias por brindarme un amor sincero y honesto. *“In a million of universes, you’re the most perfect home, the warmest hug,... and in a million of possibilities, you are with me and i am with you”*

A mis bebés: Bruno, Principe, Gordo, Slinky, Preciosa, Gorda y Princesa. Los amo con todo mi corazón, gracias por ayudarme con mi estrés y ansiedad en mis peores momentos.

Índice

Agradecimientos.....	3
Dedicatorias	4
Índice de figuras	8
Índice de tablas	9
Resumen	10
Introducción.....	12
Antecedentes	15
<i>Geobacter spp</i>	15
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	16
Modelo de transferencia extracelular de electrones.....	17
Pili tipo IV (nanocables microbianos conductivos)	18
Citocromos tipo-c.....	19
Reducción de metales pesados	20
Reducción de Cr(VI) por <i>Geobacter sulfurreducens</i>	21
El regulador Δ G _{SU1771}	21
Antecedentes del regulador postranscripcional Δ <i>csrA</i>	22
Hipótesis.....	24
Objetivos	25
Objetivo general.....	25
Objetivos secundarios.....	25
Materiales y métodos	26
Cepas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento	26
Preparación de K ₂ Cr ₂ O ₇	29
Preparación de reactivos para determinar reducción de Cr(VI) por método colorimétrico difenilcarbazida.....	29
Estrategia experimental.....	30
Determinación de la concentración mínima inhibitoria de Cr(VI) sobre el crecimiento de <i>G. sulfurreducens</i>	30
Evaluación de la velocidad de reducción de Cr(VI) por las cepas mutantes Δ <i>csrA</i> y Δ <i>gsu1771</i>	30
Evaluación del efecto del medio de cultivo usado para crecer a las diferentes cepas de <i>G. sulfurreducens</i> , sobre la reducción de Cr(VI).....	31
Remoción de Cr(VI) por una alta concentración celular de <i>G. sulfurreducens</i> ...	31
Determinación de citocromos tipo-c de células incubadas con Cr(VI)	32

Electroforesis de Proteínas (SDS-PAGE)	32
Tinción hemo	33
Resultados y discusión.....	34
Determinación de la concentración mínima inhibitoria de Cr(VI) sobre el crecimiento de <i>G. sulfurreducens</i>	34
Reducción de Cr(VI) por las cepas de <i>G. sulfurreducens</i>	35
Cinética de reducción de Cr(VI) con una baja densidad celular.....	36
Reducción de Cr(VI) por alta densidad celular y alta concentración de Cr(VI) ..	38
Reducción en medio de cultivo usado con una alta concentración de Cr(VI)	40
Contenido de citocromos tipo-c en las células incubadas con Cr(VI)	41
Conclusiones.....	44
Perspectivas.....	45
Apéndice	46
Referencias	48

Índice de figuras

Figura 1 Actividades que contaminan los ecosistemas con metales pesados.....	12
Figura 2 Modelo de transferencia extracelular de electrones	17
Figura 3 Caracterización de pili tipo IV en <i>Geobacter sulfurreducens</i>	18
Figura 4 Procedimiento para la preparación de medio de cultivo anaerobio	28
Figura 5 Esterilización mediante filtración y anaerobiosis de Cr(VI)	29
Figura 6 Electroforesis de proteínas tipo SDS-PAGE.....	33
Figura 7 Cinética de crecimiento de <i>G. sulfurreducens</i> con diferentes concentraciones de Cr(VI).....	34
Figura 8 Cinética de reducción de Cr(VI) por las cepas WT, $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$ de <i>G. sulfurreducens</i> con 4mM	36
Figura 9 Cinética de reducción de Cr(VI) por las cepas WT, $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$ de <i>G. sulfurreducens</i> con 40 mM de fumarato	37
Figura 10 Cinética de reducción por las cepas WT, $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$ de <i>G. sulfurreducens</i>	39
Figura 11 Cinética de reducción por el medio “gastado” para crecer las cepas WT, $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$	41
Figura 12 Electroforesis de proteínas tipo SDS-PAGE teñido con azul de coomasie (control de carga)	42
Figura 13 Contenido de los citocromos tipo-c de las cepas WT, $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$. Tinción hemo.....	43
Figura 14. Curva de calibración utilizada en la reducción de Cr(VI) en $\mu\text{g/mL}$	47

Índice de tablas

Tabla 1 Principales citocromos tipo-c en <i>Geobacter sulfurreducens</i>	19
Tabla 2 Cepas utilizadas en esta investigación.....	26
Tabla 3 Medios de cultivo utilizados en esta investigación.....	27
Tabla 4 Preparación y cantidades exactas utilizadas en los medios de cultivo.	46

Resumen

El avance de las actividades industriales y la mala disposición de sus residuos, ocasiona que se arrojen al ambiente grandes cantidades de metales pesados que son muy tóxicos para la salud, tal como el Cr(VI). El Cr(VI) es un metal soluble altamente tóxico para los seres vivos; por otro lado, el Cr(III) es menos tóxico e insoluble a pH neutro, facilitando su inmovilización y recuperación (Lara-Figueroa y col., 2021). Derivado de estos problemas ambientales, en este trabajo se propone el uso de bacterias como una herramienta para descontaminar sitios con altas concentraciones de metales pesados, en un proceso llamado biorremediación.

El modelo de estudio con el que se trabajó es *Geobacter sulfurreducens*. *G. sulfurreducens*, es una bacteria anaerobia, bacilo, gram negativa. Tiene la capacidad de reducir varios metales durante la respiración anaerobia a través de un proceso llamado transferencia extracelular de electrones. En este proceso, están involucrados más de 100 citocromos tipo-c y un pili conductivo tipo IV. Reportes recientes muestran que *G. sulfurreducens* puede llevar a cabo la reducción desasimilatoria de Cr(VI) a Cr(III) en medio NBAF líquido anaerobio y, se propone que los citocromos tipo-c están involucrados en la reducción de Cr(VI) (Elmeihy y col., 2021). En el laboratorio de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología se cuenta con una colección de mutantes que presentan características interesantes, entre las que destacan mutantes en los reguladores $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$ que presentan un incremento en la producción de citocromos tipo-c y pili tipo IV. Por lo tanto, en este trabajo, se evaluó la capacidad de estas mutantes para resistir y reducir Cr(VI).

Cultivos de las cepas *G. sulfurreducens* (WT, $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$) con Cr(VI), mostraron que estas cepas son resistentes y crecen en concentraciones de 10 mg/L de Cr(VI), por lo que dicha concentración se estandarizó como la concentración mínima inhibitoria (CMI).

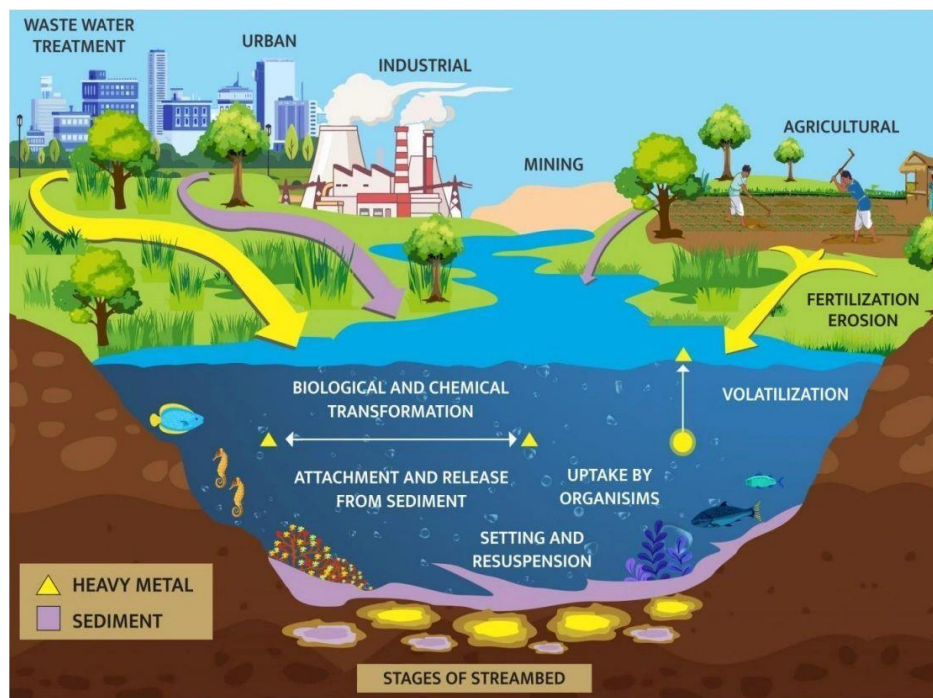
Para analizar el efecto de la concentración del aceptor de electrones (fumarato), se probó la velocidad de reducción de Cr(VI) usando dos concentraciones del aceptor de electrones presente en el medio NBAF (fumarato, 4 mM y 40 mM), una baja concentración celular (3×10^7 células) y Cr(VI) (10 mM). Encontramos que después de 6 hrs de incubación, las cepas mutantes $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$ redujeron el 100% de Cr(VI), independiente de la concentración del aceptor de electrones usada. Mientras la cepa WT, necesito 24 h para reducir el 100% del Cr(VI). Por otro lado, se realizaron ensayos de reducción de Cr(VI) con una densidad celular alta y 30 mg/L de Cr(VI). En estos experimentos de usaron células en suspensión (previamente crecidas en medio NBAF y resuspendidas en un medio basal) a concentración celular de 3×10^8 células. Bajo estas condiciones, determinamos las cepas $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$ redujeron el 100% de Cr(VI) en 72 hrs. La cepa WT redujo el 100% de Cr(VI) en 96 hrs. Para determinar si el medio de cultivo donde se inocularon las células (gastado) contiene proteínas secretadas por las bacterias y que podrían estar involucradas en la reducción de Cr(VI), se realizaron ensayos donde se incubó el medio de cultivo (sin células) con una concentración de 30 mg/L de Cr(VI). Solo observamos una reducción del 10% del Cr(VI) en las primeras 24 hrs de incubación.

Finalmente, para verificar si el incremento en la velocidad de reducción de Cr(VI) por las cepas $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$ es debido al incremento de la expresión de diversos citocromos tipo-c, se analizó el contenido de citocromos por SDS-PAGE y tinción hemo, observando que, el contenido de algunos citocromos de alto peso molecular se incrementaron en las cepas mutantes. Estos resultados muestran que las cepas mutantes $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$ reducen Cr(VI) en menor tiempo que la cepa WT. Se sugiere que los citocromos tipo-c que se incrementaron en las cepas mutantes podrían estar participando en la reducción de Cr(VI). Lo anterior se propone el uso de dichas cepas para favorecer la reducción de Cr(VI) en procesos de biorremediación.

Introducción

A pesar de que no existe una definición exacta, la literatura lo define a un metal pesado como un elemento que posee un peso atómico elevado y una densidad alta (Banfalvi, 2011). Un metal pesado se considera tóxico aún en concentraciones muy bajas, por ejemplo, metales pesados como el arsénico, plomo, cadmio, níquel, mercurio, cromo, cobalto, zinc y selenio son altamente tóxicos en concentraciones bajas (Herawati y col., 2000; Salomons y col., 1995).

La mala disposición de los residuos derivados de las actividades urbanas, industriales, mineras y agrícolas ha ocasionado que se arrojen estos contaminantes al ambiente (Salomons y col., 1995), perjudicando todas las formas de vida y ocasionando graves daños a los ecosistemas (Gaur y col., 2014) (Fig. 1). En otras palabras, estos contaminantes que contiene metales pesados han causado muchos problemas debido a su toxicidad y acumulación en la cadena trófica (Etesami, 2018).



Sources and health effects of hazardous metals

Figura 1 Actividades que contaminan los ecosistemas con metales pesados (Harithabharat, 2021).

El cromo (Cr) es un metal pesado que está presente en la corteza terrestre y es el vigésimo primer elemento más abundante (Gastil y col., 1990). El cromo se presenta predominantemente en dos estados de oxidación, el Cr(III) que es menos tóxico, móvil e insoluble y, el Cr(VI) que es tóxico, cancerígeno, mutagénico y soluble (Villacís y col., 2015).

Como consecuencia de los procesos industriales como el curtido de pieles, la galvanoplastia, la conservación de madera y el procesamiento de tintes, la contaminación por Cr(VI) ha causado graves problemas en aguas subterráneas, suelos y sedimentos (Nyman y col., 2002).

Se ha reportado diferentes estrategias para reducir Cr(VI) a Cr(III), en los cuales están los métodos *ex situ* para la reducción química de este metal en aguas subterráneas contaminadas (Krishna y Philip, 2005). También, se encuentran los métodos *in situ* que se basan en adicionar agentes químicos para reducir el Cr(VI) a Cr(III). Por otro lado, se han desarrollado tratamientos electroquímicos, filtración, precipitación, absorción y/o el intercambio de iones que se han usado para tratar la contaminación por metales pesados (Wang y Ren, 2014).

La desventaja de estos tratamientos físicos y químicos es que requieren altos costos de mantenimiento (Hashim y col., 2011; Mulligan y col., 2001) y los residuos generados deben tratarse o disponerse de manera adecuada (SEMARNAT, 2007). Una estrategia prometedora para eliminar el Cr(VI) de un ambiente contaminado, es la biorremediación, ya que es rentable y sostenible con un bajo impacto en el medio ambiente (Jobby y col., 2018).

Existen diversos microorganismos que poseen la capacidad de reducir Cr(VI), como las bacterias reductoras de sulfato (SRB) (Bencheikh-Latmani y col., 2007; Tuo y col., 2013; Wang y col., 2013). Por otro lado, se conoce que hay bacterias que llevan a cabo la reducción de metales de manera desasimilatoria (DMRB), como las del género *Geobacter* (Pradhan y col., 2017; Tuo y col., 2013; Wang y col., 2013).

Dentro del género *Geobacter*, *Geobacter sulfurreducens* ha demostrado su capacidad para reducir diferentes metales pesados mediante un mecanismo llamado transferencia extracelular de electrones. Entre los metales que *G. sulfurreducens* puede reducir, está el U(VI), Fe(III), Mn(IV), Pd(II) y Tc(II) (Orellana y col., 2013; Shelobolina y col., 2007; Cologgi y col., 2011; Lovley y col., 1991; Anderson y col., 2003).

En el caso del Cr(VI), *G. sulfurreducens* puede reducirlo a Cr(III) y lo puede acumular en forma de nanopartículas, en el espacio intracelular y periplasma (Gong y col., 2018). También, se ha reportado que *G. sulfurreducens* puede acoplar la reducción de Cr(VI) junto a la reducción de otro metal como Fe(III) (He y col., 2019).

Antecedentes

Geobacter spp

La familia *Geobacteraceae*, entre los que destaca el género *Geobacter*, comprende *deltaproteobacterias* presentes en suelos, sedimentos y ambientes superficiales donde la reducción de metales es un proceso activo. Las *Geobacteraceae* son importantes en las comunidades microbianas que degradan contaminantes como hidrocarburos en condiciones de reducción de hierro contribuyendo directa o indirectamente a la reducción de radionucleidos, metales tóxicos y especies oxidadas de nitrógeno (Reguera y Kashefi, 2019).

Entre las funciones medioambientales más importantes que desempeña esta especie esta su capacidad para integrar vías redox y puntos de control reguladores que maximizan la eficiencia del crecimiento con donantes de electrones derivados de la descomposición de materia orgánica, al tiempo que respiran óxidos metálicos, en particular los óxidos de hierro (Reguera y Kashefi, 2019).

El estudio de las especies de *Geobacter* ha llamado la atención debido a los rasgos fisiológicos únicos que posee, entre ellos: una gran cantidad de citocromos tipo-c y la capacidad para producir un pili, que funciona como nanocable para descargar electrones respiratorios a aceptores de electrones extracelulares. Siendo así, debido a sus características y rasgos fisiológicos, de mayor importancia en el área biológica así también para aplicaciones de biorremediación (Reguera y Kashefi, 2019).

G. metallireducens fue la primera especie en ser descrita (Lovley y col., 1993a), aproximadamente hace 25 años como un género nuevo en las *deltaproteobacteria*. En cuanto a *G.sulfurreducens*, fue la primera especie en la cual se desarrollaron métodos para su manipulación genética (Coppi y col., 2001).

Geobacter sulfurreducens

Geobacter sulfurreducens es un bacilo Gram negativo de la familia *Geobacteraceae*, la cual está dentro del dominio Bacteria, filo *Proteobacteria*, clase δ -*Proteobacteria* y orden *desulfuromonadales* (Lovley, 2011). *G. sulfurreducens* fue la primera especie de *Geobacter* en utilizar el hidrogeno como donante de electrones y también, tolerar el oxígeno en condiciones muy bajas (Tabares y col., 2019).

Las especies de *Geobacter* tienen la capacidad de realizar la transferencia extracelular de electrones (TEE) para reducir una amplia gama de metales pesados como: Fe(III), Mn(IV), U(VI), Co(III) y Ag(I), entre otros (Caccavo y col., 1994; Sanford y col., 2007; Law y col., 2008; Lovley y col., 2011). Las dos especies de *Geobacter* más estudiadas han sido *G. metallireducens* y *G. sulfurreducens* (Lovley y Phillips, 1988a; Lovley y col., 1987). Siendo *G. sulfurreducens* el primer representante con un sistema de manipulación genética desarrollado (Coppi y col., 2001) y su genoma secuenciado (Methé y col., 2003).

G. sulfurreducens se convirtió en la cepa seleccionada para estudiar su metabolismo oxidativo y los mecanismos de transferencia extracelular de electrones a óxidos de Fe(III) y Mn(IV) (Reguera y Kashfi., 2019). Así mismo, esto llevó al descubrimiento de pili conductores en *Geobacter* (Reguera y col., 2005) y su papel en la reducción extracelular de óxidos metálicos y U(VI) (Cologgi y col., 2011).

Modelo de transferencia extracelular de electrones

La TEE es una de las características fisiológicas distintivas de las especies de *Geobacter* (Lovley y col., 2011) en la cual participan una gran cantidad de citocromos tipo-c, un pili tipo IV (Ueki, 2021) y la formación de biopelículas en el caso de transferencia a electrodos (Fig. 2) (Lovley y col., 2011; Lovley 2006; Reguera y col., 2007). La capacidad de intercambiar electrones con su entorno extracelular define el nicho ecológico de las especies de *Geobacter* la cual es una característica importante para futuras aplicaciones biotecnológicas. Estudios anteriores han reportado que la transferencia extracelular de electrones en esta especie se lleva a cabo mediante mecanismos únicos que aún no se han descrito en ningún otro organismo (Lovley y col., 2011).

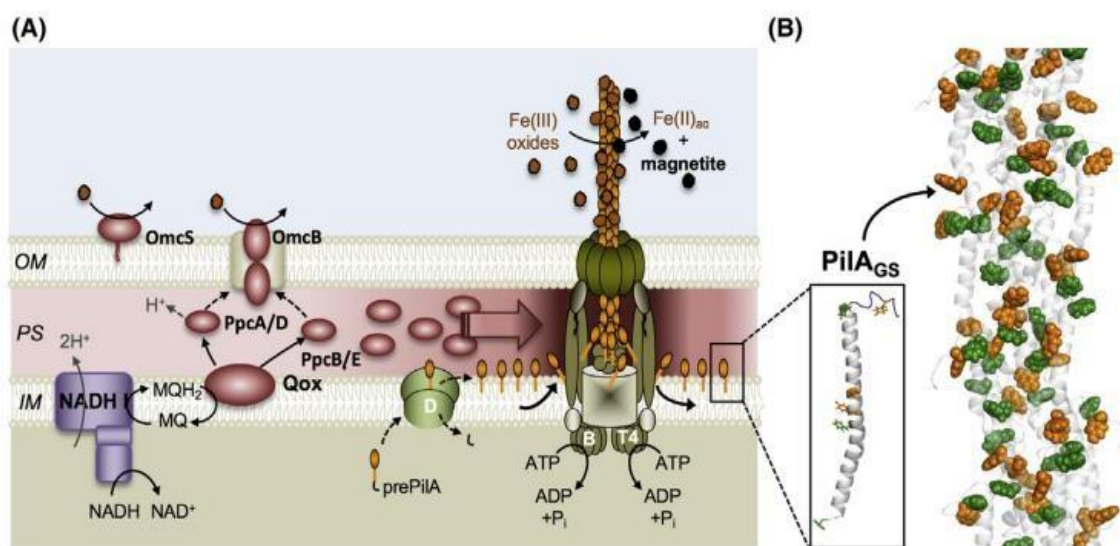


Figura 2 Modelo de transferencia extracelular de electrones. (A) Cadena respiratoria de citocromos y nanocables de *G. sulfurreducens*. Las flechas muestran el flujo de electrones desde la membrana interna hacia los citocromos periplásmicos (Ppc) y finalmente hacia los citocromos de la membrana externa (Omc). El almacenamiento de electrones en los citocromos periplásmicos se puede observar con un gradiente de color café, la transferencia de electrones se observa en la flecha del mismo color. (B) Modelo del pili tipo IV que está constituido por la proteína estructura pilina o PilA de *G. sulfurreducens*. (Reguera y Kashefi., 2019).

Pili tipo IV (nanocables microbianos conductivos)

Diversos estudios han reportado que uno de los descubrimientos más importantes en la transferencia extracelular de electrones, es que *G. sulfurreducens*, y presumiblemente otras especies de *Geobacter*, tienen la capacidad de producir pili eléctricamente conductivos (Adhikari y col., 2016; Reguera y col., 2005) (Fig. 2 y 3).

En *G. sulfurreducens*, el pili es único ya que tiene la capacidad de aceptar los electrones de los componentes periplásmicos y de membrana externa, con el fin de conducirlos hasta su aceptor final, funcionando como un nanocable (Reguera y col., 2005). Los nanocables son esenciales para la reducción de aceptores de electrones insolubles como óxidos de Fe(III) y Mn(IV) pero no para la reducción de aceptores solubles, por ejemplo, citrato de Fe(III) y fumarato, por lo tanto esto nos indica que el nanocable es la conexión entre la célula y los aceptores de electrones insolubles permitiendo la TEE a larga distancia (Reguera y col., 2005). Una de las aplicaciones recientes de *G. sulfurreducens* es su capacidad para generar bioelectricidad mediante la transferencia de electrones a un ánodo dentro de una celda microbiana de combustible (Hernández-Eligio., y col 2016).

El pili tipo IV de *G. sulfurreducens* está compuesto de polímeros formados principalmente por una proteína denominada pilina o PilA, codificada por el gen *pilA* (Reguera y col., 2005, 2006). En donde la expresión de este gen depende del factor σ^{54} y de la proteína reguladora de la respuesta PilR (Hernández-Eligio., y col 2016).

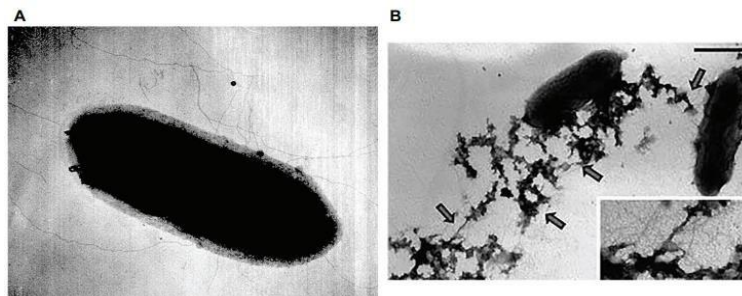


Figura 3 Caracterización de pili tipo IV en *Geobacter sulfurreducens*. (A) Micrografía electrónica de transmisión de una célula expresando pili. (B) Micrografía electrónica de transmisión del óxido de Fe(III) unido a los pili, con una barra de escala de 0,5 μm (Lovley Walker., 2019).

Citocromos tipo-c

Los citocromos son proteínas que contienen uno o más grupos hemo, los cuales poseen diversas funciones biológicas como la transferencia de electrones, transporte y almacenamiento de oxígeno, catálisis, detección de gases y regulación genética (Bowman y Bren, 2008) (Tabla 1). En especies de *Geobacter*, una de las características más importantes y llamativas son sus abundantes citocromos tipo-c y la gran diversidad de citocromos codificados en los genomas de *Geobacter* (Butler y col., 2010b; Ding y col., 2006; Méthé y col., 2003).

Tabla 1 Principales citocromos tipo-c en *Geobacter sulfurreducens*.

Nombre	Descripción	Referencias
PpcA-E	Esta familia de citocromos periplásmicos trihémicos se encuentra conservados en varias especies de <i>Geobacter</i> . PpcA es constitutiva mientras que PpcD se induce durante la reducción de Fe(III). PpcB, PpcC o PpcE aumentan las tasas de reducción de Fe(III).	(Pokkuluri y col., 2004; Butler y col., 2010; Lovley y col., 2011; Morgado y col., 2010) (Shelobolina y col., 2007a).
OmcB/C	Se descubrió en los primeros estudios sobre <i>G. sulfurreducens</i> ya que encontraron una importante actividad de Fe(III) reductasa en fracciones de membrana. Este citocromo tiene un peso molecular de 89 kDa. OmcB se encuentra unida en la membrana externa con una porción de la molécula expuesta a la superficie externa.	(Gaspard y col., 1998; Magnuson y col., 2000). (Magnuson y col., 2001) (Qian y col., 2007)
OmcE	Este citocromo se encuentra en la superficie externa de la célula, pero aún no se ha determinado su localización específica. Se sugiere que debido a que aún no se ha purificado, se le atribuye un peso molecular de 32 kDa. OmcE participa en la reducción de óxidos de Fe(III) y Mn(IV).	(Mehta y col., 2005; Nevin y col., 2009)
OmcZ	Esta proteína tiene la capacidad para reducir aceptores de electrones extracelulares solubles como óxidos de Mn(IV), pero no en presencia de óxido de Fe(III). Esto se debe a que hay una mayor expresión de OmcZ durante el crecimiento en óxido de Mn(IV).	(Holmes y col., 2011b).
PgcA	Originalmente este citocromo se describió como un citocromo periplásmico, estudios actuales lo describen ahora como un citocromo extracelular. Este citocromo se regula al alza durante su crecimiento en óxido de Fe(III), es decir, participa en la transferencia de electrones a óxidos de Fe(III) y Mn(IV) pero no a citrato de Fe(III) o a un electrodo.	(Ding y col., 2008; Holmes y col., 2011b) (Aklujkar y col., 2013; Smith y col., 2014; Zacharoff y col., 2017)

Diversos estudios han reportado que en *G. sulfurreducens* se produce una gran cantidad de citocromos tipo-c, sin embargo, se sugiere que estos no contribuyen al transporte de electrones de larga distancia, pero son importantes en la transferencia de carga, principalmente hacia los óxidos de Fe(III), electrodos y otros aceptores de electrones, así como también en la conducción de la carga desde la membrana interna hasta llegar a la membrana externa (Lovley y col., 2011).

Reducción de metales pesados

Existen diferentes métodos para la reducción de metales pesados, entre ellos, se encuentran los métodos físico-químicos como la extracción, estabilización, inmovilización, lavado de suelos, ósmosis inversa, electrocoagulación y el intercambio iónico (Barrera-Díaz y col., 2012). Se dice que estos métodos son eficaces y se realizan en periodos cortos; sin embargo, algunas de sus desventajas son la operación complicada, equipo costoso y contaminación secundaria (Xia y col., 2019).

Los métodos térmicos como la desorción térmica, vitrificación y pirólisis permiten tiempos rápidos de limpieza, pero es el grupo de tratamientos más costoso e intensivos en mano de obra y capital (SEMARNAT, 2007).

Entre los métodos biológicos se encuentra la biorremediación, fitorremediación, biosorción y extracción de quelantes. Se dice que estos métodos son ecológicos y rentables; sin embargo, algunos compuestos son resistentes al método biológico, por lo que es difícil medir el tiempo y controlar la velocidad del proceso (SEMARNAT, 2007).

Derivado de las actividades industriales y la mala disposición de residuos, se arrojan al ambiente metales pesados que son muy tóxicos para la salud, tal como el Cr(VI). Es por ello que, la biorremediación se considera una alternativa a los costosos métodos fisicoquímicos con un beneficio ambiental. La biorremediación se basa en el uso de materiales biológicos, así como microorganismos (Xia y col., 2019).

Reducción de Cr(VI) por *Geobacter sulfurreducens*

Se conoce al cromo hexavalente Cr(VI) como un compuesto tóxico para los seres vivos, por lo que se han buscado métodos para remediar este metal pesado mediante el uso de bacterias reductoras de metales.

G. sulfurreducens tiene la capacidad de reducir metales durante la respiración anaerobia en un proceso llamado transferencia extracelular de electrones. Como ya se mencionó, en este proceso están involucrados más de 100 citocromos tipo-c y un pili conductivo tipo IV.

Un estudio reciente, Elmeihy y colaboradores (2021), reportaron que *G. sulfurreducens* reduce el Cr(VI) a Cr(III) acumulando iones de Cr de forma intracelular. Con una alta densidad celular de *G. sulfurreducens*, las bacterias removieron un 99% de Cr(VI) en 20 min (100 mg/L). Por otro lado, usando una baja densidad celular, las bacterias removieron un 99% en 72 hrs. Por lo tanto, los buenos resultados de este trabajo demostraron el potencial de *G. sulfurreducens* para reducir Cr(VI) para futuras aplicaciones de biorremediación como la descontaminación de aguas residuales industriales.

El regulador GSU1771

En un trabajo previo, Tremblay y colaboradores (2011), desarrollaron un experimento de evolución adaptativa para encontrar elementos genéticos que ayudaran a *G. sulfurreducens* a incrementar la reducción de Fe(III) insoluble. Como resultado se descubrió mutaciones en los genes *pgcA* y *gsu1771*, el primero codifica para un citocromo tipo-c y el segundo para un regulador transcripcional. Finalmente para verificar que el fenotipo positivo en la reducción de Fe(III) insoluble era resultado de la mutación en el gen *gsu1771*, se construyó una cepa mutante en ese gen y se determinó que el gen *pilA* esta sobreexpresado (Tremblay y col., 2011).

En el laboratorio donde se desarrolló este proyecto, se construyó una cepa mutante en el gen *gsu1771* (Δ *gsu1771*) y se caracterizó su fenotipo y el mecanismo de regulación ejerce la proteína GSU1771 sobre el gen *pilA* y otros blancos de regulación (Almazan, 2023).

Entre las características importantes de la cepa mutante Δ *gsu1771*, es que presenta un crecimiento lento con fumarato como aceptor de electrones; pero, reduce Fe(III) soluble e insoluble en menor tiempo que la cepa WT (Martínez, 2018). También, la cepa mutante Δ *gsu1771* produce una biopelícula más gruesa y hasta 100 veces más electroconductiva, y produce una mayor cantidad de citocromos tipo-c y proteína PilA, que la cepa WT (Hernández-Eligio y col., 2022). Adicionalmente, se determinó que la proteína GSU1771 controla directamente la transcripción de varios genes que codifican proteínas involucradas en la reducción de metales, como citocromos y PilA (Hernández-Eligio y col., 2022).

Un artículo de nuestro grupo, publicado el año pasado, muestra que la proteína reguladora GSU1771 controla la expresión de más del 15% de los genes codificados en el genoma, lo que muestra que tiene un papel relevante en la regulación de la transferencia extracelular de electrones (Jaramillo-Rodríguez y col., 2023).

Antecedentes del regulador postranscripcional Δ *csrA*

En bacterias, se ha descrito a la proteína CsrA como un regulador del almacenamiento de carbono y fue descubierto originalmente en *Escherichia coli* por una mutagénesis cuyo objetivo era identificar reguladores de la expresión genética en la fase estacionaria (Valkulskas y col., 2015).

El gen *csrA* codifica a la proteína reguladora CsrA, la cual se une a la región 5' no codificable del ARN mensajero (ARNm) cerca o sobrelapando el sitio de unión a ribosoma, en una secuencia consenso ya caracterizada RUACARGGAUG (R= A o G), donde el triplete GGA es importante para la unión proteína-ARNm (Lapouge, 2008). Generalmente, la unión de la proteína CsrA a su ARNm blanco, inhibe la unión del ribosoma a la secuencia Shine-Dalgarno, reprimiendo la traducción.

Un trabajo reciente informó que en el genoma de *G. sulfurreducens*, el gen *csrA* se encuentra localizado dentro de una región donde están codificados genes relacionados con la biosíntesis de flagelo. Sin embargo, debido a que la cepa WT de *G. sulfurreducens* no posee flagelo, esto podría ser un indicio de la regulación que ejerce CsrA es dirigida sobre otros procesos celulares (Valkulskas y col., 2015).

En un estudio in silico realizado en el laboratorio, se observó que CsrA de *G. sulfurreducens* presenta un 46% de identidad con CsrA de *E. coli*. Siendo que en *E. coli*, CsrA regula procesos importantes como el metabolismo central del carbono, motilidad, adherencia y formación de biopelículas (Romeo y col., 1998; Wang y col., 2005).

Para determinar la participación del regulador CsrA en la formación de biopelículas en *G. sulfurreducens*, se construyó la cepa mutante $\Delta csrA$ y se caracterizó su fenotipo. Se encontró que la cepa mutante $\Delta csrA$ crece de manera similar que la cepa WT; sin embargo, reduce Fe(III) a Fe(II) en menor tiempo, produce una biopelícula más gruesa y presenta un incremento en la producción de citocromo tipo-c y PilA, que la cepa WT (Ruíz, 2019).

Al igual que la cepa mutante $\Delta gsu1771$, la cepa $\Delta csrA$ presenta incremento en la producción de las proteínas involucradas en la transferencia extracelular de electrones, lo que las hace buenas candidatas para ser usadas en procesos de biorremediación de sitios contaminados con metales pesados y en la producción de bioelectricidad en celdas microbianas de combustible. En este trabajo, se usaron las cepas mutantes $\Delta gsu1771$ y $\Delta csrA$ para evaluar su capacidad de reducir Cr(VI).

Hipótesis

Debido a que las cepas mutantes $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$ de *G. sulfurreducens* presentan una mayor producción de citocromos tipo-c, los cuales son los responsables de la reducción de varios metales solubles, presentarán un incremento en la reducción de Cr(VI) que la cepa WT.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de las mutaciones en los genes $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$ sobre la velocidad de reducción de Cr(VI) en *G. sulfurreducens*

Objetivos secundarios

1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de Cr(VI) sobre el crecimiento de *G. sulfurreducens*.

2. Evaluación de la velocidad de reducción de Cr(VI) por las cepas mutantes $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$.

3. Evaluar el efecto del medio de cultivo usado para crecer a las diferentes cepas de *G. sulfurreducens*, sobre la reducción de Cr(VI).

4. Determinar el contenido total de proteínas citocromos tipo-c de células y medio de cultivo usado en presencia de Cr(VI).

Materiales y métodos

Cepas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

A continuación, se presenta una lista de materiales y métodos que se utilizaron para el desarrollo de este proyecto. Las cepas de *G. sulfurreducens* se enlistan en la tabla 2.

Tabla 2 Cepas utilizadas en esta investigación.

Cepa	Genotipo/fenotipo <i>Geobacter sulfurreducens</i>	Referencia
DL1	Cepa silvestre	Hernandez-Eligio y col., 2022
$\Delta csrA$	Derivada de DL1, con la delección en el gen <i>csrA</i>	Ruíz, 2019
$\Delta gsu1771$	Derivada de <i>G. sulfurreducens</i> DL1 con la delección en el gen <i>gsu1771</i>	Almanza, 2023

A continuación, en la tabla 3, se presentan los medios usados en este proyecto:

Tabla 3 Medios de cultivo utilizados en esta investigación.

Medio de cultivo	Composición (lt)	Uso	Referencias
Medio Basal	2.5 g NaHCO ₃ 0.25 g NH ₄ Cl 0.006 g NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O 0.1 g KCl	Experimento de células en suspensión	Hernández y col., 2020.
NBAF	800 mL H ₂ O Milli Q 40 mL C ₄ H ₂ Na ₂ O ₄ (1M) 10 mL NB Sales (100X) 10 mL NB Mineral Elixir (100X) 15 mL DL Vitaminas * 10 mL CaCl ₂ (0.4%) 10 mL MgSO ₄ ·7H ₂ O (1.0%) 1.8 g NaHCO ₃ 0.5g Na ₂ CO ₃ ·H ₂ O 1 mL Na ₂ SeO ₄ (1 mM) 0.800 g C ₂ H ₃ NaO ₂	Crecimiento de las cepas de <i>G. sulfurreducens</i>	Coppi y col., 2001

Nota: En el caso del medio NBAF, **no se añadió cisteína, resazurina y extracto de levadura** en todos los ensayos de esta investigación ya que habitualmente estos se usan como agente reductor para el crecimiento anaeróbico de *G. sulfurreducens* y puede interferir en la reducción de Cr(VI).

El medio NBAF se burbujeó en botellas y tubos anaerobios (8 minutos por cada 10 mL de medio de cultivo en cada una de las fases; líquida y gaseosa) con una mezcla de gases N₂: CO₂ (80:20), se sellaron y esterizaron en autoclave (120°C) durante 20 min. (Fig. 4).

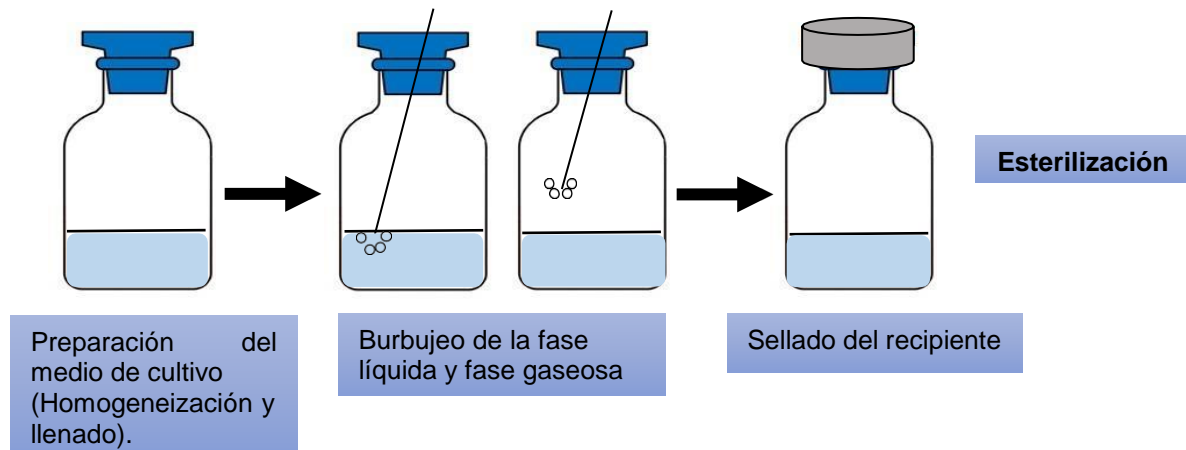


Figura 4 Procedimiento para la preparación de medio de cultivo anaerobio. La mezcla de gases (N₂: CO₂ en condiciones 80:20) es suministrada a partir de una estación de gaseo (Martínez 2018).

El mantenimiento de cultivo para crecer a *G. sulfurreducens* se realizó en medio NBAF sin rezasurina, cisteína y extracto de levadura previamente esterilizado.

Para esto, se realizó lo siguiente:

1. En la estación de gases, las jeringas se purgaron con la mezcla de N₂/CO₂ para que de esta forma puedan ser introducidas en los medios anaerobios.
2. Después, se inoculó con cultivos frescos de *G. sulfurreducens*.
3. Finalmente, se incubó a 30°C.

Preparación de $K_2Cr_2O_7$

Para una concentración stock de 500 mg/L se pesó 0.01 gr de $K_2Cr_2O_7$ y se disolvió con 20 mL de H_2O milliQ. La solución de Cr(VI) se esterilizó por filtración y finalmente se burbujeo en la estación de gases con un tiempo de 20 min en la fase líquida y 20 min en la fase gaseosa. (Figura 5 y 6).

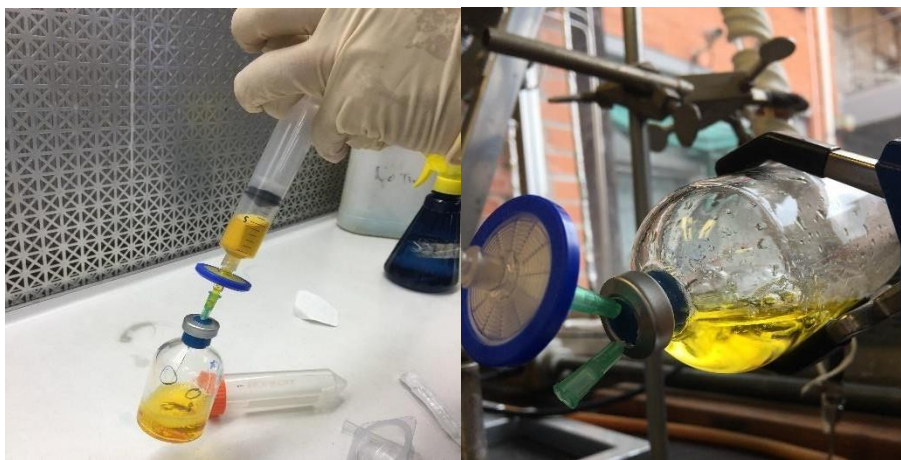


Figura 5 Esterilización mediante filtración y anaerobiosis de Cr(VI)

Preparación de reactivos para determinar reducción de Cr(VI) por método colorimétrico difenilcarbazida:

1. Se preparó una solución de H_2SO_4 al 10% de la siguiente manera:
Se agregó 0.5 mL de H_2SO_4 y 4.5 mL de H_2O en un frasco de vidrio y se cerró cuidadosamente después de unos minutos.
2. Se preparó difenilcarbazida al 0.5% de la siguiente manera: se pesó 0.025 gr de difenilcarbazida en la balanza analítica y se vertió con 5 mL de acetona en un frasco ámbar.

Estrategia experimental

A continuación, se enlistan puntos importantes para la realización de esta investigación de acuerdo con lo previamente descrito (Elmeihy y col., 2021).

Determinación de la concentración mínima inhibitoria de Cr(VI) sobre el crecimiento de *G. sulfurreducens*

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de Cr(VI) sobre el crecimiento de *G. sulfurreducens*, se realizaron ensayos por triplicado para determinar el crecimiento y resistencia de *G. sulfurreducens* en cultivos anaerobios de NBAF con diferentes concentraciones de Cr(VI). Se utilizaron concentraciones de Cr(VI) entre 5 mg/L y 300 mg/L. En este proyecto, se usó $K_2Cr_2O_7$ y posteriormente, el crecimiento celular se monitoreo por el cambio en la absorbancia (600nm) cada 24 hrs.

Evaluación de la velocidad de reducción de Cr(VI) por las cepas mutantes $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$

Para la evaluación de la velocidad de reducción de Cr(VI), se realizaron ensayos por triplicado, agregando la concentración de 10 mg/L de Cr(VI) sobre el crecimiento de las cepas mutantes $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$. La reducción de Cr(VI) se determinó por el método colorimétrico “difenilcarbazida” en solución ácida, seguida de la medición de la absorbancia a 540 nm (American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation 1999). Se tomaron muestras del cultivo a partir del tiempo inicial, posteriormente cada 2, 4, 6, 8 y 24 hrs.

Nota: En los ensayos para evaluar la velocidad de reducción se usaron dos condiciones de fumarato, 4 y 40 mM para determinar si la limitación de aceptor de electrones tiene un efecto positivo en la reducción de Cr(VI).

Evaluación del efecto del medio de cultivo usado para crecer a las diferentes cepas de *G. sulfurreducens*, sobre la reducción de Cr(VI)

Se inocularon cultivos con las diferentes cepas de *G. sulfurreducens* (WT, $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$). Se centrifugaron 50 mL del medio de cultivo a 3500 rpm por 15 min. Posteriormente, en la cámara anaerobia se filtró el medio de cultivo usado, 10 mL en cada tubo anaerobio. Posteriormente, se agregó una concentración de 30 mg/L de Cr(VI), y se determinó la concentración de Cr(VI) reducido.

Remoción de Cr(VI) por una alta concentración celular de *G. sulfurreducens*

Para la remoción de Cr(VI) por una alta concentración celular se inocularon cultivos con las diferentes cepas de *G. sulfurreducens* (WT, $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$) en medio de cultivo NBAF por 48 hrs a 37 °C. Al finalizar la incubación, se centrifugaron 50 mL del medio de cultivo a 3500 rpm por 15 min para separar la pastilla celular y el sobrenadante. En la cámara anaerobia, se resuspendió la pastilla celular y se midió la absorbancia a 600 nm.

Posteriormente, mediante la ecuación de Lambert-Beer y la expresión matemática: $C_1V_1 = C_2V_2$ se ajustó a una concentración de células de 3×10^8 . Con la concentración de células adecuada, se realizó el ensayo por triplicado en condiciones anaeróbicas.

Finalmente, en la estación de gases, se agregó acetato (20 mM) y por último, 30 mg/L de Cr(VI) en cada tubo anaerobio. Se midió la reducción de Cr(VI) por el método colorimétrico difenilcarbazida cada 24 hrs a una abs de 540 nm.

Nota: Al final de la reducción de Cr(VI) en los puntos 3 y 4, se guardaron las pastillas celulares a -70°C para el siguiente paso de esta investigación.

Determinación de citocromos tipo-c de células incubadas con Cr(VI)

Se realizó una electroforesis de proteínas y tinción hemo para determinar el contenido de citocromos tipo-c de células de *G. sulfurreducens* incubadas con Cr(VI). A la par se realizó un duplicado de la electroforesis y se tiñó con azul de coomasie como control de carga. Para este paso, se prepararon 4 geles de poliacrilamida-SDS al 15% (ver apéndice). A las pastillas celulares de cada cepa (WT, $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$) incubadas con Cr(VI), se resuspendieron con 100 μ L de B-PER (Thermo Scientific) y la suspensión se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. Seguido, se centrifugó por 5 min a 14000 rpm para separar la fracción soluble y la fracción insoluble.

Electroforesis de Proteínas (SDS-PAGE)

Para la electroforesis de proteínas, se cargaron los pozos con (por duplicado) 30 μ g con de proteína mezclados con buffer de carga (2.5 mL Tris-HCl 0.5 M [pH 6.8], 4 mL SDS, 2 mL Glicerol 100%). Como marcador de peso molecular se utilizó Thermo-scientific PageRuler Prestained Protein Ladder que fue utilizado para calcular el peso molecular de las proteínas. La electroforesis se sometió a 100 V por una hora en una solución amortiguadora Tris-Glicina 1X (Tris 25 mM, glicina 250 mM, SDS al 0.1 %). (Figura 7).

Para finalizar, los geles se tiñeron con azul de Coomassie (0.1 % de Coomassie Brilliant Blue en una solución de 40 % de etanol y 10 % de ácido acético glacial) durante 1 h. Enseguida, se lavaron con una solución desteñidora (10 % de etanol y 7.5 % mL de ácido acético glacial) por 30 min. Por último, se obtuvo la imagen por medio de un fotodocumentador de luz blanca (BioRad).

Tinción hemo

Después de correr el gel SDS-PAGE (ver apéndice) con una concentración de 30 μg de proteínas se siguió el siguiente procedimiento:

Se preparó 15 mL de TMB (3,3',5,5'- Tetramethylbenzidine MW: 240.34 gr/mol) 6.3 mM en un tubo falcón cubierto con aluminio (para evitar exposición a la luz debido a que este reactivo es sensible a la luz). Posteriormente, se mezclaron 3 partes de TMB 6.3 mM con 7 partes de acetato de sodio 0.25 M pH 5.0. Para esta mezcla se ponen los 15 mL de TMB + 35 mL de acetato de sodio (MW: 82.03 gr/mol). Se sumergió el gel (previamente sujeto a electroforesis) en la solución de TMB/acetato en oscuridad, y se dejó reposar 1 h. Después se agregó H_2O_2 (MW 34.01 g/mol) a una concentración final de 30 mM y se dejó reposar en la oscuridad por 30 minutos. Finalmente, el gel se cambió a otro contenedor y se sumergió en una solución de isopropanol/acetato de sodio 0.25M pH 5.0. a una relación 3:7, para quitar el exceso de TMB precipitado y mejorar la definición de las bandas teñidas.



Figura 6 Electroforesis de proteínas tipo SDS-PAGE

Resultados y discusión

Determinación de la concentración mínima inhibitoria de Cr(VI) sobre el crecimiento de *G. sulfurreducens*

Para determinar la concentración mínima inhibitoria de Cr(VI) sobre el crecimiento de *G. sulfurreducens*, se realizaron curvas de crecimiento usando la cepa silvestre, (WT) con diferentes concentraciones de Cr(VI). Se usaron concentraciones desde 5-300 mg/L de Cr(VI). La figura 7 muestra las cinéticas de crecimiento con las diferentes concentraciones de Cr(VI).

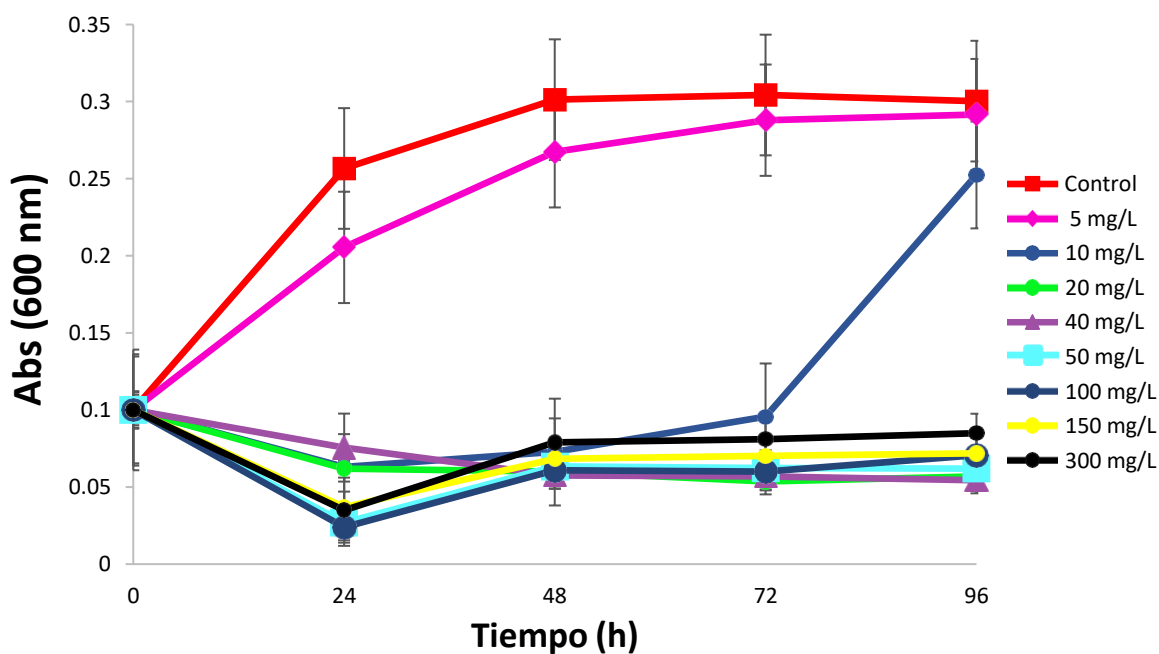


Figura 7 Cinética de crecimiento de *G. sulfurreducens* con diferentes concentraciones de Cr(VI). En cada línea se muestra la concentración de Cr(VI) usada. De control, se creció a la cepa WT sin Cr(VI). Los puntos obtenidos en cada tiempo es el promedio de un triplicado, se muestra la desviación estándar de cada punto.

La línea con cuadros naranjas muestra el crecimiento de *G. sulfurreducens* sin Cr(VI). En las primeras 24 h de cultivo, presenta un crecimiento exponencial, seguido de una fase estacionaria hasta el final del cultivo (95 h). En la línea con rombos rosas se muestra el crecimiento con una concentración de 5 mg/L de Cr(VI), y se observa un ligero retraso en el crecimiento, comparado con la cepa sin Cr(VI); sin embargo, al final de la cinética, alcanza concentraciones celulares similares a la cepa sin Cr(VI). En la línea con círculos morados se observa el crecimiento con 10 mg/L de Cr(VI), en las primeras 24 h disminuye la absorbancia, posiblemente por muerte celular; sin embargo, a las 48 h se empieza a recuperar el crecimiento hasta que finalmente alcanza una densidad celular similar al cultivo sin Cr(VI). Utilizando concentraciones de Cr(VI) superiores a 10 mg/L no se presentó crecimiento, lo que nos sugiere que la cepa WT no resiste a esas concentraciones de Cr(VI). Por lo tanto, para estudiar la velocidad de reducción de Cr(VI) con las diferentes cepas de *G. sulfurreducens* se estandarizó que la concentración mínima inhibitoria de Cr(VI) es de 10 mg/L.

Reducción de Cr(VI) por las cepas de *G. sulfurreducens*

Con la finalidad de caracterizar y cuantificar la capacidad de las cepas de *G. sulfurreducens* (WT y mutantes, $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$) para reducir Cr(VI), se determinó la reducción de Cr(VI) en dos condiciones, la primera usando una baja densidad celular (3×10^7 células) y 10 mg/L de Cr(VI), y la segunda usando una mayor densidad celular (3×10^8 células) y 30 mg/L de Cr(VI).

Cinética de reducción de Cr(VI) con una baja densidad celular

Para determinar la reducción de Cr(VI) por las cepas de *G. sulfurreducens* con baja densidad celular, se probaron dos condiciones para evaluar si la limitación del aceptor de electrones (fumarato) favorecía la reducción de Cr(VI). En la primera condición, se usó fumarato a 4 mM y 10 mg/L de Cr(VI). En la figura 8 se muestra la cinética de reducción de Cr(VI). Se observa que en el control abiótico no hay reducción de Cr(VI) (línea con círculos rojos); sin embargo, en las primeras dos horas, la cepa WT reduce un 60% de Cr(VI) (línea con triángulos verdes), mientras que las cepas mutantes $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$, reducen un 88% y 90% (líneas con cuadros azules y con rombos amarillos, respectivamente). Después de las 6 h de incubación las dos cepas mutantes redujeron el 100% de Cr(VI) mientras que a la cepa WT requirió de 26 h para reducir hasta un 95% de Cr(VI).

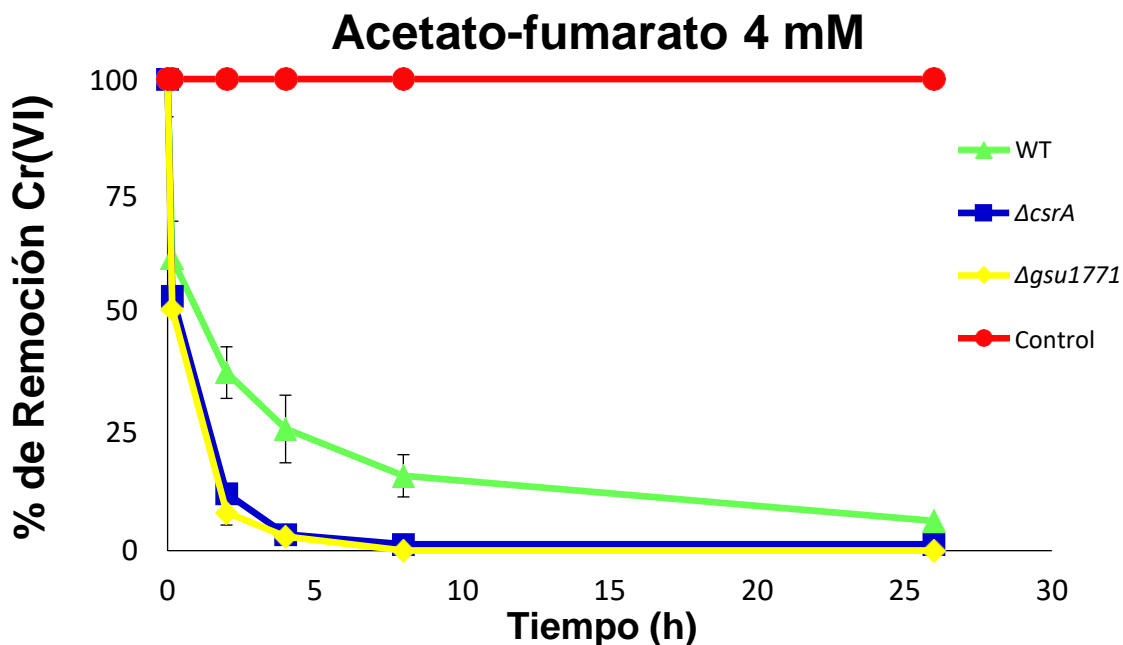


Figura 8 Cinética de reducción de Cr(VI) por las cepas WT, $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$ de *G. sulfurreducens* con 4mM. Se muestran los valores promedio de un triplicado experimental. Los valores de desviación estándar son muy pequeños para ser observados.

En la segunda condición se inocularon los cultivos con 40 mM de fumarato (aceptor de electrones) y 10 mg/L de Cr(VI).

En la figura 9 se muestra la cinética de reducción de Cr(VI). Al igual que con fumarato a 4 mM (Fig. 8), con fumarato 40 mM no hay reducción de Cr(VI) en el control abiótico. Por otro lado, dentro de las primeras 2 h se observa que la cepa WT reduce un 65% de Cr(VI) (línea con triángulos verdes), mientras que las cepas mutantes $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$ presentaron una reducción de 87% y 98% (líneas con cuadros azules y con rombos amarillos, respectivamente). Al paso de las 8 hrs de incubación las cepas mutantes redujeron el 100% de Cr(VI), mientras que la cepa WT necesito 26 h para reducir el 92% de Cr(VI).

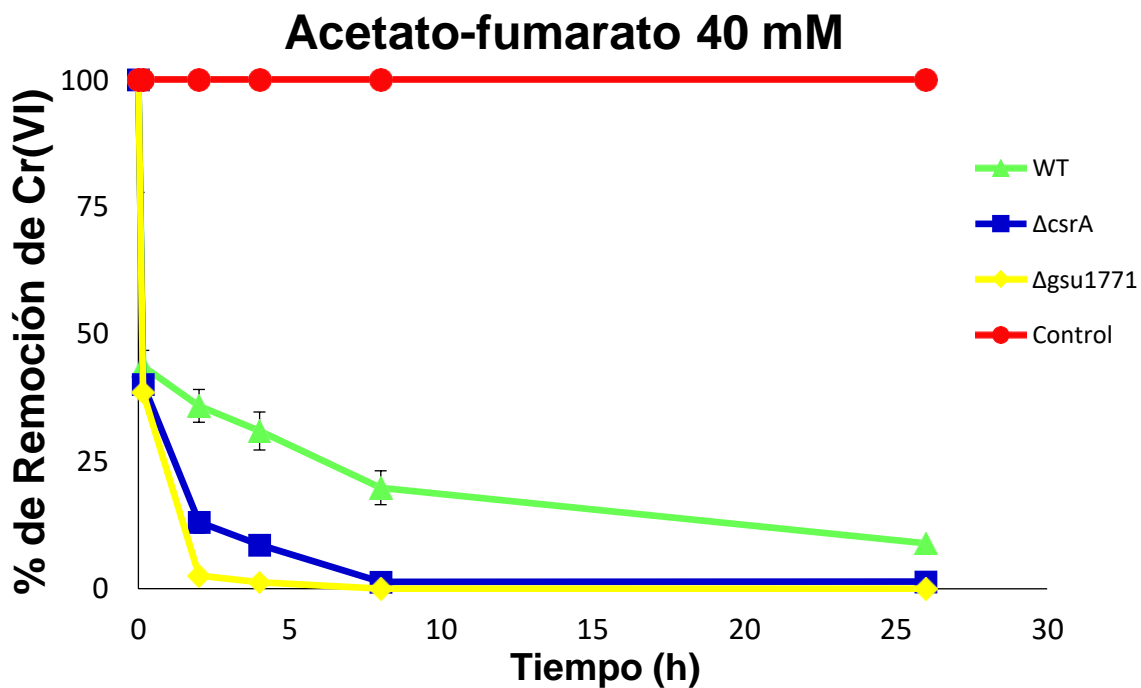


Figura 9 Cinética de reducción de Cr(VI) por las cepas WT, $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$ de *G. sulfurreducens* con 40 mM de fumarato. Se muestra los promedios de un triplicado experimental. Los valores de desviación estándar son muy pequeños para ser observados.

Las figuras 8 y 9 muestran las cinéticas de reducción de Cr(VI) a Cr(III) por las cepas de *G. sulfurreducens* con una baja densidad celular. En las dos cinéticas se muestra un comportamiento similar, siendo las cepas mutantes quienes reducen en menor tiempo el Cr(VI) a Cr(III). La reducción de Cr(VI) es dependiente de la presencia de *G. sulfurreducens*, ya que en los controles abióticos, no se observa una reducción de Cr(VI). Previamente se había reportado (Elmeihy y col., 2021) que la limitación del aceptor de electrones, podría tener un efecto positivo en la velocidad de reducción de Cr(VI); sin embargo, en nuestras dos condiciones de cultivos usadas (4 y 40 mM de fumarato), las cepas probadas presentan cinéticas de reducción similar, por lo que bajo nuestras condiciones experimentales, no observamos que la concentración de fumarato favorezca la velocidad de reducción de Cr(VI). Por otro lado, las cepas mutantes $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$ reducen en menos tiempo el Cr(VI), que la cepa WT. Lo anterior pudiera ser resultado de que dichas cepas mutantes producen más citocromos tipo-c que la cepa WT (Hernández-Eligio y col., 2022; Martínez, 2018; Ruiz, 2019). Debido a que las cepas de *G. sulfurreducens* reducen en menor tiempo Cr(VI) a Cr(III), se probó la reducción de Cr(VI) con una alta densidad celular y mayor concentración de Cr(VI).

Reducción de Cr(VI) por alta densidad celular y alta concentración de Cr(VI)

Con la finalidad de estudiar la reducción de Cr(VI) por las cepas de *G. sulfutrreducens*, usando una alta densidad celular (3×10^8 células) y una concentración mas alta de Cr(VI) (30 mg/L), se realizaron cinéticas de reducción de Cr(VI) con células previamente crecidas en NBAF. Las células de las diferentes cepas (WT, $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$) se cosecharon en anaerobiosis, después de 48 h de crecimiento en medio NBAF (ver materiales y métodos). Se calculó la concentración celular y se añadieron 3×10^8 células y Cr(VI) al medio de reacción anaeróbico.

En la figura 10, se muestra la cinética de reducción de Cr(VI), y se observa que a las 24 h de incubación, la cepa WT reduce un 70%, a las 48 h se redujo el 75% y a las 96 h el 100% de Cr(VI) (línea con triángulos verdes). Por otro lado, la cepa mutante $\Delta csrA$ a las 24 h redujo un 80% (línea con cuadros morados), a las 48 h 90 % y a las 72 h se redujo completamente el Cr(VI). Por otro lado, la cepa $\Delta gsu1771$ redujo un 90% (línea con rombos amarillos) a las 24 h, y a las 48 h se redujo el 100% del Cr(VI).

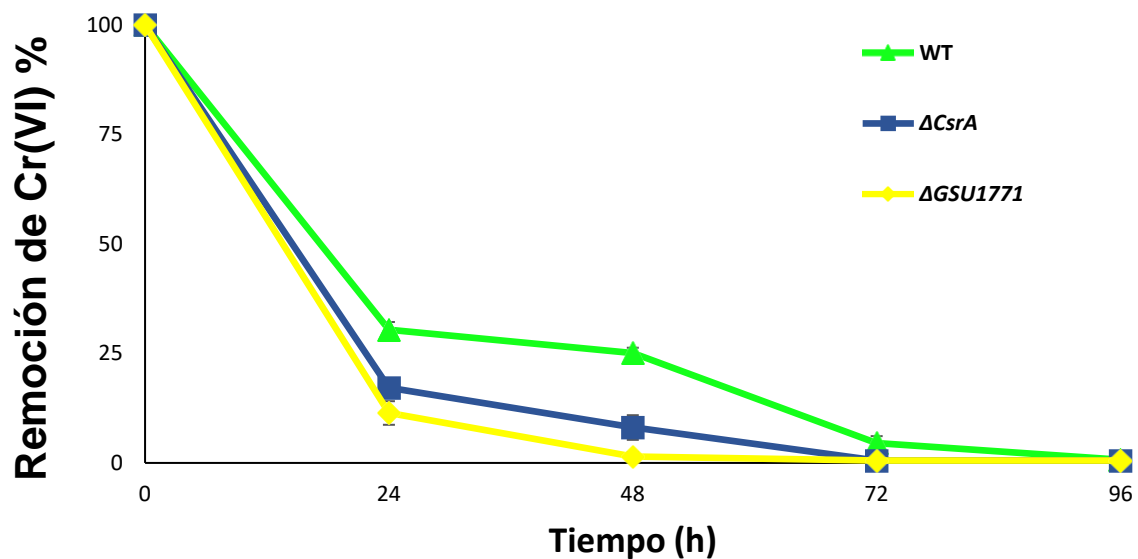


Figura 10 Cinética de reducción por las cepas WT, $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$ de *G. sulfurreducens*. Se usó 30 mg/L de Cr(VI) y una densidad celular de 3×10^8 células. Se muestran los promedios de un triplicado experimental. Los valores de desviación estándar son muy pequeños para ser observados.

Como se observa en la figura 10, las cepas mutantes de *G. sulfurreducens* reducen en menor tiempo el Cr(VI) presente en el medio. De manera sobresaliente, la cepa $\Delta gsu1771$ en las primeras 48 h redujo el 100% de Cr(VI) a diferencia de las otras dos cepas (WT y $\Delta csrA$). Al igual que con una menor densidad (Fig. 9), las cepas de *G. sulfurreducens* pueden reducir el Cr(VI) presente en el medio, como resultado de la diversidad metabólica de la bacteria. Entre los elementos involucrados en la reducción de metales solubles que se han descrito en *G. sulfurreducens* se encuentran los citocromos tipo-c de membrana externa OmcB, OmcC, OmcE (Hernandez-Eligio y col., 2020). En las cepas mutantes $\Delta gsu1771$ y $\Delta csrA$, los genes que codifican esos citocromos se encuentran sobre expresados, lo que pudiera explicar que la reducción de Cr(VI) sea en menor tiempo que la cepa WT.

Reducción en medio de cultivo usado con una alta concentración de Cr(VI)

Se conoce que *G. sulfurreducens* produce y secreta citocromos tipo-c, como OmcS y OmcZ. Para determinar si en el medio de cultivo donde se creció a *G. sulfurreducens* contiene proteínas involucradas en la reducción de Cr(VI) se realizaron ensayos donde se utilizó este medio de cultivo (aquí llamado “medio gastado”, sin células) y se incubó con una concentración de 30 mg/L de Cr(VI). (Figura 11).

Como se observa en la figura 11, solo hay una reducción del 10% de Cr(VI) a las 24 h. A tiempos más largos no se presentó un incremento en la reducción de Cr(VI). Por otro lado, no se observó reducción de Cr(VI) en el control abiótico, lo que sugiere que la baja reducción de Cr(VI) en el medio gastado es producto de una mínima concentración de proteínas presentes en el medio gastado.

Cinética de reducción de Cr(VI) con el medio de cultivo gastado.

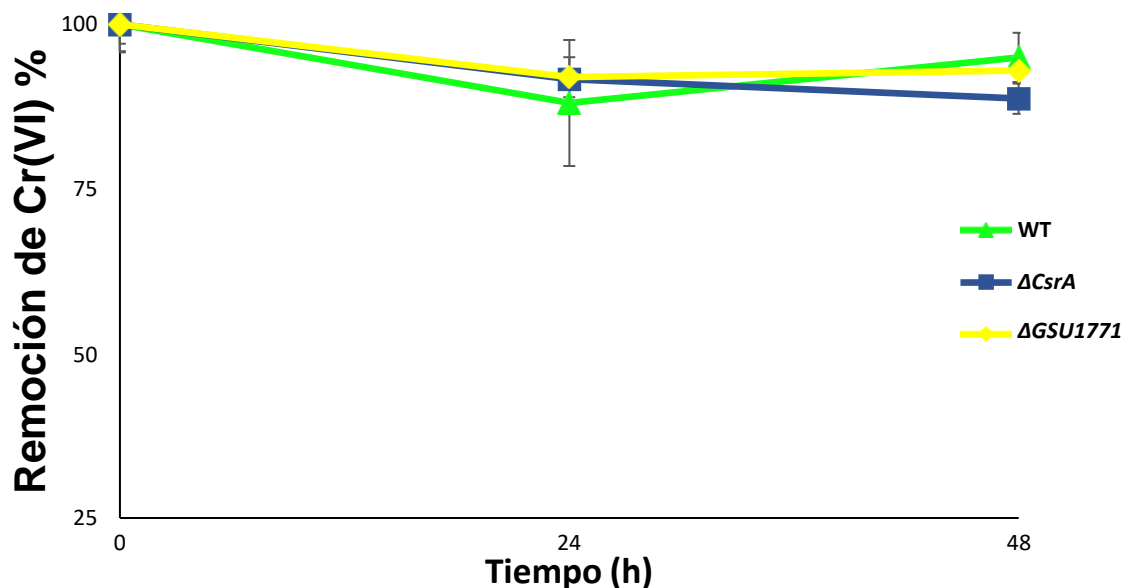


Figura 11 Cinética de reducción por el medio “gastado” para crecer las cepas WT, $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$. En este ensayo se añadió una concentración de 30 mg/L de Cr(VI) y medio de cultivo usado. Se muestran valores promedio de un triplicado experimental. Los valores de desviación estándar son muy pequeños para ser observados.

Contenido de citocromos tipo-c en las células incubadas con Cr(VI)

Con la finalidad de explorar si el incremento en la velocidad de reducción de Cr(VI) por las cepas mutantes $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$ es debido al incremento de la expresión de diversos citocromos tipo-c, se determinó el contenido de estas proteínas mediante electroforesis de proteínas tipo SDS-PAGE y tinción hemo. Se usó como control de carga geles sometidos a electroforesis SDS-PAGE teñidos con azul de coomasie.

En estos experimentos se usaron extractos de proteínas provenientes de las tres cepas de *G. sulfurreducens* crecidas con Cr(VI). En la figura 12 se muestra el control de carga teñido con azul de coomasie.

Electroforesis de proteínas tipo SDS-PAGE, azul de coomassie.

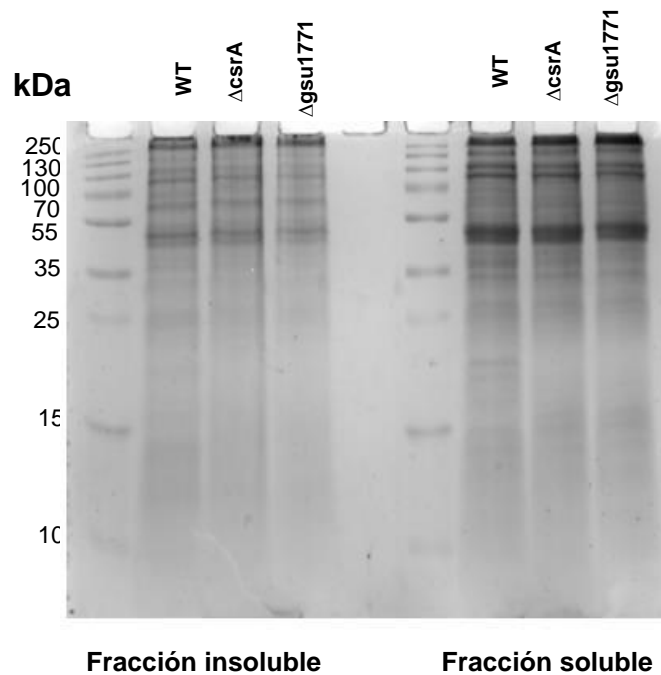


Figura 12 Electroforesis de proteínas tipo SDS-PAGE teñido con azul de coomassie (control de carga). En cada carril se muestra el extracto proteico de cada cepa usada (WT, $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$). Se muestran los pesos aproximados del marcado de peso.

En la figura 13, se muestra la electroforesis de proteínas con una tinción específica para citocromos tipo-c provenientes de las fracciones insoluble y soluble. Se observa que algunos citocromos de alto peso molecular se incrementan más en las cepas mutantes que en la cepa WT.

Este incremento en las cepas mutantes se debe a la expresión de algunos citocromos tipo-c en la transferencia extracelular de electrones y no porque se haya cargado más proteínas en la electroforesis, ya que como se observa en el control de carga (Fig. 12, tinción de azul de coomassie) se observa el mismo contenido de proteínas para ambas condiciones. Respecto a su peso molecular, se propone que, los citocromos que se incrementan son: GSU2898, GSU0702, GSU3450 y OmcB. Entre estos citocromos, OmcB destaca porque en estudios anteriores se menciona que está unido a la membrana externa y participa en la reducción de Fe(III) soluble.

Electroforesis de proteínas citocromos tipo-c (Tinción hemo).

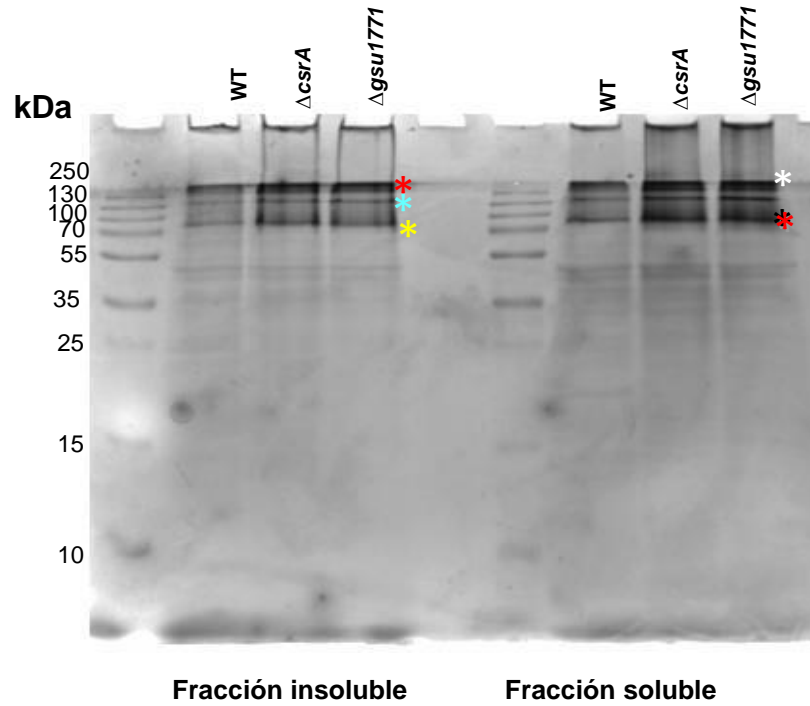


Figura 13 Contenido de los citocromos tipo-c de las cepas WT, $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$. Tinción hemo. En cada carril se muestra el extracto proteico de cada cepa usada (WT, $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$). Se muestran los pesos aproximados del marcado de peso. Los asteriscos señalan los citocromos que se incrementan.

Conclusiones

- Las cepas mutantes $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$ reducen Cr(VI) en menor tiempo que la cepa WT.
- Con una baja densidad celular de 8×10^7 , las cepas $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$ reducen 10 mg/L de Cr(VI) 12 veces más rápido que la cepa WT .
- Con una alta densidad celular de 3×10^8 las cepas $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$ reducen 30 mg/L de Cr(VI) 2 veces más rápido que la cepa WT.
- No se requiere una limitación de fumarato para acelerar la velocidad de reducción en medio NBAF.
- El medio de cultivo usado (NBAF) para crecer a *G. sulfurreducens* contiene una baja concentración de proteínas involucradas en la reducción extracelular de Cr(VI) ya que presenta una reducción de hasta un 10% en las diferentes cepas a las 24 hrs.
- Debido al incremento de citocromos de alto peso molecular en las cepas mutantes $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$ (observadas en la tinción hemo), se sugiere que estos citocromos tipo-c podrían estar participando en la reducción de Cr(VI).

Perspectivas

- Determinar mediante espectrometría de masas, las proteínas citocromos tipo-c que se incrementan en las cepas mutantes $\Delta csrA$ y $\Delta gsu1771$ durante el crecimiento y reducción de Cr(VI).
- Identificar por espectrometría de masas los citocromos tipo-c que están participando en la reducción de Cr(VI) en el medio de cultivo usado para crecer a *G. sulfurreducens*.
- Realizar ensayos de viabilidad celular en las cepas mutantes después de la reducción de Cr(VI).

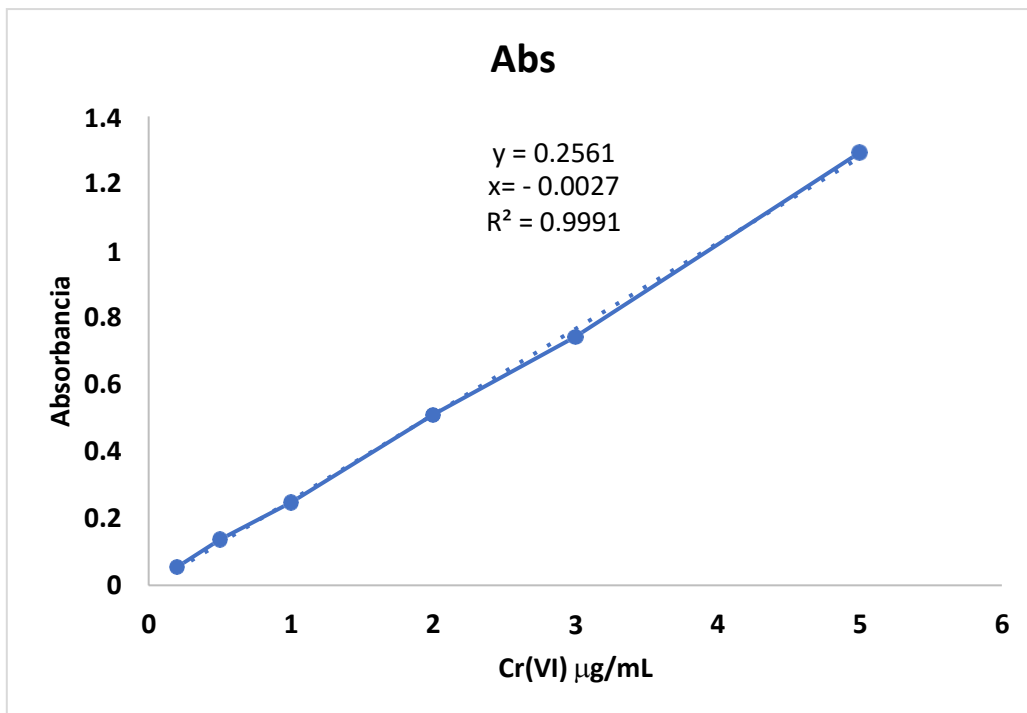
Apéndice

Tabla 4 Preparación y cantidades exactas utilizadas en los medios de cultivo.

Nombre del medio de cultivo	Reactivo	Cantidad por litro
1. DL vitaminas	H ₂ O Milli Q	800 mL
	Biotina	0.002 g
	Ácido pentoténico	0.005 g
	Vitamina B-12	0.0001 g
	Ácido p-aminobenzóico	0.005 g
	Ácido tióctico	0.005 g
	Ácido nicotínico	0.005 g
	Thiamine Hydrochloride	0.005 g
	Riboflavina	0.005 g
	Piridoxina HCl	0.01 g
	Ácido fólico	0.01 g
		Aforar a 1L con H ₂ O Milli Q
	NB Sales 100 X	H ₂ O Milli Q
KH ₂ PO ₄ (monobásico)		42 g
KH ₂ PO ₄ (dibásico)		22 g
NH ₄ Cl		20 g
KCl		38 g
NaCl		36 g
Preparación de geles de poliacrilamida al 15%		
Reactivo	Gel separador	Gel concentrador
H ₂ O	2.3 mL	2.7 mL
Acrilamida 30 %	5.0 mL	0.67 mL
Tris 1.5 M (pH 8.8)	2.5 mL	-
Tris 1 M (pH 6.8)	-	0.5 mL
SDS 10%	0.1 mL	0.04 mL
Persulfato de amonio 10%	0.1 mL	0.04 mL
TEMED	0.004 mL	0.004 mL
Volumen final	10 mL	4 mL

***TEMED:** N, N, N',N'-tetrametiletildiamina

Figura 14. Curva de calibración utilizada en la reducción de Cr(VI) en $\mu\text{g/mL}$.



Referencias

- Adhikari, R. Y., Malvankar, N. S., Tuominen, M. T., and Lovley, D. R. (2016). Conductivity of individual *Geobacter pili*. *RSC Advances*, 6(10), 8354–8357.
- Aklujkar, M., Coppi, M.V., Leang, C., Kim, B.C., Chavan, M.A., Perpetua, L.A., Giloteaux, L., Liu, A., and Holmes, D.E. (2013). Proteins involved in electron transfer to Fe(III) and Mn(IV) oxides by *Geobacter sulfurreducens* and *Geobacter uraniireducens*. *Microbiology*, 159, 515-535.
- American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation (1999) Standard methods for the examination of water and wastewater. *Estándar Methods*: 541.
- Anderson, R.T., Vrionis, H.A., Ortiz-Bernad, I., Resch, C.T., Long, P.E., Dayvault, R., Karp, K., Marutzky, S., Metzler, D.R., Peacock, A., White, D.C., Lowe, M., Lovley, D.R., (2003). Stimulating the In situ activity of *Geobacter* species to remove uranium from the groundwater of a uranium-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5884-5891.
- Banfalvi G. (2011). Cellular Effects of Heavy Metals. *Netherlands, London, New York: Springer*.
- Barrera-Díaz, C.E., Lugo-Lugo, V., Bilyeu, B., (2012). A review of chemical, electrochemical and biological methods for aqueous Cr(VI) reduction. *J. Hazard Mater.* 223, 1e12. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.054>.
- Bencheikh-Latmani, R., Obratsova, A., Mackey, M.R., Ellisman, M.H., Tebo, B.M., (2007). Toxicity of Cr(III) to *Shewanella* sp. Strain MR-4 during Cr(VI) reduction. *Environ. Sci. Technol.* 41 (1), 214-220.
- Bowman, S. E. J., and Bren, K. L. (2008). The chemistry and biochemistry of heme c: functional bases for covalent attachment. *Natural Product Reports*, 25(6), 1118. <https://doi.org/10.1039/b717196j>.
- Butler, J.E., Young, N.D., and Lovley, D.R. (2010). Evolution of electron transfer out of the cell: comparative genomics of six *Geobacter* genomes. *BMC Genomics* 11, 40.
- Caccavo, F., D. J. Lonergan, D. R. Lovley, M. Davis, J. F. Stolz & M. J. McInerney (1994) *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl Environ Microbiol*, 60, 3752-9.86.
- Cologgi, D.L., Lampa-Pastirk, S., Speers, A.M., Kelly, S.D., Reguera, G., (2011). Extracellular reduction of uranium via *Geobacter* conductive pili as a protective cellular mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 108, 15248-15252.

Coppi MV, Leang C, Sandler SJ, Lovley DR. (2001). Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(7):3180-7.

Ding Y-HR, Hixson KK, Giometti CS, Stanley A, Esteve-Núñez A, Khare T, Tollaksen SL, Zhu W, Adkins JN, Lipton MS, Smith RD, Mester T, Lovley DR (2006) The proteome of dissimilatory metal reducing microorganism *Geobacter sulfurreducens* under various growth conditions. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics* 1764:1198–1206.

Ding, Y.H., Hixson, K.K., Aklujkar, M.A., Lipton, M.S., Smith, R.D., Lovley, D. R. and Mester, T. (2008). Proteome of *Geobacter sulfurreducens* grown with Fe (III) oxide or Fe(III) citrate as the electron acceptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 1935–1941.

Elmeihy R, Shi X-Ch, Tremblay P-L, Zhang T. 2021. Fast removal of toxic hexavalent chromium from an aqueous solution by high-density *Geobacter sulfurreducens*. *Chemosphere*, 263, 128281.

Etesami H. (2018). Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: Mechanisms and future prospects. *Ecotoxicol Environ Saf.* Jan;147:175-191.

Gaspard, S., Vazquez, F. and Holliger, C. (1998). Localization and solubilization of the iron(III) reductase of *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3188–3194.

Gastil G, Diamond J, Knaack C, Walawender M, Marshal M, Boyles-Reaber C. (1990). The problem of the magnetite/ ilmenite boundary in southern and Baja California, California. In: The nature and origin of cordilleran magmatism. *Boulder, Colorado: Geological Society of America Memoir.*

Gaur, N.; Flora, G.; Yadav, M.; Tiwari, A. (2014). A review with recent advancements on bioremediation-based abolition of heavy metals. *Environ. Sci. Process. Impacts.* 16, 180–193.

Gong Y, Werth CJ, He Y, Su Y, Zang Y, Zhou X. (2018). Intracellular versus extracellular accumulation of hexavalent chromium reduction products by *Geobacter sulfurreducens* PCA. *Environ Pollut*, 240, 485-492.

Harithabharat, (2021). Environmental Education, Health and Environment, Pollution, Recent News, Waste Management, Water. Recuperado de: <https://harithabharat.org/blogs/f/heavy-metal-water-pollution>.

Hashim, M.A., Mukhopadhyay, S., Saha, J.N., Sengupta, B., (2011). Remediation technologies for heavy metal contaminated groundwater. *J. Environ. Manag.* 92, 2355-2388.

He, Y., Gong, Y., Su, Y., Zhang, Y., Zhou, X., (2019). Bioremediation of Cr (VI) contaminated groundwater by *Geobacter sulfurreducens*: environmental factors and electron transfer flow studies. *Chemosphere* 221, 793-801.

Herawati N, Suzuki S, Hayashi K, Rivai IF, Koyoma H. (2000). Cadmium, copper and zinc levels in rice and soil of Japan, Indonesia and China by soil type. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. ;64:33-39.

Hernández-Eligio Alberto, Huerta-Miranda Guillermo, Martínez-Bahena Sergio, Castrejón-López Dulce, Miranda-Hernández Margarita, Juárez Katy. (2022). Genetic and bioelectrochemical characterization of *Geobacter sulfurreducens* gsu1771-deficient mutant reveals their role in the regulation of the transcription of pilA and c-type cytochromes involved in extracellular electron transfer and conductive biofilm formation. *Bioelectrochemistry* 145.

Hernández-Eligio, A., Á. Andrade, L. Soto, E. Morett & K. Juárez (2016) The unphosphorylated form of the PilR two-component system regulates pilA gene expression in *Geobacter sulfurreducens*. *Environ Sci Pollut Res Int*, 24, 25693-25701.

Hernández-Eligio, A., Huerta, M., Martínez-Bahena, S., Castrejón, D., Miranda-Hernández, M., Juárez, K. (2022). GSU1771 regulates extracellular electron transfer and electroactive biofilm formation in *Geobacter sulfurreducens*: Genetic and electrochemical characterization. *Bioelectrochem*, 145, 108101.

Hernandez-Eligio, A., Pat-Espadas, A.M., Vega-Alvarado, L., Huerta-Amparan, M., Cervantes, F.J., and Juarez, K. (2020). Global transcriptional analysis of *Geobacter sulfurreducens* under palladium reducing conditions reveals new key cytochromes involved. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 4059-4069.

Holmes, D.E., Chavan, M.A., O'neil, R., Adams, L., Larrahondo, M.J., Liu, A. and Lovley, D.R. (2011b). Gene expression and function during grown of *Geobacter sulfurreducens* on Fe(III) or Mn(IV) oxides. Manuscript submitted.

Jaramillo-Rodriguez B, Vega Alvarado L, Rodriguez Torres L, Huerta-Miranda G, Hernández-Eligio A, Juarez K (2023). Global transcriptional analysis of *Geobacter sulfurreducens*gsu1771 mutant biofilm grown on two different support structures. PLOS ONE, aceptado.

Jobby, R., Jha, P., Yadav, A.K., Desai, N., (2018). Biosorption and biotransformation of hexavalent chromium Cr(VI): a comprehensive review. *Chemosphere*. 207, 255–266.

Krishna, K.R., Philip, L., (2005). Bioremediation of Cr(VI) in contaminated soils. *J. Hazard Mater*. 121, 109-117.

Lapouge, K., M. Schubert, F. H. Allain & D. Haas (2008) Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol Microbiol*, 67, 241-53.

Lara P, Vega-Alvarado L, Sahonero-Canavesi DX, Koenen M, Villanueva L, Riveros-Mckay F, Morett E and Juárez K (2021) Transcriptome analysis reveals Cr(VI) adaptation mechanisms in *Klebsiella* sp. Strain AqSCr. *Front. Microbiol.* 12:656589. doi: 10.3389/fmicb.2021.656589.

Law N, Ansari S, Livens FR, Renshaw JC, Lloyd JR (2008) Formation of nanoscale elemental silver particles via enzymatic reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol* 74:7090–7093.

Lovley, D. R. (2006) Microbial fuel cells: novel microbial physiologies and engineering approaches. *Curr Opin Biotechnol*, 17, 327-32.

Lovley, D. R., Giovannoni, S. J., White, D. C., Champine, J. E., Phillips, E. J. P., Gorby, Y. A., and Goodwin, S. (1993a). *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. *Archives of Microbiology*, 159(4), 336–344. <https://doi.org/10.1007/BF00290916>.

Lovley, D. R., T. Ueki, T. Zhang, N. S. Malvankar, P. M. Shrestha, K. A. Flanagan, M. Aklujkar, J. E. Butler, L. Giloteaux, A. E. Rotaru, D. E. Holmes, A. E. Franks, R. Lovley, D., and Phillips, E. (1988). Novel Mode of Microbial Energy Metabolism: Organic Carbon Oxidation Coupled to Dissimilatory Reduction of Iron or Manganese. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.*, 54, 9.

Lovley, D.R. (1987). Organic matter mineralization with the reduction of ferric iron: a review. *Geomicrobiol. J.* 5, 375–399.

Lovley, D.R., and Walker, D.J.F. (2019). *Geobacter* Protein Nanowires. *Front Microbiol* 10, 2078.

Lovley, D.R., Phillips, E.J.P., Gorby, Y.A., Landa, E.R., 1991. Microbial reduction of uranium. *Nature* 350, 413-416.

Lovley, D.R., Stolz, J.F., Nord, G.L. and Phillips, E.J. (1987). Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism. *Nature* 330, 252–254.

Magnuson, T.S., Hodges-Myerson, A.L. and Lovley, D.R. (2000). Characterization of a membrane-bound NADH-dependent Fe(3p) reductase from the dissimilatory Fe(3p)-reducing bacterium *Geobacter sulfurreducens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 185, 205–211.

Magnuson, T.S., Isoyama, N., Hodges-Myerson, A.L., Davidson, G., Maroney, M.J., Geesey, G.G. and Lovley, D.R. (2001). Isolation, characterization and gene sequence analysis of a membrane-associated 89 kDa Fe(III) reducing cytochrome c from *Geobacter sulfurreducens*. *Biochem. J.* 359, 147–152.

Martínez, S. (2018). Estudio de la regulación transcripcional mediada por la proteína GSU1771 sobre los genes relevantes en la transferencia de electrones en *Geobacter sulfurreducens*. *Tesis de Licenciatura*. Universidad Politécnica del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.

Mehta, T., Coppi, M.V., Childers, S.E., and Lovley, D.R. (2005). Outer membrane c-type cytochromes required for Fe(III) and Mn(IV) oxide reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol* 71, 8634-8641.

Methe, 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., *et al.* (2003). Genome of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments. *Science* 302, 1967-1969.

Morgado, L., Bruix, M., Pessanha, M., Londer, Y.Y., and Salgueiro, C.A. (2010). Thermodynamic characterization of a triheme cytochrome family from *Geobacter sulfurreducens* reveals mechanistic and functional diversity. *Biophys J* 99, 293-301.

Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F., (2001). Remediation technologies for metal contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Eng. Geol.* 60, 193-207.

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., *et al.* (2009). Anode biofilm transcriptomics reveals outer surface components essential for high density current production in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *PLoS One* 4, e5628.

Nyman, J.L, Caccavo, F., Cunningham, A.B., Gerlach, R., 2002. Biogeochemical elimination of chromium (VI) from contaminated water. *Bioremediat. J.* 6 (1), 39-55.

Orellana, R., Leavitt, J.J., Comolli, L.R., Csencsits, R., Janot, N., Flanagan, K.A., Gray, A.S., Leang, C., Izallalen, M., Mester, T., Lovley, D.R., (2013). U(VI) reduction by diverse outer surface c-type cytochromes of *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 6369-6374.

Pokkuluri, P.R., Londer, Y.Y., Duke, N.E., Long, W.C. and Schiffer, M. (2004). Family of cytochrome c7-type proteins from *Geobacter sulfurreducens*: structure of one cytochrome c7 at 1.45 Å resolution. *Biochemistry* 43, 849–859.

Pradhan, D., Sukla, L.B., Sawyer, M., Rahman, P.K.S.M., (2017). Recent bioreduction of hexavalent chromium in wastewater treatment: a review. *J.Ind.Eng.Chem.* 55, 1-20.

Qian, X., Reguera, G., Mester, T. and Lovley, D.R. (2007). Evidence that OmcB and OmpB of *Geobacter sulfurreducens* are outer membrane surface proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 277, 21–27.

Reguera, G. & K. Kashefi (2019) The electrifying physiology of *Geobacter* bacteria, 30 years on. *Adv Microb Physiol*, 74, 1-96.

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

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

Reguera, G., R. B. Pollina, J. S. Nicoll & D. R. Lovley (2007) Possible nonconductive role of *Geobacter sulfurreducens* pilus nanowires in biofilm formation. *J Bacteriol*, 189, 2125-7.

Romeo T. (1998). Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol* 29:1321–1330. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.01021.

Ruíz, R. (2019). Construcción y caracterización de la mutante Δ csrA en *Geobacter sulfurreducens* y su relación con la transferencia extracelular de electrones. *Tesis de licenciatura*. Universidad de Sonora.

Salomons W, Forstner U, Mader P. (1995). Heavy Metals: Problems and Solutions. *Berlin, Germany: Springer-Verlag*.

Sanford, R.A., Wu, Q., Sung, Y., Thomas, S.H., Amos, B.K., Prince, E.K. and Löffler, F.E. (2007). Hexavalent uranium supports growth of *Anaeromyxobacter dehalogenans* and *Geobacter* spp. with lower than predicted biomass yields. *Environ. Microbiol.* 9, 2885–2893.

SEMARNAT (2007). INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGÍA Y CAMBIO CLIMÁTICO. Obtenido de INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGÍA Y CAMBIO CLIMÁTICO: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/372/tecnolog.html>

Shelobolina, E.S., Coppi, M.V., Korenevsky, A.A., DiDonato, L.N., Sullivan, S.A., Konishi, H., Xu, H., Leang, C., Butler, J.E., Kim, B.-C., Lovley, D.R., (2007). Importance of c-type cytochromes for U(VI) reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *BMC Microbiol.* 7, 16.

Shelobolina, E.S., Coppi, M.V., Korenevsky, A.A., Didonato, L.N., Sullivan, S. A., Konishi, H., Xu, H., Leang, C., Butler, J.E., Kim, B.C. and Lovley, D. R. (2007a). Importance of c-Type cytochromes for U(VI) reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *BMC Microbiol.* 7, 16.

Smith, J.A., Tremblay, P.L., Shrestha, P.M., Snoeyenbos-West, O.L., Franks, A.E., Nevin, K.P., and Lovley, D.R. (2014). Going wireless: Fe(III) oxide reduction without pili by *Geobacter sulfurreducens* strain JS-1. *Appl Environ Microbiol* 80, 4331-4340.

Tabares, M. Dulay, H. & Reguera, G. (2019) *Geobacter sulfurreducens*. Department of Microbiology and Molecular Genetics, Michigan State University.

Tremblay, P.L., Summers, Z.M., Glaven, R.H., Nevin, K.P., Zengler, K., Barrett, C.L., Qiu, Y., Palsson, B.O., 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, 13-23.

Tuo, Y., Liu, G., Zhou, J., Wang, A., Wang, J., Jin, R., Lv, H., (2013). Microbial formation of Palladium nanoparticles by *Geobacter sulfurreducens* for chromate reduction. *Bioresour. Technol.* 133, 606-611.

Ueki, T. (2021). Cytochromes in Extracellular Electron Transfer in *Geobacter*. *Appl Environ Microbiol* 87.

Vakulskas, C. A., A. H. Potts, P. Babitzke, B. M. Ahmer & T. Romeo (2015) Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems. *Microbiol Mol Biol Rev*, 79, 193-224

Villacís-García M, Villalobos M, Gutierrez-Ruiz M. (2015). Optimizing the use of natural and synthetic magnetites with very small amounts of coarse Fe(0) particles for reduction of aqueous Cr(VI). *J Hazard Mater* 281:77-86.

Wan, J., Tokunaga, T.K., Brodie, E., Wang, Z., Zheng, Z., Herman, D., Hazen, T.C., Firestone, M.K. and Sutton, S.R. (2005). Reoxidation of bio reduced uranium under reducing conditons. *Environ. Sci. Technol.* 39, 6162–6169.

Wang, Y., Sevinc, P.C., Belchik, S.M., Fredrickson, J., Shi, L., Lu, H.P., (2013). Single-cell imaging and spectroscopic analyses of Cr(VI) reduction on the surface of bacterial cells. *Langmuir* 29 (3), 950-956.

Zacharoff, L.A., Morrone, D.J., and Bond, D.R. (2017). *Geobacter sulfurreducens* Extracellular Multiheme Cytochrome PgcA Facilitates Respiration to Fe(III) Oxides But Not Electrodes. *Front Microbiol* 8, 2481.