

Daniela Bustinza Ortega¹

¹ 2021, Jr. 9 de octubre, Puno, Perú (danielabustinzaortega3@gmail.com)

RESUMEN

En el presente proyecto de investigación evalúa la posible reducción progresiva de acuíferos contaminados con uranio, mediante la estimulación de microorganismos reductores de metales disimiladores, los electrodos de estos organismos se comportan como donadores de electrones y de igual forma como aceptador de electrones que se llaman "electroquímicamente estimulantes" generalmente, estas bacterias reducen los minerales insolubles que contienen iones metálicos oxidados para poder generar energía. El organismo que se utiliza es el *Geobacter* este organismo puede desarrollar biobarreras permeables para la inmovilización de uranio a largo plazo.

La investigación tiene un diseño experimental, esto con lleva a la creación de un laboratorio portátil de fácil uso y de bajo costo para el montaje de sistemas bioelectroquímicos en el que se desarrollara un procedimiento simple para cultivar y analizar cultivos de células bacterianas y biopelículas de estos organismos, también se utiliza el diseño de la parcela de prueba instalada en Old Rifle UMTRA en Rifle, Colorado.

Gracias a la cultivación de estos organismos se evaluó el potencial para eliminar uranio de las aguas subterráneas contaminadas mediante la estimulación de los microorganismos reductores de metales, y la creación de un diseño simple para una estación de gasificación que pueda ser utilizado fácilmente para el cultivo de organismos en ambientes anaeróbicos y su futura incubación en acuíferos contaminados con uranio con el prototipo desarrollado.

Las biopelículas proporcionan a las células un entorno protegido física y químicamente para la inmovilización sostenida y la reducción del uranio que es de interés para el desarrollo de estrategias mejoradas para la biorremediación in situ de entornos afectados por la contaminación de uranio y de metales pesados.

1. Introducción

Estudiar los métodos de remediación de metales pesados y en especial el uranio es de interés mundial,

ya que es un material altamente radioactivo que no solo afecta al medio ambiente si no al ser humano dejando daños irreversibles. El presente proyecto de investigación busca estudiar a los sistemas bioelectroquímicos (BES) han ganado un gran interés en las últimas décadas (Wang & Ren, 2013) Actualmente no se conoce en su totalidad el comportamiento de estas bacterias, con el laboratorio portátil buscamos estudiarlas a profundidad y en especial las llamadas, electroquímicamente activas, *Geobacter sulfurreducens* esta bacteria es una de las más conocidas y estudiadas en el campo de la bioelectroquímica, ya que se encuentra altamente enriquecida en biopelículas anódicas derivadas de aguas residuales, lo que indica su capacidad superior para realizar transferencias de electrones extracelulares sobre otras especies, gracias a esto generan mayor energía eléctrica para logra reducir la contaminación de uranio en aguas subterráneas (Harnisch et al., 2011) El proyecto se centrará en la realización de un laboratorio portátil de fácil uso y de bajo costo para la cultivación de bacterias reductoras de metales disimiladores denominados "Geobacter" y la creación de un modelo de incubación de estos a pequeña escala Gracias al laboratorio portátil para la cultivación de estas especies, se podrá instalar en cualquier mina que explote metales con el propósito de seguir estudiando el comportamiento de las mismas, con el proyecto buscamos remediar los pasivos ambientales de una forma segura y eco amigable dejados hoy en día en nuestro país, y cuando llegemos a explotar uranio en el Perú se tendrá una base más sólida y clara para poder enfrentarnos a este tipo de contaminación..

2. Antecedentes

Según (Holmes et al., 2018) en su artículo llamado "Potencial de la metanosarcina para contribuir a la reducción de uranio durante la biorremediación de aguas subterráneas promovida por acetato "nos indican que sus estudios previos de biorremediación se darán por acetato de acuíferos contaminados con uranio se centraron en *Geobacter* porque en el lugar no

se habían localizado otros microorganismos que puedan acoplar la oxidación del acetato con la reducción de U (VI). El rastreo de los niveles de transcripciones de la subunidad A de la metil CoM reductasa (*mcrA*) en el proceso de un experimento de campo de inyección de acetato demostró que los metanógenos acetoclásticos del género *Methanosarcina* se enriquecieron después de 40 días de enmienda con acetato. La mayor opulencia de *Methanosarcina* se correspondió con un hacinamiento de metano en el agua subterránea. Para determinar si las especies de *Methanosarcina* podrían estar tomando parte en la reducción de U (VI) en el subsuelo, las suspensiones celulares de *Methanosarcina barkeri* se incubó en presencia de U (VI) con acetato acomodado como donante de electrones. U (VI) se redujo por *M. barkeri* metabólicamente activo. células de *barkeri*; sin embargo, no se observó reducción de U (VI) en los controles inactivos. Estos resultados demuestran que las especies de *Methanosarcina* podrían desempeñar un papel importante en la biorremediación a largo plazo de los acuíferos contaminados con uranio después de que el agotamiento de los óxidos de Fe (III) limita el crecimiento de las especies de *Geobacter*. Los resultados también sugieren que *Methanosarcina* tiene el potencial de respaldar la multiplicidad en la geoquímica del uranio en una diversidad de ambientes sedimentarios anaeróbicos. Según (Holmes et al., 2002) Señala en su artículo denominado "Enriquecimiento de miembros de la familia Geobacteraceae asociado con la estimulación de la reducción de metales disimilatorios en sedimentos de acuíferos contaminados con uranio" Como estimular la reducción microbiana de U (VI) soluble a U (IV) insoluble parece propicia como estrategia para inmovilizar uranio en entornos subterráneos contaminados con uranio. Para saber más sobre qué microorganismos podrían estar implicados en la reducción de U (VI) in situ, se monitorearon los cambios en la comunidad microbiana cuando se incito la reducción de U (VI) con la adición de acetato en sedimentos de tres sitios diferentes contaminados con uranio. en la llanura aluvial del río San Juan en Shiprock, N.Mex. En los tres sedimentos, la reducción de U (VI) estuvo adionad de una reducción concurrente de Fe (III) y un enriquecimiento espectacular de microorganismos de la familia Geobacteraceae, que son microorganismos conocidos que reducen el U (VI) y el Fe (III). En el instante en que la reducción de U (VI) y la reducción de Fe (III) estaban casi completadas, Geobacteraceae representó ca. 40% de las secuencias de ADN ribosómico 16S (ADNr) recuperadas de los sedimentos con cebadores de PCR bacterianos, mientras que Geobacteraceae representaron menos del 5% de las secuencias de ADNr

16S en sedimentos de control que no fueron modificados con acetato y en los que U (VI) y No se incito la reducción de Fe (III). Entre el 55 y el 65% de estas secuencias de Geobacteraceae eran más similares a las secuencias de las especies de *Desulfuromonas*, y el resto estaba más estrechamente relacionado con las especies de *Geobacter*. El análisis cuantitativo de las secuencias de Geobacteraceae con PCR de número más probable y análisis TaqMan indicó que el número de Geobacteraceae las secuencias aumentaron de 2 a 4 órdenes de magnitud en el transcurso de la reducción de U (VI) y Fe (III) en los sedimentos modificados con acetato de los tres sitios. No se observó un aumento en las secuencias de Geobacteraceae en los sedimentos de control. En contraste con el predominio de las secuencias de Geobacteraceae, no se encontraron en los sedimentos secuencias relacionadas con otros microorganismos reductores de Fe (III) conocidos. Estos resultados se comparan propiciamente con un número creciente de estudios que han demostrado que Geobacteraceae son componentes importantes de la comunidad microbiana en una diversidad de ambientes subterráneos en los que la reducción de Fe (III) es un proceso importante. La combinación de estos resultados con el hallazgo de que la reducción de U (VI) tiene lugar durante la reducción de Fe (III) y antes de la reducción de sulfato sugiere que Geobacteraceae será responsable de gran parte de la reducción de Fe (III) y U (VI) mientras la biorremediación de uranio se da en estos sedimentos. Según Estimular la actividad in situ de especies de *Geobacter* para eliminar el uranio del agua subterránea de un acuífero contaminado con uranio. Se evaluó el potencial para eliminar uranio de las aguas subterráneas contaminadas mediante la estimulación de la actividad in situ de microorganismos reductores de metales disimiladores en un acuífero contaminado con uranio ubicado en Rifle, Colorado. Se inyectó acetato (1 a 3 mM) en el subsuelo durante un período de 3 período de un mes a través de una galería de inyección compuesta por 20 pozos de inyección, que se instaló como mejorador de una serie de 15 pozos de monitoreo. Las concentraciones de U (VI) disminuyeron en tan solo 9 días después de iniciada la inyección de acetato, y en 50 días el uranio había disminuido por debajo del nivel de tratamiento prescrito de 0,18 μM en algunos de los pozos de control. El análisis de secuencias de ADN ribosómico (ADNr) 16S y perfiles de ácidos grasos fosfolípidos demostró que la pérdida inicial de uranio del agua subterránea estaba asociada con un enriquecimiento de Geobacter especies en la zona de tratamiento. El Fe (II) en el agua subterránea también aumentó durante este período, lo que sugiere que la reducción de U (VI) coincidió con la reducción de Fe (III). A medida que la inyección de acetato continuó

durante 50 días, hubo una pérdida de sulfato del agua subterránea y una acumulación de sulfuro y la composición de la comunidad microbiana cambió. Los organismos con secuencias de rDNA 16S más estrechamente relacionadas con las de los reductores de sulfato se volvieron predominantes, y *Geobacter* especies se convirtieron en un componente menor de la comunidad. Este aparente cambio de reducción de Fe (III) a reducción de sulfato como el proceso terminal de aceptación de electrones para la oxidación del acetato inyectado se asoció con un aumento en la concentración de uranio en el agua subterránea. Estos resultados demuestran que la biorremediación in situ de las aguas subterráneas contaminadas con uranio es factible, pero sugieren que la estrategia debe optimizarse para mantener mejor la actividad a largo plazo de las especies de *Geobacter*. Según (Dar et al., 2013) en su artículo denominado "Distribución espacial de geobacteraceae y bacterias reductoras de sulfato durante la biorremediación in situ de aguas subterráneas contaminadas con uranio". Se analizó el estado fisiológico de las congregaciones microbianas del subsuelo esencialmente se basa en el estudio de microorganismos no insertados en el agua subterránea. Estos planteamientos se han empleado en estudios sobre biorremediación de aguas subterráneas contaminadas con uranio en un sitio de estudio en Rifle, Colorado, en el que las especies de *Geobacter* generalmente representan más del 90 por ciento de la comunidad microbiana en las aguas subterráneas durante la reducción activa de uranio. Sin embargo, para desarrollar estrategias eficientes de biorremediación in situ también es necesario identificar el estado de los microorganismos asociados a los sedimentos. Para evaluar la distribución de la comunidad natural de *Geobacter* durante la biorremediación del uranio, los sedimentos del subsuelo se empaquetaron en medidores de flujo pasivo (PFM) o en columnas de sedimentos desplegadas en pozos de monitoreo de aguas subterráneas antes de la inyección de acetato durante las pruebas de campo de bioestimulación in situ. Las pruebas se desarrollaron en el asedio del Desafío de investigación de campo integrado de rifle del Departamento de Energía (DOE). Las muestras de sedimento se extrajeron durante el pico de reducción de Fe (III) o el pico de reducción de sulfato en el transcurso de dos experimentos de campo separados y se conservaron para microscopía. Los balances celulares directos que utilizan sondas de hibridación in situ por fluorescencia (FISH) dirigidas a especies de *Geobacter* indicaron que la mayoría de *Geobacter* células no se unieron durante la reducción de Fe (III), que típicamente sigue con tasas elevadas de reducción

de uranio. Medidas semejantes realizadas durante la fase de reducción de sulfato evidenciaron que la mayoría de *Geobacter* se adhiere después del empobrecimiento de formas más sencillamente biodisponibles de minerales de hierro. Los estudios de columna de sedimentos de laboratorio corroboraron las observaciones realizadas con muestras de sedimentos recolectadas durante las pruebas de campo e indicaron que durante la reducción de Fe (III), las especies de *Geobacter* están principalmente autónomas (90 por ciento), mientras que la mayoría de las bacterias reductoras de sulfato y *Geobacter* especies se adhieren a las superficies de los sedimentos cuando la reducción de sulfato es la forma predominante de metabolismo (75 por ciento y 77 por ciento, respectivamente). Además, los experimentos con sedimentos artificiales mostraron que los cultivos puros de *Geobacter uraniireducens*, aislados del sitio de Rifle, se soltaron principalmente una vez que el Fe (III) se volvió escaso. Estos resultados demuestran que, aunque las especies de *Geobacter* deben entrar en contacto directo con los óxidos de Fe (III) para reducirlos, las células no se adhieren firmemente a los sedimentos, lo que probablemente sea una respuesta adaptativa a los minerales de Fe (III) dispersos de forma escasa y heterogénea en el subsuelo. Según (Newsome et al., 2014) en su artículo científico denominado "Biogeoquímica y biorremediación del uranio y otros radionucleidos prioritarios" Nos indica que el metabolismo microbiano tiene la capacidad de alterar la solubilidad de una amplia gama de radionucleidos prioritarios, incluido el uranio, otros actínidos y productos de fisión. De destacado interés ha sido la bioestimulación de comunidades microbianas anaeróbicas para eliminar radionucleidos sensibles a la reducción-oxidación como el uranio U (VI) de las aguas subterráneas contaminadas en emplazamientos nucleares. Particularmente prometedores son los procesos de biorreducción, mediante los cuales las bacterias reducen enzimáticamente el U (VI) acuoso a U (IV) insoluble acoplado a la oxidación de un donante de electrones orgánico; y biomineralización de fosfato de uranio, en el que la actividad de la fosfatasa bacteriana escinde los organofosforados, liberando fosfato inorgánico que precipita con U (VI) acuoso como minerales de fosfato de uranio. Aquí revisamos los mecanismos de biorreducción de uranio y biomineralización de fosfato y su idoneidad para facilitar la precipitación a largo plazo de uranio de las aguas subterráneas, con especial atención a los ensayos in situ en los emplazamientos de campo del Departamento de Energía de EE. UU. También se examinan las interacciones redox de otros

radionucleidos prioritarios (tecnecio, neptunio, plutonio, americio, yodo, estroncio y cesio).

2.2. Revisión Literaria

Los metales son una parte esencial de la vida que comprende cofactores, nutrientes, clorofila, aceptores y donantes de electrones, creadores de color y más. Aunque el hombre ha utilizado metales ampliamente desde que se descubrió el cobre en el 9000 a. C., apenas estamos empezando a apreciar la capacidad de la biología para manipular metales. La reducción microbiana del U(VI) a U(IV) puede ser una reacción importante que influye en la biogeoquímica del uranio en diversos entornos sedimentarios y es una estrategia prometedora para la biorremediación de aguas subterráneas contaminadas con uranio. (Lovley & Coates, 1997) Los sistemas bioelectroquímicos (BES) han ganado un gran interés en las últimas décadas (Wang & Ren, 2013) En estos sistemas, los electrodos sirven como donantes de electrones o como aceptor de electrones para un tipo especial de bacterias, que se denominan "electroquímicamente activas" (Lovley, 2006). Naturalmente, estas bacterias reducen los minerales insolubles que contienen iones metálicos oxidados para ganar energía (Lovley, 2006). Especialmente *G. sulfurreducens* o su pariente cercano *G. anodireducens* es bien conocido en la investigación bioelectroquímica, ya que esta bacteria se encuentra altamente enriquecida en biopelículas anódicas derivadas de aguas residuales municipales en MFC o MEC, lo que indica su capacidad superior para realizar transferencias de electrones extracelulares sobre otras especies. (Harnisch et al., 2011)(Schmidt et al., 2017). A menudo, la investigación en BES se realiza con biopelículas derivadas de inóculos de aguas residuales municipales, en las que *G. sulfurreducens* u otras especies de *Geobacter* se enriquecen y predominan en la biopelícula anódica (Call & Logan, 2011) Estos sistemas son fáciles de manejar e insensibles a la intrusión de oxígeno, y la conclusión de que *G. sulfurreducens* o su pariente cercano *G. anodireducens* es responsable del comportamiento bioelectroquímico observado es razonable debido a su gran abundancia (Harnisch et al., 2011). La capacidad de persistir en un ambiente contaminado con uranio se logra mediante varios tipos diferentes de biotransformaciones, típicamente transformaciones químicas del metal llevadas a cabo por un microbio. Se ha observado que los microbios reducen, oxidan, respiran, adsorben, mineralizan, acumulan o precipitan uranio en el medio ambiente. Este metabolismo microbiano tiene la capacidad de alterar la solubilidad de una amplia gama de radionucleidos prioritarios, incluido el uranio, Estos

procesos de biorremediación son muy prometedoras ya que estas bacterias reducen enzimáticamente el U (VI) acuoso a U (IV) insoluble acoplado a la oxidación de un donante de electrones orgánico (Newsome et al., 2014). Los estudios de laboratorio han sugerido que una estrategia simple para promover la reducción de U (VI) en acuíferos contaminados es agregar acetato como donante de electrones para estimular la actividad de microorganismos disimiladores reductores de metales (Finneran, Anderson, et al., 2002)(Finneran, Housewright, et al., 2002). Los pili de *Geobacter sulfurreducens* permiten la transferencia de electrones extracelulares y juegan un papel en la secreción de citocromos de tipo c como OmcZ. Se ha demostrado previamente que los mutantes de *G. sulfurreducens* con deficiencia de PiiA acumulan citocromos dentro de sus membranas. Este fenotipo de retención de citocromo permitió un mayor crecimiento de mutantes deficientes en PiiA en condiciones de donante de electrones y de carbono limitado en las que el formiato y el fumarato se proporcionan como el único donante y aceptor de electrones sin una fuente de carbono suplementaria. (Semenec et al., 2019) Los pili demuestran una conductividad de tipo metálico que permite la EET de largo alcance (Malvankar et al., 2012) Las mediciones directas de la conductividad en biofilms productores actuales de *Geobacter sulfurreducens* revelaron altas conductividades, rivalizando con las de polímeros sintéticos de conducción (Malvankar et al., 2011). Un trabajo más reciente ha descubierto otro modo de reducción de uranio no dependiente de metales que involucra a las proteínas pili de *Geobacter*. El trabajo del grupo Reguera ha demostrado que los pili mejoran la capacidad de las células para inmovilizar el uranio y que la mayor parte del uranio se precipita sobre los pili protegiendo las funciones respiratorias que operan en el periplasma y la membrana citoplasmática (Finneran, Housewright, et al., 2002).

3. Justificación

Uno de los problemas mas relevantes en estos tiempos son los pasivos ambientales que deja la minería, a lo largo del tiempo han ocasionado daños irreversibles, se sabe que algunos de estos pasivos desembocan directamente en lagos y ríos en nuestro país, a fin de evitar daños irreversibles en el medio ambiente y que afecten directamente a la población. En la actualidad se tiene en el Perú una de las reservas más grandes de reserva de litio y uranio que a largo plazo esto se convertirá en un gran problema, ya que el uranio es uno de los materiales mas peligrosos en el planeta, que deja daños irreversibles en la naturaleza y en ser humano, tenemos que estar preparados para ello. De tal forma que sea posible controlar la

contaminación radioactiva a largo plazo. La presente investigación es viable, pues utiliza un método fácil y de bajo costo para montar un sistema anaeróbico de tal forma que podamos cultivar las bacterias. Generalmente para la cultivación y mantención de estas bacterias para que puedan estar un ambiente anaeróbico estable, se necesita de muchos equipos que por lo general son demasiado costosos. La investigación propone una manera fácil y de bajo costo para poder cultivar las bacterias ya mencionadas, también se busca mejorar el comportamiento de las bacterias, con ello podemos abrirnos para poder hacer mas experimentos y mejorar la efectividad de biorremediación a largo plazo. El trabajo tiene una utilidad metodológica, ya que podrían realizarse futuras investigaciones que usaran metodologías compatibles, comparaciones entre periodos temporales. En el aspecto disciplinario es estudio pretende contribuir a los estudios que se realizan a nivel nacional, y en particular en Puno ya que es la región donde se vera mas los pasivos ambientales sobre la importancia de las geobacterias en la remediación de uranio con un laboratorio portátil para la cultivación de estos, mejorar la calidad de vida de cada ser que habita en nuestro planeta

3.1. Justificación Preliminar

1. ¿Cuál es el problema que se investiga?

Uno de los problemas mas relevantes en estos tiempos son los pasivos ambientales que deja la minería, a lo largo del tiempo han ocasionado daños irreversibles, se sabe que algunos de estos pasivos desembocan directamente en lagos y ríos en nuestro país, a fin de evitar daños irreversibles en el medio ambiente y que afecten directamente a la población.

2. ¿Cuál es la emergencia del problema de estudio?

En la actualidad se tiene en el Perú una de las reservas más grandes de reserva de litio y uranio que a largo plazo esto se convertirá en un gran problema, ya que el uranio es uno de los materiales más peligrosos en el planeta, que deja daños irreversibles en la naturaleza y en ser humano, tenemos que estar preparados para ello. De tal forma que sea posible controlar la contaminación radiactiva a largo plazo.

3. ¿Qué tal viable es la realización de la investigación?

La presente investigación es viable, pues es un método fácil y de bajo costo para montar un sistema anaeróbico de tal forma que podamos cultivar las bacterias y se busca el tratamiento de estos con

microorganismos que se convierte en una alternativa viable y de bajo costo.

4. ¿A que segmento de la población beneficiara el estudio?

En el aspecto social, busca una manera fácil y de bajo costo para poder cultivar las bacterias ya mencionadas, busca mejorar el comportamiento de las bacterias, con ello podemos abrirnos para poder hacer mas experimentos y mejorar la efectividad de biorremediación.

5. ¿Qué beneficios metodológicos tiene el estudio?

El trabajo tiene una utilidad metodológica, ya que podrían realizarse futuras investigaciones que usaran metodologías compatibles, comparaciones entre periodos temporales

6. ¿Qué beneficio personal, profesional o disciplinario tiene el estudio?

En el aspecto disciplinario es estudio pretende contribuir a los estudios que se realizan a nivel nacional, y en particular en Puno ya que es la región donde se vera más los pasivos ambientales sobre la importancia de las geobacterias en la remediación de uranio con un laboratorio portátil para la cultivación de estos, mejorar la calidad de vida de cada ser que habita en nuestro planeta.

3.1.1 Planeamiento del Problema

En el cierre de minas es fundamental la remediación durante la extracción de algún mineral o recuperación de estos, la reducción de los metales especialmente el uranio está siendo estudiado en estas últimas décadas, la bioelectroquímica a toma un pale muy importante en este aspecto, es ahí donde aparecen los estudios de biorremediación con especies geobacterianas, pueden transferir electrones para la generación de electricidad y así pueden reducir la contaminación de estos. Se ha planteado el uso de Geobacter como modelo para la reducción de metales pesados y uranio en acuíferos contaminados. La visión del proyecto es que sea la base para nuevos métodos de cultivos como un modelo estándar propuesto, ya que es un laboratorio portátil y de bajo costo, para nuevas generaciones cuando se llegue a explotar uranio en la Región de Puno.

3.2. Objetivo del Proyecto

Analizar la eficiencia del Geobacter para generar electricidad y lograr la reducción de uranio de un agente biológico en un sistema Bioelectroquímico.

Objetivos específicos:

- Implementar una celda de combustible microbiana a escala de laboratorio.

- Aislar, identificar y caracterizar el agente bacteriano obtenido a partir de biomasa residual de origen porcícola
 - Evaluar el desempeño bioelectroquímico del agente microbiano
- Realizar un prototipo de cultivación

4. Hipótesis

Se tiene un microorganismo denominado *Geobacter*, que puede eliminar significativamente la contaminación de uranio en acuíferos, no solo Uranio si no una variedad de metales pesados, la bacteria ya descrita tiene la capacidad de generar electricidad para poder transferir electrones y metabolizarlos. Tenemos un microbiano llamado *Geobacter* que puede eliminar con relativa facilidad, Los metales pesados como uranio, cadmio y mercurio que no son biodegradables, pero estas bacterias pueden concentrarlos de tal manera que precipita los metales para que sean eliminados con mucha facilidad. Que tienen la capacidad de generar electricidad al transferir los electrones al ánodo por sus características de la membrana bacteriana que ésta le confieren la capacidad de metabolizar electrones. Es factible la cultivación de estos microorganismos, de igual porfa construcción de un prototipo para la cultivación, para poder generar energía eléctrica y así poder remediar la contaminación

5. Materiales y Métodos

5.1 PREPARACIÓN DE LA ESTACIÓN DE GASES SIMPLIFICADA

Una estación de gasificación es el método más común para producir medio anóxico. Muchas estaciones de servicio modernas son derivados de la técnica Hungate que fue desarrollada originalmente en 1969 por Hungate y Nottingham. Las estaciones de gasificación eliminan el O₂ burbujeando ("burbujeando") gases inertes (tradicionalmente N₂ y CO₂) en un medio con una tapa sellada (que se describe en detalle a continuación). Los gases inertes eliminan el O₂ disueltodesde el medio y el espacio de cabeza del recipiente. Si bien muchos investigadores utilizan variaciones de esta técnica, las estaciones de servicio tradicionalmente han tenido que construirse manualmente. La necesidad de construcción manual es una barrera para los científicos que buscan incorporar componentes anaeróbicos en sus investigaciones. En este protocolo, describimos el montaje de una estación de gasificación con un colector de gasificación simplificado que hemos diseñado y puesto a disposición comercial. Este colector reduce

significativamente la complejidad del ensamblaje y resuelve las complicaciones de la técnica de Hungate (que se analiza a continuación en el comentario).

Partes para una estación de gasificación

1.2 Materiales

1. Cilindro de gas inerte (80:20 N₂ : CO₂ para este trabajo)
2. Regulador de presión
3. Colector de estación de gasificación (Swagelok)
4. Tubería de cobre, 1/8 pulg. OD (Swagelok, cat. No. CU-T2-S-030-50)
5. Tubería de goma (Cole Parmer, cat. No. 06508-14)
6. Conexiones macho luer-lock de 1/16 pulg. (Cole Parmer, cat. No. 41507-26)
7. Jeringa de plástico estéril de 1 ml

Procedimiento

- Conecte el regulador de presión a un cilindro de gas lleno.

En este sistema, el regulador en el cilindro de gas determina la presión del sistema y el caudal de gas se puede ajustar usando el medidor de flujo en la parte frontal del colector. El frente del panel de control del colector contiene un interruptor con cuatro posiciones.
- El ajuste de la "válvula de palanca" pasa el control de flujo a las palancas arriba de cada puerto. Esta válvula se usa típicamente en la preparación de medio anaeróbico.
- El ajuste de "válvula de aguja" se utiliza para un control más preciso del flujo de gas. Esto se usa típicamente para un puerto de jeringa para inocular y transferir cultivos celulares.
- La configuración de "ventilación" se utiliza para eliminar cualquier gas residual del aparato una vez que se terminan los experimentos.
- El ajuste "cerrado / apagado" se utiliza cuando la estación de servicio no está en uso.
- Para las estaciones de gasificación que solo están conectadas a BES para mantener ambientes anaeróbicos en el ánodo y la cámara del cátodo, se puede usar una versión más simple con solo el ajuste de la válvula de aguja.

- Conecte el regulador al tubo de entrada del colector de la estación de servicio usando 1/8 pulg. tubería de cobre.

Asegúrese de que la tubería de cobre sea lo suficientemente larga para conectar el cilindro de gas y el colector en sus posiciones finales antes de cortar la tubería.

- Monte la estación de gasificación en una mesa de laboratorio a una altura adecuada de modo que haya espacio debajo de la estación para botellas medianas.

Recomendamos montar una estación de gasificación en la mesa del laboratorio y otra en una sala de incubación con entrada para que el medio anaeróbico se pueda producir en el laboratorio y las células de electrólisis microbiana (BES) se puedan mantener anaeróbicas durante el crecimiento de la biopelícula. Alternativamente, la estación de servicio se puede reubicar de un lado a otro para los dos procesos.

- Conecte el tubo de goma a los conectores de la manguera en la parte inferior de la estación de gasificación y colóquelos con una manguera de 1/16 pulg. conectores macho luer-lock o jeringas de plástico económicas de 1 ml para que cada manguera pueda dispensar gas a los conectores adecuados.

1. PREPARACIÓN DEL MEDIO ANAERÓBICO CON LA ESTACIÓN DE GASES

Este protocolo presenta los pasos para preparar medio anóxico, un componente crítico para el crecimiento exitoso de bacterias anaeróbicas. En resumen, el medio preparado siguiendo las instrucciones de la sección Reactivos y soluciones de este apéndice se rocía (“burbujea”) con gas inerte sin oxígeno para eliminar el oxígeno disuelto de la solución y el espacio superior del recipiente. Luego, los recipientes se esterilizan en autoclave para esterilizarlos aún más antes de su uso. Los recipientes se sellan con tapones de caucho butílico y engarces de aluminio que los mantienen anaeróbicos durante varios meses, lo que permite preparar el medio anaeróbico a granel. Si bien el protocolo utiliza el medio NBAF como ejemplo, este protocolo debe seguirse para todos los medios y soluciones que deban hacerse anaeróbicos.

2.1 Materiales

- Medio NBAF (ver receta)

- Tubos de presión de 10 ml (Chemglass, cat. No. CLS-4209-10) o frascos de suero de 125 ml (Fisher Scientific, cat. No. 06-406K)
- Gasolinera ensamblada (Protocolo básico 1)
- Cánulas (aguja de acero inoxidable reutilizables; Cadence Science, nº de cat. 7937)
- Cilindro de gas inerte (80:20 N₂ : CO₂ para este trabajo)
- Tapones de goma de butilo azul (Chemglass, cat. No. CLS-4209-14)
- Engarces de aluminio (Fisher, cat. No. 06-406-15)
- Engarzador (Chemglass, cat. No. CG-4930-20 o equivalente)

Procedimiento.

1. Dispense 10 ml de medio NBAF en tubos de presión de 10 ml o 100 ml en frascos de suero de 125 ml.

Utilice siempre recipientes de vidrio diseñados específicamente para cultivos anaeróbicos.

2. Conecte la manguera de la estación de servicio a las cánulas. Un ejemplo de la conexión de un tubo a la jeringa de plástico y luego de la jeringa a la cánula. Inserte las cánulas en los recipientes de vidrio para que toquen el fondo. Cambie la válvula de control de la estación de gasificación a la posición de válvula de palanca y rocíe con 80:20 N₂ : CO₂ durante 6 min para tubos de presión y 30 min para botellas de suero.
3. Cierre los recipientes con tapones de goma butílica mientras mantiene las cánulas en el fondo de los recipientes y rocíe los tubos de presión con 80:20 N₂ : CO₂ durante 6 min o frascos de suero durante 15 min.

Recomendamos revisar periódicamente el recipiente durante el proceso de burbujeo para asegurarse de que el tapón de butilo permanezca en su lugar.

4. Mientras sostiene el tapón de butilo en su lugar, levante la punta de la cánula en el espacio de cabeza (aire justo por encima del nivel del medio) y rocíe los tubos de presión durante 3 minutos adicionales y las botellas de suero durante 15 minutos adicionales.

Para recipientes de 1 litro o más, utilice un rociador (Ace Glass, nº de cat. 6453-109) en lugar de cánulas para un burbujeo más eficaz. Conecte el rociador a 1/16 pulg. tubo de goma con un cierre luer hembra (Cole Parmer;) para que pueda conectarse a la manguera de la gasolinera. Haga burbujear la botella mediana de 1 litro con el burbujeador durante al menos 1 hora con la tapa abierta. Después de 1 hora de burbujeo, reemplace el rociador con una cánula, cierre el recipiente con un tapón de butilo y rocíe en el espacio superior durante al menos 30 minutos antes de usarlo.

5. Selle los recipientes con engarces de aluminio utilizando un engarzador. Esto proporciona un sello hermético para el almacenamiento a largo plazo del medio anaeróbico.
6. Esterilice en autoclave usando un ciclo rápido / seco durante 30 min. No apriete completamente los tapones de las botellas de 1 litro para evitar la acumulación de presión dentro de las botellas (los engarces de aluminio se dejan en los tubos de presión de 10 ml y en las botellas de suero de 125 ml). Añada siempre agua a las bandejas utilizadas para esterilizar en autoclave. Retire el medio de los recipientes de medio de 1 litro inmediatamente después de que se complete el ciclo de la autoclave para evitar la pérdida de medio debido a la evaporación prolongada.

2. INOCULACIÓN Y CRECIMIENTO DE LA CULTURA *GEOBACTER*

El cultivo de *Geobacter* se hace crecer inicialmente en recipientes anaeróbicos (tubos de presión y botellas de suero) y luego se transfiere al BES. El crecimiento inicial de las bacterias en vasos anaeróbicos lleva a las células a una fase de crecimiento exponencial medio, lo que aumenta la probabilidad de supervivencia durante la transferencia al BES. Además, se completan varias transferencias entre recipientes anaeróbicos para diluir los 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) presente en 1 ml de reservas de congelador. Este protocolo describe cómo cultivar *Geobacter* a una densidad óptica aceptable a partir de un congelador.

2.1. Materiales

1. Etanol al 70% y 100%
2. Cisteína 100 mM (ver receta)

3. Medio NBAF (ver receta) en tubo de presión de 10 ml (ver Protocolo básico 2)
4. *G. sulfurreducens* cepa PCA (ATCC # 515733), stock congelado
5. Filtro de jeringa de vidrio (ver Protocolo de soporte 2), esterilizado en autoclave
6. Trípode
7. Jeringa estéril de 1 ml y aguja de 25 G
8. Jeringa estéril de 3 ml y aguja de 25 G
9. Espectrofotómetro para determinar la DO₆₀₀
10. Frascos de suero de 125 ml (Fisher Scientific, n.º de catálogo 06-406K)
11. Reactivos y equipos adicionales para preparar el filtro de jeringa de vidrio (Protocolo de soporte 2)

Procedimiento

- Con guantes esterilizados con etanol al 70%, monte el filtro de jeringa de vidrio en un trípode para facilitar el acceso.
- Esterilice la parte frontal del filtro de jeringa de vidrio colocando una gota de etanol al 100% sobre él y quemándolo con un mechero Bunsen.
- Coloque una jeringa estéril de 1 ml con una aguja estéril de 25 G.
- Inserte la aguja en la punta de la jeringa de vidrio, asegurando un buen sellado para que el gas bombee directamente a la jeringa de plástico y empuje lentamente el émbolo hacia atrás.
- Una vez que el émbolo esté cerca del final, retire la aguja de la jeringa de vidrio y presione el émbolo para expulsar el gas.
- *Preste atención a no permitir que el émbolo se expulse completamente de la jeringa.*
- Repita ~ 10 veces.

3.2 Prepare el medio con cisteína

- Utilice la jeringa para absorber 0,1 ml de reserva de cisteína 100 mM
- Esterilice la parte superior de un tubo de presión media NBAF de 10 ml colocando una

gota de etanol al 100% en el tapón de butilo y flameándolo.

- Transfiera la solución de cisteína a los 10 ml de medio NBAF.

La cisteína actúa como un agente reductor para el medio preparado con resazurina y debe cambiar el color del medio de rosa a incoloro en 1 hora.

3.3 Inocular y hacer crecer la cultura

- Descongele una reserva de congelador de cultivo de *G. sulfurreducens* en hielo. Una vez descongelado, transfiera el cultivo a un tubo de presión NBAF "incoloro" con reducción de cisteína utilizando una jeringa anóxica y estéril de 3 ml (consulte los pasos 1 a 6 anteriores, pero use una jeringa de 3 ml en lugar de una jeringa de 1 ml) encajar con una aguja de 25 G.
- Mantenga el cultivo a 30 ° C durante ~ 2 días. Una vez que se observa el crecimiento (el medio se volverá opaco) y la densidad óptica (DO_{600} en una cubeta de plástico desechable) es de 0,2 a 0,3, transfiera el 3% del cultivo a otro tubo de presión NBAF reducida de 10 ml y déjelo crecer a 30°C. ° C hasta que la DO_{600} vuelva a alcanzar de 0,2 a 0,3, lo que indica la fase exponencial media.
- Para el inóculo de células BES, transfiera 10 ml de cultivo celular en la fase exponencial media a 100 ml de NBAF (en una botella de suero de 125 ml) e incube a 30 ° C.

Una vez que el cultivo alcanza una $DO_{600} \sim 0,2$, el cultivo está listo para inyectarse en el BES (descrito en detalle a continuación). Se puede inyectar un total de 25 a 50 ml de cultivo en la cámara del ánodo de BES para un rápido crecimiento de las células bacterianas.

3. CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA BIOELECTROQUÍMICO (BES)

Los sistemas bioelectroquímicos (BES) utilizan microorganismos para catalizar una reacción de oxidación y / o reducción en un electrodo anódico y / o catódico, respectivamente (Cologgi et al., 2014) BES ha ganado un interés considerable en los últimos años debido a su capacidad para aprovechar la actividad catalítica de microorganismos anaeróbicos para la producción de productos químicos básicos, bioenergía y biocombustibles. Los principios y operaciones de BES se han revisado en detalle en múltiples publicaciones

anteriores ([Rabaey et al., 2009](#); [Babauta et al., 2015](#); [Speers y Reguera, 2015](#)), y la sección de Comentarios de este apéndice también proporciona una descripción general de los conceptos y la terminología esenciales en BES. Este protocolo proporciona instrucciones para ensamblar un BES reutilizable y de bajo costo para el crecimiento de biopelículas de *Geobacter* que producen corriente. Además, nuestro objetivo es reducir la confusión inherente que acompaña al ensamblaje de un nuevo aparato. Si bien la gran cantidad de piezas parece abrumadora, hemos creado varios recursos para aclarar las cosas: presenta las partes de un BES antes del montaje, presenta un BES ensamblado, y proporciona una tabulación del equipo con una imagen adyacente a cada elemento como referencia durante la construcción. Además, la sección de materiales a continuación incluye los disolventes, reactivos y equipos especiales que se utilizan para operar un BES.

4.1 Materiales

1. 0,5 M de HCl
2. 0,5 N de NaOH
3. Destilada doble H₂O
4. Etanol al 100% y al 70%
5. Cilindro de gas inerte (80:20 N₂: CO₂ para este trabajo)
6. Medio FWAF, anaeróbico (ver receta)
7. FWNN medio, estéril, aeróbico (ver receta)
8. Lejía al 10%
9. Taladro
10. Aguja 25-G
11. Gasolinera ensamblada (Protocolo básico 1)
12. Filtro esterilizado en autoclave de 0,2 μm (Pall, cat. No. 4423)
13. Tubería de goma (Cole Parmer, artículo no. EW-06508-14)
14. Aguja 25-G
15. Aguja para extracción de sangre 21-G BD Vacutainer Eclipse (BD, n. ° de catálogo 368607)
16. Electrodo estándar conocido
17. Cinta de vinilo (del tipo utilizado en cajas de guantes anaeróbicas, p. Ej., 3 M, cat. No. 471)

4.2 Prepare los electrodos

- Taladre un orificio (2 mm de diámetro, 2 cm de profundidad) en la parte superior de cada electrodo de grafito (Figura A.4K.7, Artículo No. 7).
- Inserte el conector XSA-BC estanco (Figura A.4K.7, artículo n. ° 8) en el orificio.

Antes de cada uso, limpie los electrodos colocándolos durante la noche en 0.5 M HCl y luego 0.5 N NaOH. Enjuague bien con agua doblemente desionizada haciendo correr el agua sobre ellos durante la noche. Tenga cuidado de minimizar el contacto del agua con las clavijas metálicas del conector XSA-BC.

- Conecte los electrodos a los cables.
- Haga un agujero en un tapón de butilo azul que es lo suficientemente grande para dejar pasar el cable conector del electrodo hermético, y lo suficientemente pequeño como para sellarlo firmemente contra la difusión de oxígeno
- Pase el cable por la chimenea y los tapones de butilo azul. Luego, coloque el electrodo de grafito en la cámara al nivel de la membrana, pero lo suficientemente alto para permitir que la barra de agitación gire.

4.3 Prepara la membrana

- Corte un trozo de 5 × 5 cm de la membrana Nafion 117
- Coloque la membrana cortada en un vaso de precipitados de vidrio lleno de agua bidestilada. Tenga cuidado de cubrir completamente la membrana con agua.

Una vez que la membrana entra en contacto con el agua, siempre debe permanecer solvatada (al menos en un lado); de lo contrario, se secará y se destruirá.

- Calienta el agua con un plato caliente hasta que empiece a hervir, luego retira la fuente de calor y deja que se enfríe a temperatura ambiente.

Utilice siempre una nueva membrana Nafion para el montaje. Si el BES necesita volver a esterilizarse en autoclave, reemplace la membrana por una nueva.

4.4 Ensamblar la celda

- Llene una cámara con agua bidestilada. Ponga la junta tórica en la articulación de esta cámara.
- Saque la membrana del vaso de precipitados lleno de agua y colóquelo sobre la junta tórica. Tenga cuidado de minimizar la pérdida de contacto con el agua.
- Tome la otra cámara y sostenga su unión contra la membrana, y sujete las cámaras con la abrazadera de pellizco.
- Llene cada cámara con aproximadamente 150 ml de agua bidestilada hasta que la membrana esté totalmente cubierta.
- Coloque una barra de agitación en cada cámara.
- Inserte las construcciones de electrodo / alambre / tapón de goma / chimenea realizadas en los pasos de preparación de electrodos anteriores (ver Figura A.4K.5K) en las cámaras de vidrio y fíjelas en su lugar con los tapones de rosca rojos.
- Quite la tapa de aluminio de la abertura lateral superior de cada cámara hasta la mitad, inserte una aguja de 25 G y cúbrala con papel de aluminio.

Esto permite el equilibrio de la presión durante el proceso de autoclave.

- Compruebe si hay fugas de agua colocando la celda de electrólisis microbiana (BES) en un trozo de papel seco.
- Esterilice la celda de combustible en autoclave durante 20 minutos en un ciclo rápido / seco. Retire la celda de combustible inmediatamente después de que se complete el ciclo del autoclave para evitar una evaporación excesiva del agua, que puede exponer la membrana al aire y secarla.

La pila de combustible está lista para su uso después de enfriarse. Alternativamente, la pila de combustible se puede almacenar durante varios días para uso futuro.

4.5 Llenar la celda

- Seleccione una cámara como la cámara del ánodo y la otra como la cámara del cátodo. Etiquete las cámaras en consecuencia con cinta de marcado.
- Coloque la manguera de la estación de servicio con un filtro de 0,2 μm esterilizado en autoclave y una aguja de 25 G.
- Esterilice el tapón de goma lateral inferior del MEC colocando una gota de etanol al 100% sobre él y flameando el extremo. Inserte la aguja en el tapón y elimine el oxígeno burbujeando ambas cámaras con gas 80:20 $\text{N}_2 : \text{CO}_2$ durante ~ 30 min.
- Conecte la bomba de vacío (Figura A.4K.7, Artículo No. 15) a la cámara del ánodo con un tubo de goma (Cole Parmer, artículo no. EW-06508-14) y una aguja 25-G estéril, que normalmente se inyecta en la abertura lateral inferior (Figura A.4K.8). Encienda la bomba para presurizar la celda y bombear el agua fuera de la cámara del ánodo. Durante el bombeo de vacío, enjuague simultáneamente la cámara con gas anaeróbico esterilizado con filtro.

La aguja en la abertura lateral superior permite el equilibrio de la presión y evita el estallido de la membrana.

- Una vez completado el proceso de vaciado, llene la cámara del ánodo con medio anaeróbico FWF siguiendo estos pasos:
 - a. Presurice la botella de medio FWF con gas anaeróbico estéril y conéctela a la abertura lateral superior del MEC con una aguja de extracción de sangre BD Vacutainer Eclipse de 21 G.
 - b. Deje que la botella llene la cámara del ánodo hasta que el medio cubra completamente el electrodo de grafito (volumen total de 200 a 250 ml).
- Mientras continúa burbujeando la cámara del ánodo con gas anaeróbico estéril, vacíe la cámara del cátodo con la bomba de vacío.
- Llene la cámara del cátodo con medio FWNN aeróbico estéril utilizando el mismo método que para la cámara del ánodo.

4.6 Inserte el electrodo de referencia

- Guarde siempre los electrodos de referencia en una solución de electrolitos o agua desionizada.
- Pruebe la estabilidad del electrodo de referencia (Figura A.4K.7, Ítem No. 12) midiendo el potencial contra un electrodo estándar conocido.

Esterilice los guantes con etanol al 70% mientras prepara el electrodo de referencia.

- Esterilice el electrodo de referencia colocándolo en lejía al 10% recién preparada durante 5 min. Lavar a fondo con agua doble desionizada en autoclave.
- Inserte el electrodo de referencia esterilizado en un tapón de goma de butilo azul previamente autoclavado con un orificio.
- Inclinando ligeramente el BES hacia la cámara del cátodo, reemplace el tapón azul del medio con el conjunto de electrodo-tapón de referencia anterior. Selle el tapón con cinta de vinilo.

4. FUNCIONAMIENTO DE LA CÉLULA DE ELECTROLISIS MICROBIANA (MEC)

Cuando se ejecuta un BES manteniendo un potencial constante entre los electrodos, se denomina celda de electrólisis microbiana (MEC). Este trabajo usa un potencióstato para mantener un potencial constante en el ánodo (electrodo de trabajo) para que las bacterias puedan usar el electrodo como aceptor de electrones terminal. Opere el MEC con las siguientes tres consideraciones:

1. Utilice el modo FWF para el crecimiento inicial de las células bacterianas en el MEC. En este modo, las bacterias usan fumarato en el medio como aceptor de electrones terminal además del ánodo.
2. Utilice el modo por lotes FWA para promover el crecimiento de biopelículas en los electrodos eliminando el fumarato del medio, de modo que el único aceptor de electrones terminal restante sea el ánodo (que se mantiene a un potencial constante con el potencióstato).
3. Utilice el modo de flujo continuo con una bomba peristáltica para reponer el medio con un suministro ininterrumpido de medio con donante de electrones (acetato) y para eliminar

las células planctónicas. El modo de flujo continuo es fundamental para el crecimiento de biopelículas multicapa que pueden tener un espesor de cientos de micrómetros y producir una alta corriente eléctrica. La corriente máxima observada con la cepa PCA de *G. sulfurreducens* es ~ 12 mA con la configuración MEC descrita en este apéndice.

4.1. Materiales

- Frasco de suero que contiene al menos 60 ml de células en fase exponencial media ($DO_{600} \sim 0.3$; ver Protocolo básico 3)
- Etanol al 100%
- Medio FWAF, anaeróbico (ver receta)
- Medio FWA, anaeróbico (ver receta)
- Vitaminas DL (ver receta)
- Minerales DL (ver receta)
- Lejía al 10%
- Gasolinera ensamblada (Protocolo básico 1)
- Agujas 25-G
- Aguja para extracción de sangre 21-G BD Vacutainer Eclipse (BD, n. ° de catálogo 368607)
- Placa de agitación Thermo Cimarec Poly 15 (Thermo Scientific)
- El filtro de jeringa de vidrio se prepara como en el Protocolo de soporte 2
- Electrodo de referencia Ag / AgCl (Electrolítica, cat. No. C-925)
- Potenciostato (Gamry Instruments, n. ° de catálogo 992-00088, Potenciostato de interfaz 1000E o equivalente)
- Espectrofotómetro para determinar la DO_{600}
- Tubería Masterflex PharMed BPT de 3/16 pulg. (Cole Parmer, cat. No. EW-06508-15)
- Tapón de goma esterilizado en autoclave (tamaño 6.5) con dos orificios
- Sparger (Ace Glass, n. ° de catálogo 6453-109)
- Conector de manguera luer-lock hembra (Cole Parmer, cat. No. EW-41507-30)
- Bolsa de esterilización con sellado instantáneo Fisherbrand (Fisher, cat. No. 01-812-57, o equivalente)
- Jarra de 10 litros (Corning, cat. No. 1395-10L)
- Conectores macho Luer-lock (Cole Parmer, cat. No. EW-41507-26)
- Tubería de la bomba (2-STOP PHARMED, 1.30 mm ID, Cole Parmer, cat. No. EW-95713-32)
- Bomba peristáltica (Figura 7C.1.7, artículo 14; Cole Parmer, cat. No. EW-78001-42)
- Sala de cultivo sin cita fijada a 25 ° C y 30% de humedad para un crecimiento.

4.2. Modo FWAF

Este modo permite el crecimiento planctónico de células bacterianas dentro de la cámara MEC que luego se pueden utilizar para el crecimiento de la biopelícula utilizando los electrodos como aceptor de electrones terminales. Para el modo FWAF:

Coloque el extremo de una de las mangueras de la estación de servicio con una aguja estéril de 25 G y encienda el flujo de gas.

Esterilice la tapa de una botella de suero que tenga al menos 60 ml de células en fase exponencial media ($DO_{600} \sim 0.3$) colocando una gota de etanol al 100% en el tapón de butilo y flameándolo.

Inserte la aguja unida a la manguera de la estación de gasificación (paso 1) en el lado del tapón de butilo de la botella de suero para presurizar el recipiente.

Inserte la aguja a través del lado del tapón de butilo para dejar más espacio para la aguja de doble cara que se utilizará para transferir el cultivo al MEC en un paso posterior.

Inserte un extremo de una aguja de doble cara (aguja para extracción de sangre BD Vacutainer Eclipse 21-G) a través del centro del frasco de suero presurizado.

Inserte el otro extremo de la aguja de doble cara en la abertura lateral superior de la cámara del ánodo (llena con medio FWAF) y dispense aproximadamente 50 ml de las células.

Si el nivel del medio es ahora más alto que la apertura lateral más alta y la presión de la celda es alta, parte del medio fluirá fuera de la

celda al retirar la aguja de doble cara. Solucione esto insertando temporalmente una aguja estéril de 25 G en el tapón de butilo superior para liberar la presión.

Mueva la celda sobre la placa de agitación y encienda el agitador para que haya un flujo suave en cada cámara (velocidad de 150 para Thermo Cimarec Poly 15).

Conecte un filtro de jeringa de vidrio (preparado como en el Protocolo de soporte 2) a la línea de manguera de la estación de servicio.

Coloque una aguja estéril de 25 G en el extremo del filtro de la jeringa de vidrio e insértelo en la abertura lateral inferior de la cámara del cátodo.

Limpiar la cámara a ~ 1 burbuja por segundo es suficiente. Rocíe solo la cámara del cátodo durante el modo de fumarato FWA y el modo por lotes FWA. Rocíar la cámara del ánodo durante estos modos puede interrumpir el crecimiento inicial de la biopelícula.

Estabilice el tapón de goma, luego inserte una aguja 25-G estéril en la abertura lateral superior de la cámara del cátodo para permitir que la presión se equilibre.

Conecte el cable del electrodo de trabajo del potenciómetro al ánodo MEC, el cable del contraelectrodo del potenciómetro al cátodo MEC y el cable del electrodo de referencia del potenciómetro al electrodo de referencia MEC.

Aplique 0.3 V versus Ag / AgCl (valor típico para *G. sulfurreducens*) y configure el potenciómetro para registrar continuamente la corriente usando el programa de adquisición de datos de potenciómetros. Verifique el OD_{600nm} regularidad (1 a 2 veces al día) y una vez que alcance ~ 0.2, pase al modo FWA-batch.

5.6 Modo por lotes FWA (sin fumarato)

Este modo elimina el fumarato aceptor de electrones soluble y obliga a las bacterias a crecer utilizando el ánodo como aceptor de electrones terminal.

Reemplace el medio en la cámara del ánodo con medio FWA siguiendo los pasos de vaciado / llenado descritos anteriormente.

Continúe monitoreando la corriente hasta que alcance ~ 0.2 mA o alcance un máximo y comience a caer, luego pase al modo de flujo continuo.

5.7 Modo de flujo continuo

Este modo proporciona un suministro continuo de medio fresco para eliminar las células planctónicas y permite la formación de biopelículas gruesas que producen una alta densidad de corriente en MEC.

Pase dos juegos de 3/16 pulg. Tubería Masterflex PharMed BPT a través de un tapón de goma (tamaño 6.5) que tiene dos tubos de 3/16 pulg. agujeros en la parte superior.

El tubo debe ser lo suficientemente largo como para que cuando los rociadores estén conectados a los extremos, estén en el fondo de las jarras de 10 litros (~ 3 pies es suficiente).

Para ambos tubos, conecte el extremo inferior (que eventualmente entrará en el medio) con un rociador y el extremo superior con un conector de manguera luer-lock hembra.

Autoclave este conjunto en un ciclo rápido / seco durante 30 minutos utilizando una bolsa de esterilización de sellado instantáneo.

Después de la esterilización en autoclave, el conjunto se puede almacenar durante varios días.

Agregue 100 ml de cada una de las vitaminas DL y de los minerales DL esterilizados por filtración a una jarra de 10 litros llena con 9800 ml de medio FWA, junto a un mechero Bunsen encendido, lo que reduce la posibilidad de contaminación por contaminantes en el aire.

Asegúrese de que la jarra se haya esterilizado en autoclave y se haya enfriado antes de agregar las vitaminas DL y los minerales DL.

Selle la jarra con el conjunto de tapón de goma y tubo preparado en los pasos 15 a 17, teniendo cuidado de no tocar la mitad inferior del tubo que se sumergirá en el medio.

Conecte la estación de gasificación a un filtro de jeringa de vidrio preparado como en el Protocolo de soporte 2, y luego conéctelo a uno de los cierres luer hembra para

que se pueda rociar la jarra mediana. Rocíe la jarra durante 45 a 60 min.

Conecte la cámara del ánodo del MEC a la jarra mediana FWA de 10 litros usando un tubo de bomba (2-STOP PHARMED, 1.30 mm ID) que tiene conectores Luer-lock macho en ambos extremos.

Un extremo se conecta al cierre luer hembra de la jarra mediana y el otro se ajusta con una aguja 25-G estéril y se inserta en la abertura lateral superior de la cámara del ánodo (después de esterilizar a la llama el tapón de goma de butilo).

Coloque el tubo de la bomba sobre la bomba peristáltica y use el tapón para bloquear el tubo hacia abajo para asegurar un caudal adecuado. Configure la bomba para que fluya a 0,5 ml / min.

Para recolectar el medio usado a medida que se llena el MEC, coloque el tubo de goma esterilizado en autoclave con una aguja 25-G estéril e insértelo en la abertura lateral superior, y coloque el otro extremo del tubo en una jarra para desechos (consulte [Figura A.4K.9](#)). Agregue lejía al 10% a la jarra para reducir la contaminación y vacíe la jarra de desechos a diario. Use lejía para limpiar la jarra.

PROTOCOLO DE APOYO 1. PRUEBAS DE MEDIOS

Siempre se debe probar un lote de medio antes de su uso. A continuación, se muestran los protocolos de prueba para NBAF, FWAF y los medios de cisteína 100 mM utilizados en los protocolos anteriores.

Materiales

- Tubos de presión y botella de suero con medio NBAF o FWAF para probar (ver recetas y Protocolo básico 2)
- Cisteína 100 mM ("buen lote"; ya probado de acuerdo con los pasos a continuación)
- Cultivo NBAF de tipo salvaje "feliz" de *Geobacter* (Protocolo básico 3; no dejar reposar en la fase estacionaria > 2 días)
- Frasco de suero con cisteína 100 mM para analizar (ver receta y Protocolo básico 2)
- Papel de tornasol

Para NBAF y FWAF

Si el medio se preparó el mismo día, será suficiente probar dos tubos de presión. Si el medio se preparó en días separados, pruebe los dos tubos de presión y una botella de suero de 125 ml.

Reduzca los dos tubos de presión de 10 ml y una botella de suero de 125 ml de NBAF o FWAF agregando 0,1 ml o 1,0 ml de cisteína 100 mM (de un buen lote), respectivamente.

El medio debe cambiar de púrpura / rosa a incoloro en 1,5 horas.

Inocular un tubo de presión con 0,1 ml y el otro con 0,5 ml de un cultivo NBAF de tipo salvaje "feliz" de *Geobacter* (un cultivo que no se ha sentado en la fase estacionaria durante más de 2 días). Inocular la botella de suero de 125 ml con 5 ml del cultivo feliz.

Para pasar la inspección, el tubo de presión inoculado con 0,5 ml de cultivo debe alcanzar una $DO_{600} > 0,6$ en 24 horas. El tubo de presión inoculado con 0,1 ml debe alcanzar una $DO_{600} > 0,6$ en 2,5 días. Para la botella de suero, la DO_{600} debe superar 0,4 en 24 horas.

Si la NBAF pasa la inspección, registre su éxito en una tabla de lotes medianos y transfiera el medio de los cajones medianos no probados a los probados.

Si la NBAF no pasa la inspección, registre su falla en la tabla de lotes medianos y deseche todo el lote.

Para cisteína 100 mM

Tome una botella de suero de cisteína 100 mM y reduzca dos tubos de presión de NBAF (de un lote bueno / inspeccionado) agregando 0.1 ml de cisteína 100 mM por cada tubo de presión de 10 ml.

El medio debe cambiar de púrpura a incoloro en 1,5 horas.

Inocular un tubo de presión con 0,1 ml y el otro con 0,5 ml de un cultivo NBAF de tipo salvaje "feliz" de *Geobacter* (un cultivo que no se ha sentado en la fase estacionaria durante más de dos días).

El tubo inoculado con 0,5 ml de cultivo celular debe alcanzar una $DO_{600} > 0,6$ en ~ 24 h. El tubo inoculado con 0,1 ml debe alcanzar una $DO_{600} > 0,6$ en ~ 2,5 días.

Extraiga 1 ml y verifique que el pH sea ~ 7 con papel tornasol.

Si la cisteína pasa la inspección, registre su éxito en una tabla de lotes medianos y transfiera el medio de los cajones medianos no probados a probados.

Si la cisteína no pasa la inspección, registre su falla en un gráfico de lote mediano. Deseche todo el lote.

PROTOCOLO DE APOYO 2 . PREPARAR EL CONJUNTO DEL FILTRO DE JERINGA DE VIDRIO

Se pueden usar jeringas de plástico para transferir el medio anaeróbico y los cultivos bacterianos, pero se debe tener especial cuidado para asegurar que se mantenga un ambiente anaeróbico y estéril. Un sistema de filtrado conectado al extremo de la tubería de gas es una protección común contra posibles contaminantes. Si bien los filtros están disponibles comercialmente (Pall, cat. No. 4423), y se usan ocasionalmente en nuestro laboratorio, en el siguiente protocolo describimos el montaje de un sistema de filtro de jeringa de vidrio económico que se puede construir internamente y que ha funcionado efectivamente.

Materiales

- Jeringa de vidrio (Cadence Science, cat. No. 5024, o Fisher, cat. No. 14-825-3B)
 - Lana de vidrio (Fisher, cat. No. AC38606-0500)
 - Tapón de goma (tamaño # 1)
 - Aguja 18-G
1. Llene del 75% al 90% de una jeringa de vidrio con lana de vidrio.
 2. Tape la jeringa con un tapón de goma (tamaño # 1)
 3. Penetrar el tapón con una aguja de 18 G.
 4. Esterilice en autoclave el ensamblaje durante 30 minutos usando el ciclo rápido / seco.

El filtro de jeringa puede usarse inmediatamente o almacenarse en un recipiente tapado.

La jeringa ahora está lista para eliminar el oxígeno de las jeringas para la inoculación y transferencia de cultivos celulares (descrito en el Protocolo básico 3) o para colocar una aguja

para proporcionar gas estéril anóxico para rociar el BES (descrito en el Protocolo básico 4).

PROTOCOLO DE APOYO 3 . MANTENIMIENTO MEC

Si la bomba peristáltica se ajusta a 0,5 ml / min, se puede utilizar una jarra de medio de 8 litros durante aproximadamente 11 días para un MEC. Se puede utilizar una velocidad de bombeo más baja para operaciones a largo plazo. Se pueden conectar varios MEC a una jarra común mediante un divisor ([Figura A.4K.9](#)) donde la junta de vidrio se prepara en una tienda de vidrio local y se conecta con tubos BPT y conectores luer-lock hembra como se describió anteriormente para la jarra mediana. Mientras conecta la jarra, asegúrese de que no haya burbujas de aire y que el medio fluya suavemente desde la jarra a través del MEC hasta la jarra de desechos. El conjunto de filtro de jeringa de vidrio con lana de vidrio debe reemplazarse periódicamente si está bloqueando el suministro de gas. Además, controle con regularidad posibles fugas de agua.

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Utilice agua desionizada (DI) para todas las soluciones.

Cisteína, 100 mM presenta los ingredientes necesarios para hacer el stock de cisteína 100 mM. Prepare la solución madre de cisteína 100 mM agregando 17,56 g de cisteína HCl a 800 ml de agua desionizada. Si la solución se volverá anaeróbica (consulte el Protocolo básico 2) con gas N₂ puro, ajuste el pH a 7,0 con NaOH; Si la solución se volverá anaeróbica con gas 80:20 N₂: CO₂, ajuste el pH a 7,5 antes de burbujear para tener en cuenta la caída del pH del CO₂ introducido durante el proceso de burbujeo. Después del ajuste del pH, lleve el volumen a 1000 ml con agua desionizada y haga que la solución sea anaeróbica siguiendo el procedimiento discutido en el manuscrito. Distribuya la solución madre en alícuotas en tubos de presión de 10 ml y frascos de suero de 100 ml, y conviértalos en anaeróbicos siguiendo los pasos que se presentan en el Protocolo básico 2. Almacene el lote en cajones marcados como "no probado" hasta el protocolo de prueba del medio (consulte el Protocolo de soporte 1). es seguido. Almacene hasta 1 mes a temperatura ambiente.

Conclusiones

Estos resultados demuestran que una mutación de un solo par de bases en un regulador transcripcional puede tener un impacto significativo en la capacidad de utilización del sustrato y sugieren que la evolución

adaptativa debe considerarse como una respuesta potencial de los microorganismos a los cambios ambientales impuestos durante la biorremediación.

Estos resultados demuestran que el modelado iterativo junto con la experimentación puede acelerar la comprensión de la fisiología de organismos poco estudiados pero ambientalmente relevantes y puede ayudar a optimizar sus aplicaciones prácticas.

Referencias

- Call, D. F., & Logan, B. E. (2011). Lactate oxidation coupled to iron or electrode reduction by *Geobacter sulfurreducens* PCA. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(24), 8791–8794.
- Cologgi, D. L., Speers, A. M., Bullard, B. A., Kelly, S. D., & Reguera, G. (2014). Enhanced uranium immobilization and reduction by *Geobacter sulfurreducens* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(21), 6638–6646.
- Dar, S. A., Tan, H., Peacock, A. D., Jaffe, P., N'Guessan, L., Williams, K. H., & Strycharz-Glaven, S. (2013). Spatial Distribution of Geobacteraceae and Sulfate-Reducing Bacteria During In Situ Bioremediation of Uranium-Contaminated Groundwater. *Remediation Journal*, 23(2), 31–49.
- Finneran, K. T., Anderson, R. T., Nevin, K. P., & Lovley, D. R. (2002). Potential for bioremediation of uranium-contaminated aquifers with microbial U (VI) reduction. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 11(3), 339–357.
- Finneran, K. T., Housewright, M. E., & Lovley, D. R. (2002). Multiple influences of nitrate on uranium solubility during bioremediation of uranium-contaminated subsurface sediments. *Environmental Microbiology*, 4(9), 510–516.
- Harnisch, F., Koch, C., Patil, S. A., Hübschmann, T., Müller, S., & Schröder, U. (2011). Revealing the electrochemically driven selection in natural community derived microbial biofilms using flow-cytometry. *Energy & Environmental Science*, 4(4), 1265–1267.
- Holmes, D. E., Finneran, K. T., O'neil, R. A., & Lovley, D. R. (2002). Enrichment of members of the family Geobacteraceae associated with stimulation of dissimilatory metal reduction in uranium-contaminated aquifer sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2300–2306.
- Holmes, D. E., Orelana, R., Giloteaux, L., Wang, L.-Y., Shrestha, P., Williams, K., Lovley, D. R., & Rotaru, A.-E. (2018). Potential for Methanosarcina to Contribute to Uranium Reduction during Acetate-Promoted Groundwater Bioremediation. *Microbial Ecology*, 76(3), 660–667.
- <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1165-5>
- Lovley, D. R. (2006). Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 4(7), 497–508.
- Lovley, D. R., & Coates, J. D. (1997). Bioremediation of metal contamination. *Current Opinion in Biotechnology*, 8(3), 285–289.
- Malvankar, N. S., Lau, J., Nevin, K. P., Franks, A. E., Tuominen, M. T., & Lovley, D. R. (2012). Electrical conductivity in a mixed-species biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5967–5971.
- Malvankar, N. S., Vargas, M., Nevin, K. P., Franks, A. E., Leang, C., Kim, B.-C., Inoue, K., Mester, T., Covalla, S. F., & Johnson, J. P. (2011). Tunable metallic-like conductivity in microbial nanowire networks. *Nature Nanotechnology*, 6(9), 573–579.
- Newsome, L., Morris, K., & Lloyd, J. R. (2014). The biogeochemistry and bioremediation of uranium and other priority radionuclides. *Chemical Geology*, 363, 164–184.
- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2013.10.034>
- Schmidt, I., Pieper, A., Wichmann, H., Bunk, B., Huber, K., Overmann, J., Walla, P. J., & Schröder, U. (2017). In situ autofluorescence spectroelectrochemistry for the study of microbial extracellular electron transfer. *ChemElectroChem*, 4(10), 2515–2519.
- Semenec, L., Vergara, I. A., Laloo, A. E., Mathews, E. R., Bond, P. L., & Franks, A. E. (2019). Enhanced Growth of Pilin-Deficient *Geobacter sulfurreducens* Mutants in Carbon Poor and Electron Donor Limiting Conditions. *Microbial Ecology*, 78(3), 618–630.
- <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01316-8>
- Wang, H., & Ren, Z. J. (2013). A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1796–1807.

Perfil profesional

Egresada de la carrera de ingeniería de minas por la Universidad Nacional del Altiplano Puno, con alta orientación a la acción y manejo del cambio. Comprometida con la innovación y la búsqueda de mejoras continuas para maximizar los procesos e insertar ideas vanguardistas a la organización. Entusiasta líder con alta capacidad de toma de decisiones y trabajo bajo presión, impulsando el cumplimiento de metas en conjunto y promoviendo el trabajo en equipo.

Nombre del autor: Daniela Bustinza Ortega

Cargo: Trainee de Innovation

Empresa: Gold Fields

Correo electrónico:

danielabustinzaortega3@gmail.com

Teléfono / Celular:958462996

Dirección: Jr.9 de octubre, Puno