

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**“Generación de electricidad en mutantes de
Escherichia coli de la producción de NADH y
NADPH”**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster
en Bioquímica área de Especialización Bioquímica Ambiental y Memoria
para optar al Título de Bioquímico por:

María Fernanda Retamal Morales

Director de Tesis: Dr. Ricardo Cabrera Paucar

Santiago-CHILE

Mayo 2018

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

MARÍA FERNANDA RETAMAL MORALES

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Ambiental y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día _____

Director de Tesis:

Dr. Ricardo Cabrera Paucar _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Davor Cotoras _____

Dr. Sergio Álvarez _____

Dr. José Pérez _____

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Lidia que me ha apoyado y acompañado siempre junto con mi hermano Mario, mi padre Luis y toda mi familia. A mi pololo Cristóbal, por soportarme y acompañarme todos estos años, siempre entregándome palabras de ánimo y cariño; también a su familia que siempre ha sido muy atenta conmigo. A mis amigos del laboratorio, Dixon, Vicky, Kathy y Nadia, a quienes voy a estimar siempre, que son un apoyo fundamental y que hacían el día a día mucho más agradable con su cariño y buen humor. A mi tutor Ricardo, que no solo me ayudó con el trabajo de laboratorio, sino también con sus consejos de la vida. A todos los profesores y los compañeros del laboratorio. Y finalmente a Steve y Alonso, que siempre me escuchan y me entregan su amor incondicional.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue desarrollada en el grupo de Bioenergética y Enzimología Molecular del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. El trabajo fue financiado por el proyecto PAIFAC 2016. Fac Cs. (RC) y Proyecto ENL012/16.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	III
FINANCIAMIENTO	IV
INDICE.....	V
INDICE DE FIGURAS.....	VII
INDICE DE TABLAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
1.- RESUMEN.....	1
2.- ABSTRACT	3
3.- INTRODUCCIÓN.....	5
3.1. Metabolismo heterotrófico y poder reductor intracelular	5
3.2. Procesos de transferencia hacia aceptores finales de electrones	7
3.3. Celdas de Combustible Microbiológicas.....	9
3.4. Impacto fisiológico de la generación de electricidad	11
3.5. Ingeniería metabólica en el poder reductor	14
4. Hipótesis.....	19
5. Objetivo General	19
6. Objetivos Específicos.....	19
7. MATERIALES Y MÉTODOS	20
7.1. Materiales Utilizados.....	20
7.1.1. Reactivos.....	20
7.1.2. Cepas bacterianas	21
7.1.3. Medios de cultivo	21
7.2. Metodología para la Caracterización Fisiológica de las Cepas.....	22
7.2.1. Condiciones de cultivo, monitoreo de las curvas de crecimiento y obtención de muestras	22
7.2.2. Cultivos anaeróbicos	23
7.2.3. Cultivos anaeróbicos con rojo neutro	24
7.2.4. Cultivos electrogénicos	24
7.2.5. Pre-inóculo para cultivo electrogénico.....	25
7.2.6. Determinación de la concentración de glucosa en el medio de cultivo electrogénico.....	26
7.2.7. Determinación de consumo de glucosa.....	27
7.3. Celda de combustible microbiológica	29
7.3.1. Determinación del flujo de electrones en la celda.....	30
7.4. PCR de colonia y secuenciación	32
7.4.1. Verificación del tamaño de los productos mediante electroforesis.....	33
8. RESULTADOS	34
8.1. Caracterización del crecimiento anaeróbico de las cepas	34
8.1.1. Tasa de crecimiento anaeróbico	34
8.2. Efecto del rojo neutro en el crecimiento	37

8.3. Caracterización fisiológica de las cepas en condiciones electrogénicas.....	39
8.3.1. Rendimiento de biomasa y tasa de consumo de glucosa de cultivos electrogénicos.....	39
8.3.2. Crecimiento electrogénico y relación de corriente con biomasa	45
9. DISCUSIÓN	50
9.1. Efecto de la ausencia de oxígeno en el crecimiento de mutantes de la producción de NADH y NADPH en <i>E. coli</i>	50
9.2. Efecto de las condiciones electrogénicas en cultivos de <i>E. coli</i>	51
9.3. Variabilidad experimental y proyecciones.....	56
10. REFERENCIAS	59
11. ANEXO	63

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Celda de Combustible Microbiológica.....	10
Figura 2. Curvas de progreso de <i>E. coli</i>	13
Figura 3. Curvas de crecimiento anaeróbico de cepas de <i>E. coli</i> Δpgi con glucosa como única fuente de carbono.....	15
Figura 4. Vías metabólicas alrededor del nodo de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en las 4 cepas	17
Figura 5. Diagrama esquemático del sistema MFC	30
Figura 6. Curvas de crecimiento anaeróbico de las cepas de <i>E. coli</i>	36
Figura 7. Tasas de crecimiento cepa MG1655 a distintas concentraciones de rojo neutro.....	38
Figura 8. Determinación del factor de conversión de absorbancia a peso seco	40
Figura 9 Relación entre cantidad de glucosa en el medio y biomasa producida para la determinación del rendimiento de la cepa MG1655.....	42
Figura 10. Relación entre cantidad de glucosa en el medio y biomasa producida para la determinación del rendimiento de la cepa NAD-G6PDH.....	42
Figura 11. Relación entre cantidad de glucosa en el medio y biomasa producida para la determinación del rendimiento de la cepa Δpgi^a	43
Figura 12. Relación entre cantidad de glucosa en el medio y biomasa producida para la determinación del rendimiento para la cepa Δpgi -NAD-G6PDH ^a	43
Figura 13. Curvas de crecimiento de las cepas MG1655 y NAD-G6PDH en condiciones electrogénicas.....	46
Figura 14. Curvas de crecimiento de las cepas Δpgi^a y Δpgi -NAD-G6PDH ^a en condiciones electrogénicas.....	47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Metabolismo anaeróbico de células en crecimiento de <i>E. coli</i> , en presencia y ausencia de generación de electricidad.....	14
Tabla 2. Reactivos utilizados y sus respectivos proveedores.....	20
Tabla 3. Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas y sus características relevantes	21
Tabla 4. Partidores para PCR colonia	32
Tabla 5. Mix de Reacción de PCR-colonia	32
Tabla 6. Protocolo de PCR	33
Tabla 7. Tasas de crecimiento obtenidas a partir de cultivos de <i>E. coli</i>	37
Tabla 8. Tasas de crecimiento anaeróbico obtenidas a partir de cultivos de <i>E. coli</i> con diferentes concentraciones de rojo neutro	38
Tabla 9. Parámetros fisiológicos obtenidos a partir de cultivos de <i>E. coli</i>	44
Tabla 10. Parámetros de flujo eléctrico de las cepas de <i>E. coli</i> estudiadas, durante el crecimiento electrogénico.	48
Tabla 11. Rendimiento de electrones de las cepas de <i>E. coli</i> estudiadas, durante el crecimiento electrogénico.	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	: Adenosín trifosfato
e	: Carga elemental
E	: Potencial eléctrico
EDD	: Entner Doudoroff
f	: Factor de conversión de densidad óptica a biomasa
F_e	: Flujo metabólico de salida de electrones
gDW	: Gramos de peso seco (del inglés, <i>grams of Dry Weigth</i>)
<i>gnd</i>	: Gen que codifica la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa
G6PDH	: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
HPLC	: Cromatografía Líquida de Alta Resolución (del inglés, <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
i	: Corriente eléctrica
j	: Densidad de corriente eléctrica
MFC	: Celda de Combustible Microbiológica (del inglés, <i>Microbial Fuel Cell</i>)
n_a	: Número de Avogadro
NAD	: Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADP	: Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato oxidado
NADH	: Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NADPH	: Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducido
NAD(H)	: NAD y NADH
NADP(H)	: NADP y NADPH
NAD(P)	: NAD y NADP
NAD(P)H	: NADH y NADPH
NAD-G6PDH	: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
DO	: Densidad óptica
DO ₆₀₀	: Densidad óptica medida a 600 nm
DO ₆₆₀	: Densidad óptica medida a 660 nm
OxPPP	: Vía oxidativa de las pentosas fosfato (del inglés, <i>Oxidative Pentose Phosphate Pathway</i>)
PCR	: Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)

PGI	: Fosfogluco isomerasa
<i>pgi</i>	: Gen que codifica la enzima fosfogluco isomerasa
PEM	: Membrana permeable a protones
Q_{glc}	: Tasa de consumo de glucosa
r	: Razón de cambio de la corriente respecto a la densidad óptica
RN	: rojo neutro
SI	: Sistema Internacional
TCA	: Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (del inglés, <i>tricarboxylic acid cycle</i>)
V	: Volumen
$Y_{(x/s)}$: Rendimiento de biomasa por sustrato
<i>zwf</i>	: Gen que codifica la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
μ	: Tasa de crecimiento
Δpgi	: Delección del gen <i>pgi</i> que codifica la Fosfogluco isomerasa

1.- RESUMEN

Durante la generación de electricidad en sistemas de Celda de Combustible Microbiológicas (MFC, por su sigla en inglés), se han manipulado distintas vías metabólicas para generar un aumento en la bioelectricidad, debido a que los electrones necesarios para este proceso provienen del poder reductor generado dentro de la célula. Esto no solo se ha estudiado en cepas electrogénicas como lo son *Geobacter* o *Shewanella*, sino que también se han realizado estudios en *Escherichia coli*, la cual puede transferir electrones a un electrodo a través de un mediador. Estos últimos años, la investigación se ha centrado específicamente en la manipulación cofactores, principalmente el NADH. En estos casos, alteran tanto vías de consumo como de generación de este cofactor, pero evalúan principalmente la eficiencia de esta modificación en el voltaje, la corriente o en la potencia producida. Sin embargo, pocas veces consideran observar los factores intrínsecos de la bacteria que están produciendo estas mejoras. Debido a esto, en este trabajo se utilizó una MFC con distintas cepas de *E. coli* con el mediador rojo neutro para observar no solo los cambios en la generación de corriente, sino que también, el consumo de la fuente de carbono (glucosa en este caso), rendimiento, y flujo de electrones en estos cultivos electrogénicos. Esto ayudó a comprender en parte lo que puede estar pasando en el metabolismo bacteriano durante el proceso de generación de corriente. Las cepas utilizadas fueron la cepa de *E.coli* K-12 MG1655, la cepa NAD-G6PDH la cual presenta un cambio en la especificidad de cofactor de la enzima G6PDH (en la cepa silvestre utiliza NADP⁺, en este caso utiliza NAD⁺), la

cepa Δpgi (con la delección del gen que codifica la enzima fosfogluco isomerasa) y la cepa Δpgi -NAD-G6PDH que posee las dos mutaciones mencionadas. Finalmente, el trabajo demostró que las cepas MG1655 y NAD-G6PDH, que presentan más NADH, generan mayor electricidad en el tiempo que las cepas que tienen la mutación Δpgi . No obstante, el flujo de los electrones de todas las cepas fue similar, ya que no se observaron diferencias significativas. Además, se observó que la cepa Δpgi podría poseer un mejor rendimiento de mmoles de electrones por mmoles de glucosa consumida que las otras cepas, ya que produce una corriente relativamente alta para la poca biomasa y el bajo consumo de glucosa.

2.- ABSTRACT

During the electricity generation in Microbiological Fuel Cell (MFC) systems, different metabolic pathways have been manipulated to generate an increase in the bioelectricity since the electrons needed for this process come from the reducing power generated inside the cell. This has not only been studied in electrogenic strains such as *Geobacter* or *Shewanella*, but also studies have been carried out in *Escherichia coli*, which can transfer electrons to an electrode through a mediator. Over the last few years, the research has focused specifically on the manipulation of cofactors, mainly in NADH. In these cases, they alter both consumption and generation pathways of this cofactor, but they mainly evaluate the efficiency of this modification in the voltage, the current or the power produced. However, they rarely consider observing the intrinsic factors of the bacteria that are producing these improvements. Due to this, in this work we used an MFC with different strains of *E. coli* with the Neutral Red mediator to observe not only the changes in the current generation, but also the consumption of carbon source (glucose in this case), yields, and electron flux in these electrogenic cultures. This helped to partially understand what may be happening in the bacterial metabolism during the current generation process. The strains used in this work were *E. coli* strain K-12 MG1655, strain NAD-G6PDH, which shows a change in the specificity cofactor of the G6PDH enzyme (in the wild type strain uses NADP⁺, in this case uses NAD⁺), strain Δpgi (with a deletion of the gene encoding the phosphoglucose isomerase enzyme) and strain Δpgi -NAD-G6PDH that possesses the two mentioned mutations. Finally, the work

demonstrated that the strains MG1655 and NAD-G6PDH that present more NADH generate higher current per time than the strains that have the Δpgi mutation. Nevertheless, the electrons flux of all the strains was similar, since no significant differences were observed. In addition, it was observed that the strain Δpgi could have a better yield of mmol of electrons per mmol of consumed glucose than the other strains, since it produces a relatively high current for the low biomass and the low glucose consumption.

3.- INTRODUCCIÓN

3.1. Metabolismo heterotrófico y poder reductor intracelular

Los organismos heterótrofos poseen diferentes vías metabólicas que les permiten oxidar las fuentes de carbono. Dichas rutas cumplen principalmente dos funciones, generar los precursores para la biosíntesis o anabolismo, y proveer la generación de la energía (como el ATP, el NADPH y la fuerza protón-motriz) que se necesita para el consumo de nutrientes y la biosíntesis (Holms, 1986).

En el caso de *Escherichia coli*, el metabolismo anabólico se encuentra constituido por casi 1000 reacciones, pero el núcleo de esta red lo componen alrededor de 11 intermediarios de las vías centrales y los cofactores ATP, NADH y NADPH (Sauer y col., 2004). En *E. coli*, la generación de NADH y NADPH ocurre en diferentes vías del metabolismo central, de acuerdo con las especificidades o preferencias que presentan las deshidrogenasas por estos cofactores (Olavarría y col., 2014).

A pesar de que NADH y NADPH son moléculas muy similares y poseen el mismo potencial estándar de óxido-reducción (redox, $E_0' = -0,32 \text{ V}$), cumplen funciones diferentes (Carugo & Argos, 1997). El consumo de NADPH ocurre en diferentes reacciones de biosíntesis para la generación de biomasa (Fuhrer & Sauer, 2009). Por otro lado, el consumo de NADH está relacionado con la generación de energía al transferir equivalentes de reducción a la cadena transportadora de electrones para generar fuerza protón motriz. Por ejemplo, se sabe que las NADH deshidrogenasa I y II, catalizan la transferencia de electrones

de NADH (pero no de NADPH) al pool de quinonas en la membrana citoplasmática, regenerando así la forma oxidada del cofactor (Matsushita y col., 1987). Como consecuencia de estar conectados con diferentes aceptores de electrones, el equilibrio químico de estos cofactores se encuentra generalmente desplazado a la forma reducida del NADPH y la oxidada del NADH (Reich & Sel'kov, 1981).

Debido al esquema de vías de producción y consumo, los electrones transportados por NADPH permanecen en la célula, formando parte de la biomasa (aminoácidos, nucleótidos, etc), mientras que en el caso de NADH pueden salir del sistema a través de los metabolitos de fermentación o hacia un aceptor final externo en la respiración.

En *E. coli*, la ausencia de oxígeno afecta los flujos metabólicos y las concentraciones intracelulares de NADH y NADPH. Se ha reportado que al contrastar los flujos del metabolismo central en condiciones anaeróbicas respecto de las aeróbicas se observa un aumento del flujo a través de la glicólisis, un flujo similar en la vía oxidativa de las pentosas fosfato (oxPPP) y poco o ningún flujo alrededor el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) (Chen y col., 2011). También en cultivos anaeróbicos se ha observado un aumento de los niveles de NADH que son indicativos de una cadena de transporte de electrones inactiva (Partridge y col., 2006), y también se ha reportado que la concentración de NADPH disminuye en *E. coli* en ausencia de oxígeno (Partridge y col., 2006 & McCloskey y col., 2014), debido al bajo flujo a través de la isocitrato deshidrogenasa (productora de NADPH en el ciclo TCA) y de la transhidrogenasa de membrana PntAB, cuya función metabólica

primaria está relacionada con la producción de NADPH (Hanson & Rose, 1980, Canonaco y col., 2001).

Se sabe que al delecionar el gen de la fosfogluco isomerasa (enzima de la glicolisis) en *E. coli*, la cepa mutante disminuye su crecimiento en condiciones aeróbicas, produciendo una redistribución de flujos, debido a que esta modificación genética genera sobreproducción de NADPH provocando un desbalance al no poder reoxidar este cofactor, resultando en una inhibición del crecimiento celular (Canonaco y col., 2001, Nor Aini y col., 2006, Olavarría y col., 2014), aunque el mecanismo mediante el cual ocurre todavía no está claro. En condiciones aeróbicas la vía de Entner Doudoroff (EDD) se encuentra poco activa y, por lo tanto, la mutación Δpgi conlleva a una alta producción de NADPH dado que el flujo de carbono se canaliza a través de la rama oxidativa de la vía de las pentosas-fosfato (Sauer y col., 2004). En el caso de la mutante Δpgi , Sauer y col., 2004 observaron que la vía EDD se encontraba activada con respecto de la cepa silvestre. Sin embargo, si comparamos con los datos de Chen y col., 2011, la activación observada por Sauer en la mutante es de mucho menor magnitud que la activación de la cepa silvestre en condiciones anaeróbicas. De esta forma, podemos decir que las redistribuciones de flujo que acompañan a la presencia o ausencia de oxígeno, así como la delección de *pgi*, tienen consecuencias importantes para la producción de NADPH.

3.2. Procesos de transferencia hacia aceptores finales de electrones

La transferencia de electrones a un aceptor externo es un proceso fundamental en el metabolismo. Las condiciones de cultivo permiten que las

bacterias puedan transferir electrones a diferentes aceptores finales, ya sea oxígeno (en la respiración aeróbica) (Nelson & Cox, 2009) o fumarato, nitrato o aceptores sólidos como óxidos metálicos (respiración anaeróbica) (Jensen y col., 2010). Este último caso se utiliza en aplicaciones de celdas bioelectroquímicas, como se verá más adelante.

Los procesos de transferencia de electrones a un aceptor sólido se pueden clasificar en dos tipos: transferencia directa de electrones y la transferencia de electrones mediada (Mao & Verwoerd, 2013). El paso directo de electrones entre un microorganismo a un aceptor sólido, a su vez, se puede lograr a través de dos mecanismos biológicos: La interacción directa del aceptor con citocromos de tipo-c que existen en la membrana celular en algunos microorganismos reductores de metal, tales como *Shewanella* (El-Naggar y col., 2010), *Geobacter* (Reguera y col., 2005) y *Rhodoferrax* (Bullen y col., 2006). El otro mecanismo es la interacción del aceptor con los denominados nanocables bacterianos. Estos son apéndices extracelulares que actúan como vías para el transporte de electrones en diversos microorganismos, incluyendo bacterias reductoras de metales y cianobacterias fotosintéticas (Mao & Verwoerd, 2013).

Por su parte, en la transferencia mediada de electrones, una molécula mediadora soluble actúa como un transportador de electrones (electronóforo) que circula entre la bacteria y el aceptor sólido. Además, los mediadores pueden clasificarse como endógenos, y exógenos (Hernandez & Newman, 2001). Entre los mediadores endógenos se encuentran flavinas (Okamoto y col, 2013), la menaquinona y moléculas similares a quinonas, como las producidas por

Shewanella oneidensis MR-1 (Hernandez & Newman, 2001). Otro ejemplo es la piridina-2,6-tiocarboxilato (P-2,6-T) producida por la bacteria *Pseudomonas stutzeri* (Hernandez & Newman, 2001). Por su parte, los mediadores exógenos corresponden a moléculas no sintetizadas por el microorganismo electrogénico, generalmente agregada como parte del protocolo experimental. Entre ellos encontramos comúnmente el azul de metileno (Wang y col., 2010), el metil viológeno (Alegret y col., 2004) (Trudiatger, 1970) y el rojo neutro (RN) (Noll, 2006) (Park & Zeikus, 2000) (Park y col., 2000) entre otros. Los detalles del mecanismo de extracción de electrones por parte de mediadores exógenos, es decir sus características como aceptores finales de electrones, en muchos casos no son conocidos, pero a pesar de ello su uso está siendo estudiado en dispositivos denominados Celdas de Combustible Microbiológicas (MFC). Por lo tanto, se hace importante caracterizar no solamente el comportamiento como mediador si no también sobre parámetros fisiológicos de los cultivos que se encuentran generando electricidad.

3.3. Celdas de Combustible Microbiológicas

Las celdas combustibles microbiológicas son biorreactores que convierten la energía química de compuestos orgánicos en energía eléctrica a través del metabolismo bacteriano (Logan y col., 2006). Si ciertas bacterias heterótrofas se cultivan en condiciones anaerobias (y en ausencia de otros aceptores fisiológicos de electrones), pueden transferir parte de los electrones consumidos desde el nutriente a un electrodo de carbono (ánodo). Los electrones se mueven a través de un cable conectado a una resistencia, al cátodo donde se combinan con protones y

oxígeno para formar agua como se muestra en la Figura 1. Cuando estos electrones fluyen desde el ánodo al cátodo, generan la corriente para producir electricidad (Logan, 2008).

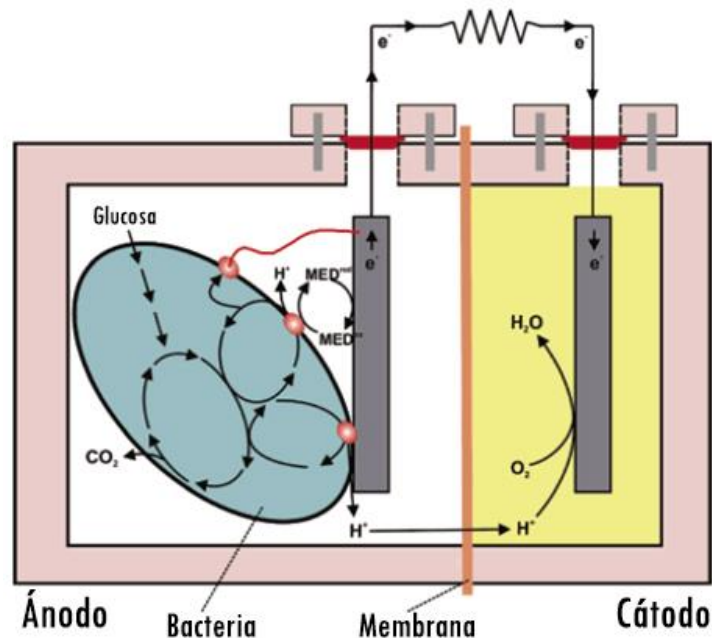


Figura 1. Celda de Combustible Microbiológica

El principio de funcionamiento de una celda de combustible microbiana. La glucosa es metabolizada por bacterias, que transfieren los electrones al ánodo. Esto puede ocurrir directamente a través de proteínas de membrana, nanocables o mediante mediadores móviles (MED, mediador redox). Modificada de Logan y col., 2006.

Con el fin de facilitar la transferencia de electrones desde el microorganismo al ánodo, se puede utilizar un mediador exógeno. Se ha mencionado que las propiedades que una molécula debe poseer para comportarse como un mediador son: (i) un potencial suficientemente diferente de la molécula donadora de electrones de la célula con el del mediador, para facilitar la transferencia de electrones, (ii) transferencia de electrones rápida con el organismo y el electrodo, (iii) capacidad de ciclos redox repetidos, (iv) ausencia de citotoxicidad y (v) buenos perfiles de absorción/adsorción/desorción del mediador tanto con el organismo

como con el electrodo, de modo que permanezca en solución y siga estando disponible para el proceso (Mao & Verwoerd, 2013). Sin embargo, resulta necesario que exista un aceptor final para los electrones en el compartimento catódico, siendo el oxígeno un aceptor destacado, debido a su elevado potencial redox y su gran disponibilidad. En una MFC, el oxígeno es reducido hasta agua debido a la presencia de protones que atraviesan la membrana permeable desde el compartimento anódico y la fuente de electrones otorgada por el cátodo. A pesar de que el oxígeno es un buen aceptor de electrones, existe un mediador eléctrico soluble ampliamente utilizado en la reacción catódica de las MFCs: Ferricianuro o hexacianoferrato ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, $E_0' = 0.358 \text{ V}$). Se utiliza debido a que posee una cinética de reducción más rápida que el oxígeno frente al electrodo (Rismani-Yazdi y col., 2008) y, además, se ha documentado un aumento en la intensidad eléctrica registrada cuando se utiliza ferricianuro en el compartimento catódico en lugar de oxígeno solamente (Oh y col., 2004).

3.4. Impacto fisiológico de la generación de electricidad

En algunos estudios de MFC se ha observado cómo la generación de electricidad tiene un impacto en el crecimiento y en la morfología de la membrana. Qiao y col., (2009) reportaron la corriente generada por *E. coli* K-12 y su crecimiento en una MFC de dos compartimentos con electrodos de felpa de carbono. En este caso utilizaron medio LB suplementado con glucosa al momento de inocular la celda en el compartimento anódico, bajo condiciones anaeróbicas sin un mediador exógeno, mientras que en el cátodo añaden ferricianuro. En este caso las bacterias en la MFC tardan más en alcanzar la fases exponencial y estacionaria que un cultivo control que no genera electricidad (Figura 2a). También muestran que la generación

de corriente se inicia aproximadamente 6 horas después del inicio del crecimiento celular, luego se incrementa tanto la corriente como la densidad óptica del cultivo, alcanzando la corriente un valor constante después de 24 horas (Figura 2b), cuando las células ya están en fase estacionaria. Igualmente, analizaron la morfología de la membrana celular de la cepa utilizada en este estudio, mediante microscopía de fuerza atómica, observando que la superficie celular era más rugosa durante la generación de corriente, lo que permitiría que los mediadores redox endógenos puedan moverse a través de la pared celular, mejorando la función electrocatalítica. Finalmente, el análisis del transcriptoma de *E. coli* reveló que, durante la generación de electricidad en la MFC se encontraban altamente inducidos algunos genes relacionados con oxidasa terminal en cadena respiratoria de *E. coli*, al igual que algunos genes del metabolismo energético (Qiao y col., 2009). Es interesante observar que en este trabajo hay producción de electricidad tanto en la fase exponencial de crecimiento como en la fase estacionaria y que, en ambas condiciones, tanto la control como en la MFC no presentan una fase *lag*. En este trabajo si bien aparecen ambas curvas de crecimiento, no se mencionan las tasas de crecimiento ni los consumos de glucosa. Además, trabajan en un medio rico suplementado con glucosa, lo cual implica que la fuente de carbono y energía está ingresando a la célula por múltiples rutas.

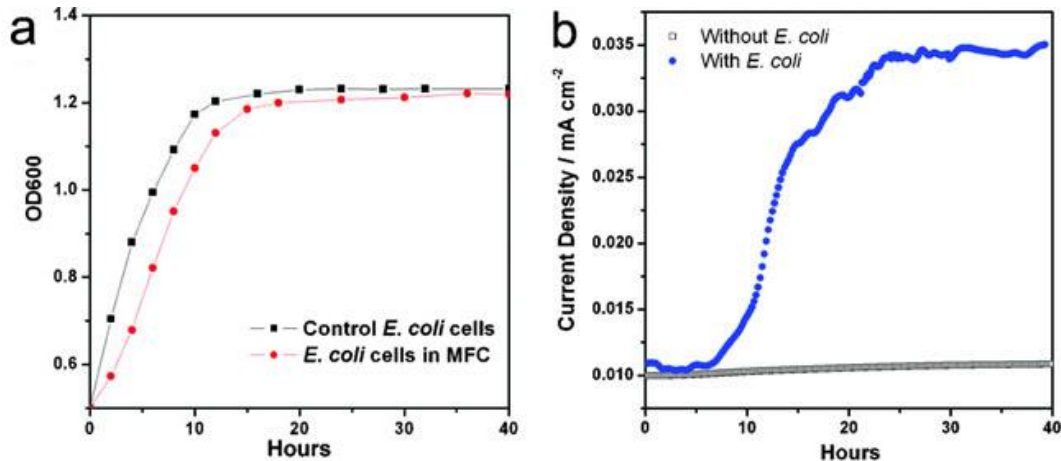


Figura 2. Curvas de crecimiento y corriente de *E. coli*

(a) Curva de crecimiento de *E. coli* control (sin electrodos) cuadrados negros y en MFC círculos rojos. (b) Perfil de generación de corriente de MFC con *E. coli* azul y control sin bacteria gris. Modificado de Qiao y col., 2009.

Otros autores han observado otros parámetros además del crecimiento y la morfología de la membrana. En el caso de la publicación hecha por Park y Zeikus (2000), utilizan una celda de dos compartimentos con electrodos de felpa de grafito. En el compartimento anódico se encontraba la cepa *E. coli* K-12 en un medio denominado medio A (el cual contiene extracto de levadura, fosfato y carbonato de sodio) con glucosa y rojo neutro (RN), mientras que en el catódico contenía ferricianuro en tampón fosfato. En este trabajo comparan el comportamiento electrogénico de *E. coli* en crecimiento y en fase estacionaria y observaron que la cantidad de energía eléctrica generada fue aproximadamente 10 veces mayor, cuando se usaron células en reposo que cuando se usaron células en crecimiento. Además, no sólo evalúan al mediador RN, sino que también lo comparan con otro, la tionina, demostrando que el primero genera más corriente y voltajes más altos.

En el trabajo de Park y Zeikus 2000 además se muestra el consumo de glucosa, la masa celular y el rendimiento de biomasa por mol de sustrato en cultivos de *E. coli* en crecimiento con glucosa y RN 100 μM con y sin producción de corriente (Tabla 1).

Tabla 1. Metabolismo anaeróbico de células en crecimiento de *E. coli*, en presencia y ausencia de generación de electricidad

Condiciones de crecimiento	Consumo de Glucosa (mM)	Masa Celular (g·L ⁻¹)	Y _{sust} (g de células · mol de sustrato)
Sin generación de electricidad	60,6 ^a	3,1 ^a	50 ^a
Con generación de electricidad	66,3 ^a	1,4 ^a	22 ^a

^a Datos obtenidos después de 6 horas de crecimiento en medio A con 100 μM de rojo neutro en una Celda de Combustible Microbiológica.

Modificado de Park & Zeikus 2000.

En la literatura por lo general solo se muestran curvas de progreso del incremento de la biomasa en conjunto con la corriente generada (Qiao y cols., 2008, Schröder y col., 2003). En muy pocos casos se menciona las tasas de crecimiento o el rendimiento del cultivo durante la generación de electricidad. Lo que se reporta en la mayoría de los casos son solo los parámetros energéticos relacionados con la electricidad, como la corriente, el voltaje, la potencia o la energía eléctrica producida.

3.5. Ingeniería metabólica en el poder reductor

Otra de las áreas de estudio que ha adquirido relevancia en este último tiempo, es la modificación genética de cepas para incrementar la generación de electricidad en MFC (Yong y col., 2009, Yong y col., 2014a, Yong y col., 2014b & Wong y col., 2016). En este sentido, el uso de mutantes que modifiquen la producción de poder reductor en la forma de NADH y NADPH lucen como un camino

promisorio de ingeniería metabólica. De hecho, también se han manipulado cepas para incrementar la producción de ciertos metabolitos reducidos como en el caso del trabajo de Sekar y col., 2017, donde eliminan el gen de la fosfogluco isomerasa (*pgi*) en una cepa de *E.coli* denominada SH5 Δ *pgi* (BW25113 Δ *hycA* Δ *hyaAB* Δ *hybBC* Δ *ldhA* Δ *frdAB*), para co-producir hidrógeno y etanol. En este trabajo los autores concluyen que la cepa SH5 Δ *pgi* no es capaz de crecer en condiciones anaeróbicas con glucosa como única fuente de carbono, a menos que se sobreexpresen los genes *zwf* (que codifica a la G6PDH) y *zwf* en conjunto con *gnd* (que codifica a la 6PGDH), de la misma cepa de *E. coli* (Figura 3).

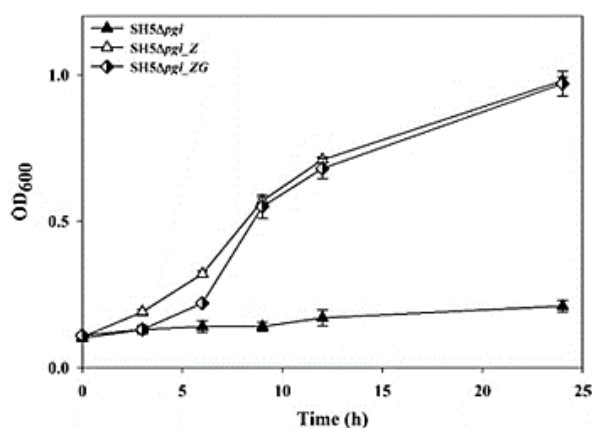


Figura 3. Curvas de crecimiento anaeróbico de cepas de *E. coli* Δ *pgi* con glucosa como única fuente de carbono

Se muestra la densidad óptica de los cultivos a 600 nm de las cepas SH5 Δ *pgi* la cual posee la fosfogluco isomerasa delecionada, SH5 Δ *pgi*_Z cepa con fosfogluco isomerasa delecionada y con plasmidio que sobreexpresa *zwf* y SH5 Δ *pgi*_ZG cepa con fosfogluco isomerasa delecionada y con plasmidio que sobreexpresa *zwf* y *gnd*. Modificado Sekar y col., 2017.

Además, observan de todas las mutantes con las que trabajan que la que es capaz de producir mayor cantidad de etanol, con la menor de acetato es una cepa SH5 Δ *pgi*_ZLG, que posee sobreexpresada *zwf* de *Leuconostoc mesenteroides* y *gnd* de *Gluconobacter oxydans*. Ambas enzimas codificadas por estos genes

presentan una mayor afinidad por el cofactor NAD^+ que por NADP^+ , debido a esto serían menos inhibidas por NADPH, permitiendo activar eficientemente la vía de las pentosas fosfato. La conclusión de estos autores al respecto del no crecimiento de la cepa SH5 Δ *pgi* en condiciones anaeróbicas levanta cierto escepticismo ya que sí se observa un leve aumento en la absorbancia, el cual es poco perceptible por la escala utilizada en el gráfico. Además, en este trabajo no se habla del análisis estadístico realizado, ni de la cantidad de réplicas utilizadas, solo muestran las desviaciones de manera gráfica.

Otro trabajo realizado en nuestro laboratorio que muestra cómo afecta al metabolismo el cambio de preferencia de cofactor es el publicado por Olavarría y col. 2014. Estudiaron la respuesta metabólica de *E. coli* a la sustitución de su glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) por una variante productora de NADH (Figura 4) a través de la recombinación homóloga con el cromosoma de la cepa silvestre, en esta cepa el incremento de producción de NADH está dado por el reemplazo y también en las cepas de Δ *pgi* (Figura 4) en las cuales el incremento de producción de NADPH está dado por el desvío del flujo. Los reemplazos causaron un efecto sustancial en las tasas de crecimiento, cayendo un 44% en la cepa silvestre y aumentando un 59% en la cepa Δ *pgi*.

Para la cepa NAD-G6PDH la simulación mostró un flujo operativo de *zwf* que contribuye al pool de NADH, y a la posible respuesta metabólica para alcanzar un nuevo balance en presencia de producción de NADH por la vía oxPPP. La caída en la tasa de crecimiento observada en la cepa NAD-G6PDH podría ser la consecuencia de una limitada capacidad sistémica para superar, a corto plazo, los

efectos de producción de NADH por G6PDH, sugerido por los datos obtenidos a través de qPCR.

Los resultados indicaron que, el efecto de la generación de NADH por G6PDH en la tasa de crecimiento depende de la presencia de la bifurcación para el flujo de carbono siendo beneficiosa cuando el paso superior de la vía Embden-Meyerhof se encuentra bloqueado (reemplazo de G6PDH en Δpgi) y desventajosa cuando la vía de las pentosas fosfato y Embden-Meyerhof estaban activas (reemplazo de G6PDH en la cepa silvestre).

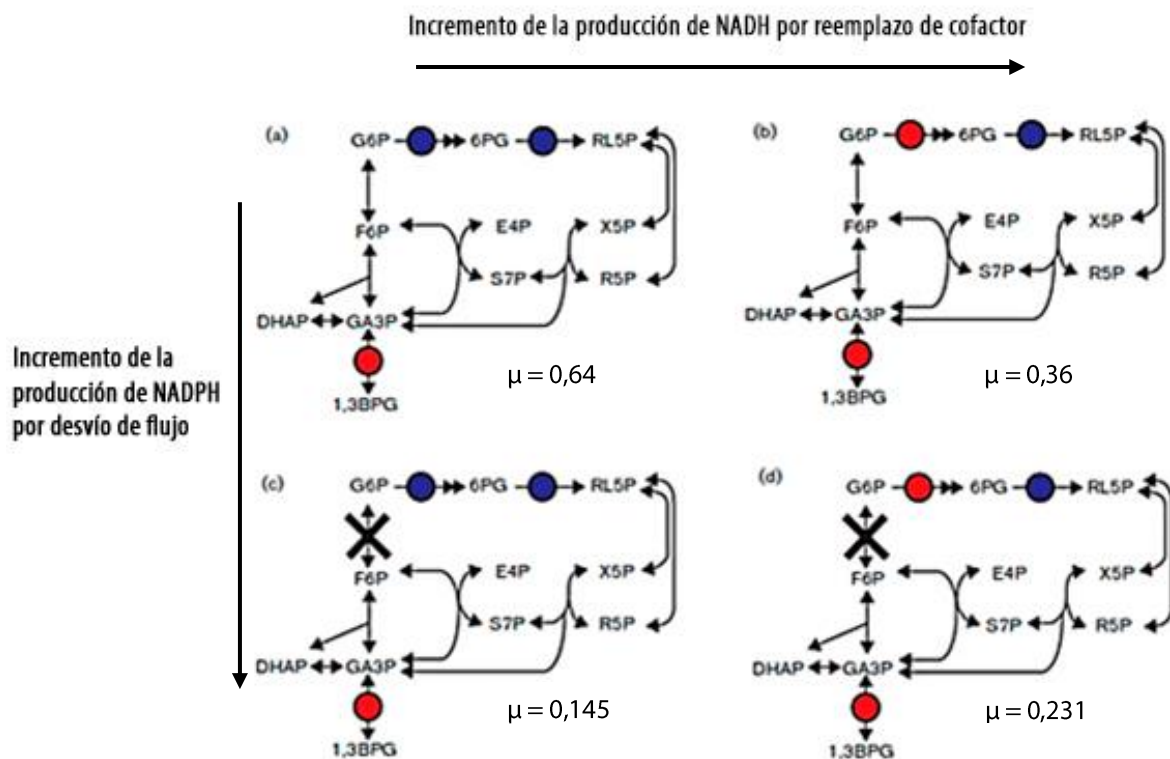


Figura 4. Vías metabólicas alrededor del nodo de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en las 4 cepas

Los círculos azules representan deshidrogenasas específicas para NADP, los círculos rojos deshidrogenasas específicas para NAD (a) MG1655, (b) NAD-G6PDH, (c) Δpgi y (d) Δpgi -NAD-G6PDH con sus respectivas tasas de crecimiento (μ) aeróbicas. G6P, glucosa-6-fosfato; 6PG, 6-fosfogluconato; RL5P, ribulosa 5-fosfato; F6P, fructosa 6-fosfato; E4P, eritrosa 4-fosfato; X5P, xilulosa 5-fosfato; S7P, sedoheptulosa 7-fosfato; R5P, ribosa 5-fosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; GA3P, gliceraldehido 3-fosfato; 1,3BPG, ácido 1,3-bisfosfoglicérico. Modificado de Olavarría y col., 2014.

Por lo expuesto anteriormente, parece posible obtener una redirección del poder reductor de la célula hacia productos de interés, como la generación de metabolitos de fermentación sin embargo dichas modificaciones generan efectos sobre el crecimiento y la distribución de flujos metabólicos (Olavarría y col., 2014). A partir de esto, surge la idea de que modificaciones en la generación de poder reductor en las vías Embden-Meyerhof y oxPPP, tendrían efectos sobre la electricidad generada por *E. coli*, ya que estas no solo estarían alterando el balance del pool de los cofactores, sino también afectando el crecimiento, por lo que la corriente se vería afectada por ambas situaciones. Debido a esto, se propone utilizar las cepas de *E. coli* mutantes para la producción de los cofactores NADH y NADPH utilizados en el estudio de Olavarría 2014 para observar su impacto en la generación de electricidad y el rendimiento de electrones por unidad de sustrato consumido, utilizando las cepas de la Figura 4. Pero, para evaluar la electrogénesis en las mutantes a estudiar hay que observar su crecimiento anaeróbico, ya que Sekar y col., 2017, sugieren que la mutante Δpgi no crece en anaerobiosis, condición que es necesaria para la electrogénesis.

4. Hipótesis

En condiciones electrogénicas las cepas de *Escherichia coli* con mayor capacidad de producción de NADH incrementarán la tasa de producción de electricidad, en tanto que las cepas con mayor capacidad de producción de NADPH Incrementarán el rendimiento de electrones por unidad de sustrato consumido.

5. Objetivo General

Caracterizar fisiológicamente las cepas de *Escherichia coli* NAD-G6PDH y Δpgi durante la generación de electricidad y observar la generación de corriente para asociar las variaciones en el rendimiento eléctrico a las respectivas mutaciones de las cepas, con glucosa como fuente de electrones.

6. Objetivos Específicos

- 1) Caracterizar el crecimiento de las cepas Δpgi y NAD-G6PDH, en condiciones anaeróbicas con glucosa como fuente de electrones.
- 2) Caracterizar fisiológicamente las cepas Δpgi y NAD-G6PDH y medir su intensidad de corriente en condiciones electrogénicas, con glucosa como fuente de electrones.
- 3) Determinación del rendimiento eléctrico de las cepas Δpgi y NAD-G6PDH con los parámetros obtenidos del objetivo 2.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Materiales Utilizados

7.1.1. Reactivos

Tabla 2. Reactivos utilizados y sus respectivos proveedores.

Insumos	Proveedor
Peptona	DIFCO
Agarosa (de bajo punto de fusión)	Calbiochem
Extracto de Levadura	DIFCO
NaCl	Merck S.A. Chile
KH ₂ PO ₄	Merck S.A.
K ₃ [Fe(CN) ₆] rojo neutro	Sigma-Aldrich
D-Glucosa	Merck S.A.
Felpa de Grafito	Sigracell
Membrana permeable a cationes	Membranes International Inc.
Cable Platino	Agencias Nórdicas S.A.
FeCl ₂	Merck S.A.
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Merck S.A.
CaCl ₂ · 2H ₂ O	Merck S.A.
Etanol	Merck S.A.
NH ₄ Cl	Merck S.A.
NaH ₂ PO ₄	Merck S.A.
ZnSO ₄	Merck S.A.
CuCl ₂	Merck S.A.
MnCl ₂	Merck S.A.
CoSO ₄	Merck S.A.
Rezasurina	Sigma-Aldrich
Tiamina	Sigma-Aldrich

Se utilizó agua miliQ que posee una conductividad de 0,04 µS/cm.

7.1.2. Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Cepas de *E. coli* utilizadas y sus características relevantes

Cepa	Características relevantes
MG1655	Cepa K-12 MG1655 con genotipo F- λ -.
NAD-G6PDH ^a	Cambio de especificidad de G6PDH
Δpgi^a	Ausencia de Fosfoglucosa isomerasa
Δpgi -NAD-G6PDH ^a	Ausencia de Fosfoglucosa isomerasa y cambio de especificidad de G6PDH

^a : Olavarria y cols., 2014

7.1.3. Medios de cultivo

Medio Luria broth (LB)

La composición del medio LB por cada 1 L es la siguiente: 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Para su preparación se disolvieron los componentes en 900 mL de agua mili-Q y se ajustó el pH a 7. Luego se completó el volumen con agua mili-Q a 1 L. Se esterilizó por autoclave.

Medio Luria broth agar (LB agar)

La composición del medio LB sólido por cada 1 L es la siguiente: 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl y agar al 1,7% p/v (17 g de agar). Para su preparación se disolvieron los componentes en 900 mL de agua mili-Q y se ajustó el pH a 7. Luego se completó el volumen con agua mili-Q a 1 L. Se esterilizó por autoclave.

Medio Mínimo M9 - Glucosa

La composición del medio mínimo M9 por cada 1 L es la siguiente: 3,0 g de KH_2PO_4 , 5,96 g de Na_2HPO_4 , 1,02 g de NH_4Cl y 0,5 g de NaCl . Para su preparación se disolvieron los componentes en 900 mL de agua mili-Q y se esterilizó por autoclave. Se adicionó 1 mL de las siguientes soluciones esterilizadas por separado: MgSO_4 2 M, CaCl_2 0,1 M, Tiamina 3 mM y sales traza. También se suplementó glucosa al medio a una concentración final de $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

La solución de sales traza contiene por cada 1 L: 1,8 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,2 g de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,4 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2,1 g de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 10 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

7.2. Metodología para la Caracterización Fisiológica de las Cepas

La caracterización fisiológica de las cepas consistió en determinar la tasa de crecimiento, consumo de glucosa y el rendimiento de biomasa, estos dos últimos parámetros, sólo para condiciones electrogénicas.

7.2.1. Condiciones de cultivo, monitoreo de las curvas de crecimiento y obtención de muestras

Las cepas utilizadas fueron almacenadas en LB 50% glicerol a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso. Luego, para realizar los cultivos se comenzó siempre inoculando una placa de LB Agar, la que se incubó a 37°C . Todos los cultivos fueron inoculados con una colonia aislada desde la placa al medio de cultivo líquido correspondiente. Solo un

experimento comenzó desde pre-inóculo anaeróbico según se indica posteriormente.

7.2.2. Cultivos anaeróbicos

Se inoculó bajo condiciones anaeróbicas, en botellas que contenían 100 mL de medio mínimo M9-Glucosa (composición detallada en la sección 7.1.3). El cultivo se mantuvo a 37°C y con agitación de 200 rpm. Las condiciones anaeróbicas se lograron purgando el medio durante 8 minutos con nitrógeno gaseoso.

Como cada cultivo se inició inoculando con una colonia individual, su DO_{600} inicial fue siempre cercana a 0. La fase *lag* fue variable en cada cepa oscilando entre 15 y 20 horas. Debido a la baja velocidad de crecimiento que presentaba *E. coli* en anaerobiosis, la fase exponencial se pudo caracterizar al día siguiente de la inoculación.

De cada cultivo realizado para caracterizar el crecimiento de las cepas estudiadas, se tomaron muestras de 1 mL cada 1 hora para medir DO_{600} .

Se realizaron controles de anaerobiosis utilizando un sensor PreSens (Figura 1 Anexo), para determinar el tiempo de purga del medio con nitrógeno gaseoso y también se utilizó el indicador Resazurina al final de los cultivos (Figura 2 Anexo), para corroborar que el sistema se encontraba sin oxígeno.

7.2.3. Cultivos anaeróbicos con rojo neutro

Se inocularon las botellas bajo condiciones anaeróbicas, en botellas de 100 mL que contenían 100 mL de medio mínimo M9-Glucosa (composición detallada en la sección 7.1.3) y RN, a 37 °C con una agitación de 200 rpm. Las condiciones anaeróbicas se lograron purgando el medio durante 8 minutos con nitrógeno gaseoso.

Para evaluar el efecto del rojo neutro (RN) sobre el crecimiento celular, se realizaron cultivos anaeróbicos de *E. coli* K12 MG1655 con glucosa como única fuente de carbono, expuestos a 20 y 100 μM de RN. Se tomaron muestras de los cultivos, cada 30 o 60 minutos midiendo la densidad óptica a 660 nm.

7.2.4. Cultivos electrogénicos

Para los experimentos en las celdas de combustible, se realizaron cultivos anaeróbicos en el ánodo, que contenían 120 mL de medio mínimo M9-Glucosa (composición detallada en la sección 7.1.3), en presencia de RN (20 y 100 μM , según corresponda) y ausencia de RN a 37 °C, con agitación magnética. Las condiciones anaeróbicas se lograron purgando el medio durante 10 minutos con nitrógeno gaseoso.

Se tomaron muestras de los cultivos, cada 30 o 60 minutos para medir la densidad óptica a 600 o 660 nm, (600 nm sin mediador y 660 con rojo neutro) y a su vez se tomaron muestras de 100 μL de medio extracelular para analizar posteriormente las concentraciones de glucosa mediante el kit D-glucosa-HK (Megazyme) como se explica en la sección 7.2.6. Estas últimas fueron incubadas a

90°C por 10 minutos y luego centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos más, luego se tomaron 80 µL del sobrenadante y se diluyeron con agua nanopura a un volumen final de 800 µL, estas muestras fueron almacenadas a -80°C,

La corriente generada en la celda de combustible fue medida con un multímetro y registrada cada vez que se tomó una muestra para densidad óptica.

Los experimentos con las cepas mutantes fueron realizados con 20 µM de RN.

7.2.5. Pre-inóculo para cultivo electrogénico

Se realizó una excepción para inocular uno de los experimentos en las celdas de combustible, debido a las condiciones en las cuales crecía la cepa *Δpgi* en la celda. En este caso, no se inició el cultivo con una colonia, si no que se realizó un pre-inóculo anaeróbico en medio mínimo M9.

Se utilizó una botella de 100 mL con una tapa que posee dos septas de butilo, conteniendo 25 mL de medio LB. Se purgó el medio líquido por 3 minutos con nitrógeno gaseoso. Luego se inoculó introduciendo una punta con la cepa de *E. coli Δpgi* desde el stock de -80°C, se cerró la botella y a través de una septa se purgó el *head-space* durante 2 minutos más, dejando una de las tapas abiertas para que pudiera salir el exceso de gas.

7.2.6. Determinación de la concentración de glucosa en el medio de cultivo electrogénico

Las muestras de medio extracelular fueron analizadas ocupando el equipo Synergy 2 Multi-Mode Microplate Readers (BioTek) con un kit D-glucosa-HK (Megazyme). El principio del kit es que la D-glucosa es fosforilada por la enzima Hexokinasa (HK) y ATP, a glucosa-6-fosfato (G-6-P), esta última, en presencia de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH) es oxidada por NADP⁺ a gluconato-6-fosfato con la formación de NADPH. El aumento de NADPH formado está en relación estequiométrica 1:1 con la D-glucosa consumida en la reacción. Es el NADPH lo que se mide por la variación de la absorbancia a 340 nm.

Las muestras fueron tomadas, tratadas y almacenadas como se menciona en la sección 7.2.4. Estas muestras fueron medidas en una placa de 96 pocillos a 37°C, donde cada pocillo contenía, 200 µL de agua, 10 µL de tampón, 10 µL de solución NADP⁺/ATP y 10 µL de medio extracelular. En el caso del blanco los 10 µL de muestra se reemplazaron por el mismo volumen de agua y para el estándar se reemplazó por 10 µL de glucosa a una concentración de 0,4 g·L⁻¹. En estas condiciones se midió la absorbancia a 340 nm por 5 minutos (A₁), una vez transcurrido este tiempo se agregó 2 µL de la mezcla de enzimas HK-G6PDH y se continuó midiendo la absorbancia a 340 nm por 30 minutos más (A₂).

La concentración de glucosa presente en cada muestra se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$[\text{Glucosa muestra}] = \frac{\Delta A \text{ muestra}}{\Delta A \text{ estándar}} \cdot [\text{Glucosa estándar}] \cdot FD \quad (1)$$

Donde ΔA corresponde a la diferencia entre las absorbancias a 340 nm después y antes de adicionar las enzimas (A_2-A_1) y FD el factor de dilución de la muestra.

7.2.7 Determinación de consumo de glucosa

El crecimiento bacteriano en un cultivo *batch* puede ser modelado usando el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dS(t)}{dt} = \frac{-\mu(S(t))}{Y_{X/S}} \cdot X(t) \quad (2)$$

$$\frac{dX(t)}{dt} = \mu(S(t)) \cdot X(t) \quad (3)$$

Donde la ecuación (2) representa la tasa de cambio del sustrato en el tiempo (en este caso glucosa), y la ecuación (3) representa la variación de biomasa en el tiempo. $S(t)$ corresponde a la concentración de sustrato (mM) en un tiempo (t) determinado de cultivo; $\mu(S(t))$ a la tasa de crecimiento (h^{-1}) determinada para la concentración de sustrato al tiempo t; $Y_{X/S}$ al rendimiento de unidad de biomasa producida por unidad de sustrato consumido (gDW de biomasa \cdot mmol de glucosa $^{-1}$) y $X(t)$ representa la concentración de biomasa (gDW \cdot L $^{-1}$) en el tiempo t.

Desde la ecuación (3) se tiene:

$$\mu(S(t)) = \frac{dX(t)}{dt} \cdot \frac{1}{X(t)} \quad (4)$$

Que al reemplazarlo en la ecuación (2) queda:

$$dS(t) = \frac{-1}{Y_{X/S}} \cdot dX(t) \quad (5)$$

Integrando:

$$\int_{S(0)}^{S(t)} dS(r) = \frac{-1}{Y_{X/S}} \cdot \int_{X(0)}^{X(t)} dX(r) \quad (6)$$

$$S(t) - S(0) = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot X(0) + \frac{-1}{Y_{X/S}} \cdot X(t) \quad (7)$$

Resultando finalmente:

$$S(t) = \left(S(0) + \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot X(0) \right) + \frac{-1}{Y_{X/S}} \cdot X(t) \quad (8)$$

Donde $S(0)$ y $X(0)$ corresponden a la concentración inicial de sustrato y de biomasa inoculada, respectivamente.

A partir de este resultado, se graficó la concentración de sustrato medida en función de la biomasa expresada en $\text{gDW} \cdot \text{L}^{-1}$ para el mismo tiempo de medición. Al realizar la regresión lineal, la pendiente obtenida correspondió a $-1/Y_{X/S}$. Este valor permitió calcular la tasa de consumo de glucosa (Q_{glc} , con unidades de $\text{mmol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) al multiplicarlo por la tasa de crecimiento obtenida del cultivo:

$$Q_{\text{glc}} = \frac{-1}{Y_{X/S}} \cdot \mu(S(t)) \quad (9)$$

El factor de conversión de biomasa (f) para expresar la densidad óptica medida a 660 nm en unidades de $\text{gDW} \cdot \text{L}^{-1}$ se obtuvo como la pendiente de la regresión lineal de la biomasa en peso seco por litro, respecto a la biomasa en DO. Para esto se realizaron tres cultivos de la cepa silvestre bajo las condiciones mencionadas en la sección 2.3.1; de cada uno se tomaron dos veces muestras en triplicado de 15 mL a distintos tiempos de cultivo, cada vez en triplicado, de las cuales se utilizó 1 mL para determinar la DO y el volumen restante se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min a 4°C. El sedimento se dejó secar durante 24 h a 100°C

en un tubo previamente masado. Posteriormente, se masó el tubo con la muestra seca en su interior, y se determinó la masa de ésta por diferencia. Finalmente, se normalizó dividiéndola por el volumen de la muestra centrifugada (14 mL en todos los casos).

7.3 Celda de combustible microbiológica

El sistema de celda combustible (Figura 5) consistió en una celda de dos compartimentos (Adams & Chittenden scientific glass), anódico y catódico, ambos de 120 mL separados por una membrana permeable a protones circular de 9,62 cm² (Membranes International Inc). El compartimento anódico posee una tapa con dos septas de butilo, en una se encuentra inserto el electrodo y la aguja de la jeringa para la toma de muestra (con una manguera que llega a aproximadamente 3 cm del fondo) en la otra septa. A la aguja se conecta una jeringa a través de una llave tres pasos. El compartimento catódico posee una tapa con un orificio en el cual se fija el electrodo con *parafilm* con muchos orificios, ya que este compartimento se encuentra expuesto al aire.

En el compartimento anódico se encontraba el cultivo electrogénico, realizado según se indica en la sección 7.2.1. El compartimento catódico, contenía una solución de 100 mM de tampón fosfato y 50 mM de ferricianuro.

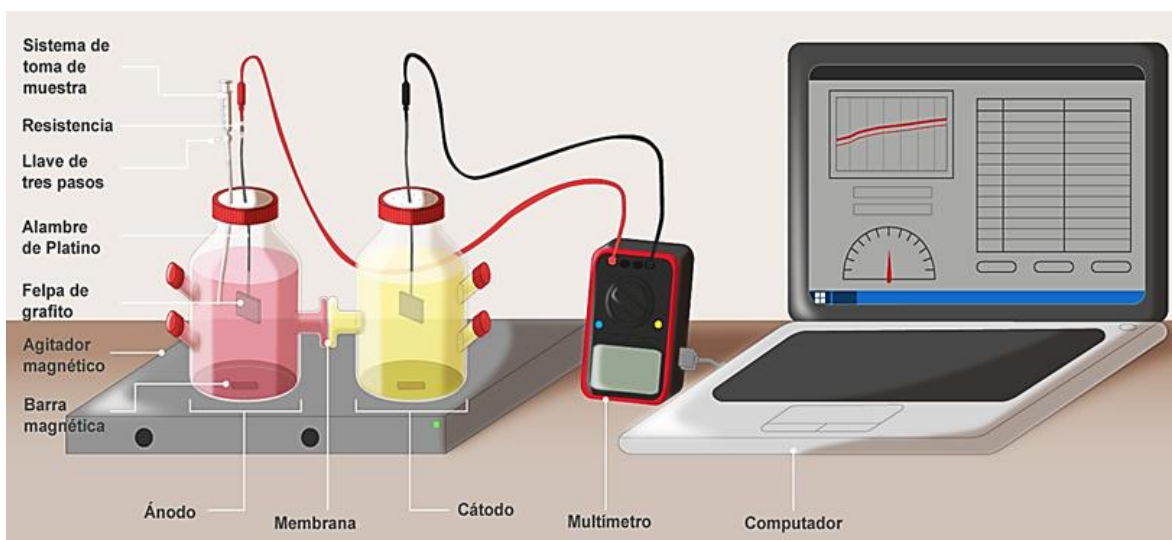


Figura 5. Diagrama esquemático del sistema MFC

En el diagrama se muestra el sistema mediante el cual se produce y se mide la corriente, registrando los datos en un computador.

Ambos compartimentos poseían electrodos conformados por una felpe de grafito (2 cm²), unida a un alambre de platino de 10 cm. Estos electrodos quedaron a 1,5 cm del fondo, ambos frente a la membrana. Al electrodo del ánodo se le conectó en serie una resistencia de 1 kΩ, para medir la intensidad de corriente. Se cerró el circuito utilizando un multímetro (HoldPeak HP-90EPC), conectado a un computador. Los datos de intensidad de corriente (μA) se registraron durante aproximadamente 30 horas. Como control negativo se realizó el mismo procedimiento, pero sin inóculo bacteriano.

7.3.1 Determinación del flujo de electrones en la celda

Para determinar el flujo de electrones por unidad de biomasa se consideró la relación entre la intensidad de corriente y la densidad óptica:

$$r = \frac{d(i)}{d(DO)} \quad (10)$$

Donde r , es la razón de cambio de la corriente en función de la densidad óptica, es decir, r indica cuánta corriente en mA aporta cada unidad de biomasa, medida en términos de densidad óptica.

Luego, para expresar el flujo de salida de electrones desde la bacteria, Fe , en función de r , se debe convertir la DO a unidades de peso seco:

$$Fe(r) = \frac{r}{f \cdot V} \left[\frac{mA}{gDW} \right] \quad (11)$$

Donde f corresponde al factor de conversión a biomasa en unidades de $gDW \cdot L^{-1} \cdot DO^{-1}$ y V al volumen en litros.

El registro experimental de la corriente fue en amperes, pero la unidad de corriente del Sistema Internacional (SI), corresponde al paso de un Coulomb de carga por segundo:

$$1 [A] = 1 [C \cdot s^{-1}] \quad (12)$$

Si se divide 1 C por la carga elemental ($e = 1,6021 \cdot 10^{-19}$ C) medida en Coulombios, se obtiene el número de electrones presentes en 1 C. El número de electrones dividido por el número de Avogadro ($N_A = 6,0225 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) entrega el número de moles de electrones equivalentes presentes en 1 C.

$$1 [C] = \frac{1}{e \cdot N_A} [mol] \quad (13)$$

Reescribiendo la ecuación (12) para expresarla en términos de mmoles y horas:

$$1 [mA] = \frac{1}{e \cdot N_A} \left[\frac{mmol}{s} \right] = \frac{3600}{e \cdot N_A} \left[\frac{mmol}{h} \right] \quad (14)$$

Reemplazando la Ecuación (14) en la Ecuación (11), se obtiene el flujo de electrones en mmoles de electrones por unidad de peso seco por hora, como se indica en la Ecuación (15).

$$Fe(r) = \frac{r \cdot 0,0373}{f \cdot V} \left[\frac{mmol}{gDW \cdot h} \right] \quad (15)$$

7.4. PCR de colonia y secuenciación

Colonias obtenidas de los cultivos electrogénicos fueron analizadas mediante PCR de colonia para verificar las modificaciones en las cepas. Se examinaron las regiones del gen *pgi*, empleando los partidores presentes en la Tabla 4 para amplificar la región codificante o para verificar la ausencia del gen, utilizando el siguiente protocolo (Tablas 5 y 6):

Tabla 4. Partidores para PCR colonia

Partidores externos para verificar el tamaño de la región del gen <i>pgi</i>	
E7	5'-CAGGTAGTACATTTATAAATAAAGGGTGA-3'
E8	5'-ATGATTTCCGTTAAATTACAGACAAGGGG-3'

Tabla 5. Mix de Reacción de PCR-colonia

Componente	Volumen (µL)
Agua destilada	23
Colonia	Picar ^a
SapphireAmp® Fast PCR Master Mix	25
Primer #1 (10 µM)	1
Primer #2 (10 µM)	1
Volumen Total	50

^a : Picar colonia desde la placa y arrastrarla por las paredes internas del microtubo de 200 µL.

Tabla 6. Protocolo de PCR

Etapas de PCR	Temperatura (°C)	Tiempo (min:seg)
ADNc	42	10:00
Pre-calentamiento	95	10:00
Desnaturación ^a	95	00:15
Alineamiento ^a	55	00:15
Elongación ^a	72	02:00
Post-calentamiento	72	5:00

^a : Corresponden a las Etapas de PCR que comprenden un ciclo. En este protocolo se utilizaron 30 ciclos.

7.4.1. Verificación del tamaño de los productos mediante electroforesis

Cada producto de PCR se mezcló en proporción 2:1 con una solución Gel Loading Dye Blue (New England Biolabs® Inc) y luego se cargaron en geles de agarosa a una concentración de 0,8% p/v en una solución TAE 1X (Tris-HCl 40 mM, acetato 20 mM y EDTA 1 mM) y Gel Red 3X (Biotium). Además de las muestras, se cargó en un carril el estándar de peso molecular (Maestrogen). Las electroforesis se realizaron a voltaje constante de 90 V en una cámara de electroforesis horizontal H2 (Fermelo). Finalmente, los geles se observaron sobre un transiluminador UV y se fotografiaron (Figura 3 Anexo).

8. RESULTADOS

Los cultivos electrogénicos usan condiciones especiales debido a que se requiere anaerobiosis y para el caso de *E. coli*, la presencia de un mediador. Como se sabe que los electrones necesarios para producir corriente eléctrica provienen del metabolismo bacteriano, en este trabajo queremos comparar el efecto de diferentes mutaciones en las vías de producción de NADH y NADPH sobre la capacidad de *E. coli* para producir corriente. Por lo tanto, primero se caracterizó el crecimiento de estas cepas en anaerobiosis, para posteriormente comparar este comportamiento con el que se obtiene para condiciones electrogénicas.

8.1. Caracterización del crecimiento anaeróbico de las cepas

Salvo para la cepa silvestre de *E. coli* MG1655, no existe reporte previo de que las cepas Δpgi , NAD-G6PDH y Δpgi -NAD-G6PDH puedan crecer en condiciones anaeróbicas. Debido a esto se decidió caracterizar la curva de crecimiento de estas cepas en condiciones anaeróbicas en medio mínimo M9, con glucosa como única fuente de carbono.

8.1.1. Tasa de crecimiento anaeróbico

Cada cepa se cultivó en triplicado y se tomó una muestra cada 30-60 minutos para medir la DO_{600} . En la Figura 6 se muestra el curso temporal del incremento de la biomasa y la regresión lineal del gráfico logarítmico para cada experimento.

En general las cepas MG1655 y NAD-G6PDH tuvieron un comportamiento similar. Para ambas la fase *lag* duró alrededor de 20 horas y se pudo observar la llegada a la fase estacionaria entre las 26 y 28 horas después de inoculado. En cambio, para las cepas Δpgi y Δpgi -NAD-G6PDH la fase *lag* duró levemente menos pero no se alcanzó a distinguir certeramente la llegada a la fase estacionaria. También se puede observar que las cepas con la mutación Δpgi crecieron hasta una densidad óptica menor (entre 0,15-0,2) que las cepas MG1655 y NAD-G6PDH (entre 1-1,5), que crecen hasta una DO_{600} casi 10 veces mayor, en el mismo rango de tiempo.

De estas curvas (Figura 6), se consideraron los valores desde el inicio de fase exponencial hasta aproximadamente 10 horas más, para obtener la linealización que permitió el cálculo de las tasas de crecimiento para las respectivas cepas, las cuales se muestran en la Tabla 7. Para la cepa silvestre se obtuvo una tasa de crecimiento de $0,42 \text{ h}^{-1}$. Las cepas con la delección del gen *pgi* se vieron mayormente afectadas en su tasa de crecimiento, para el caso de Δpgi cayendo aproximadamente un 60% respecto a la cepa silvestre. La mutación NAD-G6PDH ayuda a atenuar este efecto sobre el crecimiento ya que la doble mutante presenta un decrecimiento de un 50% respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, la mutación NAD-G6PDH por sí misma produce una disminución de aproximadamente un 40% en la tasa de crecimiento. Todas esas diferencias de las mutantes en relación con la cepa silvestre son significativas ($p\text{-value} < 0,01$).

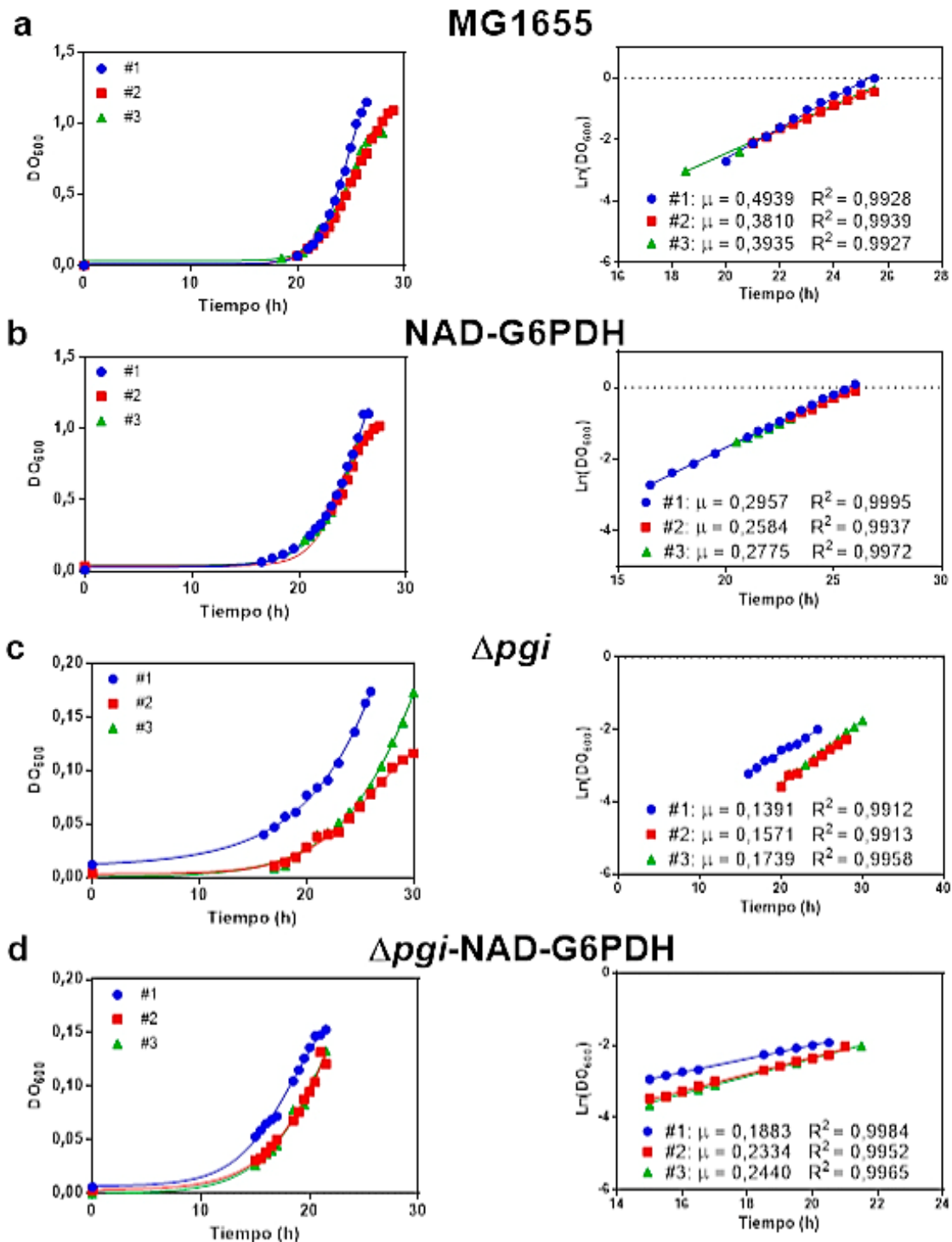


Figura 6. Curvas de crecimiento anaeróbico de las cepas de *E. coli*

El curso temporal de la DO_{600} , se grafica con el eje de la ordenada en escala normal (izquierda) y escala logarítmica (derecha). Los gráficos muestran los triplicados biológicos de las cepas (a) MG1655 (cepa silvestre) (b) NAD-G6PDH (c) Δpgi y (d) Δpgi -NAD-G6PDH. En los distintos cultivos se muestreó principalmente la fase exponencial de crecimiento. Bajo el gráfico logarítmico se muestran las regresiones de los puntos que presentaron una tendencia lineal para cada cultivo (rectas en el gráfico). La pendiente de cada ecuación corresponde a la tasa de crecimiento (μ) en unidades de h^{-1} .

Tabla 7. Tasas de crecimiento obtenidas a partir de cultivos anaeróbicos de *E. coli*

Cepa	μ (h⁻¹)
MG1655	0,42 ± 0,05
NAD-G6PDH	0,28 ± 0,02 ^{a,b}
Δpgi	0,16 ± 0,01 ^{a,b}
Δpgi -NAD-G6PDH	0,22 ± 0,02 ^a

Para cada cepa se detallan los valores de tasa de crecimiento (μ). Se muestra el promedio y la desviación estándar de éstos, calculados a partir de los cultivos de cada cepa.

^a : Aquellos valores marcados con este superíndice presentan diferencias significativas con respecto a la cepa silvestre.

^b : Aquellos valores marcados con este superíndice presentan diferencias significativas entre sí.

8.2. Efecto del rojo neutro en el crecimiento

En estudios previos del laboratorio (Brescia, 2017) se observó que el rojo neutro tenía un efecto negativo sobre el crecimiento de *E. coli*. Debido a esto, antes de iniciar los experimentos en condiciones electrogénicas, se probaron dos concentraciones de rojo neutro 20 y 100 μ M, para determinar aquella que permitiera una generación de corriente detectable con el menor efecto negativo sobre el crecimiento bacteriano. Para ello, se realizaron cultivos anaeróbicos como se describe en la sección 7.2.1. Cada cepa se cultivó en duplicado y se tomó una muestra cada 30-60 minutos para medir la DO₆₀₀ (Figura 4 anexo) y así determinar su tasa de crecimiento.

En la Tabla 8 se puede observar que las cepas mutantes son sensibles a la alta concentración de rojo neutro, ya que no logaron crecer a 100 μ M en un lapso de 25 horas. Además, en la misma cantidad de tiempo la cepa silvestre sí pudo crecer a 100 μ M, pero lo hizo con valores de DO₆₀₀ mucho menor que con 20 μ M. Es interesante que el efecto del rojo neutro es diferencial, ya que la cepa silvestre es la que se ve menormente afectada en su tasa de crecimiento, disminuyendo un

40% en comparación con condiciones anaeróbicas sin mediador, en cambio la cepa doble mutante presentó un efecto mayor, disminuyendo su tasa crecimiento en aproximadamente un 70%. Debido a que el experimento se hizo en duplicado, no podemos establecer diferencias significativas, pero logramos observar un efecto negativo del mediador en el crecimiento en *E. coli*, por lo cual decidimos usar una concentración de 20 μM en los estudios a continuación. Los efectos no solo de la concentración del mediador, sino que también durante la generación de corriente se pueden ver en la Figura 7.

Tabla 8. Tasas de crecimiento anaeróbico obtenidas a partir de cultivos de *E. coli* con diferentes concentraciones de rojo neutro

Cepa	μ (h^{-1}) RN 20 μM	μ (h^{-1}) RN 100 μM
MG1655	$0,261 \pm 0,006$	$0,18 \pm 0,05$
NAD-G6PDH	$0,16 \pm 0,07$	ND
Δpgi	$0,07 \pm 0,01$	ND
Δpgi -NAD-G6PDH	$0,06 \pm 0,03$	ND

Para cada cepa se detallan los valores de tasa de crecimiento (μ). Se muestra el promedio y la desviación estándar de éstos, calculados a partir de los cultivos de cada cepa. Los datos ND (No Determinado), son denominados así puesto que transcurridas 25 horas de experimento no presentaban crecimiento.

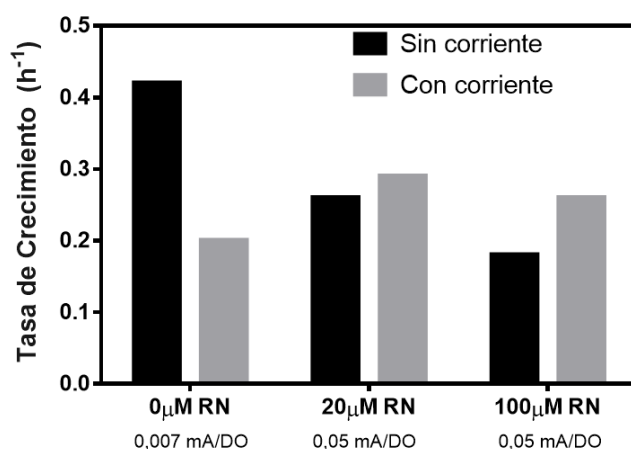


Figura 7. Tasas de crecimiento cepa MG1655 a distintas concentraciones de rojo neutro y durante la generación de corriente

Las barras negras representan la tasa de crecimiento en condiciones anaeróbica sin electrodos y la barra gris la tasa durante la generación de corriente en una MFC. Los números bajo las concentraciones de RN corresponden a la relación de corriente (mA) por densidad óptica de la respectiva MFC.

Como control se realizó un cultivo electrogénico sin mediador, como se aprecia en la Figura 5 del anexo. Al compararlo con la curva de la misma cepa con mediador, se observa que la corriente generada y su relación con la DO es mucho menor en ausencia del mediador, por lo que la presencia del mediador es necesaria para que las cepas de *E. coli* generen una corriente detectable y comparable entre las cepas mutantes.

8.3. Caracterización fisiológica de las cepas en condiciones electrogénicas

En un cultivo en condiciones electrogénicas, la glucosa consumida por las bacterias es usada para generar biomasa y electricidad. Entonces, en esta etapa caracterizamos la tasa de crecimiento, el rendimiento y la tasa de consumo de glucosa de las cepas estudiadas, durante la fase exponencial del crecimiento en condiciones electrogénicas.

8.3.1. Rendimiento de biomasa y tasa de consumo de glucosa de cultivos electrogénicos

Para determinar el rendimiento y posteriormente la tasa de consumo de glucosa, es necesario tener los valores de biomasa en unidades de gramos de peso seco por litro ($\text{gDW}\cdot\text{L}^{-1}$). Por este motivo, primero se determinó el coeficiente de conversión f ($\text{gDW}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{DO}^{-1}$) que relaciona la DO con el peso seco por litro en presencia de rojo neutro $20\ \mu\text{M}$. Para ello, en un cultivo de la cepa MG1655 se tomaron muestras para medir simultáneamente la absorbancia y los gramos de peso seco presente en un determinado volumen de cultivo, como se describe en la sección 7.2.6. De esta forma, el gráfico de la Figura 8 muestra la relación lineal entre

ambas medidas, cuya pendiente se denomina f . Se obtuvo un valor de f de 0,4 gDW·L⁻¹·DO⁻¹ (Figura 8), el cual se utilizó para transformar los valores de DO₆₆₀ presentes en las curvas de crecimiento a unidades de gDW·L⁻¹ (Figuras 9b-12b).

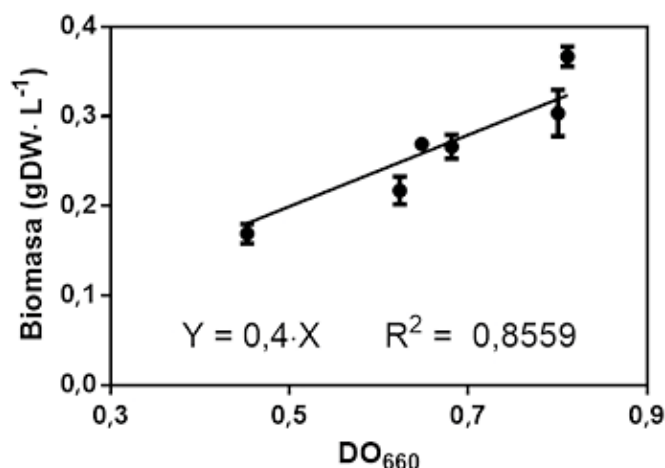


Figura 8. Determinación del factor de conversión de absorbancia a peso seco

Se muestra la correlación entre la DO registrada a distintos tiempos de muestreo y la biomasa medida en dichos tiempos en presencia de rojo neutro 20 μ M, luego de secar las muestras durante 24 horas a 100°C. La masa se normalizó en unidades de concentración dividiendo por el volumen de la muestra. Los puntos representan al promedio de las mediciones en triplicado, y las barras negras a la desviación estándar. Además, en la parte inferior del gráfico, se muestra la ecuación resultante de la regresión lineal y el coeficiente R^2 .

Para cada cepa se realizaron cultivos con rojo neutro 20 μ M y producción de electricidad, como se describe en la sección 7.2.1. Se tomaron muestras cada 30-60 minutos para medir la DO₆₆₀, y determinar la tasa de crecimiento, así como también la concentración de glucosa. Para esto último, se utilizó un ensayo enzimático acoplado (kit Megazyme D-glucosa HK) que permite asociar el cambio de absorbancia en una muestra, luego de la reducción de NAD⁺, a la cantidad de glucosa presente en ella (sección 7.2.6).

Para cada cultivo se observó el curso temporal de la DO y la concentración de glucosa (Figuras 9a-12a). En el caso de la cepa silvestre la fase exponencial presentó una velocidad menor a la observada en el cultivo anaeróbico (Figura 6a), pero mayor que en presencia de rojo neutro sin electricidad (Tabla 8 & Figura 7). Interesantemente, la cepa NAD-G6PDH creció a una tasa mayor que la silvestre, e incluso mayor que su correspondiente cultivo anaeróbico sin rojo neutro. Por otra parte, cultivos electrogénicos preliminares de Δpgi y Δpgi -NAD-G6PDH inoculados desde una colonia alcanzaron una DO muy baja al cabo de 30 horas (Figura 7 Anexo). Sin embargo, al iniciar el cultivo desde una DO_{660} inicial mayor (aprox. 0,012), usando un pre-inóculo anaeróbico (cultivos denotados con superíndice “a”) la fase *lag* prácticamente desaparece y la fase exponencial se puede muestrear por un mayor período de tiempo (Figuras 11-12). Debido a esto, los cultivos electrogénicos de estas cepas fueron subsecuentemente iniciados de esta forma. Para estas cepas la tasa de crecimiento aumenta respecto del cultivo anaeróbico con rojo neutro sin electricidad en más del doble hasta valores comparables al cultivo anaeróbico sin mediador. En cuanto a la concentración de glucosa remanente en el cultivo, la mayor disminución fue observada en el caso de la cepa NAD-G6PDH y la menor en el caso de la cepa Δpgi .

MG 1655

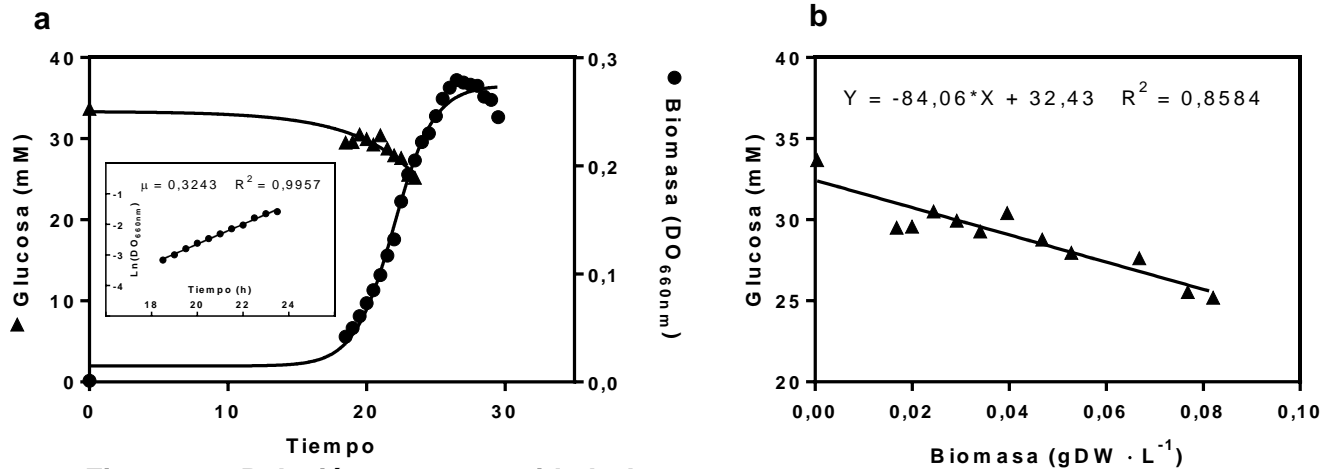


Figura 9. Relación entre cantidad de glucosa en el medio y biomasa producida para la determinación del rendimiento de la cepa MG1655

Gráficos de dispersión de la concentración de glucosa y biomasa para la cepa MG1655. El gráfico (a) corresponde a la concentración de glucosa y de biomasa en un mismo tiempo y el inserto corresponde al gráfico logarítmico donde se muestra la tasa de crecimiento (μ) en unidades de h^{-1} . (b) es la relación entre la glucosa y la biomasa expresada en $gDW \cdot L^{-1}$ (multiplicando la DO por el factor f), la pendiente corresponde al recíproco del rendimiento.

NAD-G6PDH

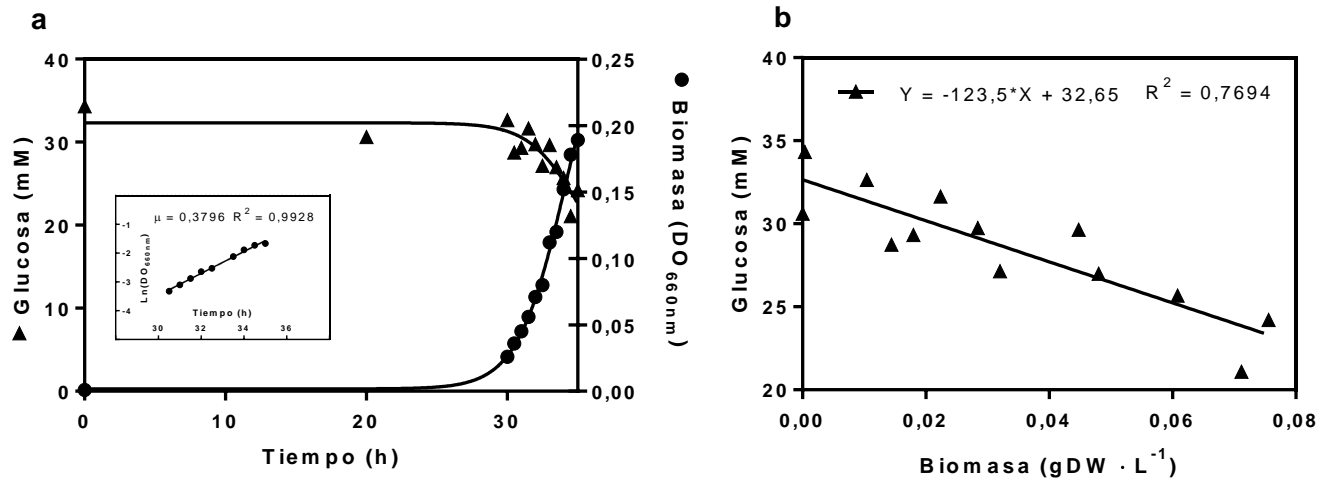


Figura 10. Relación entre cantidad de glucosa en el medio y biomasa producida para la determinación del rendimiento de la cepa NAD-G6PDH

Gráficos de dispersión de la concentración de glucosa y biomasa para la cepa NAD-G6PDH. El gráfico (a) corresponde a la concentración de glucosa y de biomasa en un mismo tiempo y el inserto corresponde al gráfico logarítmico donde se muestra la tasa de crecimiento (μ) en unidades de h^{-1} . (b) es la relación entre la glucosa y la biomasa expresada en $gDW \cdot L^{-1}$, la pendiente corresponde al recíproco del rendimiento.

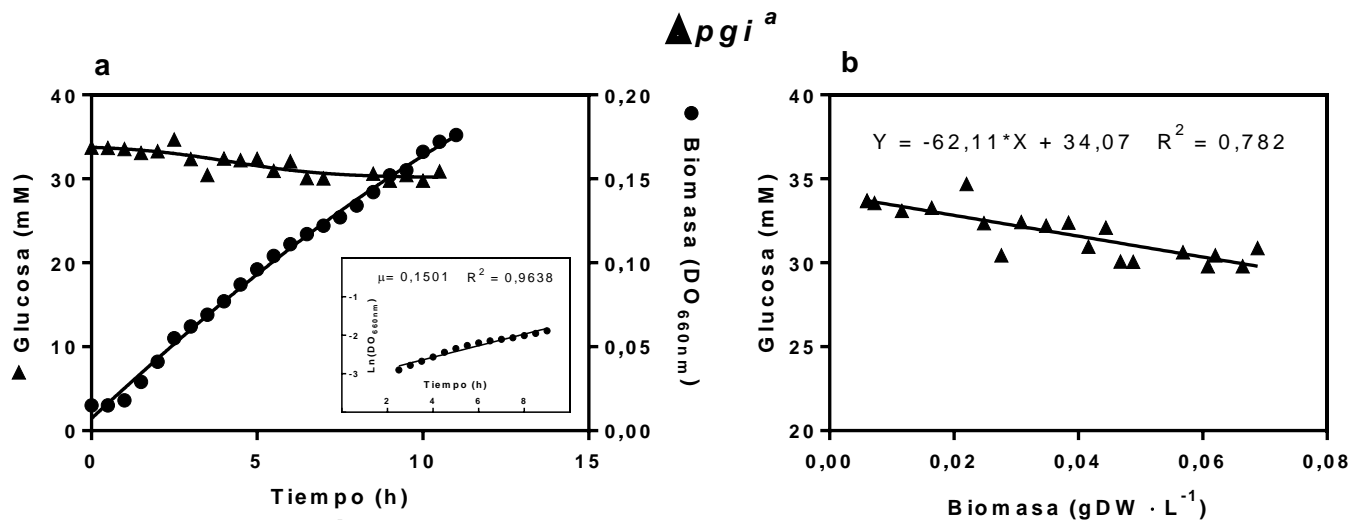


Figura 11. Relación entre cantidad de glucosa en el medio y biomasa producida para la determinación del rendimiento de la cepa Δpgi^a

Gráficos de dispersión de la concentración de glucosa y biomasa para la cepa Δpgi . El gráfico (a) corresponde a la concentración de glucosa y de biomasa en un mismo tiempo y el inserto corresponde al gráfico logarítmico donde se muestra la tasa de crecimiento (μ) en unidades de h^{-1} . (b) es la relación entre la glucosa y la biomasa expresada en $gDW \cdot L^{-1}$, la pendiente corresponde al recíproco del rendimiento.

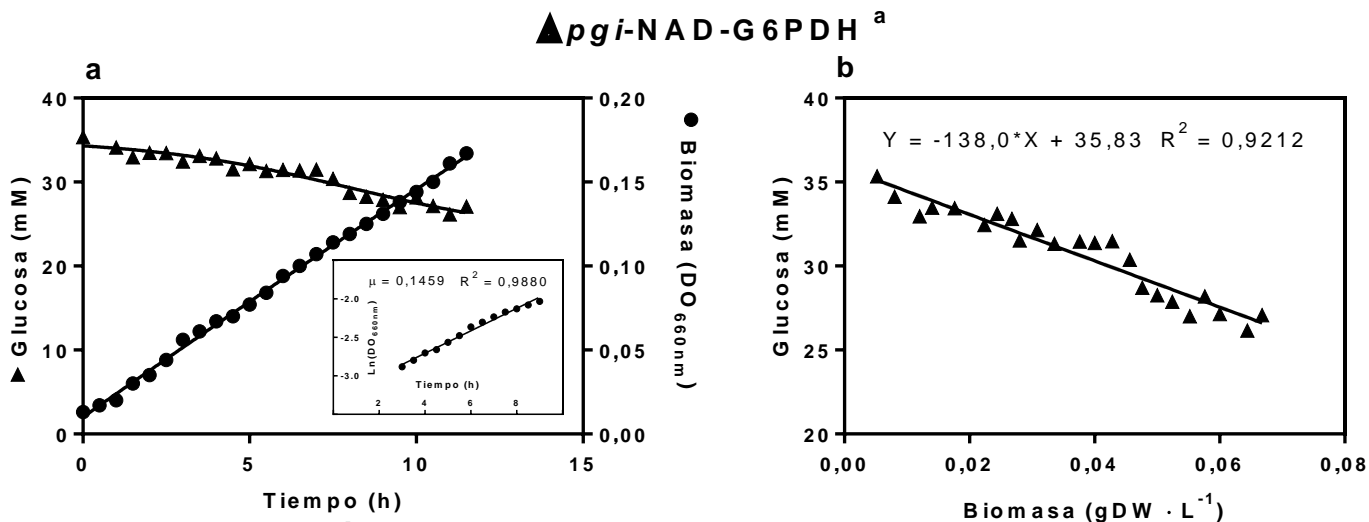


Figura 12. Relación entre cantidad de glucosa en el medio y biomasa producida para la determinación del rendimiento para la cepa $\Delta pgi-NAD-G6PDH^a$

Gráficos de dispersión de la concentración de glucosa y biomasa para la cepa $\Delta pgi-NAD-G6PDH$. El gráfico (a) corresponde a la concentración de glucosa y de biomasa en un mismo tiempo y el inserto corresponde al gráfico logarítmico donde se muestra la tasa de crecimiento (μ) en unidades de h^{-1} . (b) es la relación entre la glucosa y la biomasa expresada en $gDW \cdot L^{-1}$ (multiplicando la DO por el factor f), la pendiente corresponde al recíproco del rendimiento.

Con los datos obtenidos puede calcularse el rendimiento de biomasa por mol de glucosa consumida ($Y_{X/S}$) en condiciones de producción de electricidad. En las Figuras 9b-12b se observa que la concentración de glucosa versus el peso seco de biomasa por litro de cultivo presenta una correlación lineal. La pendiente de esta correlación corresponde al recíproco del rendimiento (ecuación 8). En la Tabla 9 se muestra que la cepa Δpgi , aunque creció más lento que la cepa silvestre, obtuvo un rendimiento mayor debido a que su consumo de glucosa fue aún más bajo. Las mutantes NAD-G6PDH presentan menor rendimiento que sus cepas parentales fundamentalmente debido al notable incremento en el flujo de consumo de glucosa. Debido a que la cuantificación de glucosa se realizó para un único cultivo, no se pueden establecer diferencias significativas, sin embargo, las tendencias son claras.

Tabla 9. Parámetros fisiológicos obtenidos a partir de cultivos electrogénicos de *E. coli* con RN 20 μ M

Cepa	μ (h^{-1})	$Y_{X/S}$ (gDW por mmol de Glucosa)	Q_{glc} (mmol·gDW $^{-1}$ ·h $^{-1}$)
MG1655	0,29 \pm 0,03	0,0119	24,38
NAD-G6PDH	0,36 \pm 0,02	0,0081	44,46
Δpgi^a	0,17 \pm 0,02	0,0161	10,56
Δpgi -NAD-G6PDH ^a	0,19 \pm 0,05	0,0072	26,22

Para cada cepa se detallan los valores de tasa de crecimiento (μ), rendimiento ($Y_{X/S}$) y tasa de consumo de glucosa (Q_{glc}). Las mediciones de glucosa fueron hechas solo para una de las dos réplicas.

^a Cepas con pre-inóculo anaeróbico.

8.3.2. Crecimiento electrogénico y relación de corriente con biomasa

Para los cultivos muestreados en Figuras 9-12 se registró simultáneamente la producción de electricidad. Adicionalmente, se realizaron réplicas de estos cultivos, pero el curso temporal de la concentración de glucosa no fue observado.

En la Figuras 13a-14a se muestra el incremento en biomasa en conjunto con la corriente generada. Las réplicas se reportan en la Figura 8 en Anexo, fundamentalmente para mostrar que, a pesar del alto nivel de variabilidad experimental, las principales tendencias se mantienen. También se graficaron las curvas donde se relaciona la DO_{660} con la corriente producida en mA (Figuras 13b-14b), cuya pendiente corresponde al rendimiento de electricidad por unidad de biomasa (denominada “r” en la Ecuación 10). Por lo tanto, este valor se puede utilizar para calcular el flujo de producción de electrones por gDW por hora (sección 7.3.1).

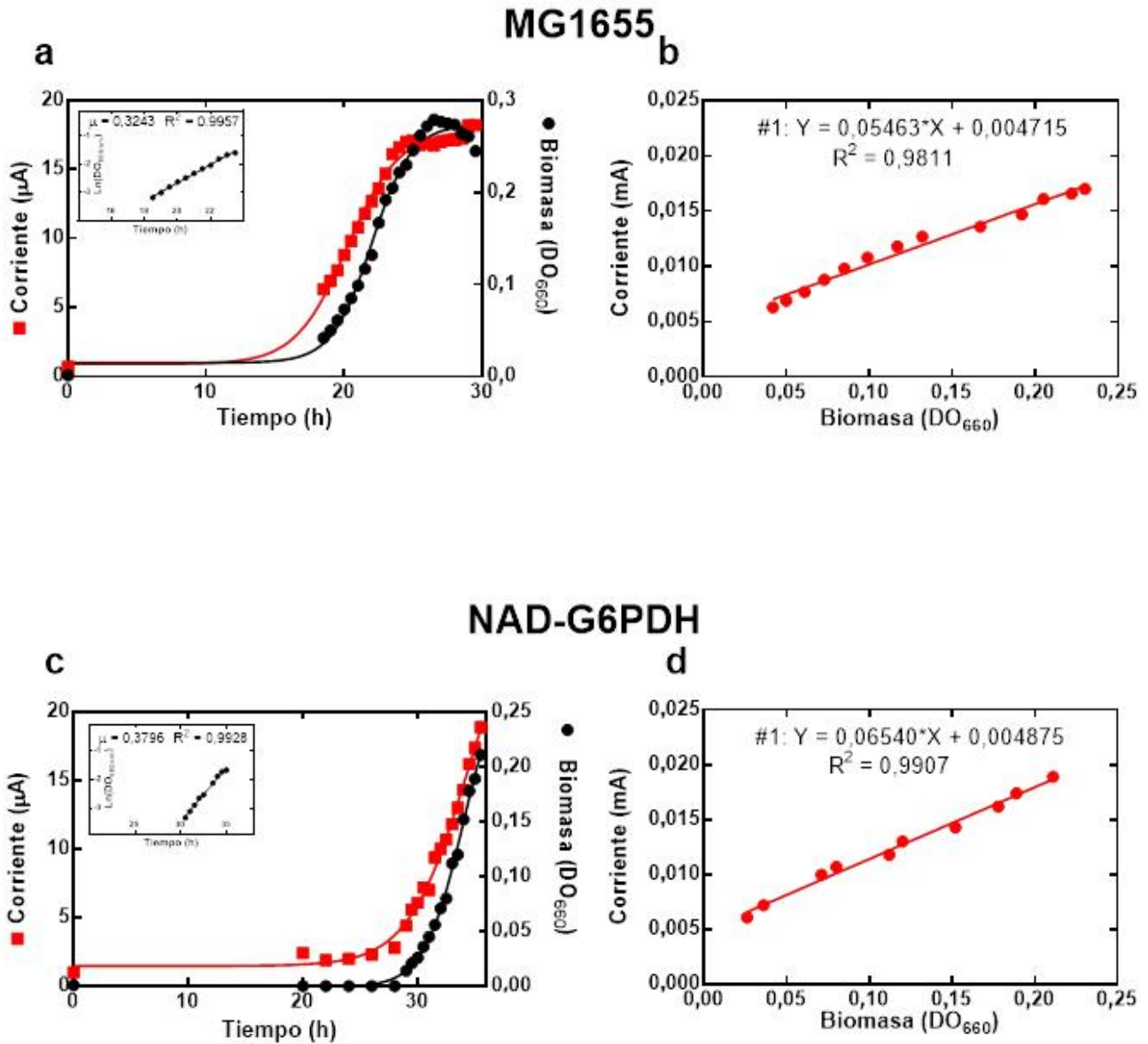


Figura 13. Curvas de crecimiento de las cepas MG1655 y NAD-G6PDH en condiciones electrogénicas

El curso temporal de la DO_{660} y de la corriente de las cepas (a) MG1655 y (c) NAD-G6PDH. La pendiente de cada ecuación en los insertos corresponde a la tasa de crecimiento (μ) en unidades de h^{-1} de la respectiva cepa. Los gráficos de la derecha muestran la relación entre la corriente generada por la biomasa del cultivo (DO_{660}) donde la pendiente sobre la regresión lineal corresponde a la relación r .

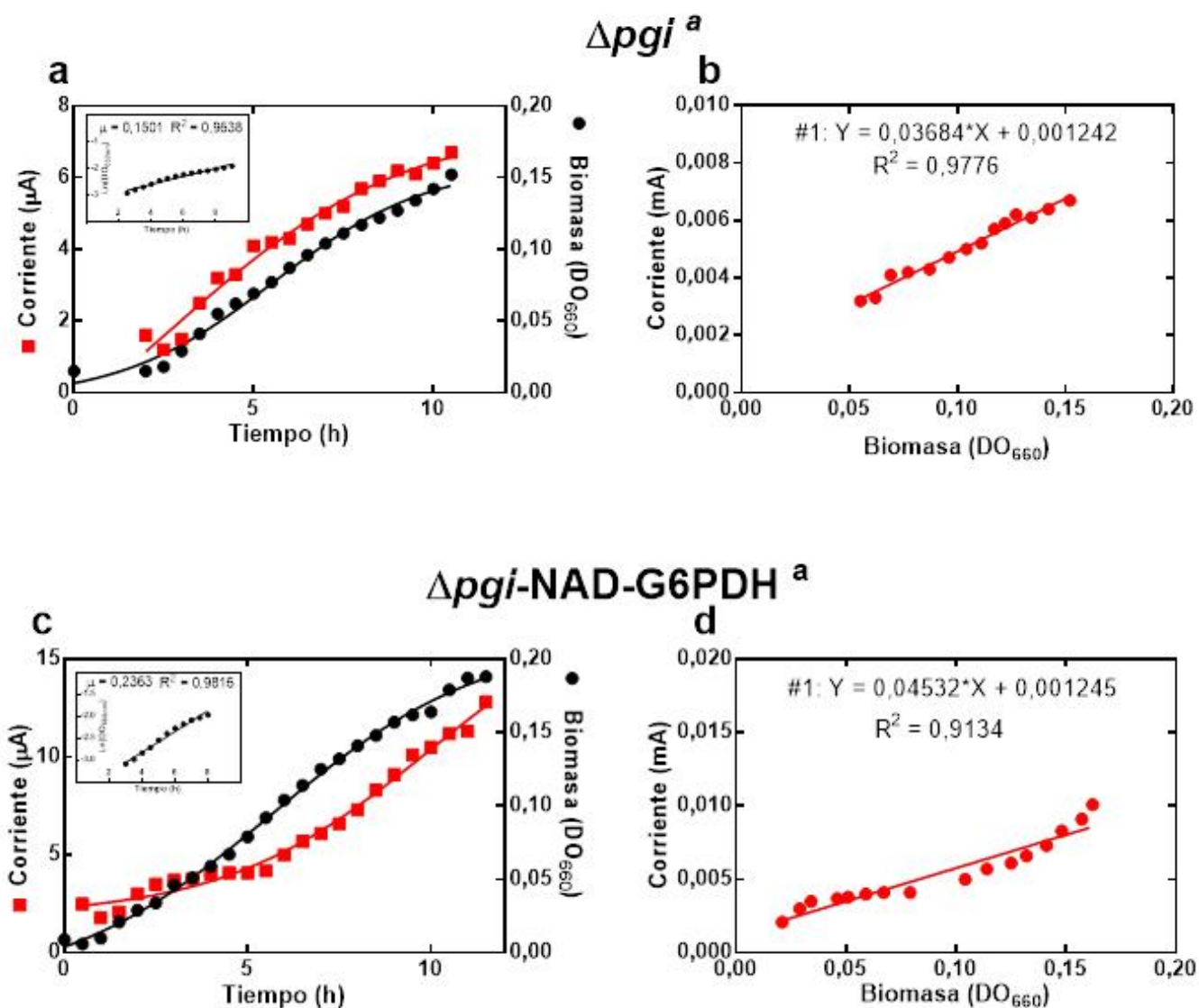


Figura 14. Curvas de crecimiento de las cepas Δpgi^a y $\Delta pgi\text{-NAD-G6PDH}^a$ en condiciones electrogénicas

El curso temporal de la DO_{660} y de la corriente de las cepas (a) Δpgi^a y (c) $\Delta pgi\text{-NAD-G6PDH}^a$, la pendiente de cada ecuación en los insertos corresponde a la tasa de crecimiento (μ) en unidades de h^{-1} de la respectiva cepa. Los gráficos de la derecha muestran la relación entre la corriente generada por la biomasa del cultivo (DO_{660}) donde la pendiente sobre la regresión lineal corresponde a la relación r .

Tabla 10. Parámetros de flujo eléctrico de las cepas de *E. coli* estudiadas, durante el crecimiento electrogénico

Cepa	μ (h ⁻¹)	r (mA·DO ⁻¹)	Fe(r) (mmol e ⁻ · gDW ⁻¹ ·h ⁻¹)
MG1655	0,29 ± 0,03	0,0552 ± 0,0006	0,0429 ± 0,0005
NAD-G6PDH	0,36 ± 0,02 ^b	0,05 ± 0,01	0,041 ± 0,009
Δpgi^b	0,17 ± 0,02 ^b	0,0370 ± 0,0001	0,02872 ± 0,00009
Δpgi -NAD-G6PDH ^a	0,19 ± 0,05	0,049 ± 0,003	0,038 ± 0,003

Para cada cepa se detallan los valores de relación corriente y DO (r) y flujo de electrones (Fe). En la tabla se muestra el promedio y la desviación estándar de las observaciones realizadas en duplicado.

^a : Cepas con pre-inóculo anaeróbico.

^b : Aquellos valores marcados con este superíndice presentan diferencias significativas entre sí.

El rendimiento de electricidad por unidad de biomasa (relación r), así como el flujo de salida de electrones resultó similar en todos los casos excepto para la mutante Δpgi , que presenta menores valores. Las relaciones r de todas las cepas resultaron no ser significativamente diferentes (p -value>0,01) comparando todas las cepas. Lo mismo pasa para el flujo de electrones Fe(r).

De acuerdo con los datos obtenidos, otro parámetro fisiológico que resulta de nuestra caracterización de cultivos electrogénicos es el rendimiento de electricidad por glucosa consumida, es decir, los mmoles de electrones generados por mmol de glucosa. Esto se obtiene al dividir el flujo de electrones por el consumo de glucosa, (réplica 1, para todas las cepas) estos valores se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Rendimiento de electrones de las cepas de *E. coli* estudiadas, durante el crecimiento electrogénico

Cepa	$Y_{e/s}$ (mmol e ⁻ · mmol glucosa ⁻¹)
MG1655	0,0018
NAD-G6PDH	0,0009
Δpgi^a	0,0027
Δpgi -NAD-G6PDH ^a	0,0014

Para cada cepa se detallan los valores de rendimiento de electrones ($Y_{e/s}$). Los datos corresponden a una de las réplicas de los experimentos electrogénicos (réplica 1 para todos los casos).
^a Cepas con pre-inóculo anaeróbico.

De esta forma, resulta que este parámetro para la cepa Δpgi es mayor que para el resto de las cepas, debido a que logra producir una corriente relativamente alta en relación con la poca biomasa que la estaría generando, junto con su bajo consumo de glucosa. Por lo contrario, la cepa NAD-G6PDH presenta un bajo rendimiento a pesar de presentar un alto flujo de electrones, debido al gran incremento en su consumo de glucosa respecto de las otras cepas.

9. DISCUSIÓN

En este trabajo estudiamos cultivos de *E. coli* en condiciones electrogénicas. En estas circunstancias, en ausencia de oxígeno, el rojo neutro estaría funcionando como un aceptor final de electrones generados por el metabolismo bacteriano. Por su parte, las cepas estudiadas presentan diferencias genéticas que afectan el modo en que la glucosa es metabolizada para generar NADH y NADPH. Nuestros resultados muestran que, tanto la extracción de electrones por rojo neutro como las modificaciones genéticas afectan las tasas observadas de crecimiento y de consumo de glucosa.

9.1. Efecto de la ausencia de oxígeno en el crecimiento de mutantes de la producción de NADH y NADPH en *E. coli*

Se sabe que las mutaciones Δpgi (delección de la fosfogluco isomerasa) y NAD-G6PDH (cambio de especificidad de NADP⁺ por NAD⁺ en la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) afectan la velocidad de crecimiento en condiciones aeróbicas (Olavarría y col., 2014); sin embargo, con nuestros resultados podemos decir que en condiciones anaeróbicas sus efectos pueden ser diferentes, tal vez debido a las diferencias en las distribuciones de flujos metabólicos. En nuestro caso, si es que la ausencia de oxígeno lleva al nivel de activación de EDD, como lo observa Chen y col., 2011, entonces esto resultaría en una atenuación de la sobreproducción de NADPH a nivel de la enzima 6PGDH y por consiguiente un menor efecto de Δpgi en la velocidad de crecimiento. Del mismo modo, los resultados de Chen y col., 2011 indican que la bacteria está usando G6PDH como

una fuente de NADPH en condiciones anaeróbicas; por lo tanto, el cambio de especificidad implica que esta enzima ya no puede ser considerada como una fuente, lo cual conduciría a una menor tasa de crecimiento.

Una observación importante es que la cepa Δpgi sí creció en condiciones anaeróbicas, contrario a lo que se concluye en la publicación de Sekar y col., 2017. En dicho trabajo los cultivos anaeróbicos en medio mínimo M9 comienzan a una DO inicial de 0,1 dejando un pequeño margen de diferencia para que la cepa pueda llegar a su DO máxima (cerca a 0,2 de acuerdo con nuestro trabajo). Más aún, el gráfico de la curva de crecimiento utiliza una escala muy grande en (Figura 3), que impide ver este leve aumento en la absorbancia del cultivo. En cambio, en nuestro caso el incremento en la DO a 600 nm pudo ser más perceptible (Figura 6c), puesto que estos cultivos se iniciaron desde una colonia, siendo la DO inicial prácticamente cero (además la escala utilizada en nuestro gráfico (Figura 6c) es menor). Además, en este trabajo comprobamos que el crecimiento se debía a la población inicialmente inoculada de la cepa, ya que sembramos placas de LB-agar con los cultivos anaeróbicos de la Figura (14a) una vez terminado el experimento (12 horas). Estas colonias fueron analizadas a través de PCR (Figura 3 Anexo) comprobando la presencia de la mutación Δpgi .

9.2. Efecto de las condiciones electrogénicas en cultivos de *E. coli*

Diversos autores (Park & Zeikus 2000, Park y col., 2000, Harrington y col., 2015) han señalado al rojo neutro como un buen mediador exógeno, caracterizado por la ausencia de citotoxicidad, pero no se ha analizado comparativamente su efecto sobre mutantes metabólicas. Al respecto, nuestros resultados indican que la

consideración que el rojo neutro es un buen mediador necesitaría ser revisada ya que observamos que este posee un efecto negativo sobre el crecimiento, que es dependiente de su concentración. Esto fue descrito previamente en el trabajo de Tesis de Brescia (2017) con la cepa silvestre. En esta investigación demostramos dos aspectos adicionales importantes: (i) a pesar del efecto negativo, la producción de electricidad por unidad de biomasa sí se incrementa con la presencia del mediador (Figura 7), y (ii) alteraciones en el metabolismo central pueden aumentar la sensibilidad de la bacteria al efecto del mediador sobre el crecimiento (Tabla 8).

Dado que se conocen los efectos del rojo neutro sobre el crecimiento, una forma de caracterizar mejor sus efectos sobre el metabolismo sería determinar otros parámetros fisiológicos. Pero en la literatura, la medición de parámetros fisiológicos en cultivos electrogénicos ha sido escasamente reportada. En la investigación de Park & Zeikus (2000) estudian el crecimiento de *E. coli* en cultivos electrogénicos usando rojo neutro 100 μM como mediador y tabulan valores de consumo de glucosa y rendimiento de biomasa por glucosa consumida. Sin embargo, en este trabajo el consumo de glucosa es expresado aparentemente como la disminución de la concentración (mM) luego de 6 horas de iniciado el cultivo, sin atender si esto fue muestreado durante la fase exponencial o abarca varias fases del crecimiento. Además, no mencionan la tasa de crecimiento y los gramos de células que informan son calculados en base a las proteínas celulares extraídas no corresponden al peso seco. Por lo tanto, una comparación directa con los valores de mmol de glucosa por gDW^{-1} por h^{-1} obtenidos en nuestro estudio no es posible. Para comprender el fenómeno de la electrogénesis en *E. coli* y poder eventualmente controlarlo

mediante herramientas de ingeniería metabólica es crucial caracterizar la fisiología del crecimiento de esta bacteria.

El perfil de crecimiento y corriente para cultivos en la cámara anódica de MFC ha sido reportado previamente por Qiao y col., 2009. En este trabajo, en el que no utilizan mediador exógeno el comportamiento de la corriente es diferente al del incremento de biomasa. La generación de corriente empieza a aumentar alrededor de las 7 horas después de iniciado el cultivo, tiempo en el cual las bacterias ya se encuentran en la fase exponencial tardía, llegando a fase estacionaria. Luego de esto, la corriente sigue subiendo incluso hasta 10 horas después de la llegada a esta fase cuando recién se estabiliza. Esto implica que la generación de corriente se encuentra principalmente en la fase estacionaria (Figura 2). En cambio, en nuestro trabajo debido al uso de rojo neutro, se observa para todos los casos que la curva de progreso de la corriente sigue una forma similar a la curva de crecimiento, donde la corriente es menos significativa en la fase *lag* de crecimiento y aumenta con el incremento de la biomasa en la fase exponencial, en una forma directamente proporcional. Debido a esto se puede obtener el coeficiente denominado r . Finalmente, el incremento de la corriente se frena alrededor de la llegada del cultivo a la fase estacionaria. De esto se desprende que al utilizar el rojo neutro obtenemos una correlación proporcional entre la corriente y la biomasa que la genera, lo cual no se aprecia en los perfiles de corriente y biomasa reportados por Qiao y col., 2009.

En el estudio de Park y Zeikus se reporta que el consumo de glucosa se incrementa un 10% al comparar un cultivo electrogénico en presencia de rojo neutro

100 μM que genera electricidad con uno que no genera electricidad (circuito abierto). Otros estudios de literatura reportan que el consumo de glucosa aumenta desde condiciones aeróbicas a anaeróbicas en aproximadamente el doble, reportando valores cercanos a 7 mmoles de glucosa $\cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ para la cepa silvestre de *E. coli* en presencia de oxígeno y de aproximadamente 14 mmoles de glucosa $\cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ en ausencia de oxígeno (McCloskey y col., 2014, Chen y col., 2011). Si comparamos el consumo de glucosa anaeróbico con el obtenido en este trabajo para la cepa silvestre bajo condiciones electrogénicas, el valor resulta mayor, e incluso el valor obtenido para la cepa NAD-G6PDH resulta más alto que cualquier valor reportado para *E. coli* en condiciones anaeróbicas. De estos resultados podríamos concluir que la mutación NAD-G6PDH aumenta dramáticamente el consumo de glucosa durante la generación de electricidad (tanto en presencia como ausencia del gen *pgi*). Sin embargo, es fundamental tener réplicas para confirmarlo y además se podría utilizar una metodología más precisa, en la cual se pueda disminuir el error. Además, nos falta saber el consumo de glucosa en 20 μM de rojo neutro sin generación de electricidad y corroborar si el consumo de nuestros cultivos en condiciones anóxicas resulta similar a los reportados en literatura para la cepa silvestre.

Además, no solo la presencia del rojo neutro en condiciones anaeróbicas afectó el crecimiento, sino que también se observó que la generación de electricidad para todos los casos aumentaba la tasa de crecimiento respecto de la presencia de rojo neutro 20 μM sin electricidad. Esto posiblemente se deba a que la presencia de los electrodos a un potencial determinado controla tanto la ganancia de energía teórica para los microorganismos, como también la salida de energía eléctrica

(Schroder 2007). Por lo tanto, cuanto más bajo es el potencial del ánodo, hay disponible menos energía por electrón transferido para el crecimiento y el mantenimiento de la célula. Un ánodo con un potencial más alto puede mejorar la tasa de crecimiento de bacterias, lo que resulta en una mayor densidad de biocatalizador, una puesta en marcha más rápida de la generación de electricidad y, en general, mayor generación de corriente (Aelterman y col., 2008). Sin embargo, en nuestro trabajo no determinamos el potencial en el cual estaba el electrodo y tampoco lo fijamos mediante un potenciostato, por lo que para comprobar si es el potencial del ánodo el que está afectando el crecimiento con rojo neutro, se debería observar el efecto sobre el crecimiento a distintos potenciales.

Como resultado, mayores densidades de biomasa pueden ser sostenidas causando un potencial aumento en la corriente, pero también una mayor competencia por la superficie del electrodo y sustrato disponible. Aparte de esto, la presencia de enzimas, estructuras de transferencia de electrones y moléculas mediadoras capaces de transferir electrones a los electrodos al ser compatibles con el potencial del ánodo les permite una transferencia de electrones eficiente (Aelterman y col., 2008). Esto podría estar explicando porque es mayor la tasa de crecimiento obtenida con rojo neutro en conjunto con la generación de electricidad en comparación con la obtenida solo con rojo neutro, a pesar del efecto negativo sobre el crecimiento bacteriano que tiene este mediador.

Además, existe la posibilidad de que el mecanismo de extracción de electrones de RN pueda generar energía para la célula, por ejemplo, aumentando la concentración de protones en el periplasma. Si el RN interactúa con el

menaquinol, como se propone en Harrington y cols., 2015, la menaquinona, al reducirse a menaquinol a través de una NADH deshidrogenasa de bombeo de protones (Complejo I), resultaría en la translocación de protones a través de la membrana interna y la regeneración de menaquinona después de la oxidación del menaquinol por RN.

9.3. Variabilidad experimental y proyecciones

Si bien los consumos de glucosa resultaron un parámetro que muestra una variabilidad en la respuesta de las cepas, para las tasas de crecimiento de los cultivos anaeróbicos solo la tasa de la cepa MG1655 logra ser significativamente diferente de los aeróbicos (*p-value* de 0,0017) y también el crecimiento aeróbico con el cultivo electrogénico (*p-value* de 0,0003). No así las tasas de las otras cepas que resultaron similares para las 3 condiciones (aeróbica, anaeróbica y electrogénica). Pero esto no quiere decir que no existan diferencias entre las cepas y condiciones, si no que la variabilidad experimental no permite asignar un valor significativo a las diferencias. Esto podría resolverse a futuro aumentando el número de réplicas o para el caso de los cultivos electrogénicos, disminuyendo la resistencia interna del sistema, aumentando la eficiencia de generación de corriente o incrementando la superficie del electrodo (Logan y col., 2006).

Es importante para considerar en esta investigación la variabilidad experimental y el número de réplicas que se necesitaría para tener diferencias significativas. De acuerdo con Logan (2012) los experimentos en MFC resultan ser muy variables y pequeños detalles que difieran entre una réplica y otra afectarán la reproducibilidad del experimento. Algunos investigadores han recomendado cuatro

o más repeticiones basadas en el análisis de ocho reactores (Larrosa y col., 2009), pero otro estudio con reactores en triplicados mostró que no habría habido una diferencia significativa en el resultado si solo se hubieran utilizado duplicados. Finalmente, Logan concluye que en su experiencia en el laboratorio con muchos cientos de pruebas en MFC, los duplicados deben ser suficientes, siempre y cuando los resultados están relativamente de acuerdo (Logan 2012). En el caso de nuestros duplicados (Figuras 13-14 y Figura 8 del Anexo), a pesar de la variabilidad observada, especialmente con las cepas mutantes, las tendencias principales parecen ser reproducibles. Sin embargo, para el análisis estadístico es necesario un triplicado, con el fin de poder establecer diferencias significativas.

Finalmente, en este trabajo expresamos el flujo de electrones por unidad de biomasa y el rendimiento de electrones por mmol de glucosa, esto con el fin de poder establecer diferencias entre las cepas no solo teniendo en consideración el flujo de electrones producido. Además, es importante notar que estos parámetros resultan innovadores en el área de las celdas de combustible, ya que en general parece existir poco consenso sobre el uso de parámetros que permitan comparar diferentes experimentos. Si bien anteriormente sólo en la tesis de Brescia (2017) se ha usado el enfoque de expresar el flujo de electrones, esto fue para un diseño experimental distinto. Este nuevo parámetro de rendimiento de electrones por mmol de glucosa determinado tomando en cuenta las réplicas necesarias, mostraría la eficiencia energética por sustrato consumido, lo cual es ideal para sistemas que buscan descontaminar de manera eficiente aguas residuales.

Igualmente, la expresión del flujo de electrones y parámetros como el consumo de glucosa también resultan útiles para el modelamiento del metabolismo durante la generación de electricidad, como también todos los resultados fisiológicos obtenidos para los cultivos electrogénicos. Esto podría realizarse mediante herramientas como el Análisis de Balance de Flujos (FBA, por su sigla en inglés). Donde estos datos mencionados pueden ser ocupados como restricciones en el modelamiento de flujos metabólicos, para así tener una idea más precisa de lo que está ocurriendo en el metabolismo bacteriano durante la generación de electricidad.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir las cepas que aumentan la producción de NADH generan más electricidad en el tiempo, por lo que tienen una mayor producción de electricidad. En tanto que las cepas que incrementan la capacidad de producción de NADPH producen más mmoles de electrones con un bajo consumo de glucosa, debido a esto, presentan un mayor el rendimiento de electrones por unidad de sustrato consumido, validándose así la hipótesis.

10. REFERENCIAS

- Aelterman, P., Freguia, S., Keller, J., Verstraete, W., & Rabaey, K. (2008). The anode potential regulates bacterial activity in microbial fuel cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 78(3), 409-418.
- Alegret, S., del Valle, M., & Merkoçi, A. (2004). Sensores electroquímicos: introducción a los quimiosensores y biosensores: curso teórico-práctico (Vol. 147). Univ. Autónoma de Barcelona.
- Brescia, I. A., Distribución de flujos metabólicos durante la producción de electricidad en cultivos de *Escherichia coli*: modelamiento matemático con uso de parámetros fisiológicos. Tesis (Magíster en Bioquímica). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2017. 82 h.
- Bullen, R. A., Arnot, T. C., Lakeman, J. B., & Walsh, F. C. (2006). Biofuel cells and their development. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(11), 2015-2045.
- Carugo, O., & Argos, P. (1997). NADP-dependent enzymes. I: conserved stereochemistry of cofactor binding. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 28(1), 10-28.
- Chen, X., Alonso, A. P., Allen, D. K., Reed, J. L., & Shachar-Hill, Y. (2011). Synergy between 13 C-metabolic flux analysis and flux balance analysis for understanding metabolic adaption to anaerobiosis in *E. coli*. *Metabolic Engineering*, 13(1), 38-48.
- El-Naggar, M. Y., Wanger, G., Leung, K. M., Yuzvinsky, T. D., Southam, G., Yang, J., & Gorby, Y. A. (2010). Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(42), 18127-18131.
- Fuhrer, T., & Sauer, U. (2009). Different biochemical mechanisms ensure network-wide balancing of reducing equivalents in microbial metabolism. *Journal of Bacteriology*, 191(7), 2112-2121.
- Fuhrer, T., Fischer, E., & Sauer, U. (2005). Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *Journal of Bacteriology*, 187(5), 1581-1590.
- Georgellis, D., Kwon, O., & Lin, E. C. (2001). Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria. *Science*, 292(5525), 2314-2316.
- Hanson, R. L., & Rose, C. (1980). Effects of an insertion mutation in a locus affecting pyridine nucleotide transhydrogenase (pnt:: Tn5) on the growth of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 141(1), 401-404.

Harrington, T. D., Tran, V. N., Mohamed, A., Renslow, R., Biria, S., Orfe, L., & Beyenal, H. (2015). The mechanism of neutral red-mediated microbial electrosynthesis in *Escherichia coli*: menaquinone reduction. *Bioresource Technology*, *192*, 689-695.

Hernandez, M. E., & Newman, D. K. (2001). Extracellular electron transfer. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *58*(11), 1562-1571.

Holms, W. H. (1986). Evolution of the glyoxylate bypass in *Escherichia coli* an hypothesis which suggests an alternative to the Krebs cycle. *FEMS Microbiology Letters*, *34*(2), 123-127

Jensen, H. M., Albers, A. E., Malley, K. R., Londer, Y. Y., Cohen, B. E., Helms, B. A., & Ajo-Franklin, C. M. (2010). Engineering of a synthetic electron conduit in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(45), 19213-19218.

Krapp, A. R., Humbert, M. V., & Carrillo, N. (2011). The soxRS response of *Escherichia coli* can be induced in the absence of oxidative stress and oxygen by modulation of NADPH content. *Microbiology*, *157*(4), 957-965.

Larrosa, A., Lozano, L. J., Katuri, K. P., Head, I., Scott, K., & Godinez, C. (2009). On the repeatability and reproducibility of experimental two-chambered microbial fuel cells. *Fuel*, *88*(10), 1852-1857.

Logan, B. E. (2008). *Microbial Fuel Cells*. John Wiley & Sons.

Logan, B. E. (2012). Essential data and techniques for conducting microbial fuel cell and other types of bioelectrochemical system experiments. *ChemSusChem*, *5*(6), 988-994.

Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., & Rabaey, K. (2006). Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environmental Science & Technology*, *40*(17), 5181-5192.

Mao, L., & Verwoerd, W. S. (2013). Selection of organisms for systems biology study of microbial electricity generation: a review. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, *4*(1), 1-18.

Matsushita, K., Ohnishi, T., & Kaback, H. R. (1987). NADH-ubiquinone oxidoreductases of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. *Biochemistry*, *26*(24), 7732-7737.

McKinlay, J. B., & Zeikus, J. G. (2004). Extracellular iron reduction is mediated in part by neutral red and hydrogenase in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, *70*(6), 3467-3474.

Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. (OMEGA, 2009).

- Noll, K. (2006). Microbial fuel cells. In *Fuel Cell Technology* (pp. 277-296). Springer London.
- Oh, S., Min, B., & Logan, B. E. (2004). Cathode performance as a factor in electricity generation in microbial fuel cells. *Environmental Science & Technology*, 38(18), 4900-4904.
- Okamoto, A., Hashimoto, K., Nealson, K. H., & Nakamura, R. (2013). Rate enhancement of bacterial extracellular electron transport involves bound flavin semiquinones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(19), 7856-7861.
- Olavarria, K., De Ingeniis, J., Zielinski, D. C., Fuentealba, M., Muñoz, R., McCloskey, D., Feist, A., & Cabrera, R. (2014). Metabolic impact of an NADH-producing glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 160(Pt 12), 2780-2793.
- Park, D. H., Kim, S. K., Shin, I. H., & Jeong, Y. J. (2000). Electricity production in biofuel cell using modified graphite electrode with neutral red. *Biotechnology Letters*, 22(16), 1301-1304.
- Park, D. H., & Zeikus, J. G. (2000). Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1292-1297.
- Partridge, J. D., Scott, C., Tang, Y., Poole, R. K., & Green, J. (2006). *Escherichia coli* transcriptome dynamics during the transition from anaerobic to aerobic conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 281(38), 27806-27815.
- Qiao, Y., Li, C. M., Lu, Z., Ling, H., Kang, A., & Chang, M. W. (2009). A time-course transcriptome analysis of *Escherichia coli* with direct electrochemistry behavior in microbial fuel cells. *Chemical Communications*, (41), 6183-6185.
- Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T., & Lovley, D. R. (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, 435(7045), 1098-1101.
- Reich, J. G., & Selkov, E. E. E. (1981). Energy metabolism of the cell. *A Theoretical Treatise*. Acad. Press, London.
- Rismani-Yazdi, H., Carver, S. M., Christy, A. D., & Tuovinen, O. H. (2008). Cathodic limitations in microbial fuel cells: an overview. *Journal of Power Sources*, 180(2), 683-694.
- Sauer, U., Canonaco, F., Heri, S., Perrenoud, A., & Fischer, E. (2004). The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 6613-6619.

- Schröder, U. (2007). Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 9(21), 2619-2629.
- Trudiatger, P. A. (1970). On the absorbancy of reduced methyl viologen. *Analytical Biochemistry*, 36(1), 222-225.
- Wang, C. T., Chen, W. J., & Huang, R. Y. (2010). Influence of growth curve phase on electricity performance of microbial fuel cell by *Escherichia coli*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(13), 7217-7223.
- Wang, Y., San, K. Y., & Bennett, G. N. (2013). Cofactor engineering for advancing chemical biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(6), 994-999.
- Wong, M. T., Cheng, D., Wang, R., & Hsing, I. M. (2016). Modifying the endogenous electron fluxes of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4. 1 for improved electricity generation. *Enzyme and Microbial Technology*, 86, 45-51.
- Yong, Y. C., Yu, Y. Y., Yang, Y., Li, C. M., Jiang, R., Wang, X., & Song, H. (2012). Increasing intracellular releasable electrons dramatically enhances bioelectricity output in microbial fuel cells. *Electrochemistry Communications*, 19, 13-16.
- Yong, X. Y., Feng, J., Chen, Y. L., Shi, D. Y., Xu, Y. S., Zhou, J., ... & Shi, C. L. (2014a). Enhancement of bioelectricity generation by cofactor manipulation in microbial fuel cell. *Biosensors and Bioelectronics*, 56, 19-25.
- Yong, X. Y., Shi, D. Y., Chen, Y. L., Jiao, F., Lin, X., Zhou, J., ... & Zheng, T. (2014b). Enhancement of bioelectricity generation by manipulation of the electron shuttles synthesis pathway in microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 152, 220-224.

11. ANEXO

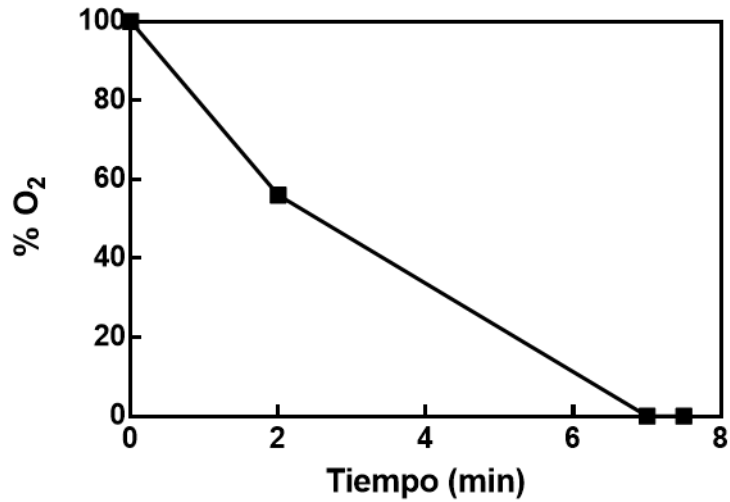


Figura 1 Anexo. Concentración de oxígeno en botella con medio de cultivo. El gráfico muestra el porcentaje relativo de oxígeno presente en una botella con medio de cultivo M9-glucosa a tres tiempos distintos de purga con nitrógeno gaseoso.

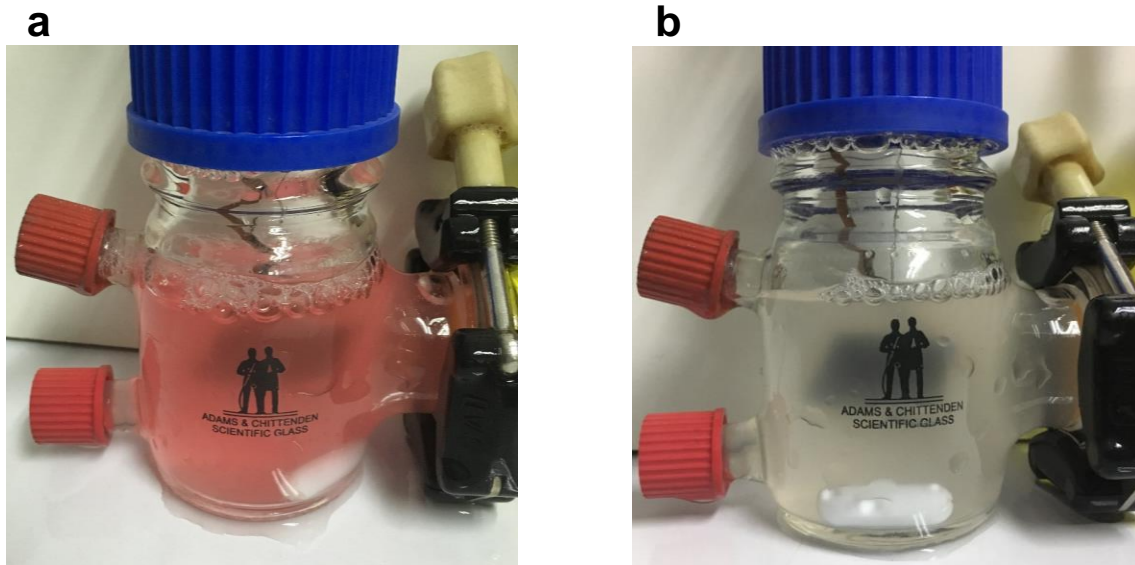


Figura 2 Anexo. Uso de resazurina como control de anaerobiosis.

La figura muestra el uso de resazurina como indicador de anaerobiosis, generada con purga con nitrógeno, en (a) se ve el compartimento anódico con biomasa y resazurina ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) recién incorporada al medio. (b) muestra el medio transcurrido 7 minutos de la adición del indicador.

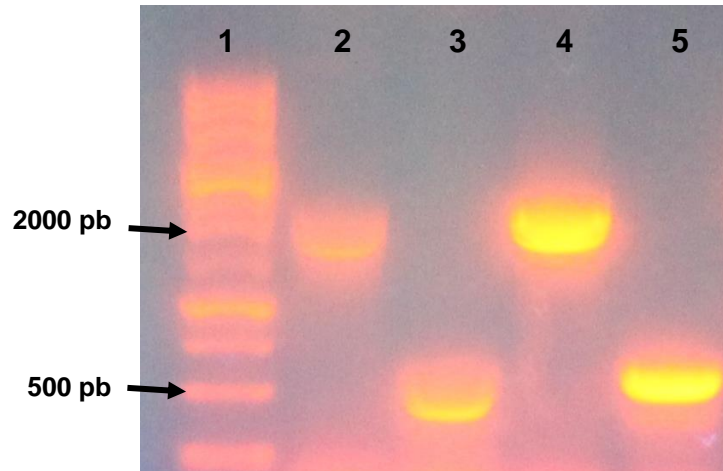


Figura 3 Anexo. PCR colonia para confirmar delección del gen *pgi*.

Gel obtenido de la electroforesis de los productos del PCR de colonias provenientes de cultivos anaeróbicos, donde el carril 1 es el estándar molecular, el 2 es la cepa silvestre, 3 Δpgi , 4 NAD-G6PDH y el carril 5 la cepa Δpgi -NAD-G6PDH. La delección de *pgi* deja una cicatriz de 527 pb y el gen con los partidores poseen un tamaño de 2107.

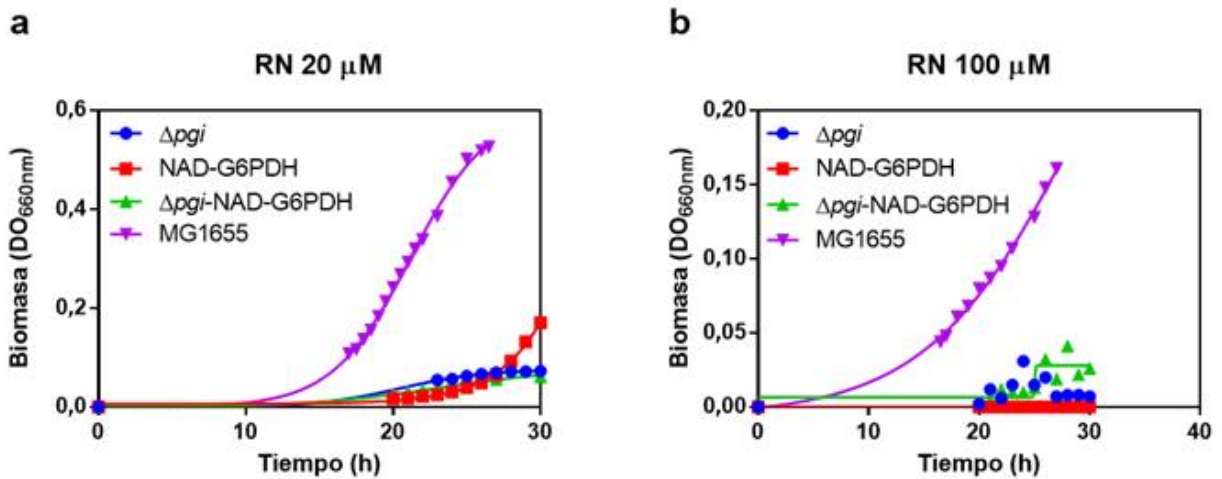


Figura 4 Anexo. Curvas de crecimiento a diferentes concentraciones de rojo neutro en condiciones anaeróbicas.

Crecimiento de cultivos *batch* de las cepas Δpgi , NAD-G6PDH, Δpgi -NAD-G6PDH y MG1655 (cepa silvestre) para diferentes concentraciones de rojo neutro (a) 20 μ M y (b) 100 μ M.

MG1655

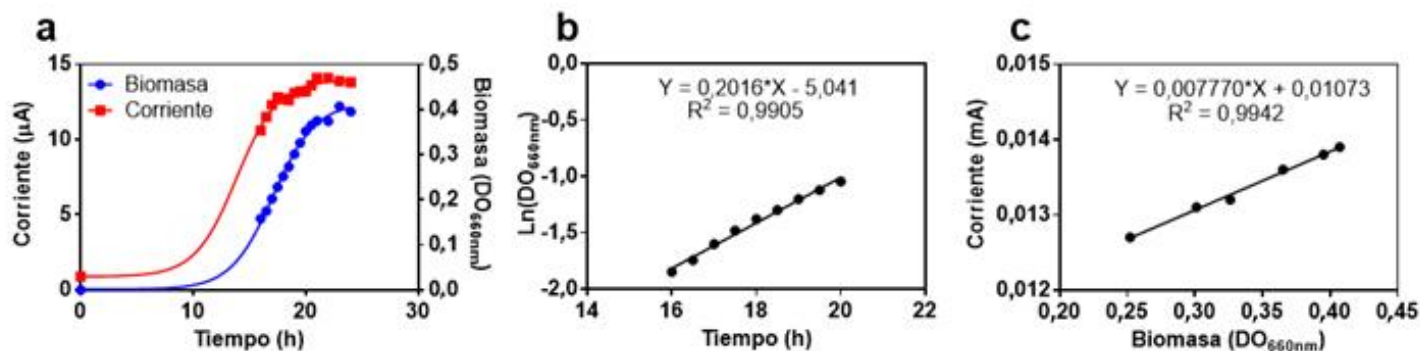


Figura 5 Anexo. Crecimiento electrogénico sin rojo neutro

En la figura se muestran (a) El curso temporal de la DO₆₆₀ y de la corriente de la cepa MG1655, (b) Regresión lineal en escala logarítmica, donde la pendiente de cada ecuación corresponde a la tasa de crecimiento (μ) en unidades de h^{-1} . (c) muestra la relación entre la corriente generada por la biomasa del cultivo (DO₆₆₀) donde la pendiente sobre la regresión lineal corresponde a la relación r .

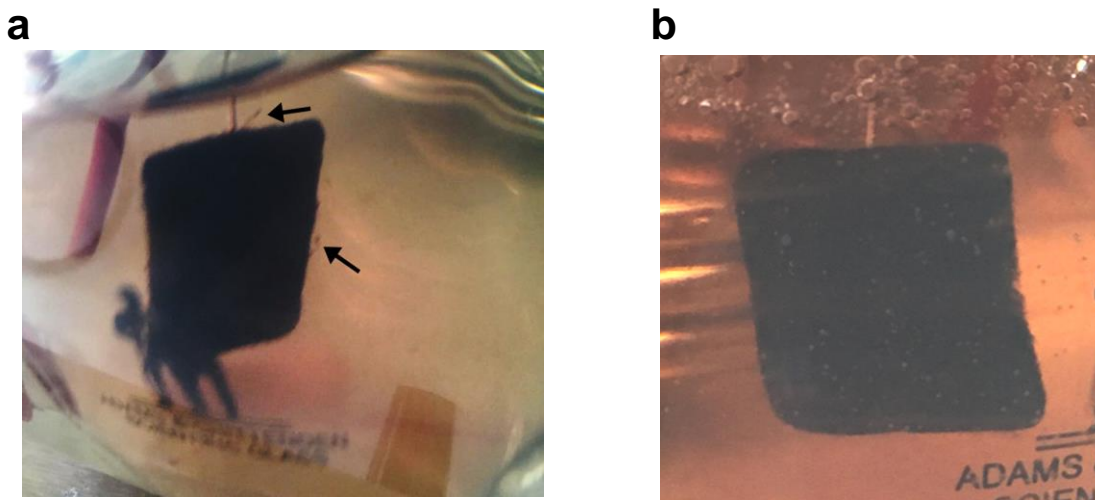


Figura 6 Anexo. Formación de biopelículas en el electrodo.

Para los cultivos de la cepa Δpgi desde colonia, además de un incremento en la corriente, pero no en la biomasa, (a) se observó la presencia de biopelículas que se formaban sobre la felpa del electrodo, las cuales se podían apreciar a simple vista. Las flechas negras indican la presencia de estas biopelículas (la felpa se encontraba totalmente compactada, no eran fibras provenientes de este material). (b) Cultivo de Δpgi desde pre-inóculo anaeróbico, no se observó formación de biopelículas.

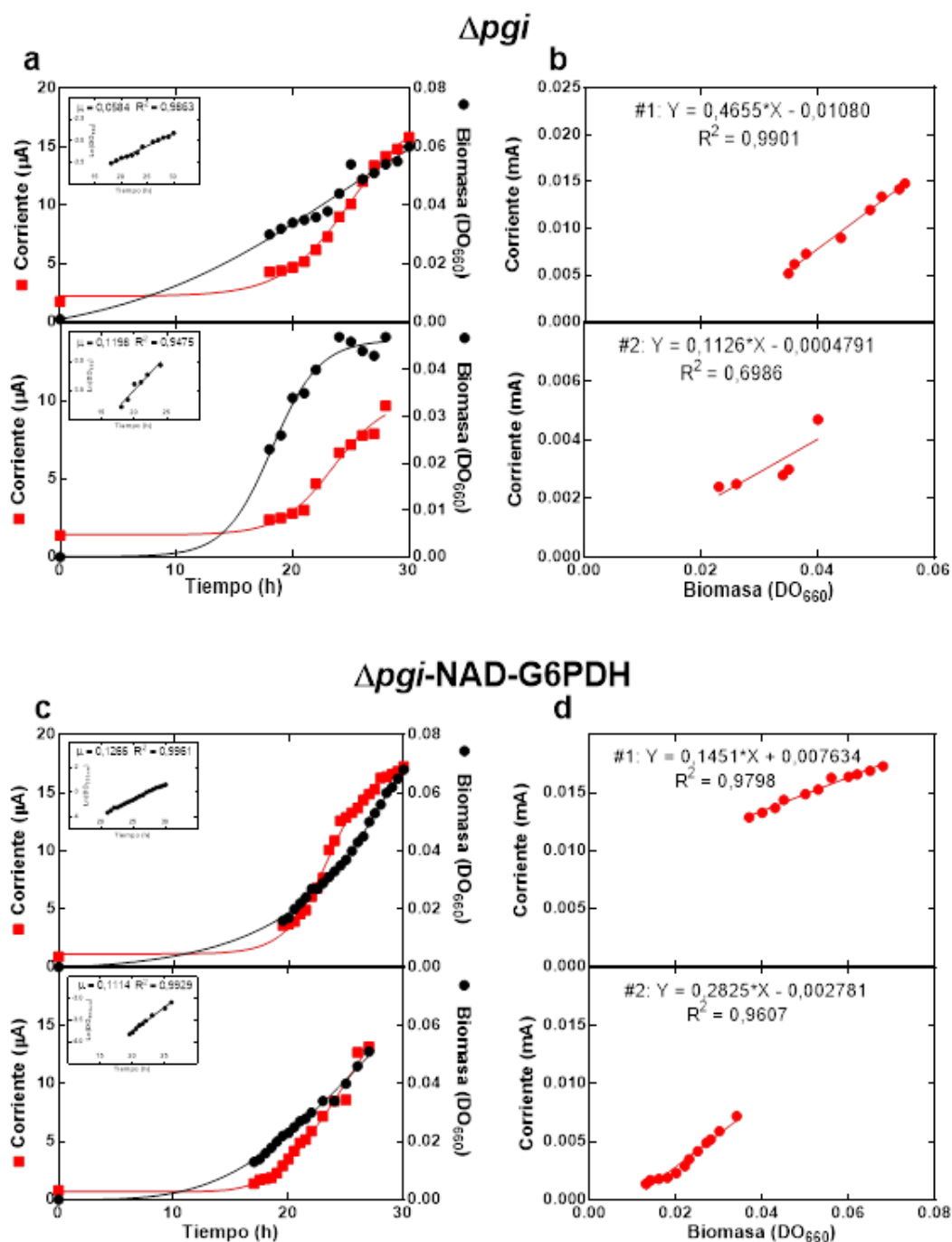


Figura 7 Anexo. Curvas de crecimiento de las cepas Δpgi y $\Delta pgi\text{-NAD-G6PDH}$ en condiciones electrogénicas

El curso temporal de la DO_{660} y de la corriente de las cepas (a) Δpgi y (c) $\Delta pgi\text{-NAD-G6PDH}$, la pendiente de cada ecuación en los insertos corresponde a la tasa de crecimiento (μ) en unidades de h^{-1} de la respectiva cepa. Los gráficos de la derecha muestran la relación entre la corriente generada por la biomasa del cultivo (DO_{660}) donde la pendiente sobre la regresión lineal corresponde a la relación r . Los gráficos muestran los duplicados biológicos desde colonia (réplica 1 arriba y 2 abajo).

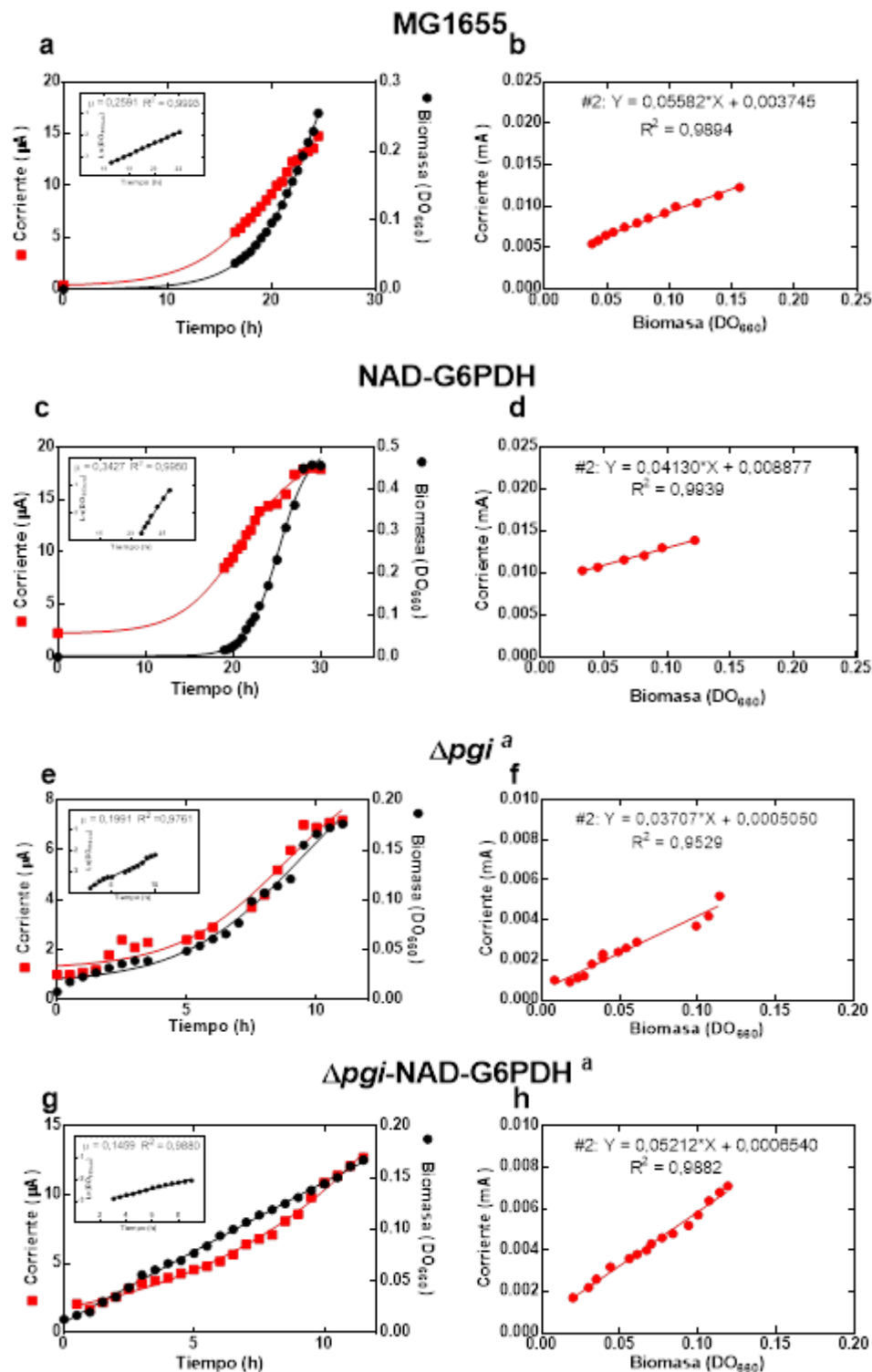


Figura 8 Anexo. Curvas de crecimiento de las cepas MG1655, NAD-G6PDH, Δpgi^a y $\Delta pgi\text{-NAD-G6PDH}^a$ en condiciones electrogénicas

El curso temporal de la DO_{660} y de la corriente de las cepas, la pendiente de cada ecuación en los insertos corresponde a la tasa de crecimiento (μ) en unidades de h^{-1} de la respectiva cepa. Los gráficos de la derecha muestran la relación entre la corriente generada por la biomasa del cultivo (DO_{660}) donde la pendiente sobre la regresión lineal corresponde a la relación r . Los gráficos muestran los duplicados biológicos desde colonia (réplica 1 arriba y 2 abajo).