



Biofilms autotróficos: camino a las fotoceldas biológicas

**Tesis para optar por el título de
Doctora en Ciencias, área Biología**

CONICET



UNIVERSIDAD NACIONAL
de MAR DEL PLATA

I N T E M A

Biofilms autotróficos: camino a las fotoceldas biológicas

por Lic. Aisha Guardia

Tesis para optar por el título de
Doctora en Ciencias, área Biología.

Resumen

Se ha comenzado a investigar hace algunos años la incorporación de microorganismos fotosintéticos tanto en el ánodo como en el cátodo de sistemas bioelectroquímicos buscando optimizar la obtención de energía a partir de los mismos. Además de la generación de bioelectricidad a partir de la luz, un beneficio adicional de los sistemas bioelectroquímicos que incluyen organismos fotosintéticos es que el dióxido de carbono (CO_2) atmosférico se incorporaría y fijaría en la biomasa, pudiendo llegar al extremo de generar sistemas electroquímicos carbono negativos. En esta tesis, se abordó un estudio electroquímico fundamental de dos tipos de microorganismos fotosintéticos en sistemas bioelectroquímicos: la bacteria fotosintética anoxigénica *Rhodopseudomonas palustris* aislada a partir de una laguna andina (Catamarca, Argentina) y la microalga *Scenedesmus dimorphus*.

R. palustris cepa AZUL fue capaz de intercambiar electrones con electrodos que hicieron las veces de dadores o aceptores de electrones denotando su gran versatilidad metabólica, lo cual le permite a esta cepa sobrevivir a condiciones cambiantes en su ambiente. El análisis genómico comparativo de la especie, apoyó la idea de que la cepa evolucionó como un ecotipo diferente y que gran parte de las secuencias de los distintos genomas son propias a una o algunas cepas. El genoma de *R. palustris* AZUL evidenció además, una gran maquinaria genética destinada a la homeostasis de distintos metales.

Por otro lado, se estudió la incorporación de microalgas como suministradoras de oxígeno en cátodos de sistemas bioelectroquímicos. El análisis realizado con *S. dimorphus* indicó que ésta no presenta actividad electrogénica. Se exploró también su incorporación en sistemas de columnas que imitan la configuración de un humedal electroquímico. Si bien las potencias obtenidas fueron bajas para abastecer una aplicación real, se concluyó que la incorporación de microalgas en futuras aplicaciones resulta posible.

fueron comparables a las obtenidas mediante aireación mecánica y

pero que pueden producir oxígeno a una tasa tal que podrían reemplazar a la aireación mecánica con un consumo energético casi nulo.

Director de Tesis: Dr. Juan Pablo Busalmen

Co-directora de Tesis: Dra. Ma. Verónica Beligni

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Juan Pablo, por haberme dado la oportunidad de unirme a su grupo, por guiarme y enseñarme tanto. Después de estos 5 años en su grupo, no sólo me llevo lecciones del mundo académico sino también, un gran aprendizaje en cuanto a lo personal.

Quiero agradecer a Vero, una persona que me apoyó en muchos momentos y no me dejó caer. Un ejemplo de perseverancia y amor por la ciencia.

A todo el grupo de IIBio, aprendí muchísimo de cada uno de ellos. Me llevo con mucho cariño el recuerdo de su compañía todos estos años, fueron una gran familia para mí. No sólo ejemplos a seguir, sino un grupo de personas hermosas. También al personal de INTEMA, que siempre estuvo dispuesto a ayudar y colaborar.

Mención especial al grupo de Precaries, con quienes compartí muchísimas risas. A Ger, Marian, Ale, Joaco, Santi, Luchi y Charlie, que hicieron de mis mañanas momentos muy divertidos.

A Juani, quien considero un hermano, compartimos los 5 años de nuestro doctorado codo a codo. Sin él no hubiera sido lo mismo.

A mis amigas, que me hacen tan feliz, que me bancaron en este camino y me impulsaron en el día a día. Gracias infinitas a ellas: Gala, Rocha, Sofi, Dani, Romi, Pecu, Nati, Manu y Belu.

A Guido, por impulsarme a cada segundo, por tanto amor, por sacar mi mejor versión.



Agradezco mis papás, su amor y su apoyo son en gran parte el motor de mi vida. Esta tesis es para ellos.

Al CONICET, la UNMdP y el INTEMA, por haber posibilitado el desarrollo de esta tesis.

Índice general

Abreviaturas	11
1. Introducción general	15
1.1. Descubrimiento y funcionamiento de los Sistemas Bioelectroquímicos	16
1.2. Mecanismos de transferencia extracelular de electrones	18
1.3. ¿Por qué estudiar la incorporación de microorganismos fotosintéticos en sistemas bioelectroquímicos?	22
2. Caracterización electroquímica de la bacteria fotosintética <i>Rhodopseudomonas palustris</i>	29
2.1. Introducción	29
2.1.1. Características generales de las bacterias fotosintéticas	29
2.1.2. Fotosíntesis anoxigénica	31
2.1.3. Metabolismo	33
Metabolismo fotótrofo	33
La fijación de CO ₂ es el mecanismo central de balance redox durante el crecimiento fotoheterótrofo	34
Fijación de nitrógeno y producción de hidrógeno	36
Compuestos inorgánicos como fuente de poder reductor. Oxidación de Fe ⁺²	38
Respiración utilizando compuestos diferentes del oxígeno	40
2.1.4. Electroquímica de <i>R. palustris</i>	42
2.2. Materiales y Métodos	44
2.2.1. Material biológico y condiciones de cultivo	44

2.2.2. Celda electroquímica	44
2.2.3. Técnicas electroquímicas	46
Cronoamperometría	47
Voltametría Cíclica	47
Ensayos de acumulación de ^{microscopía electrónica de} barrido.	49
2.2.4. Observación de <i>biofilms</i> de <i>R. palustris</i> sobre electrodos por microscopía de barrido	49
2.3. Resultados	51
2.3.1. Crecimiento de <i>R. palustris</i> AZUL en bioreactores	51
2.3.2. Análisis electroquímico utilizando el electrodo como dador de electrones	52
2.3.3. Análisis electroquímico utilizando el electrodo como aceptor de electrones	56
Acumulación de carga en <i>biofilms</i>	65
2.3.4. Discusión	67
3. Análisis genómico de <i>Rhodopseudomonas palustris</i> AZUL	75
3.1. Introducción	75
3.1.1. Clasificación general de los genomas de bacterias púrpuras.	75
3.1.2. Comparación genómica de especies	77
3.1.3. Pangenoma y Genoma núcleo: concepto y modelos	78
3.1.4. Características del genoma de <i>R. palustris</i>	84
Aislamientos de <i>R. palustris</i>	87
3.2. Materiales y Métodos	90
3.2.1. Aislamiento de la cepa AZUL, secuenciación y anotación	90
3.2.2. Análisis genómico	90
Cepas de <i>R. palustris</i> utilizadas	94
Filogenia de la especie	94
Comparación genómica	95
3.2.3. Espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente	96

3.3. Resultados	97
3.3.1. Aislamiento de <i>R. palustris</i> cepa AZUL.	97
3.3.2. Análisis genómico	97
3.3.3. Pangenoma y genoma núcleo	102
3.3.4. Características relevantes del genoma de <i>R. palustris</i> AZUL .	108
3.3.5. Anotación funcional de genes específicos de <i>R. palustris</i> AZUL	111
Resistencia por eflujo de metales	114
Reducción de metales	116
Secuestro extracelular 	117
3.3.6. Incorporación de metales	118
3.3.7. Respuesta general a estrés	119
3.4. Discusión	121
 4. Caracterización electroquímica de la microalga <i>Scenedesmus dimorphus</i> .	 131
4.1. Introducción	131
4.1.1. Conceptos básicos sobre microalgas	131
4.1.2. Fotosíntesis oxigénica	132
Flujo de electrones y síntesis de ATP	133
Asimilación de carbono y fotorespiración	135
4.2. Electroquímica de microalgas	135
4.2.1. Rol de las microalgas en los biocátodos	136
4.2.2. Potencial uso de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales	139
4.3. Materiales y Métodos	144
4.3.1. Material biológico y condiciones de cultivo	144
4.3.2. Celda electroquímica	144
4.3.3. Sistema bioelectroquímico de tipo columna	145
4.4. Resultados	149
4.4.1. Crecimiento y producción de oxígeno	149

4.4.2. Análisis electroquímico utilizando el electrodo como dador de electrones	151
Influencia de los <i>biofilms</i> de <i>S. dimorphus</i> en la reacción catódica	153
Influencia del material de electrodo	156
4.4.3. Utilización de <i>S. dimorphus</i> para mejorar el desempeño catódico en humedales bioelectroquímicos	157
Análisis de desempeño: curvas de potencia	162
4.5. Discusión	165
5. Conclusiones Generales	171
Anexo	175
Bibliografía	175

Abreviaturas

E potencial. 53

I corriente. 160

J unidades de corriente (A m^{-2}). 53

P potencia. 145, 160

Q carga acumulada. 47

R resistencia. 160

V voltaje. 160

hs horas. 49

t_d tiempo de duplicación. 49

Abs600nm absorbancia a 600 nm. 49

ADN ácido desoxirribonucleico. 75

ARNr ácido ribonucleico ribosomal. 76

ATP adenosil tri-fosfato. 27

BDBH *best bidireccional hits*. 89

BES sistemas bioelectroquímicos, por *bioelectrochemical systems*. 13

CE contra electrodo. 16

COGt *clusters of orthologous groups triangles*. 89

CR centro de reacción. 27

CV voltametría cíclica, del inglés *cyclic voltammetry*. 46, 152

DBQ demanda bioquímica de oxígeno. 137

DIET intercambio de electrones directo entre especies. 19

DQO demanda química de oxígeno. 137

E_i potencial de inicio. 46

E_l potencial límite. 46, 47

E_{pA} potencial de pico anódico. 47

E_{pC} potencial de pico catódico. 47

Fe-S hierro-azufre. 131

FPM fuerza protón motriz. 27

GH paquete GET HOMOLOGUES. 88

I_{p1c} pico máximo de corriente catódica. 47

I_{pA} pico máximo de corriente anódica. 47

MFC celdas de combustible microbianas por *microbial fuell cells*. 13, 135, 137

MLST tipificación multilocus de secuencias, del inglés *Muti-Locus Sequence Typing*).

76

OCP potencial de reposo, del inglés *open circuit potential*. 44

OMCL *orthologous markov clustering*. 89

PHB poli-b-hidroxialkanoatos. 82

ppb partes por billón. 96

ppm partes por millón. 96

PSI sistema fotosintético I, por *photosynthetic system* o también P700. 131

PSII sistema fotosintético II, por *photosynthetic system* o también P680. 131

PY medio rico en peptonas. 88

Q quinonas. 29

RAST plataforma de anotación rápida utilizando subsistemas. 92

RE electrodo de referencia. 16

SEM microscopía electrónica de barrido, del inglés *scanning electron microscope*. 48

Syntho agua residual sintética. 143

TCA ciclo de ácidos tri-carboxílicos. 82

WE electrodo de trabajo. 16

Capítulo 1

Introducción general

La electroquímica microbiana intenta comprender los aspectos fundamentales de la interacción entre microorganismos (o sus estructuras moleculares) y superficies conductoras; y utilizarlos en la producción de biocorriente, el desarrollo de sensores, la limpieza de aguas residuales u otros usos que han emergido a partir del descubrimiento de la actividad eléctrica en bacterias [1, 2]. Aunque es posible encontrar materiales conductores en la naturaleza tales como los óxidos metálicos, es de interés para esta tesis analizar la interacción eléctrica de los microorganismos con los materiales que usualmente se utilizan en la fabricación de electrodos. Entre los materiales más utilizados se encuentra el grafito, junto con otros que han sido utilizados en diferentes aproximaciones en el tema.

Son muchas las tecnologías que han cobrado protagonismo a partir de los distintos descubrimientos de la electroquímica microbiana en los últimos años [3, 4] y según sea el grado de interacción entre los microorganismos y los electrodos, éstas se dividen en primarias y secundarias. Las primarias abarcan procesos bioelectroquímicos directos como la transferencia extracelular de electrones entre las células y el material; mientras que las secundarias involucran interacciones indirectas, como por ejemplo cambios en el ambiente microbiano (pH, concentración de metabolitos, etc) como resultado de las reacciones de electrodo. Las tecnologías primarias también suelen denominarse sistemas bioelectroquímicos, por *bioelectrochemical systems* (BES) y entre ellas las celdas de combustible microbianas por *microbial fuell cells* (MFC) han

sido las protagonistas durante los últimos años [3, 5, 6]. En la siguientes secciones, se introducirán algunos conceptos sobre estas tecnologías que resultan básicos e importantes para la comprensión de los distintos sistemas bioelectroquímicos, así como también sobre los procesos fisiológicos detrás del intercambio de electrones entre un electrodo y los microorganismos. Estos conceptos serán necesarios para comprender el desarrollo de esta tesis.

1.1. Descubrimiento y funcionamiento de los Sistemas Bioelectroquímicos

Las celdas de combustible microbianas funcionan convirtiendo la energía que se encuentra biodisponible en sustratos orgánicos solubles en energía eléctrica gracias a la acción de microorganismos ubicados en uno o los dos compartimentos de la celda: el ánodo, en el que se producen las reacciones de oxidación, y el cátodo, en el cual se llevan a cabo las reacciones de reducción. Estos compartimientos se encuentran conectados eléctricamente por una resistencia o por un circuito externo que consume corriente eléctrica y están separados entre sí por una membrana semipermeable de intercambio iónico (Fig 1-1A) [7].

A diferencia de las celdas de combustible abioticas, en las cuales se utilizan por ejemplo catalizadores costosos como el platino o el oro para promover las reacciones electroquímicas, en las MFC estas reacciones son catalizadas por microorganismos y pueden ser operadas a temperatura ambiente o adaptadas a cualquier temperatura que éstos necesiten [5]. Cuando se utilizan microorganismos electrogénicos¹ en el ánodo de una MFC, los electrones obtenidos a partir de la oxidación de compuestos orgánicos o inorgánicos, son drenados hacia un electrodo polarizado que hace las veces de un aceptor terminal de electrones natural para las células. Los electrones viajan a través del circuito externo hacia el cátodo, en el que usualmente se reduce oxígeno (O_2), completando así el proceso y generando una corriente eléctrica [6].

¹Que presentan la capacidad de intercambiar electrones con un electrodo.

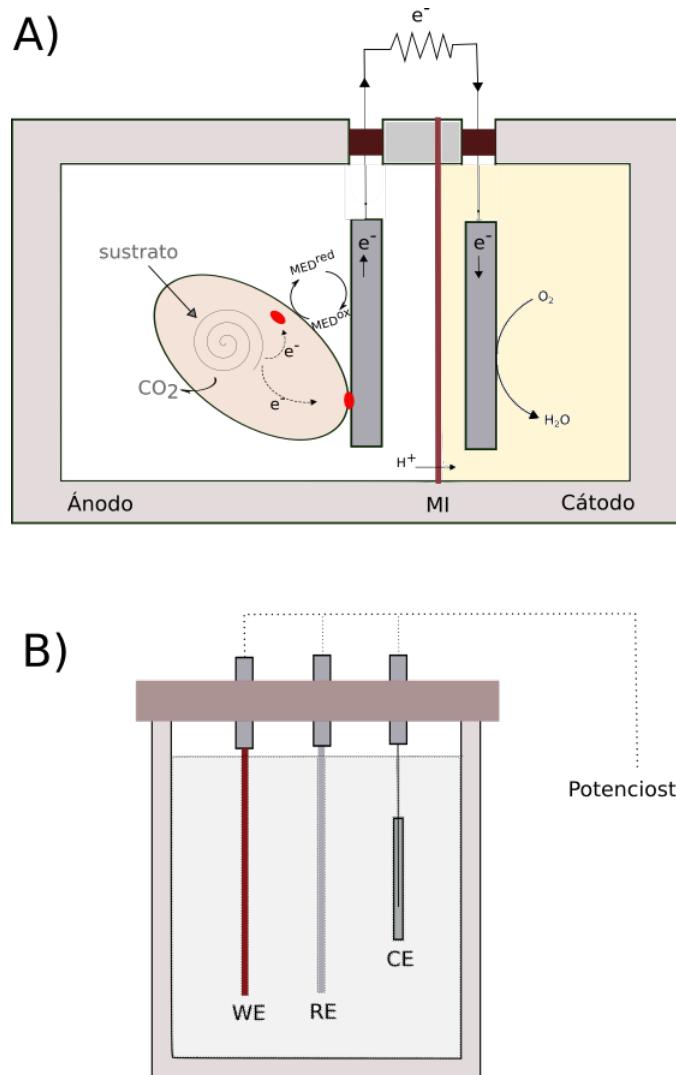


Figura 1-1: Esquema simplificado de sistemas bioelectroquímicos. A) Celda de combustible microbiana clásica. El sistema se divide en dos compartimentos separados por una membrana de intercambio iónico. En el ánodo ocurren las reacciones de oxidación donde las bacterias electrogénicas pueden llevar a cabo la biocatálisis de estas reacciones mediante la transferencia directa o indirecta de electrones al electrodo. Los electrones viajan del ánodo hacia el cátodo, a través de una resistencia. En el cátodo se producen las reacciones de reducción, clásicamente mediante la reducción de oxígeno a agua. B) Reactor electroquímico de 3 electrodos. Sistema de un solo compartimento en el cual un electrodo de trabajo (WE) es polarizado como ánodo (positivo) o como cátodo (negativo) respecto de un electrodo de referencia (RE) de potencial fijo. Para lograr la polarización el potenciómetro hace circular una corriente entre el WE y el contra electrodo (CE) cerrando así el circuito. Figura adaptada de [7].

Aunque el mayor número de investigaciones sobre estos sistemas surgieron a partir del año 2001, cuando Reimers y col. lograron obtener energía eléctrica a partir de la materia orgánica en sedimentos marinos de manera sostenida en el tiempo [8], las MFC son en realidad una tecnología mucho más vieja. El concepto de utilizar microorganismos para obtener una corriente eléctrica, por ejemplo de *Escherichia coli*, se implementó en 1911 [9]. Pero la investigación sobre estos sistemas pasó a una nueva era cuando se presentó la primera MFC capaz de obtener energía eléctrica sin la necesidad de incorporar mediadores artificiales para la transferencia de electrones entre los microorganismos y los electrodos [10].

Existen distintas configuraciones de los sistemas bioelectroquímicos según sea el objetivo que se quiera alcanzar. Muchos estudios se basan en los llamados sistemas de tres electrodos que consisten, a diferencia de una MFC, en una celda única que contiene un electrodo de trabajo (WE), un contra electrodo (CE) y un electrodo de referencia (RE) controlados por un potenciómetro² (Fig. 1-1B). Este sistema permite utilizar el electrodo de trabajo como ánodo o como cátodo según sea el potencial impuesto.

1.2. Mecanismos de transferencia extracelular de electrones

A medida que se llevan a cabo las funciones vitales de las células, la oxidación de ciertos sustratos puede ocasionar un desbalance en el estado de óxido-reducción que perjudique a las funciones celulares. Es por ello, que la presencia de aceptores electrónicos solubles en la naturaleza que puedan ser internalizados en las células es esencial [5]. En condiciones aeróbicas el oxígeno es el acceptor preferido dado su alto potencial de reducción. Por otro lado, en condiciones anaeróbicas, algunas bacterias son capaces de llevar a cabo la respiración (reducción) de otros compuestos solubles

²Dispositivo electrónico utilizado para controlar un celda de tres electrodos y ejecutar experimentos electroanalíticos. El sistema funciona manteniendo el potencial del electrodo de trabajo a un nivel constante con respecto al potencial del electrodo de referencia, mediante el ajuste de la corriente en un electrodo auxiliar.

como nitratos o sulfatos, o insolubles como los óxidos de hierro ferroso (Fe^{+3}) o de manganeso (Mn^{+4}). Por ser sólidos, tanto los compuestos de Fe^{+3} como los de Mn^{+4} son los análogos más similares a un electrodo que podemos encontrar en la naturaleza y usualmente se dice que una bacteria es capaz de respirar estos minerales al utilizarlos como aceptores electrónicos [5]. A estos microorganismos se los denomina exoelectrógenos por su capacidad de exportar los electrones hacia estos compuestos, los cuales no pueden ingresar al interior celular. De la misma manera, hoy se sabe que existen bacterias capaces de aceptar electrones de compuestos sólidos externos e incluso de electrodos, utilizando mecanismos que aún se encuentran bajo estudio.

En un sentido o en el otro, la transferencia de electrones puede darse de manera indirecta o directa. En el primer caso los microorganismos producen compuestos que actúan como mediadores electrónicos, como quinonas, flavinas o fenazinas, que se liberan al exterior celular para que interactúen con el dador o el aceptor de electrones [5]. Newman y Kolter (2000) describieron por primera vez este concepto mediante el análisis de mutantes de *Shewanella oneidensis*, una bacteria electrogénica gram negativa, y propusieron que la producción y liberación de quinonas hacia el medio extracelular le permitía respirar (reducir) óxidos de Fe^{+3} [11].

Las bacterias que llevan a cabo una transferencia directa necesitan ponerse en contacto con el dador-aceptor. Esta capacidad ha sido ampliamente estudiada en la familia *Geobacteraceae*, particularmente *Geobacter sulfurreducens*, que junto con *Shewanella oneidiensis*, han sido las especies modelos en el estudio de transferencia directa de electrones hacia un electrodo.

El detalle de la transferencia extracelular de electrones en estas especies ha sido foco de discusión durante varios años, dado que poseen distintos componentes redox involucrados en el proceso: como los citocromos del tipo c y los pili³. En 2016, nuestro grupo presentó un modelo de red de transmisión o *relay network* en el cual tanto los citocromos como el pili están involucrados en el transporte de electrones a largas dis-

³Apéndice en forma de pelo que se encuentra en la superficie de muchas bacterias, y les permite establecer contacto y/o intercambiar información genética con el exterior. ~~En lo que a la bioelectroquímica respecta, el *pilus* (singular del pili) representa una especie de fibra semiconductora que provee condiciones equipotenciales entre puntos físicamente distantes[12].~~

tancias dentro de la matriz extracelular de, por ejemplo, un *biofilm* sobre un electrodo [12].

La existencia de distintos mecanismos de transferencia de electrones resulta lógica cuando se analizan los nichos donde habitan estos microorganismos. Varios miembros del género *Geobacter*, por ejemplo, han sido aislados de cuerpos de agua o sedimentos de ambientes prístinos, así como de diferentes acuíferos. Estos microorganismos mantienen como característica común la anaerobiosis, y por ende, cierto grado de estabilidad en cuanto al pH, la salinidad y la temperatura [13]. En cuanto a los sustratos orgánicos que utilizan las distintas especies de *Geobacter*, existe una gran preferencia por el acetato restringiendo así la variabilidad en la actividad metabólica, por lo cual el nicho ecológico del género se encuentra acotado [13]. Por otro lado, miembros de la familia *Shewanellaceae* son capaces de metabolizar una gran variedad de sustratos y mantener distintas vías metabólicas activas, incluso a muy bajas temperaturas y en presencia de oxígeno, el cual también pueden utilizar como acceptor de electrones. Es por ello que estas bacterias traen aparejada la capacidad de respirar aeróbica o anaeróticamente gran variedad de sustratos, lo cual explica su amplia distribución en diferentes estratos químicos y del ambiente [14].

La relación costo-beneficio de ambas estrategias de transferencia de electrones también resulta interesante ya que, por un lado, la producción de mediadores y su excreción al medio extracelular es costosa aunque le permite a *S. oneidensis* alcanzar aceptores electrónicos sin la necesidad de entrar en contacto con ellos. Sin embargo, estas moléculas también pueden ser utilizadas por otros microorganismos, por lo que además deben invertir energía en tener una tasa alta de división y así aumentar significativamente el número de células respecto de otras especies. La expresión de distintas vías metabólicas también resulta costosa pero le permite a estas bacterias actuar de manera inmediata en función de cambios repentinos en el ambiente [13]. Cabe destacar que *S. oneidiensis* presenta además la posibilidad de establecer un intercambio directo de electrones. Los miembros de la familia *Geobacteraceae* por otro lado, no expresan vías relacionadas a un metabolismo aerobio como por ejemplo la glicólisis, limitación que balancean al no presentar una gran demanda energética,

aumentando su actividad sólo en los casos en que el sustrato preferido está disponible. Esto se debe a su capacidad de almacenar carga en la gran batería de citocromos periplasmáticos que posee [15, 16, 17], lo cual les permite metabolizar rápidamente el acetato aunque éste no se necesite, otorgándole así una ventaja frente a otros oxidadores de acetato.

A raíz del descubrimiento de la electrogenia en estas bacterias, surgieron distintas preguntas como por ejemplo, si estas estrategias han sido adoptadas por más microorganismos, o si además de interactuar con los electrodos podían interactuar entre sí. Koch y Harnish (2016) han hecho una revisión de gran cantidad de bibliografía y observaron que la capacidad de transferir electrones a un ánodo está distribuida por casi todos los phyla analizados (excepto Euryarcheota y Bacteriodetes) y que la capacidad de tomar electrones de un electrodo también se encuentra bien distribuida aunque ausente o no suficientemente descripta en Cyanobacteria, Acidobacteria y Deferribacteres [13].

Por otra parte, Lovley y col. (2011) describieron el intercambio de electrones directo entre especies (DIET), que amplía el espectro de posibilidades de utilización de las bacterias electroactivas a infinidad de aplicaciones [18].

1.3. ¿Por qué estudiar la incorporación de microorganismos fotosintéticos en sistemas bioelectroquímicos?

Como se mencionó anteriormente, los sistemas bioelectroquímicos se basan en la incorporación de bacterias electrogénicas, en la mayoría de los casos, en el ánodo. Sin embargo, las eficiencias que suelen obtenerse están muy por debajo de los máximos hipotéticos calculados [19] principalmente debido a la derivación de los electrones intercambiados hacia distintos procesos metabólicos que no se encuentran directamente relacionados con la producción de corriente como por ejemplo, las fermentaciones [20, 21]. Una de las estrategias que se ha comenzado a investigar hace algunos años es la incorporación de microorganismos fotosintéticos tanto en el ánodo como en el cátodo buscando generar sistemas fotovoltaicos biológicos [22, 23].

Entre los años 2000 y 2010 comenzó una carrera por el desarrollo de energías sustentables y, con ello, aquellas tecnologías dependientes de la luz solar ganaron gran interés [22]. Además de la generación de bioelectricidad a partir de la luz, un beneficio adicional de los sistemas bioelectroquímicos que incluyen organismos fotosintéticos es que el dióxido de carbono (CO_2) atmosférico se incorporaría y fijaría en la biomasa, pudiendo llegar al extremo de generar sistemas electroquímicos carbono negativos. En bibliografía se pueden encontrar distintas configuraciones de estos sistemas (Fig. 1-2), a veces llamados photoceldas biológicas, en las que la incorporación de estos microorganismos se puede dar en el ánodo o en el cátodo.

En el primer caso, en el que se introducen microorganismos fotosintéticos en el ánodo (Fig. 1-2, A - D), la transferencia de electrones puede darse, al igual que con los microorganismos heterótrofos, de manera directa o indirecta mediante el agregado de mediadores artificiales (Fig. 1-2 A). Otras opciones contemplan la producción de hidrógeno para su oxidación en el electrodo (Fig. 1-2 B) o la relación sinérgica con bacterias heterótrofas (Fig. 1-2 D) [22]. En la figura 1-2 A-C se observan los casos en los que se fomenta la reacción anódica (producción de electrones) por los

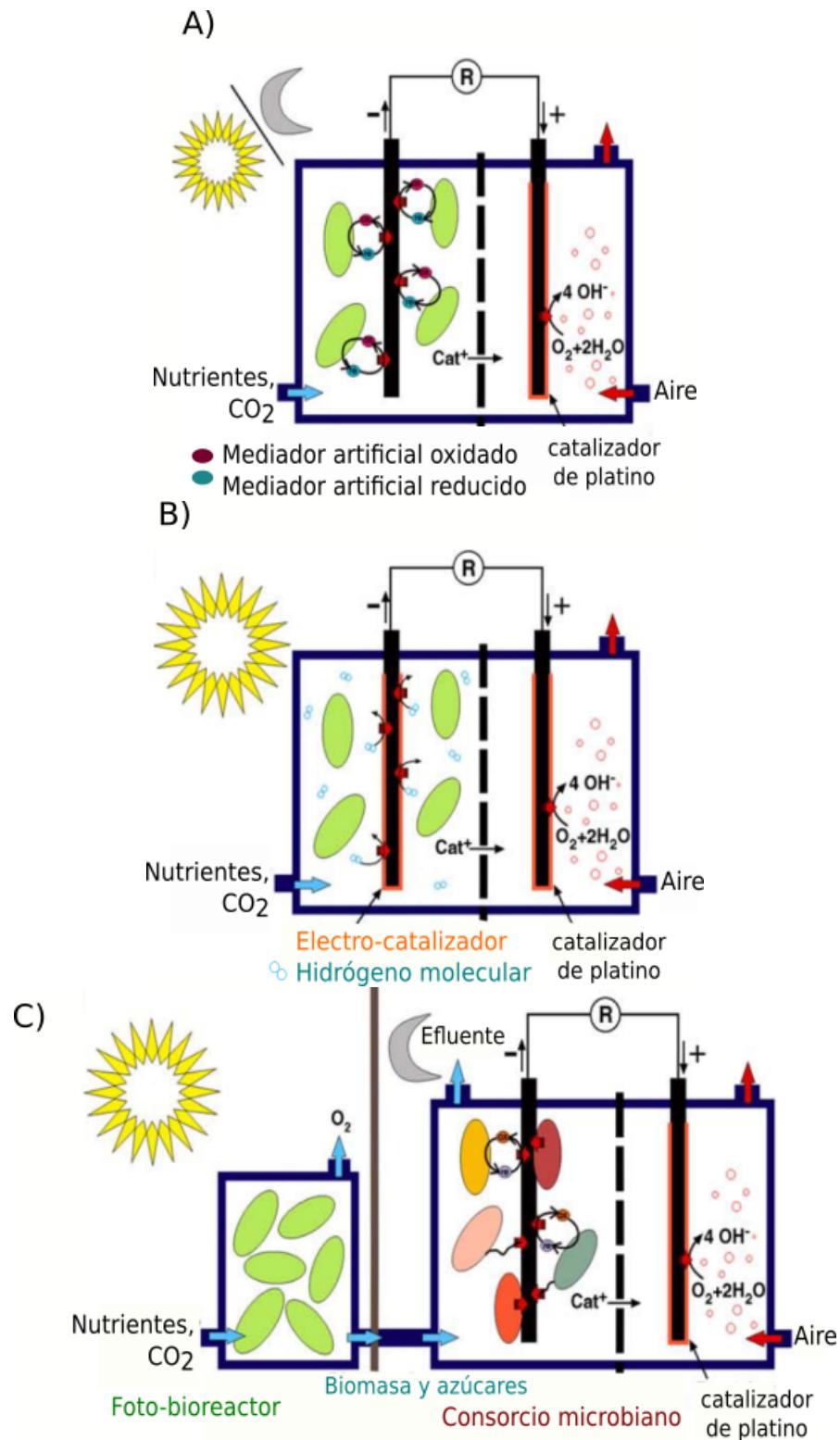
microorganismos para optimizar la producción de corriente, a la vez que se fija el CO₂ en biomasa que luego puede ser utilizado para otros procesos tecnológicos. Por otro lado, las figuras 1-2 D y E muestran sistemas electroquímicos en los que se incorporan microorganismos fotosintéticos en el cátodo. Mientras que en el panel D se presenta un sistema con el objetivo de aprovechar los compuestos reducidos presentes en los sedimentos (Fig. 1-2 D), en el panel E el anolito se encuentra controlado por lo que, además del beneficio de producir corriente, este sistema se puede utilizar para limpiar aguas residuales (1-2 E).

En un primer período de investigación en torno a las photoceldas biológicas (1985 - 2000), se utilizaron distintas especies de cianobacterias como biocatalizadores de las reacciones del ánodo, mediante el uso de mediadores artificiales que transfirieran los electrones desde los microorganismos hacia el electrodo [24, 25, 26] (Fig. 1-2 A). Estos estudios demostraron que la energía recuperada en el sistema bioelectroquímico se debía en realidad, a la oxidación de compuestos orgánicos durante la fase oscura, mientras que en los períodos de luz la eficiencia de la photocelda disminuía [24]. Por otro lado, el agregado de mediadores artificiales implicaba un desarrollo no sustentable y poco amigable con el medioambiente y es por ello que estas primeras photoceldas biológicas no prosperaron. Otra aproximación de obtención de energía mediante transferencia indirecta de electrones en el ánodo, fue el uso de microorganismos fotosintéticos productores de H₂ [27, 28]. En este caso, el H₂ producido fotosintéticamente era oxidado *in situ* generando energía.

El estudio de sistemas que se valgan de las relaciones sinérgicas entre organismos fotosintéticos y bacterias electrogénicas también ha cobrado protagonismo en los últimos años (Fig. 1-2 C-D). En el marco de estas tecnologías se pueden encontrar distintas combinaciones como por ejemplo, microorganismos fotosintéticos en conjunto con bacterias heterótrofas en sedimentos (Fig. 1-2 D); o cultivos *ex situ* de organismos fotosintéticos utilizados para alimentar celdas de combustible contenido bacterias heterótrofas para la generación de energía (Fig. 1-2 C) [22].

Por último, la incorporación de organismos fotosintéticos oxigénicos en el cátodo también ha sido ampliamente estudiada en los últimos años. Esto se debe a que el

oxígeno generado como producto de la fotosíntesis actúa como un aceptor natural de electrones, evitando aquellas aproximaciones costosas que utilizan aireación mecánica. En este último caso, se utilizan además catalizadores de platino, lo que atenta contra el desarrollo de la tecnología por su elevado costo.



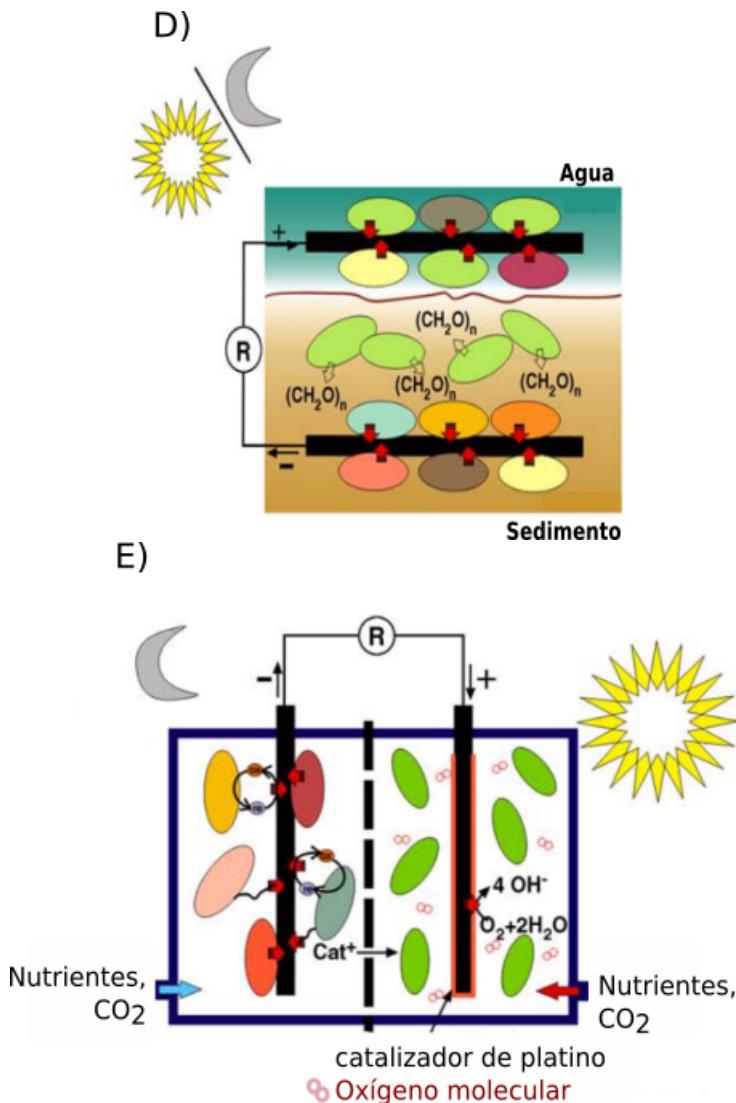


Figura 1-2: Distintas configuraciones de sistemas bioelectroquímicos que incorporan microorganismos fotosintéticos. A) Cianobacterias incorporadas al ánodo de una MFC junto con un mediador artificial y cátodo abiótico. B) Microorganismos fotosintéticos productores de hidrógeno molecular como mediador natural de electrones en el ánodo de una MFC y cátodo abiótico. C) Consorcio microbiano contenido en bacterias electrogénicas en el ánodo, alimentado por un fotobioreactor externo. Cátodo abiótico. D) Microorganismos fotosintéticos en conjunto con bacterias heterótrofas en sedimentos. E) Microorganismos fotosintéticos productores de oxígeno molecular incorporados al cátodo de una MFC, con bacterias electrogénicas en el ánodo. El sol representa reacciones que se llevan a cabo bajo condiciones de luz, y la luna aquellas en condiciones de oscuridad. El símbolo sol/luna representa aquellas dependientes de ciclos luz:oscuridad. R, resistencia. Los símbolos - y + representan la dirección de flujo de los electrones desde el ánodo hacia el cátodo. Figura adaptada de [22].

En esta tesis, se abordará un estudio electroquímico fundamental de dos tipos de microorganismos fotosintéticos en sistemas bioelectroquímicos. Por un lado, en el capítulo 2 se presentarán los resultados correspondientes a la interrogación electroquímica, tanto anódica como catódica, de *Rhodopseudomonas palustris* una bacteria fotosintética anoxigénica capaz de usar distintos dadores y aceptores de electrones. Este estudio se complementará en el capítulo 3 con un análisis genómico de la misma buscando identificar determinantes genéticos vinculados a la actividad electrogénica. Por otro lado, en el capítulo 4 se hará lo propio con la microalga *Scenedesmus dimorphus* y se explorará su utilización en el cátodo de un sistema bioelectroquímico, en un esfuerzo por utilizar el conocimiento básico obtenido en la optimización de las tecnologías bioelectroquímicas que actualmente se desarrollan en el grupo de trabajo.



en estas páginas en blanco
que te quedan antes de los
capítulos podrías pegar
alguna foto que tenga que
ver con lo que sigue.
Puede ser científica o
incluso personal, tuya en el
lab o tuya con el grupo.

Capítulo 2

Caracterización electroquímica de la bacteria fotosintética

Rhodopseudomonas palustris

2.1. Introducción

2.1.1. Características generales de las bacterias fotosintéticas

Los organismos fotótrofos se definen por su capacidad de transformar la energía lumínica en energía química aprovechable para las funciones metabólicas y para su crecimiento. Existen dos clases de microorganismos fotosintéticos: los oxigénicos, que oxidan el agua y como producto evolucionan oxígeno (O_2) y los anoxigénicos, que oxidan un compuesto diferente al agua y transfieren los electrones a un centro de reacción (CR) sin producir oxígeno. En ambos casos, la transferencia de estos electrones genera una fuerza protón motriz (FPM) que se utiliza para la producción de adenosil tri-fosfato (ATP) [29] .

Dentro del grupo de los fotosintéticos anoxigénicos se encuentran las bacterias pertenecientes a Acidobacteria, Heliobacteria, bacterias verdes sulfurosas y las bacterias púrpuras (sulfurosas y no sulfurosas) [29]. Estas últimas son un grupo ampliamente distribuido en ambientes tanto terrestres como acuáticos y pueden encontrarse tanto

en cuerpos de agua dulce, como en ambientes marinos o incluso hipersalinos expuestos a la luz. Su característica más notable es la capacidad de crecer en condiciones fotoautótrofas y/o fotoheterótrofas. Los pigmentos mayoritarios que presenta este grupo son la bacterioclorofila a y b y varios carotenoides, que se encuentran localizados junto con otros componentes fotosintéticos en un sistema de membranas internas que se originan a partir de la membrana citoplasmática. Estas membranas intracelulares consisten en pequeñas intrusiones, vesículas, túbulos o lamelas paralelas o en ángulo, respecto de la membrana citoplasmática y contienen los CR, antenas colectoras de luz (LH, del inglés *light harvesting*) y demás componentes del aparato fotosintético [29].

La fotosíntesis anoxigénica en las bacterias púrpuras se da en condiciones anóxicas o deficientes de oxígeno, ya que éste reprime la síntesis de pigmentos y formación del aparato fotosintético. Es por ello que estas bacterias viven preferencialmente en ambientes acuáticos con gran cantidad de material orgánico soluble, baja tensión de oxígeno y temperatura moderada [30]. Participan en el ciclado anóxico de carbono como productores primarios (fijación de dióxido de carbono (CO_2) y fotoautotrofia) y como consumidores primarios de compuestos reducidos (photoheterotrofia). En ambientes sulfídricos y con llegada de luz, estas bacterias también cumplen un rol importante ya que oxidan sulfuros, permitiendo que las zonas superiores en la columna de agua se mantengan libres de altas concentraciones de estos compuestos y óxidas, de manera de que puedan subsistir plantas, animales y otras bacterias aeróbicas [31].

En lo que respecta a la clasificación se distinguen dos subgrupos, las bacterias púrpuras sulfuroosas y las no-sulfuroosas, basada originalmente en la tolerancia de las especies frente al azufre. Mientras que las primeras incluían especies que toleraban concentraciones milimolares de este compuesto al oxidarlo a glóbulos de azufre almacenados intracelularmente, las no-sulfuroosas no eran capaces de llevar a cabo esta oxidación [32, 33]. Años más tarde, Hansen y van Gemerden (1972) demostraron que este criterio de clasificación no era absoluto, sino que a bajas concentraciones (menos de 0,5 mM) la mayoría de las especies no-sulfuroosas eran capaces de oxidar sulfuro a azufre elemental, ditionato o sulfato. A diferencia de las sulfuroosas, estas bacte-

rias no eran capaces de almacenar estos compuestos intracelularmente sino que eran depositados en el exterior [34].

Distintos análisis filogenéticos basados en el gen 16S muestran que las bacterias púrpuras sulfuroosas incluyen especies del grupo de las γ -proteobacterias, mientras que las no-sulfuroosas son α y β -proteobacterias [30]. Se conocen unos 25 géneros de bacterias sulfuroosas y aproximadamente unos 20 de no-sulfuroosas. Dentro de las α -proteobacterias se pueden reconocer tres órdenes: Rhodospirillales, Rhodobacterales y Rhizobiales, los cuales incluyen especies que han sido ampliamente estudiadas dada su versatilidad metabólica y facilidad de cultivo en laboratorio, como por ejemplo *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus* y *Rhodopseudomonas palustris*.

De aquí en adelante, se describirán características generales de *R. palustris* para poder comprender el análisis electroquímico llevado a cabo con esta especie para esta sección. En ciertos casos, se compararán y/o generalizarán algunos atributos de *R. palustris* con *R. sphaeroides*, ya que son dos especies modelo que comparten varias aptitudes metabólicas.

2.1.2. Fotosíntesis anoxigénica

El aparato fotosintético se encuentra en una invaginación de la membrana citoplasmática llamada membrana intracitoplasmática, en la que se localiza el CR formado por tres polipéptidos que unen pigmentos (bacterioclorofila, bacteriofeyofitina y carotenos), citocromos del tipo c y quinonas (Q) (Fig. 2-1).

La transferencia de electrones comienza cuando la luz es absorbida por la bacterioclorofila a (P870) en la antena, en la que se encuentran los componentes colectores de energía. La energía es luego transferida al CR, el cual adopta un potencial muy electronegativo (-1 V contra el electrodo normal de hidrógeno (SHE)), provocando la reducción de una bacterioclorofila dentro del mismo. Una vez reducida esta molécula, el electrón es transferido a una bacteriofeyofitina y luego a una Q. Todos estos procesos se llevan a cabo en la membrana (Fig. 2-1 A). La transferencia de energía en el CR ocurre de forma muy rápida, durando una billonésima de segundo, mientras que las reacciones *a posteriori* son más lentas, en el orden de los micro o milisegundos.

El electrón proveniente del CR se combina con un protón (H^+) proveniente del lado citoplasmático formando un átomo de hidrógeno (H_2). La Q adiciona dos átomos de H_2 formando una hidroquinona (QH_2), la cual transfiere los electrones al citocromo bc1. Finalmente, estos electrones regresan al CR gracias a la participación de un citocromo periplasmático del tipo c. En este punto, los electrones han completado el flujo cíclico (Fig. 2-1).

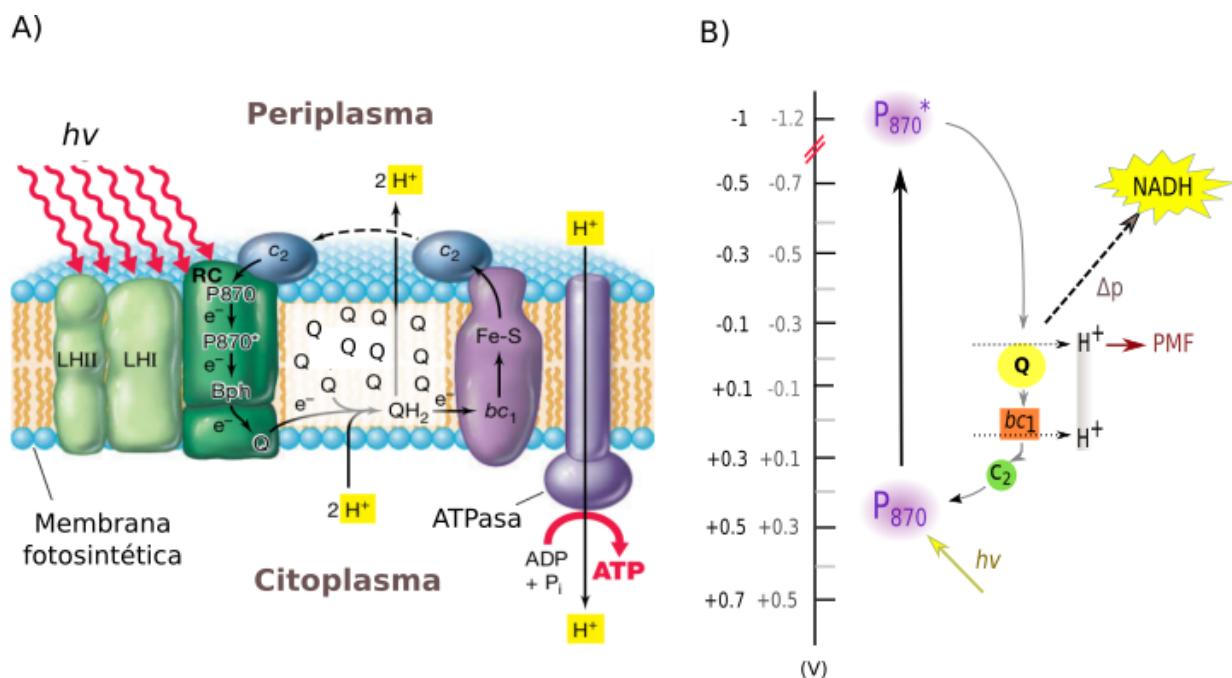


Figura 2-1: Fotosíntesis anoxigénica en bacterias púrpuras. A) Arreglo de los complejos proteicos en el centro de reacción (CR) en bacterias púrpuras. B) Flujo de electrones durante la fotosíntesis anoxigénica. Los potenciales redox se presentan en función del electrodo normal de hidrógeno (SHE) en color negro y del electrodo Ag/AgCl (utilizado en esta tesis) en color gris. $h\nu$, luz. LH, antenas colectoras de luz. P_{870}^* , bacterioclorofila (excitada*). Bph, bacteriofóorfina. Q, quinona. QH_2 , quinona reducida. H^+ , protón. c_2 , citocromo c_2 . bc_1 , complejo bc_1 .

El ATP se sintetiza durante el flujo de electrones gracias a la actividad ATPasa que acopla la FPM generada con la formación de ATP. Este mecanismo se denomina fotofosforilación cíclica ya que los electrones circulan en un *loop* cerrado [29].

En el caso de un metabolismo fotoautótrofo, el ATP sintetizado por la fotofosforilación cíclica no es suficiente para el crecimiento ya que se necesita poder reductor (NADH o NADPH) para que se lleven a cabo las reacciones de reducción de CO_2 .

Es así, que en estas condiciones las bacterias púrpuras obtienen el poder reductor a partir de la oxidación de distintos dadores inorgánicos, entre ellos: hierro ferroso (Fe^{+2}), sulfuro de hidrógeno (H_2S), azufre (S), tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$), arsenito (AsO_3^{-2}), nitrito (NO_2^-). Los electrones provenientes de estas oxidaciones contribuyen al *pool* de Q reducido que se encuentra en la membrana fotosintética, en la que la enzima ubiquinol NAD⁺ óxido-reductasa cataliza la reducción de NAD⁺ a NADH a partir de los H⁺ del *pool* de Q (Fig. 2-1 B). A este proceso se lo denomina flujo reverso de electrones y requiere de energía la cual proviene de la FPM [35].

2.1.3. Metabolismo

La gran versatilidad de esta bacteria le permite crecer bajo cualquiera de los cuatro tipos principales de metabolismo: fotoautótrofo, fotoheterótrofo, quimioautótrofo y quimioheterótrofo [36]. A continuación, se describirán los distintos metabolismos que esta especie puede llevar a cabo haciendo foco en las condiciones que podrían estar relacionadas con la posible electroactividad ³ de la especie.

Metabolismo fotótrofo

Como se mencionó anteriormente, *R. palustris* es capaz de crecer fotosintéticamente en anaerobiosis tanto autotróficamente, obteniendo energía de la luz y el carbono a partir de la fijación de CO₂ como también de forma heterótrofa obteniendo el carbono de un compuesto orgánico.

En 1933, Muller realizó estudios acerca de la fisiología en bacterias púrpuras y planteó que debía haber alguna conexión entre los dos tipos de metabolismo autótrofo [37]. A partir de sus estudios, observó que estas bacterias eran capaces de oxidar un sustrato orgánico y estableció una relación entre el estado de oxidación del sustrato y la producción y/o fijación de CO₂, indicando que los procesos predominantes en el metabolismo eran asimilativos y que el compuesto carbonado era convertido casi en su totalidad a material celular. De esta manera, propuso que la fijación de CO₂

³Capacidad de conectarse eléctricamente con un electrodo o superficie conductora

era fundamental en el balance redox celular, siendo un proceso necesario para el crecimiento fotoheterótrofo [37]. Años más tarde, se comprobó que el crecimiento de estas bacterias podía llevarse a cabo fotoheteróficamente en ausencia de CO₂, sólo si se daban las condiciones para la fijación de nitrógeno (y consecuentemente, la evolución de hidrógeno) o si otros aceptores alternativos, como el di-metil sulfóxido (DMSO) eran agregados en el medio de cultivo [38, 39]. Más tarde se comprendió que estos últimos son procesos que, al igual que la fijación de CO₂, permiten disipar el exceso de electrones (cofactores reducidos) y mantener el balance redox celular [40].

La fijación de CO₂ es el mecanismo central de balance redox durante el crecimiento fotoheterótrofo

El ciclo de Calvin Benson Bassham (CBB) es el principal mecanismo mediante el cual las bacterias púrpuras pueden fijar moléculas de CO₂, siendo de vital importancia para la biosíntesis de precursores y por ende, para el crecimiento celular. Al ser organismos preferentemente fotoheterótrofos, utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono y la oxidación de los mismos deja como resultado un gran exceso de cofactores reducidos (como el NADH), obligando a la célula a mantener un balance del estado redox [41]. Este balance se da principalmente por el ciclo CBB y depende del estado de oxidación del sustrato utilizado. Esto último quiere decir que, en función del punto de entrada del sustrato en el metabolismo (su estado de oxidación) y por ende, la ruta utilizada para la biosíntesis de precursores, se generarán una mayor o menor cantidad de moléculas reducidas y por lo tanto, el balance por medio del ciclo CBB variará según el sustrato [42].

En el caso de *R. palustris*, el ejemplo es claro cuando se analiza un sustrato como el acetato. Esta especie, a diferencia de otras bacterias púrpuras no-sulfuroosas, metaboliza el acetato por el ciclo del glioxitato [36, 43] el cual es una variante del ciclo de ácidos tricarboxílicos en el que se produce un *by-pass* de las reacciones de descarboxilación. Este mecanismo permite el crecimiento en acetato como única fuente de carbono, lo cual resultaría insostenible ya que este sustrato no permite la reposición de intermediarios del TCA por reacciones anapleróticas [41]. Durante el ciclo, se

sintetiza malato a partir de 2 moléculas de acetil-CoA utilizando la isocitrato-liasa y malato-sintasa (enzimas exclusivas del ciclo del glioxilato), junto con otras enzimas del TCA [43] (Fig. 2-2).

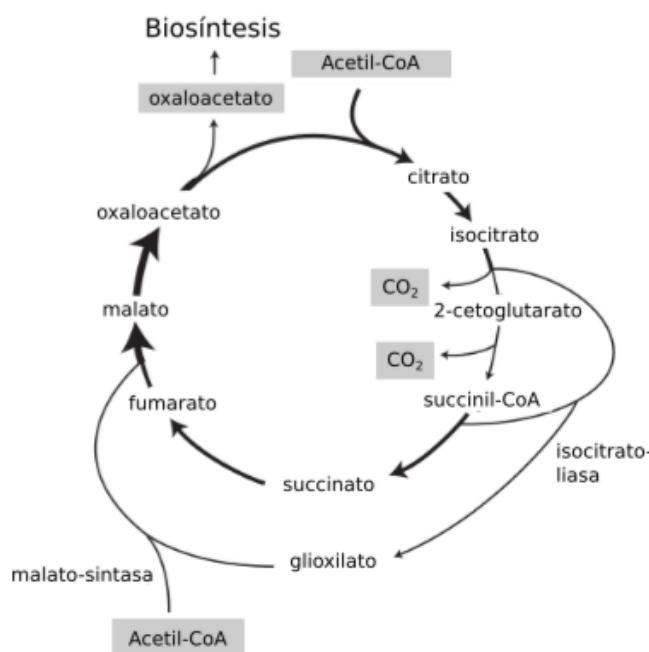


Figura 2-2: Ciclo del glioxilato. Las enzimas isocitrato liasa y malato sintasa, características de este proceso, junto con las enzimas del TCA permiten metabolizar el Acetil-CoA a malato a partir del acetato. Adaptado de [41].

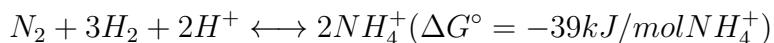
A diferencia de otros sustratos, el acetato en la célula se convierte directamente a acetil-CoA (principal precursor para la biosíntesis), el cual entra al ciclo del glioxilato. El succinato por ejemplo, es metabolizado vía TCA siendo descarboxilado dos veces para producir acetil-CoA, perdiendo así tres veces más C en forma de CO₂, el cual podría ser utilizado para biosíntesis [42]. En el caso de compuestos cuyo punto de entrada en el metabolismo son similares, como el succinato y fumarato, el balance redox vía CBB refleja mejor su similitud en los estados de oxidación [42].

A partir de análisis del flujo metabólico por C¹³ marcado, se determinó que durante la oxidación del acetato, se producen aproximadamente el doble de cofactores

reducidos que los necesarios para la biosíntesis y que es el ciclo de CBB quien juega un rol central, aceptando el exceso de electrones y permitiendo así el reciclado de estos cofactores [40]. De esta forma, el ciclo de CBB no sólo cumple un papel fundamental en el metabolismo fotoautótrofo de esta bacteria sino también en el metabolismo fotoheterótrofo (Fig. 2-3 A).

Fijación de nitrógeno y producción de hidrógeno

La fijación de nitrógeno también constituye un proceso importante para el balance redox durante el metabolismo fotoheterótrofo (Fig. 2-3 B) [38]. En condiciones de fijación de nitrógeno, esto es, en ausencia de amonio como fuente de N, *R. palustris* es capaz de fijar del N₂ atmosférico generando obligadamente H₂ y NH₃ [38]. Este último, es asimilado en forma de aminoácidos y nucleótidos. Si bien la reacción de reducción de nitrógeno a amonio es exergónica, se requiere una gran energía de activación debido a la estabilidad del triple enlace del N₂. En condiciones fisiológicas, los microorganismos logran esto gracias al consumo de ATP y la presencia de la enzima nitrogenasa, sin la cual esta reacción sólo podría ocurrir en condiciones de alta temperatura y presión [29].



El complejo nitrogenasa consta de dos proteínas: la di-nitrogenasa y la di-nitrogenasa reductasa, ambas contienen hierro, y la dinitrogenasa también contiene molibdeno. Para reducir el N₂, se requieren 6 electrones; sin embargo, la reacción total consume 8 electrones por molécula de N₂ fijada, 2 de los cuales se pierden como H₂.

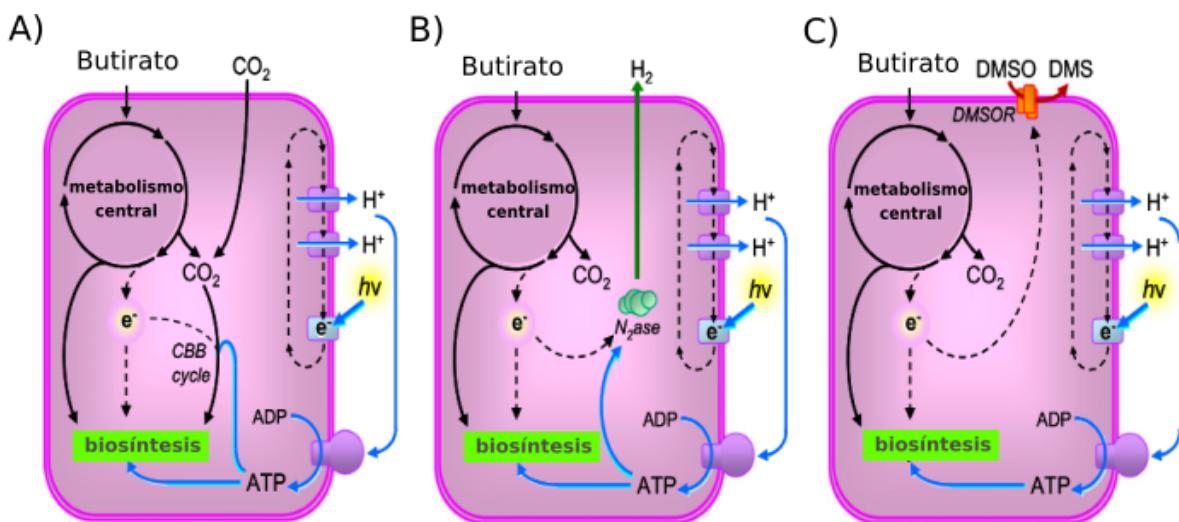


Figura 2-3: Estrategias de balance redox en bacterias púrpuras no-sulfurosas durante el crecimiento fotoheterótrofo. Durante el crecimiento fotótrofo utilizando butirato (fuente de carbono altamente reducida), el ATP se genera a partir de la fosforilación cíclica en la que los electrones son continuamente excitados por la luz, pero no se disponen a un acceptor final de electrones. Es por ello, que estas bacterias poseen otras estrategias de balance redox. Tres mecanismos están descriptos: A) fijación de CO₂ mediante el ciclo de Calvin, B) fijación de N₂ y consecuente evolución de H₂ y C) reducción de un acceptor de electrones como por ejemplo del DMSO, por la DMSO reductasa. Líneas continuas negras, metabolismo de carbono. Líneas continuas azules, metabolismo energético. Líneas punteadas, flujo de electrones. Figura adaptada de [40].

Bajo un metabolismo fotoheterótrofo, existe una competencia entre el ciclo CBB y la fijación de nitrógeno en lo que se refiere al mantenimiento del balance redox, siendo CBB el mecanismo principal o favorecido (Fig. 2-3 A y B) [40]. Cuando se mutan genes comprometidos en la fijación de CO₂, como la enzima RuBisCO, miembros de la familia Rhodospirillaceae son incapaces de crecer en sustratos como malato, succinato o acetato, excepto que se den las condiciones necesarias para la fijación de N₂ [44, 40]. McKinlay y Harwood (2010) observaron mediante análisis del flujo metabólico por C¹³, que los flujos a través del ciclo de Calvin disminuyen cuando las células de *R. palustris* producen hidrógeno [40]. Para ello, utilizaron la mutante nifA la cual expresa constitutivamente las nitrogenasas y por ende produce H₂ en presencia de amonio. De esta manera, compararon cepas productoras y no productoras (fenotipo salvaje) de hidrógeno bajo las mismas condiciones. Los autores observaron que el flujo de electrones que en el fenotipo salvaje es dirigido hacia el ciclo CBB, resulta en su

mayoría derivado hacia la producción de H₂ en la mutante NifA, aunque no se elimina el balance por CBB por completo [40]. Esto último sugiere que existiría un cuello de botella que previene el aumento de la tasa de producción de H₂ en la célula. En los casos en los que no sea posible la fijación de CO₂ ni la de N₂, otros procesos que lleven a la reducción de compuestos como el DMSO podrían jugar un papel importante en el balance redox celular (Fig. 2-3 C). Esto se describirá en las siguientes secciones.

Desde el punto de vista electroquímico, comprender la energética celular y los puntos de entrada y salida de electrones es indispensable. Como se mencionó anteriormente en la introducción general, los microorganismos pueden conectarse de dos maneras con un electrodo: tomando electrones de un electrodo polarizado para ingresarlos al interior celular (cátodo), o exportando electrones producto de su metabolismo hacia el espacio extracelular utilizando el electrodo como acceptor (ánodo). En base a estas dos posibilidades, se detallan a continuación algunos procesos descriptos de toma o exportación de electrones en bacterias púrpuras, las cuales comparten gran parte de las funciones metabólicas a pesar de tratarse de otras especies diferentes a *R. palustris*.

Compuestos inorgánicos como fuente de poder reductor. Oxidación de Fe⁺²

Durante la fotosíntesis anoxigénica, las bacterias púrpuras llevan a cabo un transporte cíclico de electrones que genera una FPM a través de la membrana la cual permite la síntesis de ATP. Algunos de estos electrones, son desviados de ese ciclo hacia la NADH deshidrogenasa para formar poder reductor. Estos electrones deben reponerse y es aquí donde algunos dadores inorgánicos como el Fe⁺², ciertos compuestos reducidos del azufre o el H₂ juegan un papel importante.

Las bacterias que se han aislado con la capacidad de utilizar el hierro como fuente de electrones son filogenéticamente muy diversas, incluyendo miembros de las bacterias púrpuras sulfurosas, no sulfurosas y verdes del azufre. La oxidación de hierro no se restringe sólo a los fotótrofos, sino que las bacterias acidófilas o neutrófilas también pueden obtener energía del Fe⁺², ya sea acoplado a la reducción de O₂ (a pH bajos o neutro) o de NO₃ [45].

A partir del análisis del genoma de *R. palustris* cepa CGA009, se identificaron 24 receptores en la membrana externa relacionados a sideróforos y 7 TonB (proteínas de unión a sideróforos), lo cual sugiere que esta cepa utiliza diversos sideróforos para la adquisición de hierro ferroso [36]. A su vez, 7 factores sigma extracelulares se encuentran acoplados a la transcripción de receptores del tipo ferro-sideróforos, o se ubican próximos a los genes relacionados a la toma de Fe⁺², específicamente, genes de biosíntesis de sideróforos y un sistema de adquisición putativo que incluye proteínas con motivos de unión a hemo [36].

En 2005, Jiao y col. describieron una cepa de *R. palustris* (TIE-1) capaz de oxidar Fe⁺² e identificaron un operón esencial para llevar a cabo este proceso [46, 47]. Esta cepa es capaz de crecer foto-autotróficamente con Fe⁺², H₂ o tiosulfato como dadores electrónicos, o foto-heterótrofamente con diversos sustratos orgánicos. Los autores mostraron que la oxidación del hierro ferroso es óptima a pH 6,5 - 6,9 y que los productos pueden ser magnetita o goetita, dependiendo también del pH [46].

Se han aislado distintas especies de diversos ambientes y el mecanismo mediante el cual estas bacterias son capaces de oxidar hierro difiere entre ellas. En el caso de la cepa TIE-1, se identificó el operón PioABC (Pio, del inglés *phototrophic iron oxidation*), el cual contiene tres genes importantes para la oxidación de Fe⁺²: PioA, un citocromo deca-hemo que se encuentra posiblemente en periplasma, PioB que presenta un dominio putativo de una porina y pioC que codifica para una proteína hierro-azufre de alto potencial (HiPIP, del inglés *high potential iron-sulfur protein*) que se encuentra en periplasma [47]. Estas tres proteínas muestran gran similitud (98 %, 97 % y 100 %) en su secuencia con respecto a RPA0746, RPA0745 y RPA0744, de la cepa CGA009 de *R. palustris*, lo cual es consistente con las varias regiones conservadas que se han identificado entre estas dos cepas [45]. Tanto PioA como PioB presentan gran homología con MtrA y MtrB, respectivamente, que son proteínas involucradas en la reducción de Fe(III) de *S. oneidensis* MR-1 [45]. El mecanismo mediante el cual *R. palustris* oxida Fe(II) no está claro, ya que este proceso se puede dar intracelularmente luego del transporte del ión al periplasma, o extracelularmente si contase con una maquinaria en la membrana externa capaz de oxidar al Fe (II) y

realizar una transferencia de electrones hacia el *pool* de quinonas.

Respiración utilizando compuestos diferentes del oxígeno

Muchos miembros del grupo de bacterias púrpuras se caracterizan por su versatilidad respecto al metabolismo energético. Especies de *Rhodobacter* y *Rhodopseudomonas* pueden crecer aeróbicamente, fotosintéticamente y anaeróbicamente utilizando sustratos como por ejemplo óxidos de tri-metil-amina (TMAO) o DMSO como aceptores de electrones [48, 39]. Aunque el hecho de que esto se trate de un verdadero proceso respiratorio o no, todavía no está claro, estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente y se sabe que son reducidos a TMA y DMS por bacterias no fotosintéticas. Se ha demostrado además, que en estas bacterias el flujo de electrones hacia estos compuestos está acoplado a una translocación de protones y conservación de energía [48]. Algunos autores demostraron que *R. capsulatus* y especies relacionadas eran capaces de crecer en presencia de una fuente de carbono fermentable, en oscuridad y anaerobiosis, sólo ante el agregado de alguno de estos aceptores. Madigan y Gest (1978) finalmente sugirieron que durante la respiración anaeróbica de TMAO o DMSO se genera una FPM escasamente suficiente para alcanzar el umbral requerido para la síntesis de ATP por la ATPsintasa [49]. De esta manera, la reducción de estos compuestos podría contribuir a la energética celular por lo menos durante un transporte activo o movilidad y/o manteniendo un estado redox óptimo en condiciones anaeróbicas en ausencia de luz.

En lo que se refiere a metabolismo fotosintético, en principio la reducción de distintos aceptores finales no parecería ser funcionalmente importante. Sin embargo, Ferguson y col. (1987) propusieron hace ya varios años algunos roles posibles para la respiración anaeróbica de compuestos bajo condiciones fotoheterótrofas. Por un lado, la reducción de distintos aceptores electrónicos podría estar relacionada a una generación suplementaria de FPM en condiciones de luz limitante donde la magnitud de este proceso se vea comprometida [48]. Esta situación puede darse, por ejemplo, cuando un cultivo planctónico se encuentra en fase estacionaria y las células comienzan a “hacerse sombra”, como es el caso de *Rhodobacter capsulatus* AD2 que aumenta la

tasa de respiración de nitratos, lo cual contribuye a una mayor generación de FPM [50].

Otra posible forma de contribución de la respiración anaeróbica a la energética celular sería la de funcionar como sumidero del exceso de equivalentes reducidos producto del metabolismo heterótrofo. El crecimiento de *R. capsulatus* en condiciones anaeróbicas y fotótrofas por ejemplo, depende de la presencia de bicarbonato o algún acceptor electrónico auxiliar como el nitrato, óxido nitroso o DMSO (Fig. 2-3 C) [39, 42, 51]. Como último caso, la respiración anaeróbica de compuestos podría evitar que exista una sobre-reducción o sobre-oxidación de los componentes del transporte cíclico de electrones, lo cual restringe la tasa de flujo de electrones y por ende la síntesis de ATP, ayudando así a mantener un estado redox celular óptimo durante la fotosíntesis (Fig. 2-3 C) [52]. Moore y Kaplan (1994) propusieron que metales y/o metaloides podrían cumplir esta función, aceptando electrones y permitiendo el balance de co-factores redox de las células [53].

Si bien no hay sustento para pensar que *R. palustris* podría utilizar un electrodo como acceptor final de electrones para procesos respirativos, el hecho de que pueda disponer el exceso de electrones producto de la oxidación de compuestos orgánicos a un electrodo parecería factible.

2.1.4. Electroquímica de *R. palustris*

Como ya se mencionó, existen dos formas de caracterizar electroquímicamente a este especie: utilizando un electrodo como dador de electrones o como aceptor. En el primer caso, las células toman electrones de un electrodo y lo incorporan a su metabolismo, por ejemplo en condiciones foto-autótrofas, en las que no dispongan de un sustrato orgánico como dador. Bose y col. (2014) estudiaron la capacidad de ferrotrofia de la cepa TIE-1 oxidadora de hierro, mediante la toma de electrones de un electrodo polarizado al potencial del Fe^{+2} , registrando una corriente catódica máxima de 0.015 A m^{-2} [54]. El operón pioABC presente en esta cepa, se caracterizó como unidad responsable de este proceso. Unos años más tarde, se logró correlacionar la corriente catódica generada a partir de la toma de electrones de un electrodo en condiciones fotótrofas con un aumento en co-factores redox reducidos en el interior celular, que eran luego utilizados para la reducción de CO_2 , el principal sumidero del exceso de electrones en estas condiciones [55]. Mediante el uso de inhibidores, los autores concluyeron que los electrones provenientes del electrodo entran a la célula a través de componentes de la cadena de transporte de electrones fotosintética, que la FPM es necesaria para la toma de los mismos y que el complejo bc1 juega un rol importante en el flujo de electrones [55]. El uso de carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona y antimicina A, desacoplantes-inhibidores de la FPM y del citocromo bc1, respectivamente, generaron el paso de una corriente catódica a una anódica [55]. Esto último sugiere que la cepa TIE-1 utilizaría al electrodo para disipar el exceso de electrones cuando la cadena fotosintética se encuentra inhibida.

Por otro lado, se observó que la cepa DX-1 de *R. palustris* era capaz de transferir electrones hacia un electrodo y producir corriente [56]. Su capacidad electroactiva se exploró en el ánodo de una celda de combustible microbiana, en condiciones fotoheterótrofas y en oscuridad, con distintos sustratos orgánicos como dadores de electrones. Para ello se utilizaron dos tipos de electrodos para el compartimento anódico: papel de carbón o electrodos de grafito del tipo “cepillo”, los cuales poseen una superficie de contacto mucho mayor. Las densidades de potencia y corriente generadas con los

electrodos de mayor superficie (2720 mW m^{-2} , 0.099 A m^{-2}) son de las mayores registradas en un cultivo puro de microorganismos fotosintéticos, en el que el potencial del ánodo no es fijado por un potenciómetro [56]. Mediante el análisis voltamétrico, los autores identificaron dos picos de oxidación (-0,35 V y 0,27 V) y dos de reducción (-0,44V y -0,2 V) utilizando un electrodo de Ag/AgCl⁴ como referencia, los cuales adjudicaron a un proceso de transferencia directa de electrones desde el *biofilm* hacia el electrodo.

A pesar de tratarse de resultados interesantes desde el punto de vista de los procesos de transferencia extracelular de electrones, y del hecho que *R. palustris* es una especie de gran importancia dada su versatilidad metabólica, no se registraron en bibliografía más estudios sobre la inclusión de esta bacteria en sistemas electroquímicos, ni tampoco sobre las bases moleculares que pudieran servir para explicar estos resultados aislados.

Por esta razón, y teniendo en cuenta que se dispuso de una cepa de *R. palustris* de origen autóctono proveniente de una salina de altura de la provincia de Catamarca, se decidió ahondar en su estudio electroquímico y complementarlo con un análisis genómico, el cual será presentado en el capítulo 3.

⁴Tipo de electrodo de referencia utilizado en ensayos electroquímicos. Su potencial estándar contra SHE, utilizado para sentar las bases de la escala de potenciales redox, es aproximadamente +0.209 V

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Material biológico y condiciones de cultivo

Para el desarrollo de esta sección se utilizó la bacteria fotosintética *R. palustris* cepa AZUL, la cual fue aislada de una muestra de agua proveniente de la Laguna Azul, Catamarca, Argentina cedida gentilmente por la Dra. María Eugenia Farías (PROIMI - CONICET) [57]. Los cultivos se mantuvieron en condiciones fotoheterótrofas, en una incubadora operada a 30°C en un medio de cultivo estándar levemente modificado para favorecer el crecimiento electrogénico [58] y conteniendo: cloruro de potasio (KCl) 30 mM, bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 25 mM, cloruro de amonio (NH_4Cl) 9.3 mM, fosfato de sodio anhidro (NaHPO_4) 2.5 mM, vitaminas y minerales. Como sustrato orgánico se utilizó acetato de sodio en una concentración de 20 mM. Los medios de cultivo y el material utilizado se esterilizaron en autoclave (121°C, 20 minutos) y las condiciones anoxigénicas se mantuvieron por burbujeo de una mezcla de $\text{N}_2:\text{CO}_2$ (80:20) que a su vez permitió mantener un pH estable del medio de alrededor de 7.4. Para contribuir a la formación de los *biofilms*, los reactores se llenaron de medio y se inocularon a partir de un pre-cultivo para lograr una absorbancia a 600 nm (Abs_{600nm}) de 0.1. En los casos en los que se especifique en el medio, luego de 24 hs de operación en *batch*, se conectó una bomba peristáltica con el objetivo de suplementar con medio de cultivo fresco, a una tasa de dilución de 0.025 L h^{-1} .

2.2.2. Celda electroquímica

Para lograr el crecimiento electrogénico de los cultivos de *R. palustris* se utilizaron reactores electroquímicos de 3 electrodos, diseñados en nuestro laboratorio y fabricados en los talleres de INTEMA (Fig. 2-4). Éstos consistieron en una cámara capaz de contener hasta 160ml de medio de cultivo, con una tapa con agujeros a través de los cuales se introdujeron uno o más electrodos de trabajo (WE), el electrodo de referencia (RE) y el contra electrodo (CE). Este sistema contó además, con una entrada y una salida de medio de cultivo, permitiendo así operarlo tanto en *batch* como en

condiciones de flujo continuo (Fig. 2-4). La salida de medio también permitió la salida de gases, delimitando de esta manera la altura o nivel del líquido en el interior del reactor.

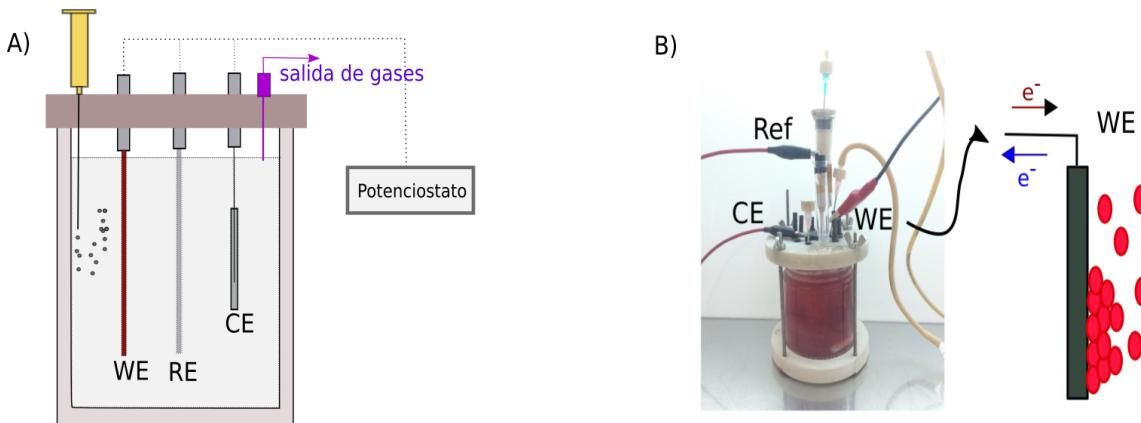


Figura 2-4: Reactor electroquímico utilizado para el crecimiento y experimentación de *R. palustris*. A) Esquema simplificado del reactor utilizado donde los distintos electrodos se insertan por medio de la tapa del reactor, junto con las agujas que permiten la entrada (con un filtro de vidrio agregado) y salida de gases. El sistema se controla con un potenciómetro que permite llevar a cabo los análisis electroquímicos, permitiendo usar el electrodo de trabajo como cátodo o como ánodo. B) Fotografía de un reactor operado en *batch* tomada durante la fase estacionaria del cultivo, el cual presenta su color rojo característico. RE, electrodo de referencia. CE, contra electrodo. WE, electrodo de trabajo.

Todos los experimentos se realizaron utilizando barras de grafito de 0.4 cm de diámetro como WE, teniendo en cuenta el área sumergida para el cálculo posterior de densidad de corriente. El área geométrica expuesta fue de $3.9 \times 10^{-4} \text{ m}^2$. La superficie de estos electrodos se renovó luego de cada experimento mediante un proceso de lijado (lijado grado 1000), seguido de pulsos de sonicación en agua destilada para remover los desechos del pulido. Como CE se utilizó un alambre de platino de 0.7 mm de diámetro y 15 cm de longitud. Los electrodos de referencia se diseñaron en nuestro laboratorio, utilizando camisas de vidrio llenas con 1% agar-cloruro de sodio (NaCl) 3M y un alambre de plata en equilibrio con cloruro de plata (Ag/AgCl). Estos electrodos tienen un potencial aproximado de +0.209 V contra el electrodo estándar de hidrógeno (SHE). Los resultados se presentan de aquí en más en función de este electrodo.

2.2.3. Técnicas electroquímicas

La caracterización electroquímica se realizó por medio de potencióstatos AUTOLAB PGSTAT101 y μ AUTOLAB tipo III controlados por el software NOVA en sus distintas versiones (1.1, 1.6, 2.0). Estos equipos son amplificadores electrónicos que controlan la caída de potencial entre el WE y el electrolito, gracias a la presencia del RE como componente de sensado, que permite fijar el potencial del WE. En el CE ocurren las contrareacciones redox que complementan a las del WE, permitiendo así el balance del flujo de electrones. Por ejemplo, por cada oxidación que ocurre en el WE, hay un proceso de reducción que ocurre en el CE.

Antes de mencionar las distintas técnicas es necesario entender algunos conceptos electroquímicos y su relación con los procesos biológicos que pudieran ocurrir entre las células y los electrodos. Un término que se utilizará reiteradas veces es la "polarización" de electrodos. Polarizar un electrodo significa fijar su potencial en valores más positivos o más negativos respecto de su potencial de reposo, del inglés *open circuit potential* (OCP). Todas las reacciones electroquímicas ocurren en la interfase entre el electrodo y el electrolito, el cual es un conductor iónico como por ejemplo una solución acuosa con sales inorgánicas disueltas. Polarizar negativamente implica elevar el potencial de los electrones, de modo que superan una barrera de activación que les permite saltar a estados electrónicos "vacantes". A este flujo electrónico desde el electrodo hacia el electrolito se le llama corriente de reducción, y en este caso el WE funciona como cátodo.

Por otro lado, cuando se aplica un potencial positivo, se disminuye la energía de los electrones, aumentando el potencial del electrodo que ahora funciona como ánodo. En este caso, los electrones encuentran una energía más favorable en el electrodo por lo que viajan del electrolito al electrodo, generando una corriente anódica.

Hablando en un sentido biológico, se debe tener en cuenta que la cantidad de pasos en las reacciones electroquímicas que ocurren en la interfaz entre el electrodo y un *biofilm* puede ser mayor. Esto se debe básicamente a la posible presencia de enzimas como catalizadoras de estos procesos, entre otros factores que deben contemplarse. A

modo general, cuando se utiliza al WE como cátodo, cualquier célula o molécula capaz de conectarse con él, será capaz de tomar electrones a partir del mismo, en un proceso de reducción. Cuando el WE funciona como ánodo, el flujo de electrones ocurre desde las células o moléculas, hacia el electrodo. Dado que, como ya se mencionó, en la naturaleza podemos encontrar aceptores electrónicos naturales en su forma insoluble que son utilizados para la respiración, usualmente se dice que al reemplazar estos aceptores por electrodos, las células son capaces de respirar el electrodo porque le ceden sus electrones.

Cronoamperometría

Esta técnica fija un potencial en el electrodo y se registra la evolución de la corriente que circula por el sistema. Para la caracterización electroquímica de *R. palustris* se realizó una exploración a distintos potenciales tanto negativos (catódicos), como positivo (anódico) con el objetivo de establecer si las células eran capaces de conectarse con el electrodo.

Voltametría Cíclica

En esta técnica se varía el potencial del WE (en relación al RE) de manera lineal mientras se registra la corriente. Cuando se cambia el potencial de un electrodo, se pueden generar dos tipos de corrientes: capacitiva y faradaica. Esta última está relacionada con los procesos de óxido-reducción de los compuestos electroactivos, ya sean iones, moléculas solubles o moléculas en estructuras biológicas que se encuentren en el entorno del electrodo. La corriente capacitiva en cambio, no está relacionada con una reacción redox sino con la carga y descarga de la doble capa eléctrica que se establece entre el electrodo y la solución. La misma está considerada como corriente de fondo a la reacción de interés. Por ejemplo, a velocidades altas de barrido y por ende, cambios rápidos en el potencial del electrodo, una alta corriente capacitiva podría llegar a enmascarar la corriente faradaica y generar problemas en la interpretación. Es por ello que en general en los sistemas bioelectroquímicos se trabaja a bajas velocidades. De manera similar, un *biofilm* electrogénico de poca cobertura en contacto con el

electrodo y en consecuencia con una baja actividad electrocatalítica, también sería difícil de analizar incluso a velocidades bajas de barrido.

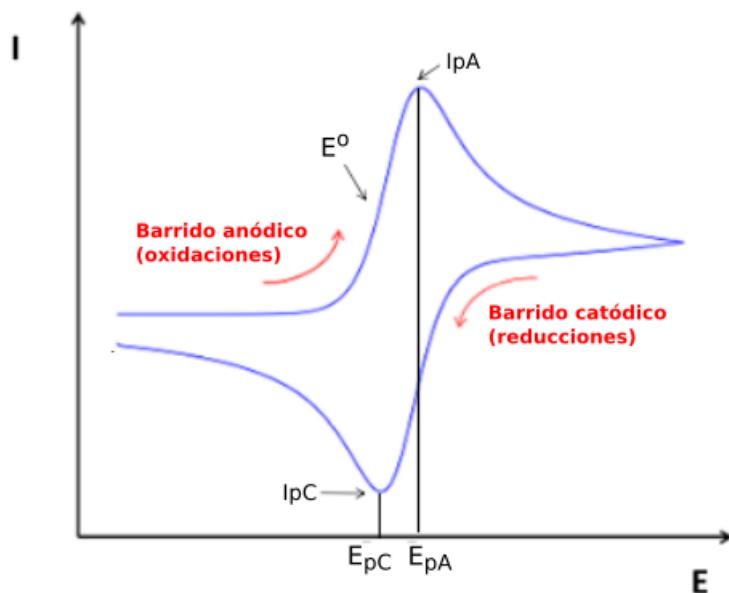


Figura 2-5: Voltametría tipo de un sistema reversible. E_i , potencial de inicio. E_l , potencial límite. i_{pA} pico de corriente anódica. i_{pC} , pico de corriente catódica. E_{pA} , potencial al cual ocurre el pico de corriente anódica. E_{pC} potencial al cual ocurre el pico de corriente catódica.

La voltametría cíclica, del inglés *cyclic voltammetry* (CV) se basa entonces en un escaneo o barrido por distintos potenciales cuyos límites y velocidad, definida como el cambio en el potencial en función del tiempo ($\nu = \frac{\Delta E}{\Delta t}$), los determina el operario. El barrido comienza desde un potencial de inicio (E_i) y puede seguir hacia potenciales positivos (barrido anódico) en los que ocurren oxidaciones, o hacia potenciales negativos (barrido catódico) en los que ocurren reducciones. Una vez que se llega al potencial límite (E_l), el barrido se invierte hasta alcanzar el otro extremo de la ventana de potenciales. En este punto el barrido se invierte nuevamente para iniciar otro ciclo. Una voltametría puede contener desde uno a varios ciclos, de acuerdo a lo que se necesite estudiar. A medida que la CV avanza, la corriente muestra componentes capacitivos, y en el caso de que las células o el *biofilm* puedan conectarse eléctricamente con el electrodo, tendrá una componente faradaica que es la reacción de interés. Cuando esto sucede, se observa un aumento en la corriente como se puede ver en la figura 2-5. Ante un barrido anódico, la corriente comienza a aumentar a

partir de un potencial particular hasta llegar a un pico máximo de corriente anódica (I_pA) debido a una oxidación electroquímica. El potencial al cual ocurre este I_pA se denomina potencial de pico anódico (E_pA). Luego de alcanzar el E_l y comenzar el barrido catódico, se da la reacción de reducción respectiva en caso de tratarse de un proceso reversible, con su pico máximo de corriente catódica (I_{p1c}) y su potencial de pico catódico (E_pC) (Fig. 2-5).

Con el objetivo de caracterizar electroquímicamente a *R. palustris* cepa AZUL se realizaron CV a distintas velocidades luego de distintos tiempos de polarización a distintos potenciales. La ventana de potenciales utilizada fue de -0.6V a 0.8V excepto que se indique lo contrario. El E_i en todos los casos fue el potencial de polarización fijado en la cronoamperometría previa para estimular el desarrollo en relación al electrodo.

Ensayos de acumulación de carga

La cantidad de carga acumulada (Q) en los biofilms de *R. palustris* se midió mediante el registro de la descarga de corriente generada luego de distintos tiempos a OCP del *biofilm*. Esto significa que luego de una cronoamperometría a 0.5V, se procede a interrumpir la polarización de los electrodos dejandolos a OCP por distintos tiempos, en los cuales se registra el cambio en el potencial a circuito abierto. Una vez que se vuelven a polarizar los electrodos es posible medir la Q en cada uno de esos tiempos gracias a una descarga de corriente que se produce durante los primeros minutos al volver a polarizar. De esta manera, es posible analizar la respuesta de los *biofilms* ante la ausencia repentina del aceptor de electrones.

2.2.4. Observación de *biofilms* de *R. palustris* sobre electrodos por microscopía de barrido

Las barras de grafito recubiertas por los *biofilms* de *R. palustris* se retiraron cuidadosamente de los reactores y se fijaron con glutaraldehído 2.5 % durante 15 minutos, se deshidrataron por inmersión en una serie de alcoholes a distintas concentraciones

(40 ,60 ,80 y 100 % de etanol en agua ultra pura) y se secaron al aire. Finalmente, las muestras fueron recubiertas con oro por electro-pulverización para su visualización por microscopía electrónica de barrido, del inglés *scanning electron microscope* (SEM)(Jeol JSM-6460 LV).

2.3. Resultados

2.3.1. Crecimiento de *R. palustris* AZUL en bioreactores

R. palustris AZUL se creció en cultivos anaeróbicos en condiciones fotoheterótrofas utilizando acetato como dador orgánico. A partir de las curvas de crecimiento realizadas, se obtuvo una estimación del tiempo de duplicación (t_d) de 7.8 hs (Fig. 2-6), requiriendo aproximadamente de 4 días para llegar a la fase estacionaria. Bajo estas condiciones, los culivos en *batch* pasaron de un color rosado claro a uno rojo oscuro, debido a los pigmentos fotosintéticos.

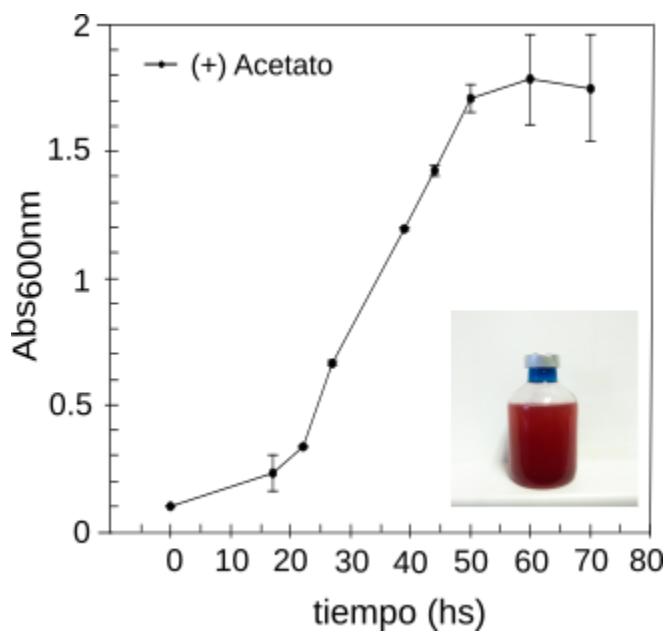


Figura 2-6: Curva de crecimiento de *R. palustris* AZUL en condiciones fotoheterótrofas. Se inocularon viales con medio de cultivo previamente esterilizados y desoxigenados mediante burbujeo de N₂:CO₂ y se midió el crecimiento mediante el registro de la absorbancia a 600 nm (Abs600nm). Se utilizó acetato 20 mM como fuente de carbono. horas (hs).

Dada la gran versatilidad metabólica de esta especie y los antecedentes electroquímicos, se decidió evaluar la actividad electroquímica de AZUL para la toma de electrones a partir del electrodo (cátodo) así como para la transferencia de electrones desde las células hacia el electrodo (ánodo). El primer objetivo consistió en ganar información acerca de la respuesta de las células en presencia de electrodos polarizados a distintos potenciales, evaluando al mismo tiempo la formación de *biofilms* sobre los mismos. Para comenzar con la exploración electroquímica de esta cepa, los reactores electroquímicos se inocularon con pre-cultivos fotoheterótrofos.

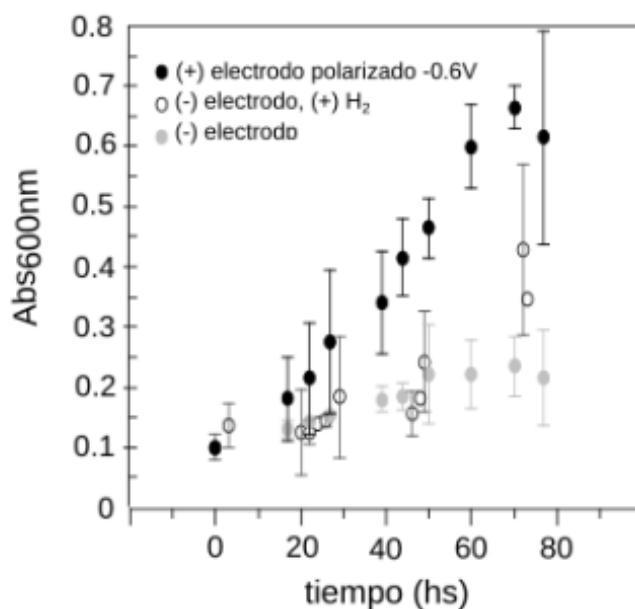
2.3.2. Análisis electroquímico utilizando el electrodo como dador de electrones

Con el objetivo de analizar si nuestra cepa era capaz de aceptar electrones de un electrodo polarizado en condiciones fotoautótrofas, se inocularon reactores conteniendo un medio de cultivo sin fuente de carbono orgánico (condiciones fotoautótrofas) y se polarizaron los electrodos a un potencial negativo. Bajo estas condiciones, *R. palustris* normalmente recurre a la oxidación de compuestos inorgánicos como fuente de electrones para llevar a cabo el flujo reverso y producir NADH [35] por lo que existe la posibilidad de que utilice el electrodo para los mismos fines.

Se utilizaron electrodos polarizados a -0,6 V, en ausencia de cualquier otro dador y se registró la evolución de la Abs_{600nm} de los cultivos operados en *batch*. Se utilizaron reactores en los que no se polarizaron los electrodos como control. En la figura 2-7 A se observa que hay un mayor crecimiento planctónico cuando el electrodo sirve de dador de electrones ($t_d = 23.5$ hs). Por el contrario, los cultivos crecidos en las mismas condiciones pero en ausencia de electrodos polarizados, presentaron un t_d extremadamente largo de 47.8 hs (Fig. 2-7 A). Esto indica que de alguna manera *R. palustris* AZUL es capaz de utilizar los electrones aportados por el electrodo para su crecimiento.

A potenciales negativos, existe la posibilidad de que se produzca H₂ electroquímicamente sobre el electrodo y el mismo difunda hacia el medio. Dado que *R. palustris* posee la capacidad de oxidar el H₂, se decidió determinar si el mismo tenía algún papel como intermediario de la toma de electrones por parte de las células. Para ello, se conectaron dos reactores en serie para separar físicamente los electrodos polarizados negativamente (primer reactor) de las células (segundo reactor) (fig 2-7 C). Ambos sistemas se conectaron haciendo burbujeante los gases de salida del primer reactor en el segundo. En la figura 2-7 C se observa que el H₂ generado electroquímicamente en el primer reactor dio lugar al crecimiento de *R. palustris AZUL* en el segundo reactor confirmando la capacidad de las células para utilizar los electrones por una vía indirecta. Sin embargo, el crecimiento observado fue menor en comparación al crecimiento de las células en contacto directo con los electrodos por lo que es posible que co-existan mecanismos de transferencia mediada con transferencia directa.

A)



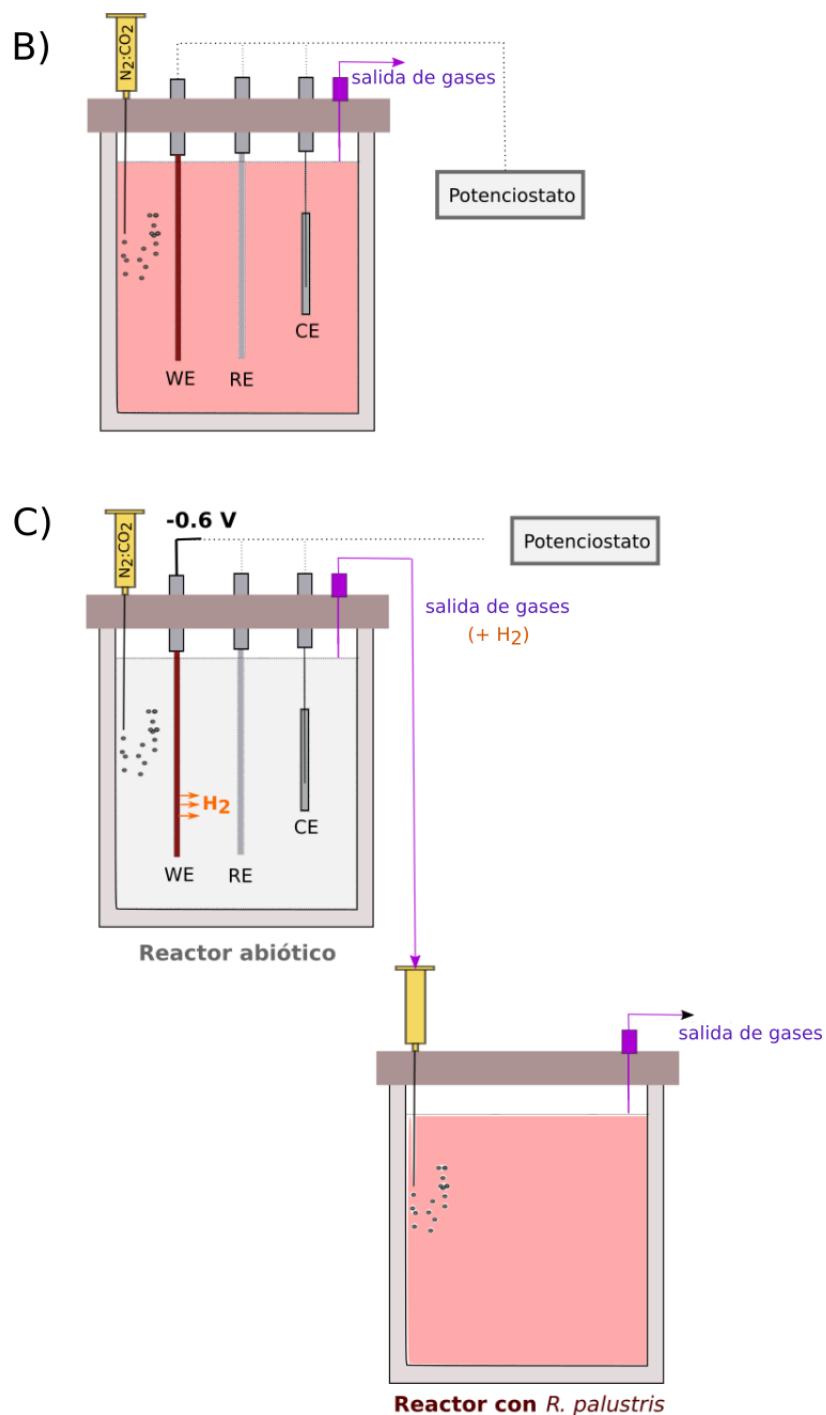


Figura 2-7: Crecimiento de *R. palustris* AZUL en bioreactores bajo condiciones fotoautótrofas. Se utilizaron reactores electroquímicos de 3 electrodos y un sistema doble de dos reactores conectados en serie y se registró el crecimiento (Abs_{600nm}) en condiciones fotoautótrofas donde el único dador de electrones fue el electrodo. A) Crecimiento de *R. palustris* AZUL a lo largo de los días en presencia (+) o ausencia (-) de electrodos polarizados negativamente, y sin electrodos (-) pero con presencia (+) de H_2 producido electroquímicamente. B) y C) Esquemas simplificados de los sistemas utilizados.

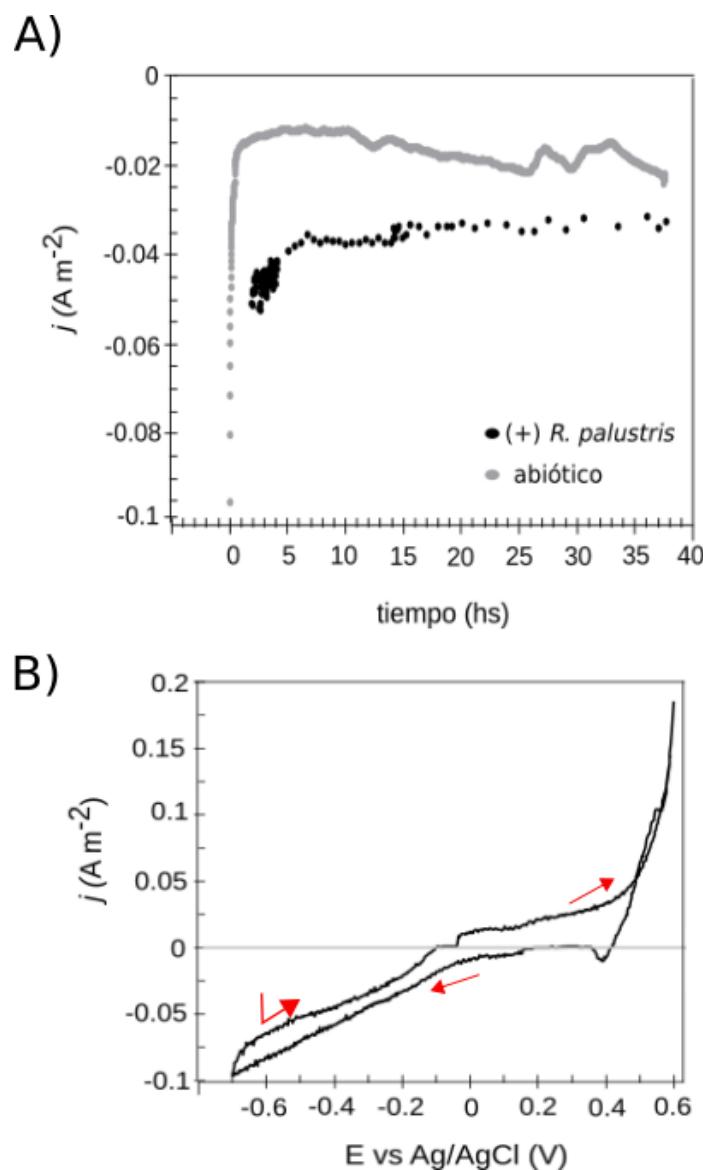


Figura 2-8: Exploración catódica de *R. palustris* AZUL. *R. palustris* se creció en reactores electroquímicos de tres electrodos y se polarizó el WE a -0.6 V (vs Ag/AgCl). Los reactores permanecieron anaeróbicos mediante el burbujeo de la mezcla N₂:CO₂. A) Cronoamperometría a -0.6 V. B) Voltametría de *R. palustris* bajo condiciones fotoautotroficas utilizando el electrodo como dador de electrones. Las flechas rojas indican el comienzo y la dirección del barrido de potenciales. unidades de corriente (A m^{-2}) (J). potencial (E).

Durante las cronoamperometrías no se registraron aumentos significativos en la corriente catódica (negativa) a lo largo de los días, sin embargo, se observó que la corriente en presencia de células fue siempre mayor (Fig. 2-8). Esta figura muestra un aumento en la corriente catódica⁵ cuando los reactores son inoculados con *R. pa-*

⁵Las corrientes catódicas presentan valores negativos, por lo que un aumento en la corriente catódica hace referencia a valores aún más negativos que el comparado.

lustris, indicando así que las células estarían aceptando electrones del electrodo y por ello la corriente es mayor en comparación con la curva del reactor abiótico (Fig. 2-8 A).

La figura 2-8 B muestra la voltametría obtenida luego de polarizar los electrodos a -0.6 V durante horas. El lado catódico de la CV muestra un proceso de catálisis reductiva que comienza en -0.15 V (Fig. 2-8 B). Durante este proceso, a medida que barremos hacia potenciales más negativos, se observa un aumento en la corriente que se sostiene en el tiempo, aún cuando el ciclado cambia de sentido y comienza a barrer hacia potenciales mas positivos (anódicos). Este comportamiento implica la continua regeneración redox de la maquinaria redox que cataliza la transferencia de electrones desde el electrodo y hacia el interior celular. En otras palabras, tan pronto como la célula acepta electrones del electrodo, reduciendo las moléculas destinadas a este proceso, el sistema biológico las re-oxida incorporando electrones al metabolismo, dejando "libres" a las moléculas en cuestión para seguir aceptando electrones desde el electrodo.

2.3.3. Análisis electroquímico utilizando el electrodo como acceptor de electrones

En condiciones fotoheterótrofas *R. palustris* produce un exceso de cofactores redox como producto de la oxidación del sustrato orgánico el cual es balanceado preferencialmente por medio de la fijación de CO₂ [40]. En base a esto, se decidió estudiar si *R. palustris* AZUL era capaz de utilizar un electrodo polarizado positivamente como acceptor de electrones para complementar este proceso, al igual que hace con otros aceptores electrónicos.

De la misma manera que con la exploración catódica, se procedió a inocular reactores operados en *batch* en los cuales se tomaron medidas de corriente y se obtuvieron los perfiles voltamétricos a distintos potenciales. El *t_d* de las células en los reactores fue de 6.5 hs, más corto que lo observado previamente en los pre-cultivos, lo que probablemente se deba al suministro continuo de CO₂ en el medio (Fig. 2-9).

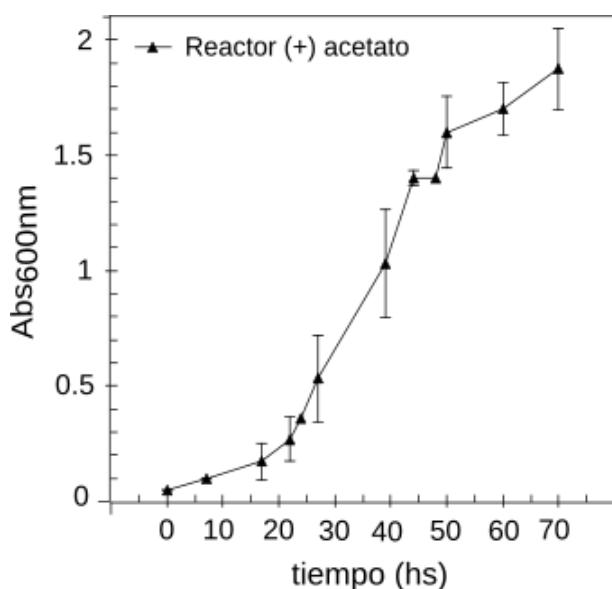


Figura 2-9: Crecimiento planctónico típico de *R. palustris* AZUL en bioreactores electroquímicos bajo condiciones fotoheterótrofas con acetato como dador orgánico. Los reactores permanecieron anaeróbicos mediante el burbujeo de la mezcla N₂:CO₂. Se registró la Abs_{600nm} a lo largo del tiempo de polarización a diferentes potenciales.

Una vez inoculados, los electrodos fueron polarizados a 0,2, 0,4 o 0,5 V y el registro de corriente se interrumpió para realizar CVs con el objetivo de determinar la presencia o ausencia de señales redox. En todos los casos se observó macroscópicamente la formación de *biofilms* sobre los electrodos polarizados.

La figura 2-10 muestra las voltametrías realizadas luego de diez horas de polarización continua. Estas CVs muestran una respuesta electroquímica en común entre las distintas condiciones anódicas ensayadas, caracterizada por una oxidación a potenciales altos (0,57 V), acompañado por un proceso de reducción que se observa por debajo de los 0,47 V (Fig. 2-10). Estas señales parecen resolverse mejor a medida que el potencial ensayado es más alto y se definen aún más dos procesos reductivos cerca de los 0,4 y 0,2 V. No se observaron procesos de óxido-reducción en los controles (curva roja) (Fig. 2-10), a pesar de formarse un *biofilm* sobre el electrodo sin polarizar, indicando que las señales observadas se deben a la condición de polarización impuesta.

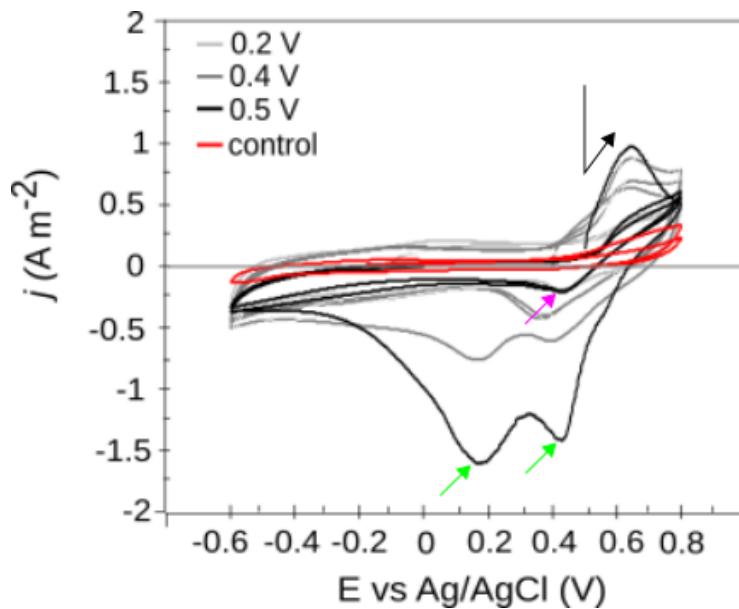


Figura 2-10: Voltametrías cíclicas de *biofilms* de *R. palustris* AZUL luego de cronoamperometrías a distintos potenciales. Se creció a *R. palustris* en reactores electroquímicos de 3 electrodos y se polarizaron los WE a distintos potenciales (0,2, 0,4 y 0,5 V) para que sirvieran de aceptores electrónicos. Se realizaron CVs luego de diez horas continuas de polarización. Como fuente de carbono se utilizó acetato 20 mM y bicarbonato 25 mM, que además funcionó como amortiguador del pH de la solución. Se muestran las CV realizadas a cada potencial, en una ventana de potenciales de -0,6 a 0,8 V, partiendo desde el potencial de polarización respectivo en cada caso, en dirección a potenciales anódicos (la flecha negra indica el comienzo y dirección del barrido para la CV realizada después de la polarización a 0,5 V). Las flechas verdes indican los picos de reducción durante el primer ciclo de la CV (curva 0,5 V). La flecha violeta indica el pico de reducción que ocurre durante el segundo y tercer ciclo (curva 0,5 V). La velocidad del barrido fue de 1 mVseg^{-1} . El control corresponde a electrodos que permanecieron sin polarizar en el mismo reactor.

Dados los potenciales a los cuales se observaron los procesos, se decidió continuar el análisis bajo la condición a 0,5 V. Para ello, los reactores subsiguientes se inocularon y mantuvieron en *batch* durante 1 día, luego del cual se operaron en continuo con un factor de dilución de 0.025 Lh^{-1} para asegurar el lavado de las células planctónicas. De esta manera, fue posible analizar la respuesta del *biofilm* de forma independiente de la población planctónica, maximizando además la incidencia de la luz.

Las células nuevamente se adhirieron a las distintas superficies, formando *biofilms* tanto en los electrodos polarizados (Fig. 2-11) como en los controles que no fueron polarizados (en la foto se observa el *biofilm* sobre el WE en foco, los controles se vieron en todos los casos con la misma apariencia). Las micrografías de los electrodos colonizados mostraron que la estructura de los *biofilms* en estas dos condiciones era

diferente (Fig. 2-12). En la condición control las células formaron múltiples capas atravesadas por algunos canales, por los cuales la fase líquida es libre de circular hacia el interior del *biofilm*. Por otro lado, los *biofilms* formados sobre electrodos polarizados presentaron una mayor complejidad estructural. En ellos se observaron múltiples capas con parches de células distribuidos sobre la superficie y otras regiones libres de células, en las que se pudo observar gran cantidad de precipitados inorgánicos (Fig. 2-12).

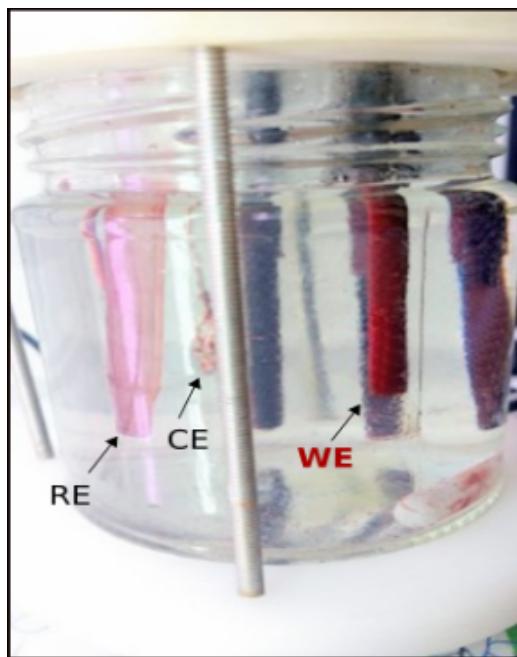


Figura 2-11: *Biofilm* de *R. palustris* sobre un electrodo de grafito polarizado. Se creció a *R. palustris* en reactores de celda simple y se polarizaron electrodos de grafito a 0.5 V. Como fuente de carbono se utilizó acetato 20 mM y bicarbonato 25 mM, que además funcionó como amortiguador del pH de la solución. RE, electrodo de referencia; CE, contra electrodo; WE, electrodo de trabajo.

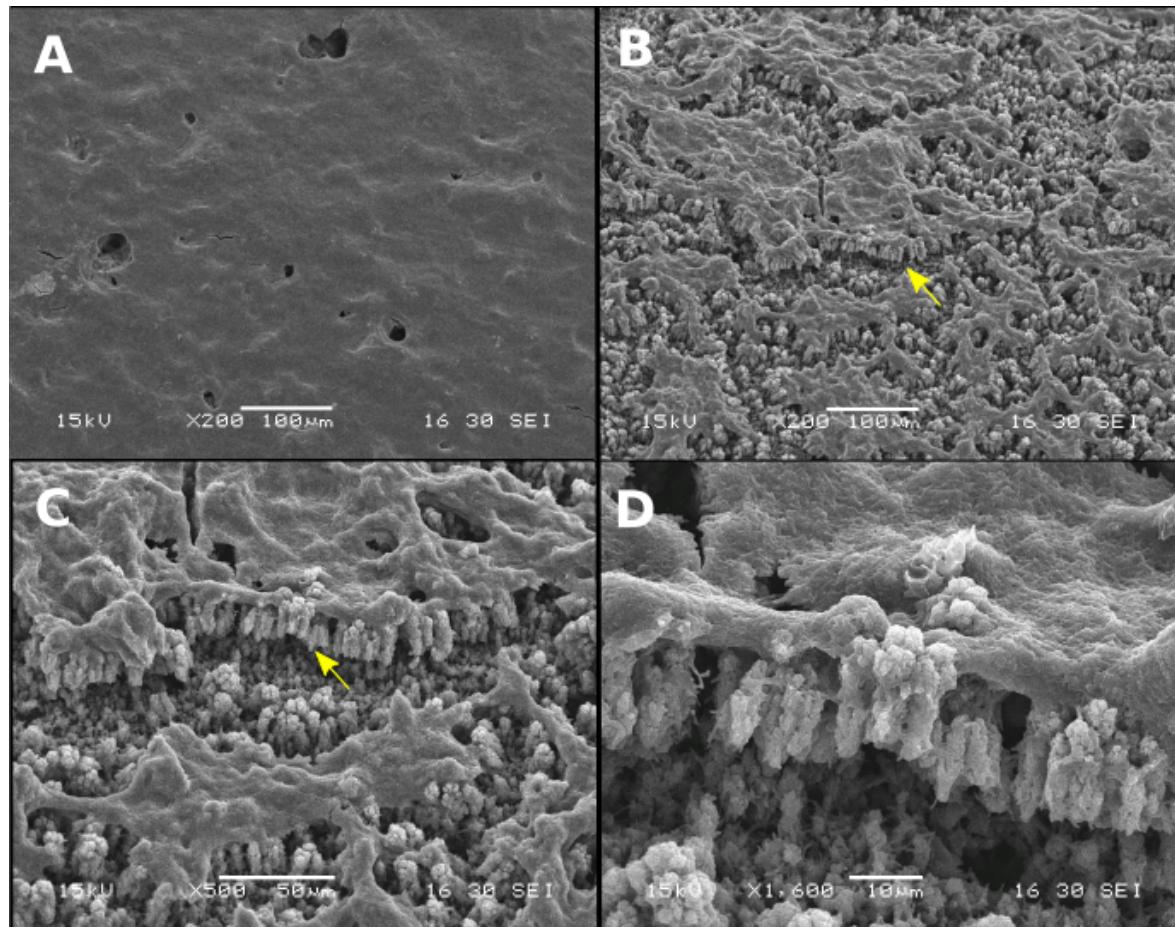


Figura 2-12: Micrografías de *biofilms* de *R. palustris* AZUL sobre electrodos de grafito. *Biofilms* crecidos sobre electrodos sin polarizar (A) y polarizados (B - D) se extrajeron al finalizar los ensayos, y se fijaron y deshidrataron (ver materiales y métodos) para su observación mediante microscopía de barrido (SEM). Las flechas amarillas en los paneles B y C corresponden a las regiones magnificadas en las fotografías C y D, respectivamente.

La evolución de la corriente durante el desarrollo del *biofilm* se presenta en la figura 2-13. Se observó un transiente de corriente al inocular el reactor, indicio de la capacidad electrogénica de *R. palustris*. La corriente producida fue baja, observándose un leve aumento de 0.0098 a 0.016 A m⁻² durante el transcurso del desarrollo del *biofilm* (Fig. 2-13).

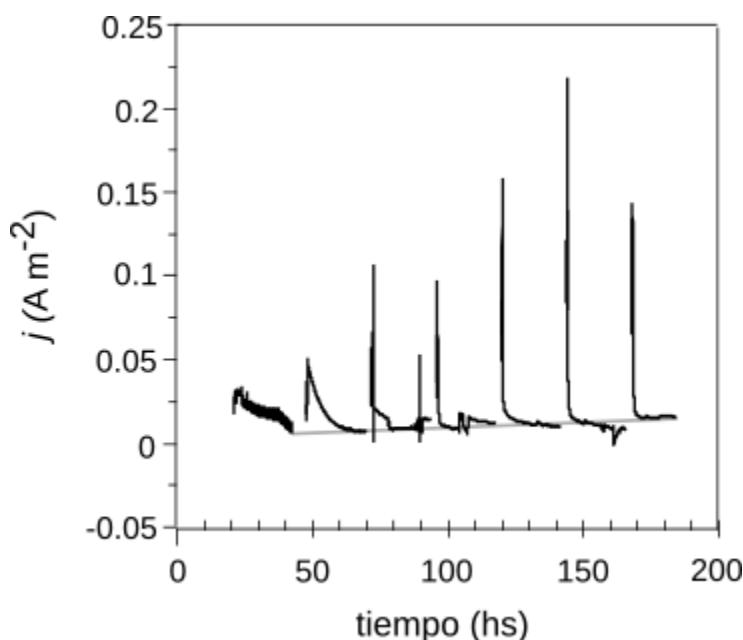


Figura 2-13: Cronoamperometría a 0.5 V de *R. palustris* AZUL. *R. palustris* se creció en reactores electroquímicos de tres electrodos en presencia de electrodos de grafito polarizados a 0.5 V (vs Ag/AgCl). Los reactores permanecieron anaeróbicos mediante el burbujeo de la mezcla N₂:CO₂. La cronoamperometría se interrumpió por voltametrías cíclicas, generando en cada nueva reconexión del electrodo, una descarga.

En suma con las señales redox observadas en las voltametrías, estos resultados indican que *R. palustris* AZUL sería capaz de establecer una conexión eléctrica con electrodos polarizados a 0,5 V y transferirle electrones pero a una baja tasa de transferencia. En base a esta hipótesis, se decidió realizar los ensayos voltamétricos a la mitad de la velocidad analizada anteriormente, es decir, realizar un barrido más lento de potenciales que permitiera observar mejor la respuesta.

En las CVs realizadas a 0,5 mV seg⁻¹ se observan picos mejor definidos (Fig. 2-14 A), apoyando la idea de que las células son capaces de entregar electrones a una tasa muy lenta (Fig. 2-10 y 2-14 A). Además, se observó un segundo proceso de oxidación de menor magnitud a los 0,43 V que no se había detectado anteriormente (flecha roja).

en el lado anódico (positivo) de la CV). En la figura 2-14 A se definen bien los dos procesos redox que caracterizan a *R. palustris* AZUL: el par redox de menor potencial indicado con flechas rojas, y el de mayor potencial indicado con flechas verdes.

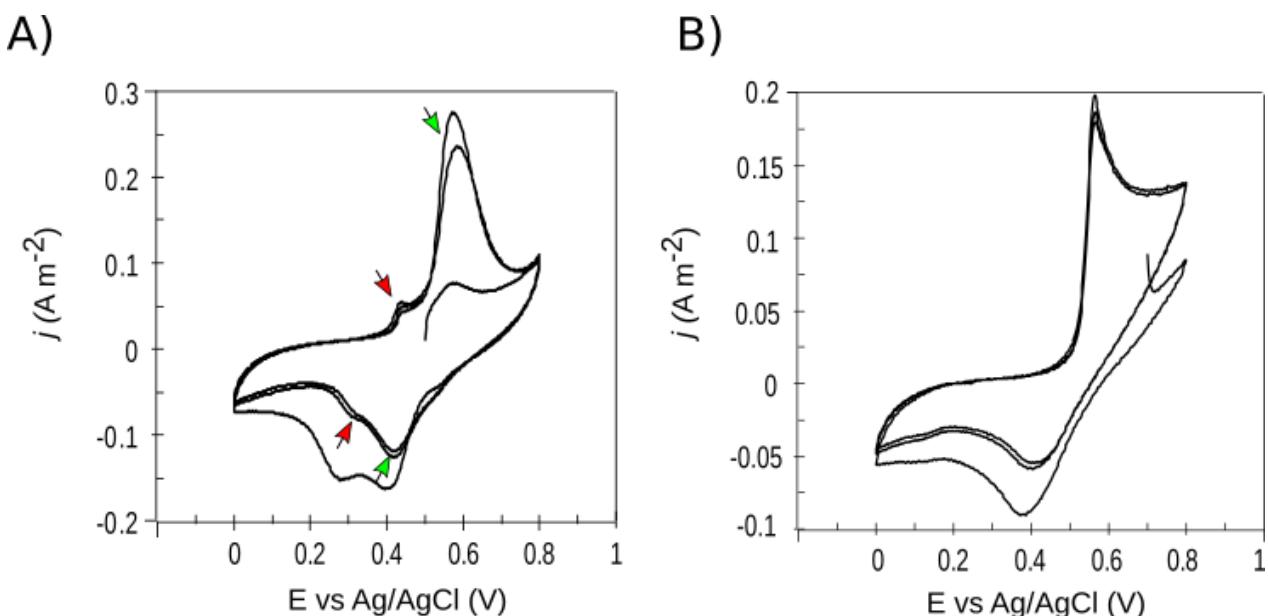


Figura 2-14: Voltametrías cíclicas luego de cronoamperometrías a 0,5 (A) y 0,7 V (B) a baja velocidad. *R. palustris* se creció en reactores electroquímicos en presencia de los electrodos de grafito polarizados. Los reactores permanecieron anaeróbicos mediante el burbujeo de la mezcla $\text{N}_2:\text{CO}_2$. Las cronoamperometrías se interrumpieron por voltametrías cíclicas realizadas a 0.5 mV seg^{-1} (A y B). Las flechas en A) indican el par redox detectado de menor potencial (rojo) y el par de mayor potencial (verde).

Estas voltametrías se realizaron luego de haber mantenido la polarización a los potenciales indicados, en esta condición ocurre una oxidación continua de los elementos redox sobre células, que puede desencadenar una respuesta inducida. Una vez interrumpida la polarización, el ciclado en las voltametrías comenzó en todos los casos hacia potenciales anódicos, dando lugar primero a los procesos de oxidación cuyos potenciales y corrientes de pico fueron respectivamente 0,43 V, $0,047 \text{ A m}^{-2}$ y 0,57 V, $0,27 \text{ A m}^{-2}$, luego de 10 horas de polarización. Al barrer el potencial en dirección catódica, se detectaron nuevamente los dos procesos de reducción observados anteriormente a 0,4 V y 0,2 V cuyas mayores corrientes de pico (-0,16 y -0,15 A m^{-2} , respectivamente) se dieron durante el primer ciclo de la voltametría para luego estabilizarse en valores menores durante el segundo y tercer ciclo.

Es interesante notar que el potencial al cual ocurre el mayor proceso de oxidación en las voltametrías es mayor que el potencial aplicado en la cronoamperometría. Esto podría significar que la polarización pudo no haber sido suficiente para promover un cambio más significativo en el comportamiento electrogénico. Para despejar esta duda se realizaron ensayos en los que el potencial de polarización fue 0,7 V y se observó que los procesos de óxido-reducción no resultaron bien definidos en las voltametrías (Fig. 2-14 B). Es probable que esto se deba a que la condición resultó muy oxidativa para las células, comprometiendo la estabilidad de sus moléculas externas.

En la siguiente figura se observa la evolución del perfil voltamétrico de los *biofilms* a lo largo de los días de polarización a 0.5 V (Fig. 2-15 A). Se realizó una CV por día y se observaron nuevamente los dos procesos de reducción, el primero con el máximo de corriente a 0.4 V y el segundo variando entre 0.1 y 0.2 V durante la evolución del *biofilm*. Estos procesos presentaron sus mayores corrientes de pico durante el primer ciclo de la CV. Notablemente, sólo el pico situado a 0.4 V se mantuvo durante todos los ciclos, seguido de lo que parece ser una corriente límite⁶ de alrededor de -0.1 A m⁻². El pico de reducción ubicado en el primer ciclo entre los 0.1 y 0.2 V disminuyó conforme evolucionaba el *biofilm*, mientras que el pico de reducción en 0.4 V aumentó (Fig. 2-15 A). La máxima corriente alcanzada por este proceso fue de -1,42 A m⁻² al tercer día, valor que disminuye hasta estabilizarse a los 0,9 A m⁻² en el séptimo día de crecimiento del *biofilm*. El lado anódico de la CV evolucionó como un típico proceso de *turnover*, con su máxima corriente de pico situada arrededor de los 0.57 V (Fig. 2-15 A).

La figura 2-15 B muestra el perfil de corriente obtenido al momento de la repolarización de los electrodos una vez finalizadas las voltametrías. Estos resultados muestran dos procesos de descarga. El primero presenta su pico máximo de corriente a los 6 minutos mientras que la mayor descarga ocurre a los 18 minutos a partir de la reconnexión (Fig. 2-15 B). Estas descargas luego de las CVs sugieren que al momento de finalizar el último ciclo de la voltametría aún existe carga acumulada en el *biofilm*, que

⁶Meseta de corriente que se alcanza cuando la proporción de masa transferida está en su máximo valor.

sólo se puede descargar luego de un tiempo de exposición a una condición oxidativa (polarización a 0,5 V), apoyando la idea de que *R. palustris* AZUL tendría una tasa lenta de transferencia de electrones al electrodo. Se observa a su vez, que la cantidad de corriente descargada aumenta conforme evoluciona el *biofilm*, mientras que el tiempo requerido para la descarga disminuye (Fig. 2-15 B). Si estas descargas provinieran de la carga transferida desde el electrodo hacia las células durante el primer ciclo de la CV y que no pudo ser totalmente recuperada (durante la oxidación), entonces las descargas deberían presentar la misma magnitud de carga que la "inyectada" en los *biofilms* (primer ciclo de la CV (Fig. 2-15 A)). Sin embargo, las descargas observadas en la figura 2-15 B presentan un orden de magnitud menor que el observado en los ciclos de reducción durante el primer ciclo de las CVs (Fig. 2-15 A), por lo que es posible que esta carga haya quedado almacenada en las formas reducidas de las moléculas involucradas. Reforzando esta idea, es importante destacar que para la señal del par redox más bajo (flecha roja), no se observa una contraparte oxidativa cuando se barre el potencial a alta velocidad y en consecuencia no se detecta el proceso de reducción durante los ciclos subsiguientes. En otras palabras, dado que en el primer ciclo se lleva a cabo un proceso de reducción o entrada de electrones de gran magnitud, que luego no puede ser oxidada o "vaciada" a potenciales oxidativos; en los ciclos subsiguientes el sistema no permite la entrada de electrones a ese potencial ya que parte de la maquinaria involucrada probablemente se encuentre aún reducida. Esto se puede visualizar mejor al comparar las voltametrías a diferentes velocidades, donde al ciclar a una velocidad más lenta (Fig. 2-14) se puede observar un pico de oxidación ausente en las CVs más rápidas (Fig. 2-15). Dado que, a una velocidad más lenta, se produce la oxidación (por lo menos en parte) de las moléculas relacionadas al par de menor potencial, en los ciclos subsiguientes sí se observa su reducción, aunque aún en menor medida respecto del primer ciclo (Fig. 2-14).

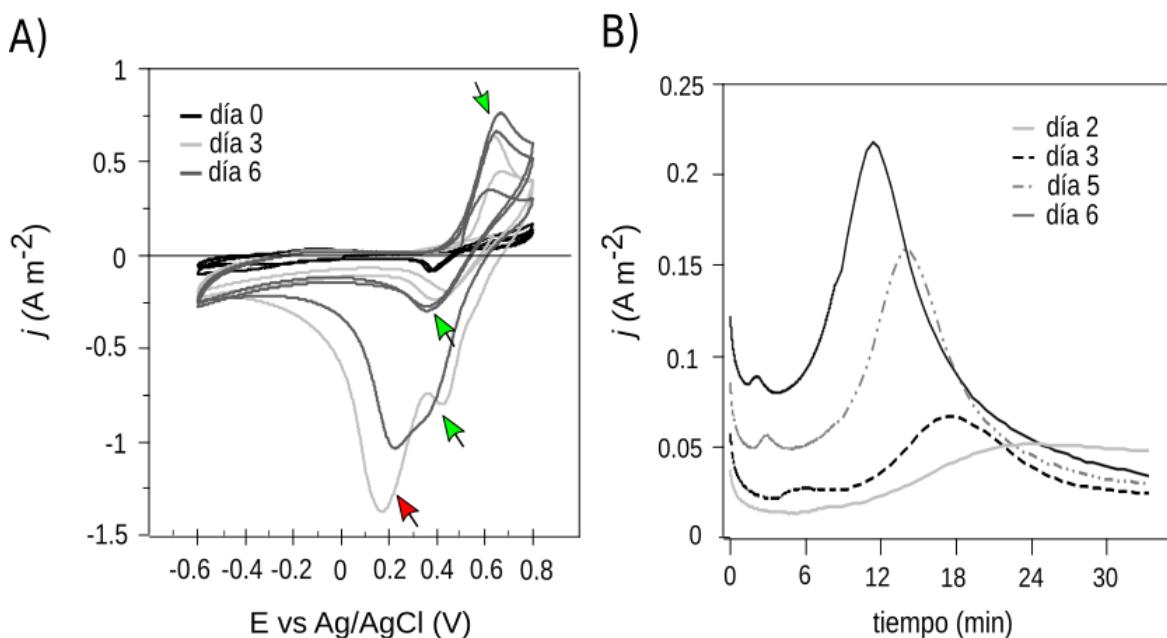


Figura 2-15: Perfil voltamétrico de biofilms de *R. palustris* a lo largo de los días. A) Se crecieron *biofilms* sobre electrodos polarizados a 0,5 V y se realizó una CV cada día. La velocidad de barrido fue de 1mV seg^{-1} . La flecha roja indica la parte reductiva del proceso correspondiente al par redox de potencial más bajo, y las verdes indican el par de potencial más alto. B) Evolución del perfil de descargas de corriente ante la reconexión de los electrodos a 0,5 V inmediatamente después de cada CV.

Acumulación de carga en *biofilms*

Los resultados mostrados hasta el momento sugieren que existe algún tipo de conexión eléctrica entre las células y el electrodo, pero que la tasa de transferencia de electrones es lenta. Una de las ventajas de utilizar un electrodo como aceptor de electrones es que se pueden registrar los cambios en el potencial de circuito abierto⁷ (OCP) cuando se interrumpe la polarización, dando un indicio de la relación oxidado:reducido de los componentes electroactivos en contacto con el electrodo [16]. De esta manera, es posible analizar la respuesta biológica del *biofilm* ante la repetida ausencia del aceptor de electrones. Es por ello que se decidió realizar ensayos de acumulación de carga en los cuales los *biofilms* crecidos sobre electrodos polarizados a 0,5 V se desconectaron y se dejaron a OCP durante distintos tiempos para registrar la evolución del potencial, como también la cantidad de carga acumulada al momento

⁷Potencial que adopta un electrodo, respecto a una referencia, cuando no circula corriente desde o hacia él.

de la reconexión.

La figura 2-16 muestra que *biofilms* de *R. palustris* acumulan carga cuando se los priva del aceptor, y que la carga acumulada aumenta a mayores tiempos de OCP. Una vez que se interrumpe la polarización a 0,5 V, se observa una caída en el OCP hasta llegar a 0.4 V, lo cual indica que el ambiente próximo al electrodo se encuentra más reducido conforme pasa el tiempo. En términos biológicos esto indica que ante la ausencia del aceptor, las células acumulan electrones provenientes del metabolismo oxidativo en moléculas redox sobre la superficie celular, que están conectadas con el electrodo.

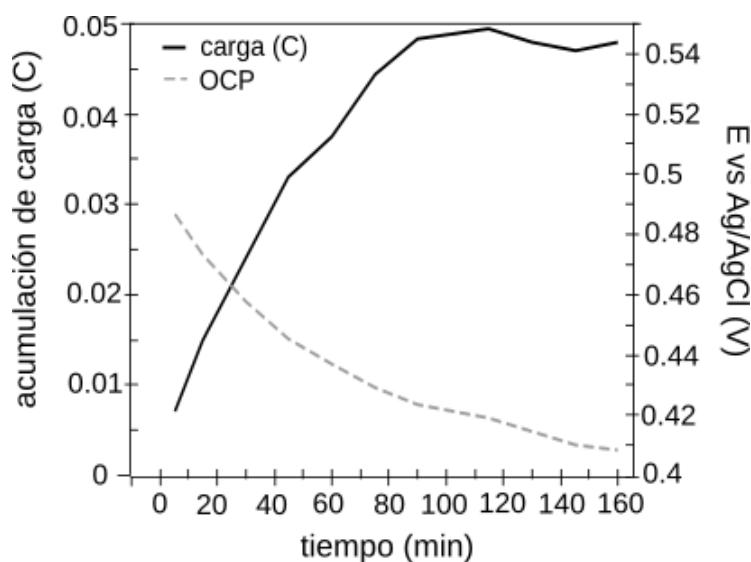


Figura 2-16: Relación entre la caída de potencial y carga acumulada en el tiempo por *biofilms* de *R. palustris*. Se interrumpió la polarización en *biofilms* crecidos sobre electrodos polarizados a 0,5 V, y se registró a tiempos crecientes la caída del potencial de circuito abierto (OCP). Luego de cada tiempo transcurrido a OCP, se registró la carga acumulada por el *biofilm*.

Estos resultados en conjunto indican que *R. palustris* AZUL es capaz de transferirle electrones a un electrodo polarizado que funcione como aceptor en condiciones fotoheterótrofas, con acetato como dador orgánico.

2.3.4. Discusión

En este capítulo se presentó la exploración electroquímica de la cepa AZUL de *R. palustris* en bioreactores electroquímicos y bajo distintas condiciones de polarización. Esta bacteria es reconocida por su gran versatilidad metabólica y sumado a unos pocos antecedentes electroquímicos en bibliografía [59, 56], se decidió evaluar su capacidad de transferir electrones extracelularmente desde y hacia un electrodo. El uso de electrodos permitió reemplazar los posibles dadores y/o aceptores de electrones que esta bacteria pudiera estar utilizando en la naturaleza, siendo una gran herramienta para análisis relacionados a la transferencia extracelular de electrones.

En primer lugar, el registro del crecimiento de esta cepa en bioreactores y las distintas técnicas electroquímicas implementadas indican que *R. palustris* AZUL es capaz de tomar electrones a partir de electrodos polarizados negativamente, que hacen las veces de un dador de electrones. En condiciones fotoautótrofas, las células obtienen el carbono necesario para los procesos de biosíntesis a partir del CO₂ y el NaHCO₃ presente en el medio, mientras que la energía lumínica permite la generación de ATP gracias a la fotosíntesis anoxigénica. Sin embargo, a diferencia de un metabolismo fotoheterótrofo, en estas condiciones la generación de cofactores reducidos como por ejemplo el NADH, se da a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos, mediante el flujo reverso de electrones [35].

Los resultados muestran que, en presencia de un electrodo como dador, las células crecen con una tasa de duplicación de 23.5 hs, mucho menor que bajo las condiciones fotótrofas preferidas por estas bacterias ($t_d = 6.5$ hs, en bioreactores con acetato como dador), pero no nula. En cultivos crecidos bajo las mismas condiciones pero sin electrodos polarizados, se registró una t_d de 47.8 hs, lo cual sugiere que los electrones provenientes del cátodo estarían siendo utilizados para la generación de equivalentes de reducción necesarios para el desarrollo de las células. Se necesita explorar el sistema en mayor profundidad para asegurar si se trata de una transferencia de electrones directa o indirecta. Sin embargo, los ensayos realizados en el sistema de dos reactores conectados en serie sugieren que podrían co-existir ambos mecanismos de

transferencia. Por un lado, un mecanismo directo de toma de electrones por parte de las células, probablemente por contactos esporádicos entre éstas y el electrodo dada la ausencia de un *biofilm* macroscópicamente observable; y por el otro, la oxidación del H₂ molecular producido electroquímicamente por el electrodo a potenciales tan negativos.

En estudios realizados en *S. oneidensis* se observó que los electrones provenientes de un cátodo ingresan a la cadena de transporte de estas bacterias cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones, generando un aumento en el gradiente de protones y en consecuencia, mayores niveles de ATP intracelular; como también un incremento en el *pool* de cofactores redox (NADH, FMNH₂). Este aumento de cofactores reducidos está relacionado con un flujo reverso de electrones mediado por el complejo I [60].

En la introducción de este capítulo también se mencionó la toma de electrones de un cátodo para otra cepa de *R. palustris*. Este es el caso de TIE-1, cepa con capacidad ferrotrófica, a partir de la cual se identificó el operón pioABC que codifica las principales proteínas responsables de la oxidación del Fe⁺² y que estarían involucradas en la toma de electrones a partir de un cátodo [47]. A diferencia del caso de *S. oneidensis* donde el oxígeno actúa como aceptor de electrones, en estas bacterias fotosintéticas anoxigénicas, el proceso encargado de recibir los electrones provenientes del metabolismo es la fijación de CO₂ [54]. Guzman y col. (2019) utilizaron una aproximación interdisciplinaria en la que mediante diversas técnicas analizaron los caminos bioenergéticos y los sumideros electrónicos que le permiten a *R. palustris* TIE-1 tomar electrones a partir de un cátodo [55]. Los resultados que obtuvieron indican que la toma de electrones extracelular se encuentra acoplada a la cadena de transporte fotosintética y que este proceso genera un aumento en los cofactores reducidos intracelulares como el NADH y NADPH. Además, mostraron que los electrones provenientes del electrodo son aceptados en última instancia por el ciclo de Calvin-Benson-Bassham y que, por ende, contribuyen a la generación de biomasa [55].

Dado que *R. palustris* AZUL no posee en su genoma el operón pioABC (capítulo 3), nuestros resultados dan cuenta de otro tipo de mecanismo que le permite a las

células aceptar electrones de un dador externo. Además del registro del crecimiento celular como evidencia de este proceso, observamos un aumento en la corriente catódica en presencia de bacterias y corrientes de *turnover* en las CV realizadas.

La determinación de la posible vía o vías de toma extracelular de electrones en esta bacteria requerirá de estudios electroquímicos adicionales como también de una exploración bioquímica/molecular que permita arrojar luz sobre los componentes redox capaces de internalizar electrones a la célula. Por otro lado, conocer las vías metabólicas río abajo de la toma de electrones a partir de un dador externo será necesario para confirmar si el destino de los electrones en *R. palustris* AZUL se encuentra relacionado con un aumento en el *pool* de cofactores reducidos intracelulares y con la fijación de CO₂.

En lo que respecta a la segunda parte de los resultados de este capítulo, se estudió la capacidad de *R. palustris* AZUL de transferir electrones a un electrodo polarizado que hiciese las veces de un aceptor externo. Este escenario ha sido estudiado en un gran número de microorganismos siendo *G. sulfurreducens* y *S. oneidiensis* las bacterias modelo.

R. palustris AZUL fue capaz de formar *biofilms* sobre electrodos de grafito, por lo que fue posible analizar la existencia de procesos redox en la interfaz célula-electrodo. Se utilizó acetato como dador orgánico, el cual por bibliografía se sabe que produce aproximadamente el doble de cofactores reducidos intracelulares que los que la célula necesita para los procesos de biosíntesis [40]. En base a esto, se propuso estudiar la posibilidad de que el electrodo pudiera ser un sumidero de este exceso de electrones en conjunto con el proceso de fijación de CO₂.

Los resultados presentados muestran la existencia de procesos de intercambio de electrones entre las células y el electrodo, lo cual indica que existiría en principio un mecanismo de exportación de electrones hacia el medio extracelular. Si bien existe un reporte sobre otra cepa que tendría la capacidad de comunicarse eléctricamente con un electrodo [56], los potenciales a los que esta cepa es capaz de entregar electrones a un aceptor no están descriptos. Es por ello que el análisis electroquímico comenzó con una exploración fijando distintos potenciales anódicos y observando los procesos de

óxido-reducción en las voltametrías. En función de estas señales, se decidió seguir con el estudio electroquímico a 0,5 V, ya que polarizando a este potencial se observaron las mayores corrientes de pico en las CVs. Por encima de este potencial las mismas no se definían tan bien y se consideró que potenciales tan altos podrían resultar muy oxidativos para las células.

A diferencia de las bacterias electrogénicas modelo, no se registró para *R. palustris* AZUL un aumento en la corriente en función de los días que despierte interés con fines aplicados. En cambio, Xing y col. (2008) reportaron valores de 3.3 A m^{-2} para otra cepa de *R. palustris* identificada como DX-1 [56]. Las diferencias en el desempeño de dos cepas de la misma especie pueden deberse a distintos factores, aunque se presume que tienen que ver con diferencias en las capacidades metabólicas ya que estas cepas presentan una gran variabilidad génica intra-específica (capítulo 3). A pesar de no haberse registrado aumentos en la corriente, se pudieron detectar dos procesos redox bien definidos que ocurren cuando se crecen las células fijando el potencial a 0,5 V.

En base a estos resultados concluimos que es posible que *R. palustris* AZUL le transfiera electrones a un aceptor externo. Sin embargo, este proceso se daría a una velocidad baja y es por eso que no se registraron aumentos de corriente en el tiempo. Esto no resulta ilógico desde una perspectiva fisiológica. Si bien a partir del descubrimiento de la electrogenia de la mano de *G. sulfurreducens* hubieron muchos intentos por encontrar cada vez más microorganismos con esta capacidad, muchos de estos no han evolucionado para respirar electrodos, sino que han desarrollado mecanismos que les permiten salvar situaciones fisiológicas que de otra manera implicarían una menor supervivencia.

Como ya se ha mencionado, estas bacterias fotótrofas pueden crecer en presencia de sustratos altamente reducidos, generando un exceso de cofactores, el cual disipan en parte gracias al ciclo de Calvin. Sin embargo, se ha visto que existe cierto grado competencia entre el ciclo de Calvin y otros procesos que aceptan electrones como por ejemplo la fijación de N_2 [42, 40], o la reducción de compuestos inorgánicos como el DMSO o TMAO [61]. En este sentido, el electrodo polarizado a potenciales anódicos podría representar otro sumidero de electrones para lograr el balance redox bajo con-

diciones fotoheterótrofas. Por otra parte, los resultados aquí presentados podrían no ser indicativos de un proceso respiratorio dado el alto potencial al cual se observaron los procesos redox, existen bacterias capaces de reducir metal/oídes como por ejemplo el óxido de manganeso, vanadato, selenito/ato, telurito/ato que implican procesos de alto potencial. *R. capsulatus* es capaz de reducir telurito gracias a una tiol-disulfuro oxidoreductasa llamada DsbB que actúa como nexo entre el *pool* de quinonas y el metaloide [62]. De manera similar, se reportó la reducción extracelular de selenito por parte de *R. sphaeroides* bajo condiciones fotoheterótrofas con ácido málico como sustrato [63].

Ferguson y col. (1987) consideraron posibles roles de los procesos respiratorios en condiciones fotótrofas [48]. En primer lugar, la reducción de aceptores externos podría contribuir a la generación de Δp cuando las condiciones sean desfavorables, por ejemplo cuando la luz sea limitante al crecer la población celular, generando un fenómeno de *self-shading* o de auto-sombreado. *R. capsulatus* AD2 y N22 presentan un pico de actividad máximo de la nitrato reductasa cuando el cultivo envejece, indicando que cuando las células comienzan a hacerse sombra, comienzan a respirar nitrato para suplir la menor producción de fuerza protón motriz [50, 64]. En este punto, más estudios tanto bioelectroquímicos como bioquímicos harían falta para determinar si los cambios que observamos en el perfil voltamétrico de los *biofilms* de *R. palustris* AZUL a lo largo de los días podrían estar relacionados con la transferencia de electrones al electrodo a altos potenciales para contribuir con la generación de Δp a medida que el *biofilm* se engrosa y la luz se vuelve limitante en el interior del *biofilm*.

Por último, la sobre-reducción o sobre-oxidación de los componentes de la cadena de transporte cíclica fotosintética restringe la tasa de flujo de electrones en estas bacterias y por ende, la tasa de síntesis de ATP [65], por lo cual resulta de suma importancia mantener el estado redox óptimo de este sistema. En este sentido, distintos caminos metabólicos que involucren respiración anaeróbica, como la reducción de óxido nitroso, nitrato, TMAO/DMSO, podrían cumplir un papel en el mantenimiento redox de los distintos componentes de la cadena de transporte [48]. La característica en común de estos compuestos es que sus vías de reducción se ramifican de la cadena

de transporte cíclica a partir del nivel del *pool* de quinonas, al igual que las proteínas con actividad foto-oxidasa encargadas de mantener un estado redox óptimo durante la fotosíntesis en *R. capsulatus* y *R. rubrum* [66]. En base a lo que se discutió anteriormente, es probable que ciertos compuestos desempeñen ambas funciones: sumidero de exceso de cofactores redox y el mantenimiento del estado redox óptimo de algunos componentes individuales de la cadena fotosintética.

Los ensayos de acumulación de carga realizados con *R. palustris* AZUL permitieron corroborar que las células son capaces de utilizar un electrodo como sumidero de carga. Un aspecto importante de la manera en que realizamos estos ensayos de carga y descarga de los *biofilms* es la posibilidad de detectar procesos de intercambio de electrones en microorganismos que sí presenten capacidad electrogénica pero que la misma no pueda inferirse a partir de ensayos cronoamperométricos debido a la baja tasa de transferencia. Resulta entonces como una buena aproximación electroquímica en la búsqueda de nuevas bacterias electrogénicas.

A partir de lo discutido en este capítulo, se puede concluir que *R. palustris* AZUL posee mecanismos de intercambio de electrones desde y hacia el medio extracelular, y que este intercambio puede inducirse al fijar los potenciales apropiados sobre electrodos que actúen como dadores y aceptores, respectivamente. Estos resultados sirven como punto de partida para el estudio de los componentes implicados en estos procesos. *R. palustris* AZUL puede tomar electrones a partir de un electrodo polarizado de manera directa, e indirectamente utilizando el H₂ como mediador. Una posible vía de ingreso de electrones estaría relacionada con el par redox más bajo observado en las voltametrías (Fig. 2-15). Este par puede ser reducido electroquímicamente por el electrodo (proceso observado en las CVs), pero no por el metabolismo oxidativo celular (evidenciado por el valor de OCP estable a 0.4 V). Cuando los electrodos se polarizan a potenciales anódicos, las células forman un *biofilm* sobre el electrodo generando una corriente a una tasa muy lenta. El posible origen de esta corriente podría estar relacionado a un proceso de balance redox interno, que permita reoxidar los componentes de la cadena fotosintética y cofactores internos.

Capítulo 3

Análisis genómico de *Rhodopseudomonas palustris* AZUL

3.1. Introducción

3.1.1. Clasificación general de los genomas de bacterias púrpuras.

Los microorganismos que llevan a cabo una fotosíntesis anoxigénica son principalmente acuáticos. A diferencia de la fotosíntesis oxigénica, este tipo de fotosíntesis no produce oxígeno. En estas bacterias, los procesos de transferencia de carga son dependientes de la luz y están mediados por moléculas de bacterioclorofilas, lo cual se comparte con el grupo de las cianobacterias, los *Chlorobiaceae*, los *Chloroflexaceae* y los *Helio bacteriaceae*.

Las bacterias púrpuras no sulfurosas se encuentran dentro del grupo de las α y las β Proteobacterias, mientras que las púrpuras sulfurosas se encuentran dentro de las γ Proteobacterias [30]. El primer grupo es muy diverso, heterogéneo, y se puede dividir en tres órdenes: Rhodospirillales, Rhodobacterales y Rhizobiales. Dentro de estos órdenes se encuentran las especies modelo en el estudio de la fotosíntesis anoxigénica como *R. palustris* perteneciente al orden de los Rhizobiales y *Rhodobacter sphaeroides* perteneciente a los Rhodobacterales. A lo largo de los años, se han llevado a cabo

muchos estudios que involucran distintos análisis acerca de características fisiológicas, morfológicas y genéticas de las bacterias púrpuras. En lo que respecta al análisis genómico, esto surge gracias a la secuenciación completa del genoma de algunas cepas que son de libre acceso en las bases de datos.

Las especies mencionadas anteriormente, junto con otros miembros de las α Proteobacterias, son considerados microorganismos altamente versátiles por su metabolismo. Esto genera gran interés en el estudio de vías metabólicas bajo diferentes condiciones que son fácilmente manipuladas en laboratorio, como cambios en la luz, el carbono, el nitrógeno o la fuente de electrones. Por otra parte, el estudio de estas bacterias para la producción de hidrógeno y degradación de hidrocarburos, entre otras, se ha vuelto cada vez más interesante desde el punto de vista de su aplicación [40].

El interés en el estudio de genómica y sistemática parte del deseo de entender la evolución y la filogenia bacteriana, así como también la diversidad especie-específica incluyendo adaptaciones de las especies ante las condiciones cambiantes entre los distintos ambientes, las relaciones de competencia y la distribución biogeográfica [30]. Con el descubrimiento de la electroactividad en bacterias surgen ahora nuevos retos, como por ejemplo identificar los determinantes moleculares relacionados con este tipo de respuesta.

Los tamaños de los genomas de *R. palustris*, *R. rubrum* y *R. sphaeroides* son de 5.45, 4.40 y 4.60 Mb aproximadamente, siendo los dos últimos de un tamaño similar mientras que el de *R. palustris* cepa CGA009 es más largo [31]. Además de la diferencia en el tamaño, la arquitectura del genoma de esta bacteria también presenta diferencias en comparación con las otras dos. En primer lugar *R. sphaeroides* presenta dos cromosomas circulares y 5 plásmidos. Diversas cepas de *R. rubrum* también presentan plásmidos aunque pequeños, mientras que para el caso de *R. palustris*, se identificó sólo un plásmido para la cepa CGA009, pero no para el resto de las cepas secuenciadas, como se verá mas adelante. Es interesante destacar que este plásmido tiene la capacidad de replicarse con miembros del género *Bradyrhizobium* pero no con bacterias púrpuras como *R. rubrum* o *R. sphaeroides*, indicando que el plásmido no

es de origen relacionado a bacterias púrpuras sino del grupo de los rizobios [31].

A pesar de compartir ciertas virtudes metabólicas, no se han encontrado regiones largas de similitud entre las tres especies con excepción del *cluster* de genes fotosintéticos aunque, a su vez, se sabe que *R. palustris* posee una maquinaria fotosintética mejor preparada para el crecimiento fotótrofo en comparación a las otras dos especies [67, 31].

R. palustris también posee un gran número de genes asociados a la transducción de señales en comparación a otros miembros de α Proteobacteria, lo cual le confiere probablemente a esta especie la habilidad de controlar diversos procesos fisiológicos que le permiten adaptarse a distintos nichos o condiciones adversas [31].

En lo que respecta a rearreglos cromosómicos, las tres especies mencionadas presentan familias similares de transposones. Sin embargo, el número varía dentro que cada especie por lo cual las funciones derivadas de estos transposones probablemente confieran a cada cepa un rol importante en la diferenciación intra o inter-específica [31].

3.1.2. Comparación genómica de especies

La genómica ha revolucionado varios aspectos de la microbiología ya que diariamente se genera una gran cantidad de información, siendo necesarias aproximaciones bioinformáticas, estadísticas y matemáticas para llevar a cabo investigaciones en este campo. En los últimos años algunos paradigmas han comenzado a cambiar en la medida en que aumentaron los esfuerzos por entender la gran diversidad microbiana. Por ejemplo, lo que hace poco más de dos décadas parecía inalcanzable como la secuenciación de un genoma microbiano completo, ahora es considerado insuficiente para poder describir una especie o un género [68].

La clasificación de bacterias se basó históricamente en características como estructuras celulares y tipo de metabolismo. Más tarde, alrededor del año 1970, los ensayos de hibridación del ácido desoxirribonucleico (ADN) permitieron diferenciar las distintas especies microbianas. De esta manera, los aislamientos microbianos que mostraban un porcentaje de hibridación (homología) ADN-ADN igual o mayor a un

70 % se consideraban de la misma especie. Luego, gracias a las técnicas de secuenciación, otros marcadores como el gen que codifica para el ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) 16S se introdujeron con el objetivo de identificar aislamientos microbianos. Este método presentaba además, gran correlación con la técnica previa de hibridación. Si bien resultó efectiva para la gran mayoría de los casos que hoy conocemos, la técnica del 16S presenta aún limitaciones y algunas excepciones, como por ejemplo para el género bacteriano *Bacillus*, o para microorganismos que presenten polimorfismos en regiones utilizadas para la generación de *primers* universales [69].

Por otra parte, el análisis mediante el uso del ARNr 16S no resulta eficiente para resolver cuestiones a nivel de sub-poblaciones. Es así, que la introducción de otras técnicas que aumenten la cobertura genética del análisis resultaron mejores, como la tipificación multilocus de secuencias, del inglés (*Muti-Locus Sequence Typing*) (MLST). Este es un procedimiento para caracterizar aislamientos bacterianos que incluye la secuenciación de fragmentos de 7 genes *housekeeping*. Aún así, las técnicas mencionadas siguen resultando pobres por la limitada cobertura génica que incluyen en el análisis intra-específico [69].

3.1.3. Pangenoma y Genoma núcleo: concepto y modelos

En los últimos años, se ha hecho evidente que los genomas bacterianos pertenecientes a un mismo género o especie presentan un nivel de conservación menor a lo que uno esperaría. Por ejemplo, distintas cepas de una misma especie pueden presentar un conjunto de genes conservados, pero también un gran número de secuencias que no estén conservadas en todas las cepas. En base a esto, se propuso que los genomas bacterianos se componen, en principio, de un conjunto de genes que pertenecen al denominado genoma núcleo, y un conjunto de genes accesorios, pertenecientes al genoma flexible. Las secuencias pertenecientes al primer grupo son aquellas que codifican para proteínas involucradas en funciones celulares esenciales, como por ejemplo replicación, transcripción, traducción así como también las relacionadas con el fenotipo de la especie [68, 69]. Por otro lado, las secuencias accesorias suelen codificar proteínas que contribuyen a la adaptación de los distintos aislamientos a su nicho; o

que son compartidas por algunos miembros del grupo, pero no por todos. Por último, se denomina pangenoma al conjunto o repertorio total de secuencias que presentan todas las cepas de una especie o género.

Tettelin y col. (2005) enfatizaron por primera vez en la magnitud de la diversidad microbiana intra-específica al comparar los genomas de siete cepas de *Streptococcus agalactiae* y mostraron que el pangenoma puede ser mucho mayor que el genoma de un simple aislamiento [70].

Se ha demostrado para varias especies bacterianas, incluyendo tanto patógenas como de vida libre, que los pangenomas de las mismas resultan abiertos. Esto significa que se necesitaría de un gran número de genomas de distintas cepas para poder determinar todo el repertorio génico de la especie [71, 70]. Por otro lado, para especies con un pangenoma cerrado, la secuenciación de genomas adicionales no provee información adicional (genes novedosos) y se considera que el repertorio génico entero de la especie ha sido caracterizado. Esto último resulta cierto para especies comensalistas y patógenas, cuyo nicho es el hospedador y por ende las condiciones no varían con la magnitud de los cambios que pueden presentarse en otros nichos. El análisis genómico de estas bacterias es un caso interesante en lo que respecta a la variación génica de las sub-poblaciones ya que deben co-evolucionar junto con sus hospedadores [68].

Existen varios modelos que han intentado estimar los tamaños del pangenoma y del genoma núcleo de algunas especies, pero sólo dos de ellos se abordarán en esta tesis. Brevemente, estos modelos se diferencian principalmente en la cantidad de categorías de genes que presenta cada especie o género, y por ende en la cantidad de variables y la complejidad de los modelos matemáticos. El primer modelo es el de Tettelin y col., el cual permite estimar el tamaño del genoma núcleo y del pangenoma, realizando un *clustering*¹ de genes en dos grupos: genes pertenecientes al núcleo que son compartidos por todas las cepas, y los genes novedosos [70]. Dado que el análisis comparativo de múltiples genomas de especies individuales ha revelado que existe una gran diversidad intra-específica, surge la pregunta de ¿Cuántos genomas de una

¹proceso de clasificación a partir de una base de datos que forma agrupaciones o *clusters* según un criterio de similitud

especie deberían ser secuenciados para tener representado todo el repertorio génico de la misma? Tettelin y col. fueron pioneros en intentar responder esta pregunta mediante la comparación genómica de distintas cepas de *S. agalactiae*. Una manera de abordar esto, consistió en estimar cuántos genes novedosos pueden identificarse cada vez que un nuevo genoma de la especie es secuenciado [70]. Lo más notable resultó ser que cantidades significativas de secuencias en estos genomas eran específicas de cada cepa y, por lo tanto, cada nuevo genoma que fuera secuenciado e integrado al análisis arrojaba un cierto número de genes novedosos al repertorio génico de la especie.

Intuitivamente, a medida que más genomas se incorporan al análisis, el número de genes novedosos comienza a disminuir. El análisis de *S. agalactiae* reveló que, en promedio, cada genoma adicional presenta 33 genes novedosos previamente no caracterizados para la especie. Para llegar a este resultado, se utilizaron funciones de decaimiento exponencial para el ajuste de los datos [70]. Estos resultados mostraron además que el pangenoma de *S. agalactiae* es abierto, y que se requiere de un gran número de genomas en el análisis para caracterizar el repertorio génico de la especie.

Para extrapolar el tamaño del genoma núcleo de una especie, se puede medir el número de genes conservados como una función del número de cepas utilizadas, para $n = 1, 2, \dots, 8$: (*i*) genomas considerados. Los valores promedio de genes compartidos se extrapolan mediante un ajuste con una función de decaimiento exponencial:

$$F_c n = \kappa_c \exp\left[\frac{-n}{\tau_c}\right] + \Omega \quad (3.1)$$

donde κ es la amplitud del decaimiento exponencial, τ la constante de decaimiento que mide la velocidad con la cual $F_c(n)$ (genoma núcleo) converge a un valor asintótico y Ω mide el tamaño del genoma núcleo cuando $n \rightarrow \infty$, es decir, cuando el número de genomas que se tienen en cuenta tiende a infinito.

De manera similar, para $n = 1, 2, \dots, 8$ números de genes cepa-específicos, la estimación del número de genes novedosos también se puede ajustar por una función

de decaimiento exponencial:

$$F_s n = \kappa_s \exp\left[\frac{-n}{\tau_s}\right] + tg(\theta) \quad (3.2)$$

donde $tg(\theta)$ mide el número específico de genes para $n \rightarrow \infty$.

Como el tamaño del pangenoma puede calcularse como una función del número de cepas independientes n , entonces:

$$P(n) = D + \sum_{j=2}^n \{\kappa_s \exp\left[\frac{-j}{\tau_s}\right] + tg(\theta)\}$$

donde D es el número promedio de genes por genoma. Esta expresión puede escribirse algebraicamente igual de la siguiente manera:

$$P(n) = D + tg(\theta)[n - 1] + \kappa_s \exp\left[\frac{-2}{\tau_s}\right] \left[\frac{1 - \exp\left[\frac{-(n-1)}{\tau_s}\right]}{1 - \exp\left[\frac{-1}{\tau_s}\right]} \right] \quad (3.3)$$

A partir de la Eq. 3.3, $\lim_{n \rightarrow \infty} [P(n)] \approx tg(\theta) \cdot n$, donde θ representa el ángulo extrapolado del crecimiento del tamaño del pangenoma $P(n)$ a medida que más cepas independientes de la especie se agregan al análisis. En la figura 3-1 se observa por un lado el número de genes que comparten todas las cepas analizadas de *S. agalactiae* (genoma núcleo) y el tamaño estimado del pangenoma.

En primer lugar, los autores extrapolaron el número de genes compartidos ante la adición secuencial de secuencias, por medio del ajuste de la función a los datos (Eq 3.1) y observaron que el número de genes compartidos por todas las cepas disminuye inicialmente a medida que se agregan más secuencias. Luego, el tamaño estimado del genoma núcleo alcanza un mínimo de 1806 genes y se mantendría relativamente constante independientemente del agregado de más genomas al análisis (Fig 3-1).

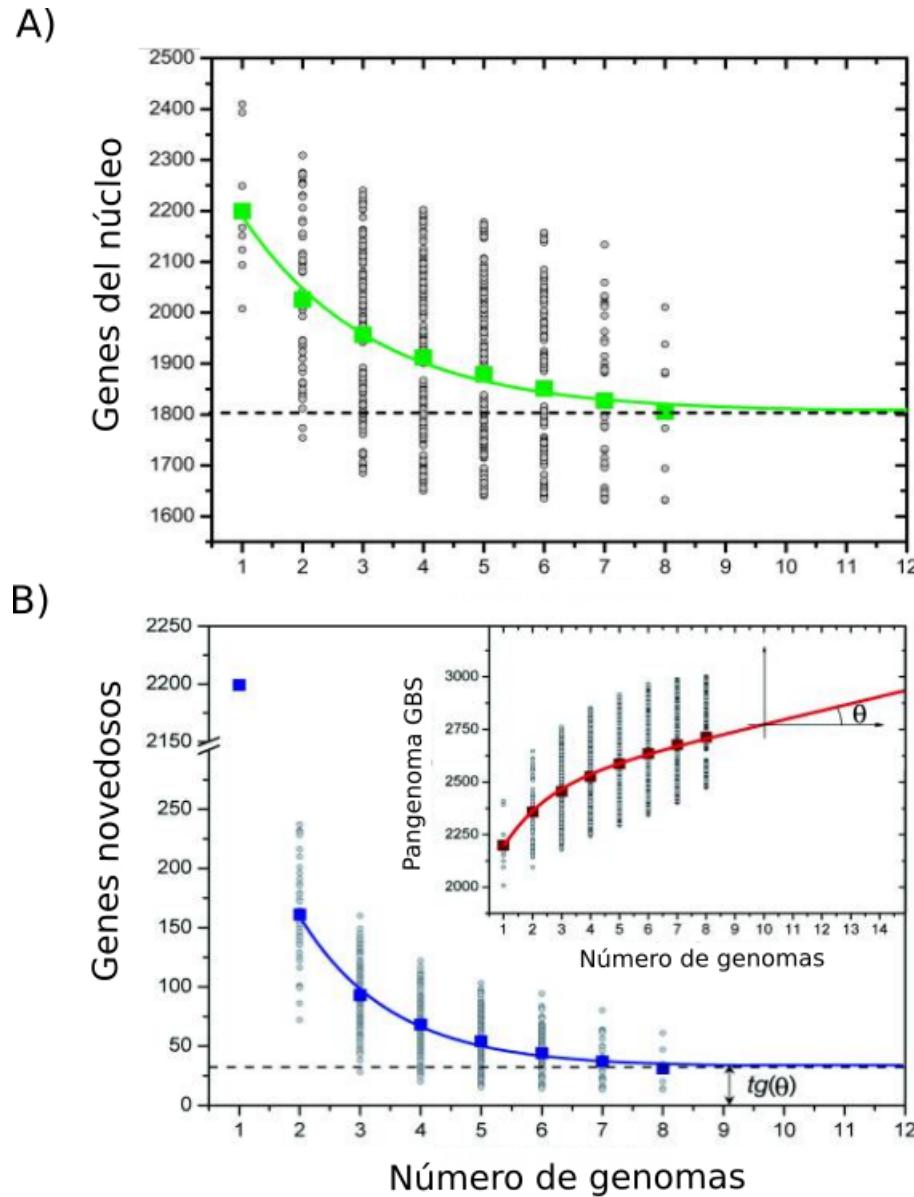


Figura 3-1: Tamaño del genoma núcleo y pangenoma de *S. agalactiae*. A) El número de genes compartidos se graficó en función del número de cepas agregadas secuencialmente al análisis, la línea continua representa el ajuste según la Eq. 3.1 a los datos que estimó un genoma núcleo de aproximadamente 1806 genes. B) La disminución del número de genes novedosos o específicos se muestra en azul. El número promedio de genes novedosos ($tg(\theta)$) estimado a partir los datos con la Eq 3.2 se muestra en líneas punteadas. *Inset*, tamaño del pangenoma en función del número de cepas n mostrado en rojo. Figura extraída y adaptada de [75].

Para la estimación del repertorio génico total de la especie (pangenoma), primero se determinó el número de genes novedosos ante la adición secuencial de secuencias y se utilizó la ecuación 3.2 para el ajuste. Luego, la ecuación 3.3 arrojó un número prome-

dio de 33 genes novedosos ante el agregado de cada genoma. En otras palabras, esto significa que el modelo predice que para cada nuevo genoma de *S. agalactiae* agregado al análisis, se estiman en promedio 33 nuevos genes que se agregan al repertorio génico o pangenoma de la especie y sugiere que el mismo es un pangenoma abierto.

Este trabajo fue un punto de partida para el entendimiento y análisis de la diversidad microbiana, sugiriendo que para ciertas especies no resulta suficiente la secuenciación de cientos de genomas para estimar su repertorio génico.

Unos años más tarde, Lapierre y Gogarten realizaron un análisis incluyendo un mayor número (573) de taxones bacterianos para estimar el pangenoma total de las bacterias. Mediante el análisis de la frecuencia de ocurrencia, los autores determinaron 3 grupos de familias de genes que forman el pangenoma, cada uno evolucionando bajo distintas fuerzas [72]. Entre los grupos se encuentran: 1) secuencias pertenecientes al genoma núcleo extendido, compartido por todos o casi todos los miembros incluídos en el análisis, 2) secuencias accesorias, presentes en uno o unos pocos miembros y 3) secuencias representadas en un subset de genomas [72]. A partir de estos resultados se desprende una definición de genoma núcleo más relajada, que permite incluir secuencias que sólo se pierden en una pequeña fracción de la población. Si bien éstas no codifican necesariamente proteínas necesarias para la supervivencia del organismo, constituirían una base de componentes esenciales sobre los cuales se apoya el resto del genoma [73].

En vista de que la caracterización de genes de una especie no debería tomar sólo dos posiciones (genoma núcleo compartido por todos y genes accesorios) como propone Tettelin y col., comenzaron a desarrollarse modelos más complejos para evitar caer en restricciones que no son biológicamente tan reales [74, 75]. En uno de dichos modelos, se designaron 3 clases de genes: aquellos pertenecientes al núcleo y al núcleo relajado, el cual comprende secuencias presentes en la mayoría de las cepas; al *shell*, que abarca secuencias moderadamente conservadas; y al *cloud*, que incluye aquellos genes raros compartidos entre unas pocas cepas o cepa-específicos.

En lo que respecta a especies no patógenas, se ha determinado gran variabilidad intra-específica para varios microorganismos, y esto es particularmente cierto tam-

bién para *R. palustris*. Oda y col. realizaron en 2002 un estudio sobre la diversidad genotípica y fenotípica de bacterias púrpuras en sedimentos acuáticos y mostraron que el género *Rhodopseudomonas* consiste en poblaciones diferentes con distintas características fisiológicas [76]. Unos años más tarde, se revelaron adaptaciones de estas bacterias fotótrofas a distintos micro-ambientes sedimentarios mediante el análisis del genoma núcleo y el pangenoma con algunas de las cepas secuenciadas de *R. palustris* [77], lo cual se desarrollará en la siguiente sección.

3.1.4. Características del genoma de *R. palustris*

Larimer y col. realizaron un estudio genómico de la cepa CGA009 de *R. palustris*, el cual reveló que una gran cantidad de secuencias le confieren a esta cepa gran versatilidad para los cuatro tipos de metabolismo de carbono y energía [36].

R. palustris puede crecer anaeróbicamente utilizando energía de la luz y obteniendo el carbono de compuestos orgánicos o CO₂; mientras que en ambientes aeróbicos crece heterotróficamente. Su genoma tiene la maquinaria necesaria para la degradación de ácidos grasos, dicarboxílicos, compuestos aromáticos (incluyendo monómeros de lignina). Posee los genes que codifican para la ruta Embden-Meyerof (glucólisis), ciclo de ácidos tri-carboxílicos (TCA), vía pentosa-fosfato y glioxilato, como también para la síntesis de glucógeno y poli-β-hidroxialkanoatos (PHB), los cuales puede degradar ante la falta de una fuente de carbono. Por otro lado, se encontró que esta cepa posee 3 nitrogenasas: una dependiente de molibdeno, una de vanadio y una de hierro, evidenciando su capacidad de fijar N₂. Sólo se conoce un caso, *Azotobacter*, que codifica para las tres nitrogenasas, siendo que el resto de las bacterias fijadoras de nitrógeno poseen en su mayoría, sólo la nitrogenasa dependiente de molibdeno [36].

La posibilidad de sensar rápidamente los cambios en las condiciones ambientales y ajustar el metabolismo de manera adecuada surge de la gran capacidad de regulación génica de esta especie. El genoma de *R. palustris* presenta, al igual que algunas bacterias que habitan suelos, un 9 % de sus genes destinados a la regulación génica; mientras que la mayoría de las bacterias de vida libre poseen una proporción de 5-6 % de genes regulatorios. La mitad de estos genes codifican dominios transmembrana, y en menor medida incluyen genes con dominios PAS (sensores de O₂, estado redox, luz), dominios GAF (unión a ligandos, interacciones proteína-proteína), entre otros. Presenta una gran variedad de arquitecturas en los dominios de hisitidin kinasas en 63 puntos de vías de señalización y 19 factores sigma, 16 de los cuales son factores sigma extra-citoplasmáticos. Estos últimos se designan así ya que los 4 casos de mayor estudio en un primer momento involucraron funciones sobre periplasma y membrana (transporte, secreción, estrés extra-citoplasmático) [78].

La tabla 3.1 muestra el número de genes divididos en distintas categorías y su respectivo porcentaje en el genoma de *R. palustris* CGA009 [36]. Si bien el trabajo realizado por Larimer y col. arrojó gran cantidad de información acerca de la maquinaria de genes de *R. palustris* CGA009, se sabe que distintas cepas de una misma especie bacteriana pueden presentar una gran diferencia génica. Las bacterias púrpuras tienen la capacidad de vivir bajo varios tipos de metabolismos, por lo que esta versatilidad se encuentra también reflejada en su amplia distribución en los ambientes. A pesar de esto, el estudio de la diversidad genotípica de estas bacterias no ha sido ampliamente abarcado.

Muchas especies bacterianas, particularmente las que habitan los suelos, se componen de clones genéticamente diversos que se originan como consecuencia de procesos evolutivos que ocurren durante alguna adaptación a condiciones locales en ambientes que son muy heterogéneos y que por ende presentan una gran variedad de nichos [79].

Categoría de genes	Número de genes	% del genoma
Metabolismo energético	1514	31
Transporte	700	14.5
Transducción de señales	225	4.7
Transcripción	288	6
Replicación y reparación	129	2.7
Traducción	170	3.5
Predicción de la función general	404	8.4
Función desconocida	432	9
Hipotéticas Conservadas	545	11.3
Hipotéticas	429	8.9

Cuadro 3.1: Distribución de genes de *R. palustris* CGA009 en categorías funcionales. Tabla adaptada de [124]

Aislamientos de *R. palustris*

A pesar de que se ha aislado un gran número de cepas pertenecientes a esta especie, sólo se encuentran disponibles algunos pocos genomas completamente secuenciados. *R. palustris* CGA009 es la cepa ya mencionada, utilizada para gran variedad de estudios particularmente relacionados al análisis genómico [36]. Las cepas BisB18, BisB5 y BisA53 se aislaron a partir de la superficie de sedimentos de tipo arcilloso de un río en los Países Bajos [77]. Las dos primeras provienen de la misma muestra de sedimento, mientras que la tercera se aisló a partir de una muestra a 5 metros de distancia de la primera. La cepa HaA2 se aisló a partir de una muestra tomada a 240 km de distancia de las anteriores, a partir de un estanque natural poco profundo producto de la acumulación de agua de lluvia en una depresión del ambiente [76]. La cepa TIE-1, caracterizada como oxidadora de hierro, se aisló a partir de un estero rico en hierro en *Woods Hole*, Massachussets. Por último, *R. palustris* DX-1 se aisló a partir de un cátodo expuesto al aire de una celda de combustible microbiana alimentada con acetato y operada durante tres meses en condiciones de laboratorio [56].

Oda y col. (2008) realizaron un análisis comparativo de los genomas de 5 cepas de *R. palustris* y concluyeron que, a pesar de compartir un gran número de genes entre ellas, cada cepa contiene un conjunto de genes que son cepa-específicos, o que se encuentran compartidos por unas pocas cepas pero no por todas [77]. A partir de las 23683 proteínas predichas en total, 2750 resultaron ser las secuencias compartidas por los 5 genomas analizados y se estableció un genoma núcleo relajado de 3319 genes (compartido por 4 o más cepas). Estas secuencias pertenecientes al núcleo, dieron cuenta de la flexibilidad metabólica característica de la especie, codificando proteínas para la fotosíntesis, respiración, fijación de nitrógeno, biodegradación y oxidación de compuestos inorgánicos [77].

En la siguiente figura adaptada de Oda y col. (2008) se observa el porcentaje y número de genes de cada una de las cepas analizadas que se comparten entre los 5 genomas (genoma núcleo), entre 4, 3 y 2 genomas, y el número de secuencias específicas a cada cepa (Fig. 3-2).

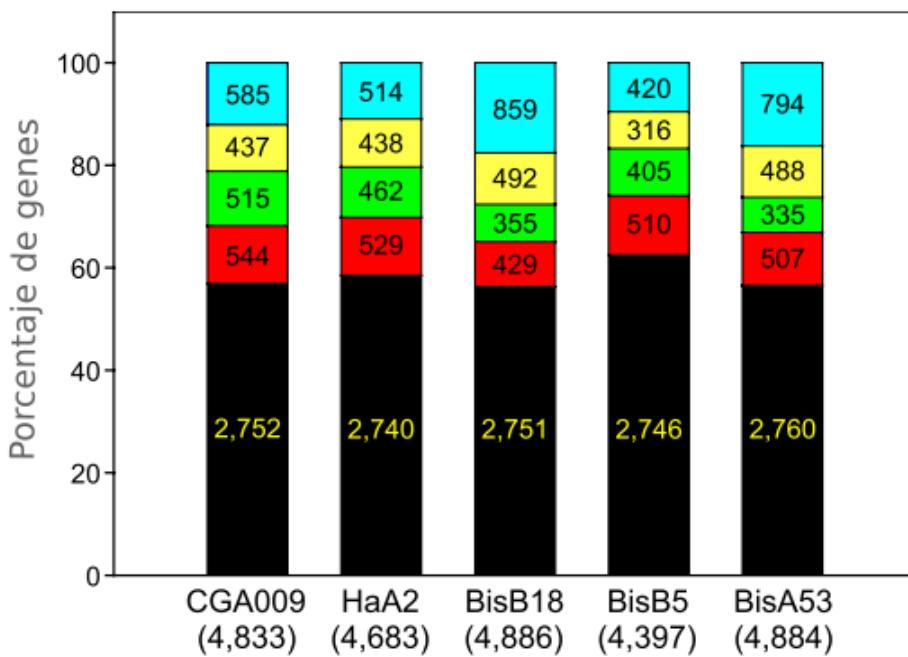


Figura 3-2: Comparación genómica de las 5 cepas de *R. palustris* analizadas en [68]. Las categorías de ortólogos se determinaron mediante el uso del software OrthoMCL. Cada categoría se encuentra representada por colores: en negro los genes compartidos por los 5 genomas incluyendo parálogos, en rojo aquellos compartidos por 4 genomas incluyendo parálogos, en verde por 3 genomas incluyendo parálogos y en amarillo por 2 genomas incluyendo parálogos. Los genes ceapa-específicos se encuentran en celeste.

Las características principales de cada cepa en cuanto a la estimación de preferencias metabólicas basadas en el análisis genómicos se encuentran resumidas en la tabla 3.2. El análisis realizado por Oda y col. sugiere que *R. palustris* CGA009 estaría mejor adaptada a ambientes con escaso nitrógeno, al presentar gran variedad de genes destinados a la fijación y adquisición de nitrógeno, particularmente por ser genéticamente rica en la nitrogenasa de vanadio. HaA2 presenta varias oxidases terminales adicionales en comparación al resto de las cepas, indicando una adaptación a ambientes aeróbicos o microaeróbicos y un metabolismo oxidativo. Por el contrario, la cepa BisB18 es la que mejor estaría adaptada a sobrevivir bajo un metabolismo respiratorio anaerobio en condiciones de oscuridad, ya que posee enzimas que le permiten fermentar piruvato y tres sets de genes que codifican para la dimetil-sulfóxido reductasa, la cual le permitiría usar el DMSO como acceptor final de electrones. Otra particularidad de BisB18 es su capacidad de crecer fotoheterótrofamente utilizando

metanol o acetona como fuente de carbono, lo cual resulta atípico para el resto de las cepas. Dentro del género *Rhodopseudomonas*, BisB5 es de las pocas que presenta un inventario génico destinado a la degradación de fenil-acetato como fuente de carbono para un crecimiento fotoheterótrofo. Por último, BisA53 forma *biofilms* gruesos en condiciones de laboratorio y posee varios genes relacionados a la producción de exopolisacáridos, como también siete *sets* de genes colectores de luz mientras que el resto de las cepas posee sólo cuatro [77]. Este análisis comparativo confirma que a pesar de tratarse de la misma especie, los genes específicos a cada cepa, entre otras particularidades, las definen como ecotipos diferentes que probablemente hayan evolucionado con distintas adaptaciones en función de las necesidades impuestas por el ambiente.

Cepa	Especialización/Adaptación
CGA009	Fijación y adquisición de nitrógeno
HaA2	Metabolismo aerobio oxidativo
BisB18	Crecimiento anaeróbico en oscuridad
BisB5	degradación anaeróbica de compuestos aromáticos
BisA53	Metabolismo fotótrofo, síntesis de exopolisacáridos

Cuadro 3.2: Características particulares predichas como adaptaciones de cada cepa de *R. palustris* adaptada de [68]. Mediante la interpretación basada en los genes cepa-específicos se predijeron las características fisiológicas más relevantes para cada cepa en lo que respecta a la vida microbiana en sedimentos.

Debido a las particularidades que hacen a *R. palustris* una especie tan interesante, se llevó a cabo el análisis genómico de la cepa autóctona AZUL. En primer lugar, se comparó esta cepa con aquellas que estuviesen secuenciadas en su totalidad a ese momento, y luego se interrogó su genoma con mayor profundidad para determinar las características génicas relacionadas con su ambiente.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Aislamiento de la cepa AZUL, secuenciación y anotación

La cepa AZUL de *R. palustris* fue cedida gentilmente por el Dr. Néstor Cortez (IBR-CONICET) quien estuvo a cargo del aislamiento. Se utilizaron muestras de agua de la Laguna Azul ($27^{\circ}34'17.3''$ S $68^{\circ}32'19.6''$ W) provistas por la Dra. María Eugenia Farias (PROIMI-CONICET), las cuales se filtraron para su enriquecimiento. Los filtros se incubaron en medio rico en peptonas (PY) dentro de una jarra de anaerobiosis iluminada a temperatura constante de 28°C . Luego de 2-3 días de incubación, se detectó la coloración rojo-amarronada en los filtros y en el medio utilizado. El cultivo se sembró sobre PY-agar para lograr el aislamiento de bacterias coloreadas capaces de crecer en anaerobiosis y luz [57].

no se dice nada de la secuenciacion ni de la anotación!

3.2.2. Análisis genómico

Es importante tener en claro los distintos *softwares* que se utilizaron para realizar el análisis tanto individual como comparativo de los genomas de *R. palustris*. Para la comparación genómica intra-específica se utilizaron distintas aproximaciones: el paquete GET HOMOLOGUES (GH) [80] y el programa Roary [81].

GH es un paquete de código libre que utiliza aproximaciones de búsqueda de ortólogos² que permiten realizar un análisis detallado del pangenoma de una especie.

En la figura 3-3 se muestra el diagrama de flujo que resume el funcionamiento del programa. Los archivos de secuencias *input* que se aceptan son del tipo fasta (.faa) y aquellos descargados del GenBank (.gbk). Para realizar el *clustering* de ortólogos, GH puede utilizar tres algoritmos de búsqueda diferentes y obtener un consenso a partir de ellos. Además, para realizar un análisis más robusto, el programa permite

²Secuencias o genes homólogos originados en base a un proceso de especiación. Es decir, cuando una especie diverge en dos especies separadas, las copias divergentes presentes en cada organismo se denominan ortólogas. Este concepto aplica para el caso de las distintas cepas de una misma especie. En otras palabras, las secuencias ortólogas son aquellas secuencias presentes en distintos organismos que presentan alto grado de similitud ya que se han originado a partir de un ancestro en común.

seleccionar previamente los parámetros de búsqueda como por ejemplo el porcentaje de solapamiento e identidad de los alineamientos, como también la línea de corte del *E-value*³. Con el mismo objetivo, también es posible imponer un criterio de sintenia⁴ parcial y/o escanear la composición de los dominios en las secuencias. Para esto último, se utiliza la clasificación de dominios proteicos de Pfam, cuya amplia colección posee alineamientos de múltiples secuencias que cubre gran parte de los dominios y familias de proteínas comunes. El escaneo de composición de dominios se realiza mediante el paquete incorporado HMMER3. Esta restricción aumenta la probabilidad de que las secuencias agrupadas en cada *cluster* sean proteínas funcionalmente equivalentes.

Los algoritmos que permiten realizar el agrupamiento de ortólogos dentro del paquete GH son: *best bidireccional hits* (BDBH), *clusters of orthologous groups triangles* (COGt) y *orthologous markov clustering* (OMCL). Mientras BDBH se basa en búsquedas por pares, COGt realiza aproximaciones de a 3, las cuales se consideran más confiables ya que utilizan algoritmos más específicos para identificar eventos de especiación y duplicación. Los métodos de a pares en cambio, usan la relación simétrica de *best-match* como criterio de ortología. Por otro lado OMCL aplica el algoritmo de cadena de Markov, ampliamente utilizado para el agrupamiento de redes en bioinformática, que permite una clasificación global de las relaciones en un mismo espacio, generando *clusters* que se componen de ortólogos y/o parálogos⁵ recientes (si fueran incluídos) de al menos dos especies.

GH permite realizar análisis tanto estadísticos como gráficos del genoma núcleo y pangenoma, como también realizar los ajustes necesarios para estimar sus tamaños mediante el modelo de Tettelin y col. (2005) [70] o el modelo mixto binomial de Snipen y col. (2009).

³Número de *hits* esperados con la misma puntuación (*score*) que pueden ser encontrados sólo por azar.

⁴Conservación del orden de los genes en un segmento cromosómico.

⁵Secuencias o genes homólogos que se encuentran separadas en un genoma debido a un evento de duplicación.

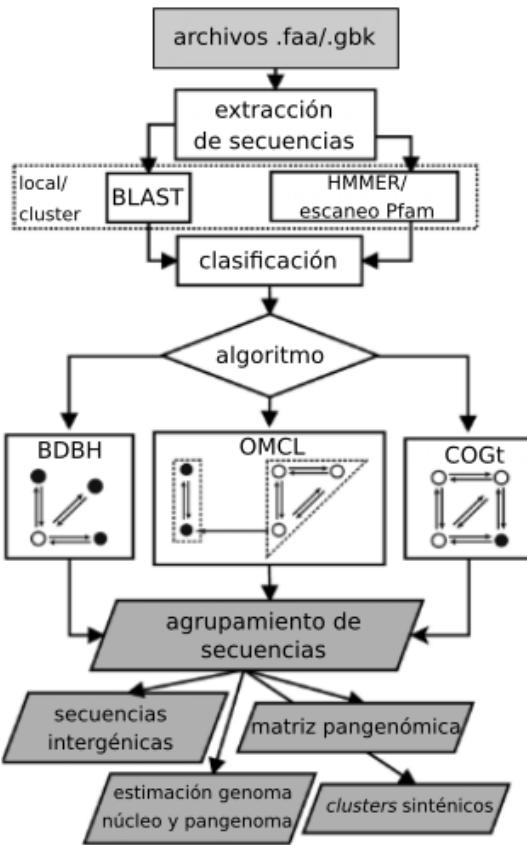


Figura 3-3: Diagrama de flujo del paquete GET HOMOLOGUES. Adaptado de [80].

Roary es otro programa destinado al análisis del pangenoma en procariotas, que permite identificar los genes pertenecientes al genoma núcleo y los accesorios [81]. Los archivos preferidos a la hora de iniciar un análisis con este programa tienen un formato particular, el cual se obtiene (entre otras formas) a partir del *software* de predicción de genes Prokka [82].

En la figura 3-4 se observa el diagrama de flujo con los pasos necesarios para obtener la información del pangenoma de una especie. En términos generales, Roary realiza un proceso de filtrado y pre-agrupamiento de las secuencias, luego realiza una comparación del tipo todos-contra-todos con BLASTP⁶, y finalmente un último agrupamiento utilizando el algoritmo de Markov (MCL)⁷.

⁶Programa bioinformático de alineamiento local de secuencias, en este caso, proteicas <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

⁷Algoritmo ampliamente utilizado para el agrupamiento de redes en bioinformática

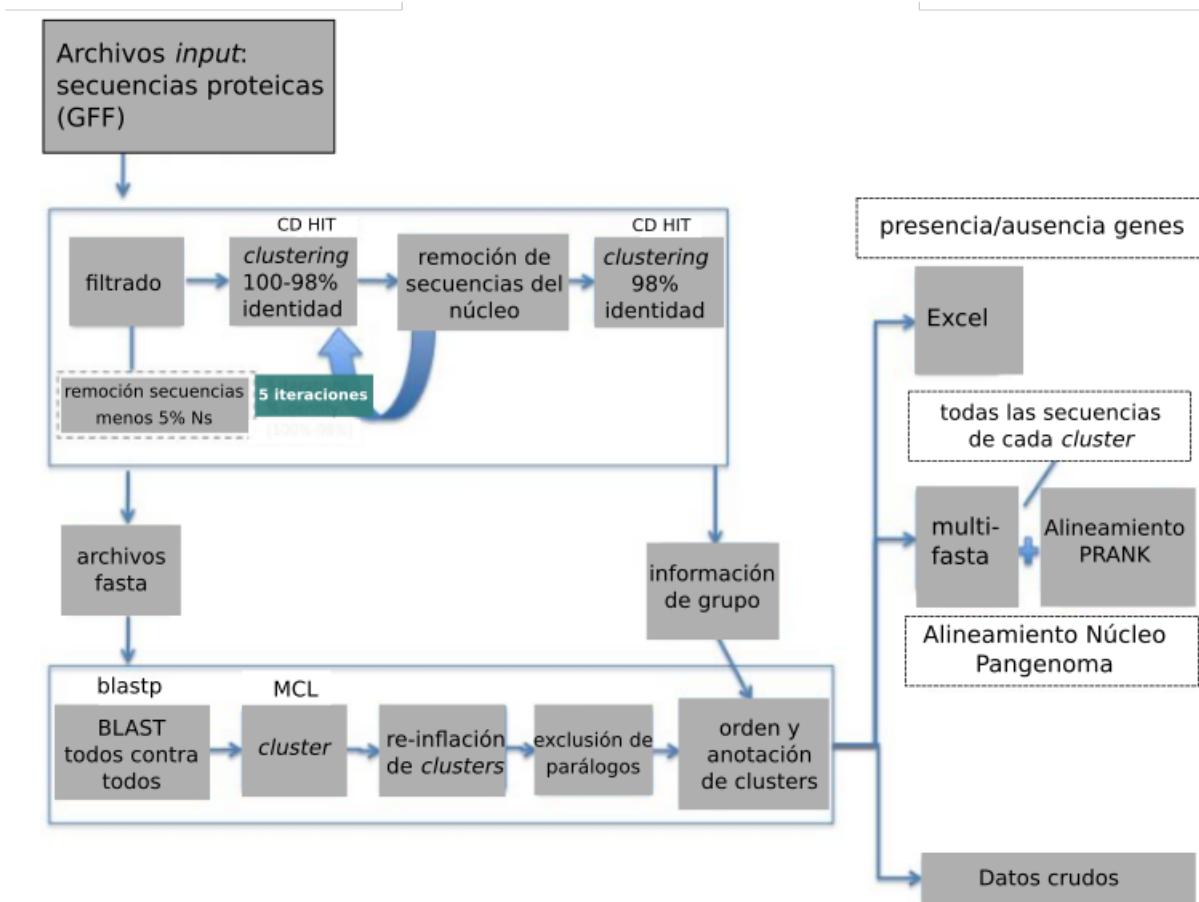


Figura 3-4: Diagrama de flujo del paquete Roary. Adaptado de [82].

Las secuencias *input* son entonces aquellas provenientes del Prokka, a partir de las cuales se extraen las regiones codificantes y se convierten a proteínas. El programa CD-HIT es utilizado en primer lugar para realizar un pre-agrupamiento, reduciendo así el costo computacional de los procesos subsiguientes. Este primer filtrado se realiza teniendo en cuenta primero una identidad y cobertura del 100 %, y reduciendo este valor serialmente un 0.5 % hasta llegar al valor determinado por el operador. Si se encuentra una secuencia homóloga en cada genoma, la misma es agregada al conjunto definido para el genoma núcleo y no se tiene en cuenta para el análisis posterior con BLASTP. Habiendo obtenido un archivo fasta con una secuencia representativa para cada *cluster*, se genera una base de datos a partir del mismo que se compara con la base de datos del BLAST. Como resultado, se genera un archivo que sirve luego como *input* del MCL, que realiza otro proceso de *clustering*. Finalmente, estos resultados se

expanden con aquellas secuencias extraídas en el primer paso de filtrado con el CD-HIT. En conjunto, estos procesos generan los *clusters* de homólogos para la especie.

En lo que respecta a la descripción genómica particular de *R. palustris* AZUL, se utilizó en primer lugar la información procedente de la plataforma de anotación rápida utilizando subsistemas (RAST) (<https://rast.theseed.org>), la cual posee un servicio de predicción de genomas procariotas. Dentro de esta plataforma entonces, se ingresan los datos crudos provenientes de la secuenciación. La predicción de genes a partir de estos datos se lleva a cabo por el software GLIMMER [83], para finalmente realizar una asignación de funciones, predecir los distintos Subsistemas en los genomas y reconstruir las redes metabólicas [84]. Esta plataforma brinda gran cantidad de información de una manera gráfica y de fácil interpretación, sirviendo como primer paso para la descripción general de la cepa [84].

Cepas de *R. palustris* utilizadas

Se utilizaron los datos crudos generados a partir de la secuenciación de *R. palustris* AZUL o aquellos provenientes de la predicción del RAST (según se indique). Los genomas de las cepas restantes se obtuvieron a partir de la plataforma del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/508>). Se seleccionaron aquellas cepas que al momento de realizar el análisis tuvieran su genoma completamente secuenciado y disponible.

Filogenia de la especie

Las secuencias del gen de ARNr se obtuvieron de la base de datos SILVA o NCBI y se alinearon con el programa de alineamientos MAFFT [85], utilizando el seteo establecido con excepción de la matriz, para la cual se utilizó PAM1. El alineamiento de múltiples secuencias se recortó (*trimmed*) con el programa BMGE (*Block Mapping and Gathering with Entropy*) [86], y se tuvieron en cuenta los siguientes argumentos: -m DNAPAM500 -h 0.5 -g 0.2 -b 1. Este procedimiento eliminó aquellas columnas del alineamiento con un porcentaje de *gaps* igual o mayor al 20 %. La reconstrucción filogenética se realizó con el programa MrBayes 3.2.6, el cual utiliza el método

de inferencia bayesiana [87]. Se utilizó el modelo evolutivo GTR, con los parámetros prestablecidos, tasa de variación de distribución gama y proporción de sitios invARIABLES. Se realizaron dos corridas de cadena de Markov Monte Carlo, acopladas a Metropolis (MCMCMC, por sus siglas en inglés Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo model), cada una con cuatro cadenas y una temperatura de T=0.05. La convergencia de las cadenas se controló mediante el monitoreo de la desviación estándar de las frecuencias de separación (<0.01).

Las secuencias genómicas completas de las cepas de *R. palustris* se obtuvieron del NCBI y la reconstrucción filogenética teniendo en cuenta el genoma núcleo de las mismas se realizó usando el *software* Roary [81].

Los árboles se visualizaron con Dendroscope v3.5.7 [88] y se editaron con iTOL [89].

Comparación genómica

Para el agrupamiento de secuencias ortólogas con el *software* GH, se estableció un mínimo de cobertura del alineamiento de 90 % para que dos secuencias resulten *best hits*. Esto simplemente realiza un *clustering*, no brinda información sobre el comportamiento del genoma núcleo o pangenoma.

El análisis de composición genómica⁸ que permite obtener tablas provenientes de distintos muestreos para la estimación del tamaño del genoma núcleo y pangenoma, tuvo en cuenta los siguientes parámetros:

- Porcentaje de identidad mínimo para que dos secuencias sean homólogas = 90. Por *default* no se impone una línea de corte respecto a la identidad, siempre y cuando BLAST identifique a las secuencias como *best hits*. Esto permite encontrar homólogos remotos. En este caso, se fijó este valor en un 90 % al tratarse de la misma especie bacteriana.
- Porcentaje mínimo de cobertura = 70. Esto significa que para el análisis de composición genómica, se requiere que un 70 % de la secuencia presente una

⁸Se realizan simulaciones que permiten estimar cuantos genes novedosos son adicionados con cada nuevo genoma muestrado al azar.

similitud igual o mayor al valor preestablecido.

A diferencia del parámetro nombrado anteriormente (cobertura del alineamiento de 90 %), estos parámetros no se utilizan en el proceso de *clustering* inicial de ortólogos sino que, forman parte del seteo de la simulación de la matriz pangenómica y controlan como se compara un gen con aquellos procesados previamente para ver si es catalogado como novedoso o no.

Se obtuvieron las secuencias de ADN genómico de las distintas cepas de *R. palustris* a partir del NCBI para la corrida con el *software* Roary. En el caso de la cepa AZUL, estos datos se descargaron directamente de la plataforma del INDEAR (<https://www.indear.com/>). Estos genomas pre-ensamblados se utilizaron como *input* en el programa Prokka para su anotación. Los archivos *output* conteniendo un ensamblado por muestra, se utilizaron como archivos de entrada para el análisis genómico por Roary. Para la comparación de las secuencias de las cepas de *R. palustris* realizada por BLASTP, se seteó el porcentaje de identidad en un 80 %.

3.2.3. Espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente

Se analizó una muestra de agua proveniente de la Laguna Azul mediante espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente (Perkin Elmer NexION 350X) por el método TotalQuant (CEFOBI - CONICET, Rosario, Argentina) para estimar semicuantitativamente el contenido de elementos. Mediante este método la estimación se obtuvo con un 50 % de error, lo cual permitió determinar la presencia o ausencia de los elementos en la muestra.

3.3. Resultados

3.3.1. Aislamiento de *R. palustris* cepa AZUL.

La cepa AZUL de *R. palustris* utilizada en esta tesis se aisló a partir de una muestra de agua proveniente de la Laguna Azul en Catamarca, Argentina. Esta laguna se encuentra en el altiplano andino, que es un platô del tipo volcánico-sedimentario de aproximadamente 4000 mts de altura, en el que se han formado algunas lagunas sobre cuencas endorreicas evaporíticas de difícil acceso. La irradiancia solar es 165 % mayor en comparación al nivel del mar, con un flujo de UV-B instantáneo de 17 W m^{-2} . Estas lagunas se caracterizan por una concentración baja de nutrientes, particularmente de fósforo, presencia de metales pesados y por presentar una gran amplitud térmica que va de los 20°C durante el día a los -40°C durante la noche. A pesar de presentar condiciones tan adversas, la diversidad microbiana es alta [90].

Se realizó un análisis fisicoquímico de la muestra de agua de la Laguna Azul a partir de la cual se aisló la cepa AZUL. El análisis se llevó a cabo mediante un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP, por *Inductively coupled plasma mass spectrometry*), por el método TotalQuant. Éste permite semicuantificar la mayoría de los elementos con un error de aproximadamente 50 %, que resulta suficiente para estimar la presencia o ausencia de los mismos y el orden de concentración. Los resultados se muestran en la tabla 3.3, en la que se puede observar la presencia de metales y metaloides como por ejemplo rubidio (Rb), cromo (Cr), vanadio (V), selenio (Se) y arsénico (As), entre otros. Dado que las condiciones de la región de las lagunas del Altiplano Andino son muy fluctuantes, los resultados de la tabla 3.3 evidencian que los microorganismos presentes en Laguna Azul se encuentran expuestos eventualmente a concentraciones altas de estos metales.

3.3.2. Análisis genómico

Una vez aislada la cepa, se procedió a secuenciar su genoma (INDEAR) el cual se anotó en la plataforma RAST (<http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>), un servidor

Elemento	Unidad	Concentración
B	Ppb	10640,759
Si	Ppm	6,3781105
Li	Ppm	2,9484005
P	Ppb	1240,9195
Br	Ppb	627,6245
I	Ppb	120,908
Fe	Ppb	94,2545
As	Ppb	58,2325
Rb	Ppb	20,569
Cr	Ppb	18,054
Xe	Ppb	15,569
V	Ppb	12,172
Ti	Ppb	11,7545
Se	Ppb	6,203
Sr	Ppb	6,098
Mo	Ppb	3,5615
U	Ppb	2,291
Zn	Ppb	2,038
Cu	Ppb	2,001
Sc	Ppb	1,7435
Al	Ppb	1,5515
Ba	Ppb	1,1725

Cuadro 3.3: Análisis del agua de la Laguna Azul. Se semicuantificaron los elementos presentes en la muestra extraída de la Laguna Azul mediante espectrocopía de masa con plasma acoplado inductivamente (ICP) por el método TotalQuant con un error de aproximadamente un 50 %. Los datos se encuentran ordenados de mayor a menor concentración en partes por millón (ppm)/ partes por billón (ppb) según se aclare.

Característica	AZUL	CGA009	BisB18	BisB5	BisA53	HaA1	TIE-1	DX-1
Tamaño (Mb)	6.05	5.46	5.51	4.89	5.51	5.33	5.74	5.4
GC (%)	65.6	65	65	64.8	64.4	66	64.9	65.4
Secuencias codificantes	5596	4862	4867	4397	4852	4792	5193	4849
Plásmido	-	1	-	-	-	-	-	-

Cuadro 3.4: Características generales de las distintas cepas de *R. palustris*. La información genómica de cada cepa utilizada en esta sección se obtuvo a partir de la información presente en el NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/508>). La información de la cepa AZUL se obtuvo a partir del servidor RAST (<http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>) donde se encuentra anotado su genoma.

destinado a la anotación de genomas procariotas.

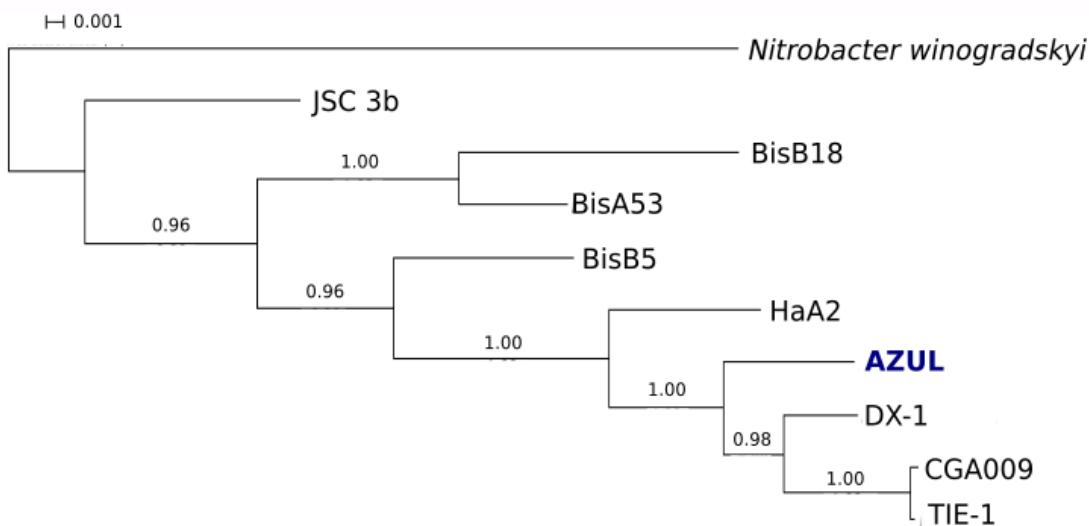
Para llevar a cabo la comparación genómica de AZUL con otras cepas de la especie, se realizó una búsqueda de aquellas que estuvieran secuenciadas en su totalidad al momento del análisis y fueran de acceso libre en el NCBI. Las cepas utilizadas para el análisis fueron: CGA009, BisB18, BisB5, BisA53, TIE-1, DX-1 y HaA2 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/508>). Las principales características genómicas se encuentran en la tabla 3.4.

A partir de la información presentada en la tabla 3.4 se puede observar, en primer lugar, que el genoma de la cepa AZUL es el más grande en comparación a las demás cepas analizadas; específicamente, un 10 % más grande que las demás cepas, y un 20 % más grande que BisB5. Por esta misma razón posee el mayor número de secuencias codificantes. Todas las cepas de *R. palustris* mostraron un porcentaje GC alto en comparación a otros genomas bacterianos [91], alrededor del 65 %. A partir de la información brindada por el NCBI, se realizó una filogenia para 9 miembros de la especie, basada en el gen que codifica el componente ribosomal 23S (Fig. 3-5A). A su vez, se obtuvo la filogenia correspondiente al alineamiento múltiple de secuencias pertenecientes al genoma núcleo a partir del Roary (Fig. 3-5B).

El análisis filogenético de *R. palustris* se realizó de dos maneras. Por un lado, el genoma núcleo de cada cepa se concatenó y alineó con los restantes. Por el otro, se utilizó el gen ribosomal 23S. En la figura 3-5 se observa en ambas filogenias que

AZUL se encuentra dentro de un mismo clado junto con las cepas DX-1, CGA009 y TIE-1, formando un grupo monofilético que posee a su vez un antecesor común con la cepa HaA2. Esta cepa fue aislada a 240 km de las cepas Bis, que se encuentran por fuera de este grupo. BisB18 parece estar más relacionada filogenéticamente con BisA53 que con BisB5, a pesar de haberse aislado a partir de la misma muestra de sedimentos y BisA53 a partir de una muestra ubicada a 5 metros de distancia. La cepa JSC 3b (Fig. 3-5A) corresponde a un aislamiento cuyo genoma se encontraba secuenciado por la mitad al momento del análisis, pero que se sumó al análisis para incluir la mayor cantidad de cepas cuya secuencia del 23S estuviera disponible. Ambas filogenias presentan topologías de árbol similares, y particularmente idénticas para el clado donde se encuentra la cepa AZUL. Esto indica que la relación de parentesco entre las cepas analizadas puede inferirse simplemente a partir del 23S, dado que el alineamiento múltiple de los genes del genoma núcleo confirma estas relaciones.

A)



B)

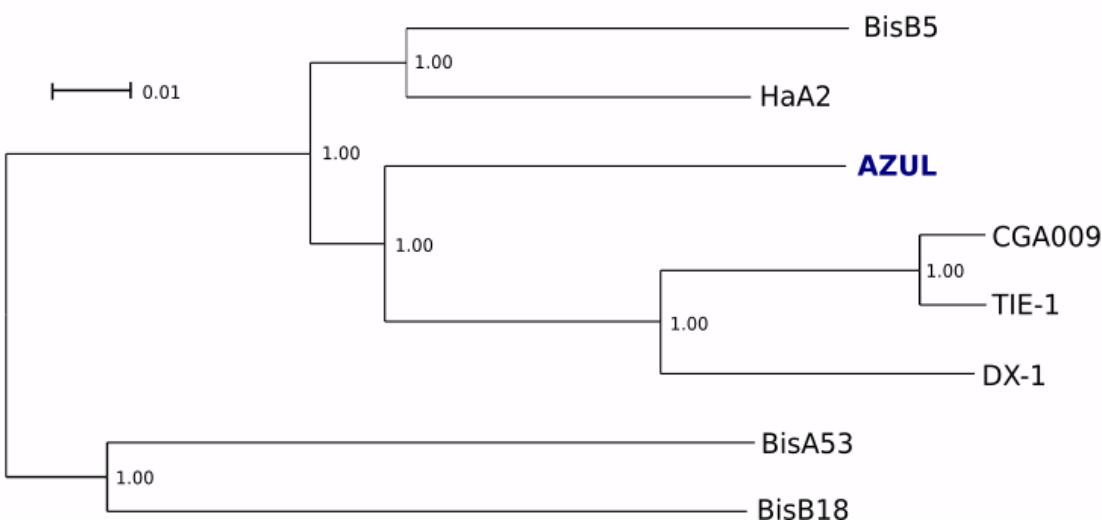


Figura 3-5: Relaciones filogenéticas de las cepas de *R. palustris*. A) Filogenia en base al gen que codifica para el 23S. Grupo externo: *Nitrobacter winogradskyi*. La estimación se realizó a partir del método de inferencia bayesiana (Ver materiales y métodos). B) Filogenia realizada a partir del alineamiento múltiple de secuencias pertenecientes al genoma n úcleo de las distintas cepas por el programa Roary. Este programa utiliza el m étodo *Neighbour Joining* para realizar la inferencia filogenética.

3.3.3. Pangenoma y genoma núcleo

Debido a la gran versatilidad metabólica de las bacterias púrpuras se decidió estudiar el comportamiento del genoma núcleo y del repertorio génico total o pangenoma de la especie *R. palustris*, teniendo en cuenta las 8 cepas ya mencionadas. Este análisis se llevó a cabo por medio de dos *softwares*: el Roary [81] y el GET HOMOLOGUES [80]. Tal y como se menciona en la sección Materiales y Métodos, estos programas presentan diferencias en cuanto a los algoritmos de búsqueda y *clustering* de secuencias. Sin embargo, ambos permiten la construcción e interrogación del genoma núcleo y del pangenoma. Al utilizar estos dos *softwares* se buscó comparar los resultados provenientes de distintos algoritmos y valerse de las mejores aproximaciones de cada programa para la interpretación de los resultados.

A partir de los 8 proteomas disponibles de cepas de *R. palustris*, se realizó una corrida del programa GH que permitió detectar secuencias homólogas utilizando en principio, el algoritmo de BDBH que realiza búsquedas bi-direccionales por BLAST. Además, para la búsqueda de ortólogos se realizó un escaneo vía HMMER de composición de dominios proteicos de Pfam. El mínimo de cobertura del alineamiento para el análisis por BLASTP, requerido para que dos secuencias resulten *best-hits*, se fijó al tratarse de la misma especie bacteriana en 90 % .

En este análisis, se obtuvieron 1873 (BDBH), 1856 (COGt) y 1960 (OMCL) *clusters* de genes pertenecientes al genoma núcleo. El consenso entre los tres algoritmos arrojó unos 1778 *clusters* de genes (Fig. 3-6 y Fig. 3.5). Por otro lado, mediante el análisis con Roary se observó un genoma núcleo de 1418 genes (Fig. 3.5).

Para poder definir el pangenoma de la especie, se volvieron a utilizar los *clusters* de genes definidos por los algoritmos COGt y OMCL⁹. Mediante este análisis se obtiene una matriz pangénomica, en forma de una tabla que muestra la presencia/ausencia de cada gen en los distintos genomas. El tamaño empírico del pangenoma según los algoritmos se muestra en la tabla 3.5, en conjunto con los modelos de estimación

⁹BDBH no se utiliza ya que para computar la composición de *clusters* pertenecientes al pangenoma y estimar el tamaño hipotético, la asignación de secuencias a los *clusters* no debe depender de un genoma de referencia, como es el caso de este algoritmo.

pangenómica (ver abajo). Se obtuvieron 12724 *clusters* de genes para el pangenoma según COGt, 6382 según OMCL y 16630 con Roary, lo cual indica que las características específicas de cada algoritmo producen grandes variaciones en la estimación del pangenoma.

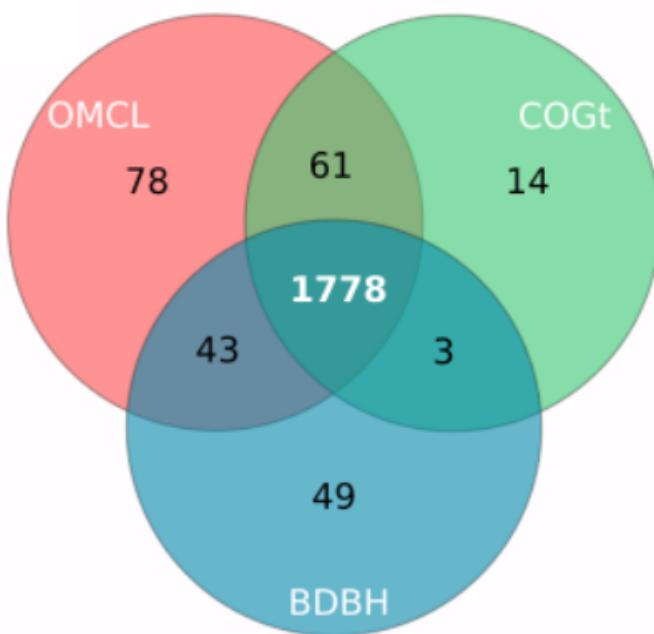


Figura 3-6: Genoma núcleo consenso de *R. palustris*. Se calculó el genoma núcleo de las ocho cepas mediante el uso de distintos algoritmos de búsqueda y *clustering* de genes dentro del paquete GH: BDBH, OMCL y COGt. Se fijó un mínimo de cobertura de alineamiento de secuencias de 90 % para el *clustering* de secuencias.

Agrupamiento Genómico	Definición	Roary	GET HOMOLOGUES			Modelo exponencial (Tettelin et al., 2005)	Modelo binomial mixto (Snipen et al.,)
			BDBH	COGt	OMCL		
Genoma núcleo	Genes presentes en todos los genomas/taxas	1418	1873 (1778)	1856 (1778)	1960 (1778)	2143	1960
Pangenoma	Repertorio total de genes	16630	-	12724	6382	8907	6375

Cuadro 3.5: Pangenoma y genoma núcleo de *R. palustris* según distintos métodos de *clustering*. Se utilizaron distintos algoritmos de agrupación de genes ortólogos para estimar el genoma núcleo de las 8 cepas y el repertorio total génico o pangenoma de la especie. Los resultados de BDBH, COGt y OMCL se obtuvieron por el paquete GH en el cual se estableció un mínimo de cobertura de 90 % para que dos secuencias resulten *best hits*. Entre paréntesis se muestra el genoma núcleo consenso obtenido en base a los tres algoritmos. En Roary se fijó el porcentaje de identidad en un 80 %. Las estimaciones del modelo exponencial y binomial mixto se obtuvieron por el programa GH en función del *clustering* realizado por OMCL.

Se procedió entonces a realizar los ajustes según el modelo de Tettelin y col. [70]. El paquete GH permite realizar un muestreo de 10 experimentos en el que los genomas son ordenados azarosamente y son secuencialmente agregados al *pool* pangenómico. De esta manera, se tiene un seguimiento de los genes novedosos que son agregados con cada nuevo genoma muestreado al repertorio total, mientras que aquellos que han sido encontrados previamente, son entonces agregados al genoma núcleo. En la figura 3-7A y B se muestran los ajustes realizados tanto para el núcleo como para el pangenoma según el modelo de Tettelin y col. (2005) a partir de los *clusters* definidos por el algoritmo OMCL.

Para estimar el número de genes presentes en todas las cepas, se extrapoló el número de genes compartidos mediante el ajuste de los datos con la ecuación 3.1. El resultado obtenido de todas las permutaciones en el orden de adición de genomas al análisis se muestra como puntos negros en la figura 3-7 A. Como era de esperarse, el número de genes compartidos disminuye a medida que se adicionan más genomas al análisis. Sin embargo, la curva indica que el genoma núcleo alcanza un mínimo de 2135 genes, que corresponde al valor de ω . Esto es, el tamaño del genoma núcleo cuando el número de cepas en el análisis tiende a infinito (Fig. 3-7). Es importante destacar que la varianza de los puntos se achica al final del análisis, lo cual sugiere

que no se necesitaría de un n mucho más grande para alcanzar un valor estable de ω . Por otro lado, el número de secuencias estimadas pertenecientes al genoma núcleo es mucho menor en comparación al tamaño promedio de los genomas de las cepas. Esto indica que una gran parte de los genes de cada cepa estarían moderadamente conservados o serían específicos a una o unas pocas cepas.

El paquete GH permite obtener una estimación del tamaño del pangenoma mediante el ajuste de los datos realizado con la ecuación 3.3 (figura 3-7 B). Los círculos negros en este gráfico corresponden a los valores obtenidos de todas las permutaciones en la búsqueda de genes novedosos, es decir, se cuentan los genes observados por primera vez, que no han sido encontrados previamente. El gráfico muestra el ángulo θ , que cuantifica la pendiente con la cual se agregan genes novedosos al pangenoma con la adición de cada cepa. Este resultado sugiere que el pangenoma de *R. palustris* es abierto y que su tamaño aumenta con el número de genomas que se adicionen al análisis. Los valores del genoma núcleo y del pangenoma estimados por este modelo ante la adición de la octava cepa al análisis fueron de 2143 y 8907 genes, respectivamente (Tabla 3.5).

Dado que este valor promedio de genes específicos ($\tan(\theta)$) puede variar a medida que se incluyen más genomas al análisis, se obtuvo la curva del comportamiento de genes novedosos *vs* cantidad de genomas. Para ello, se utilizaron los datos resultantes del análisis del GH de la figura 3-7 B y se graficaron los genes novedosos en función de un mayor número hipotético de genomas de *R. palustris*. La figura 3-7 C muestra que ante el agregado de 14 genomas en el análisis, la $\tan(\theta)$ alcanza un valor estable. Esto quiere decir, que aunque se agreguen más cepas al análisis, el número promedio de genes novedosos aportado por cada una se mantiene en un valor relativamente constante de aproximadamente 336 genes.

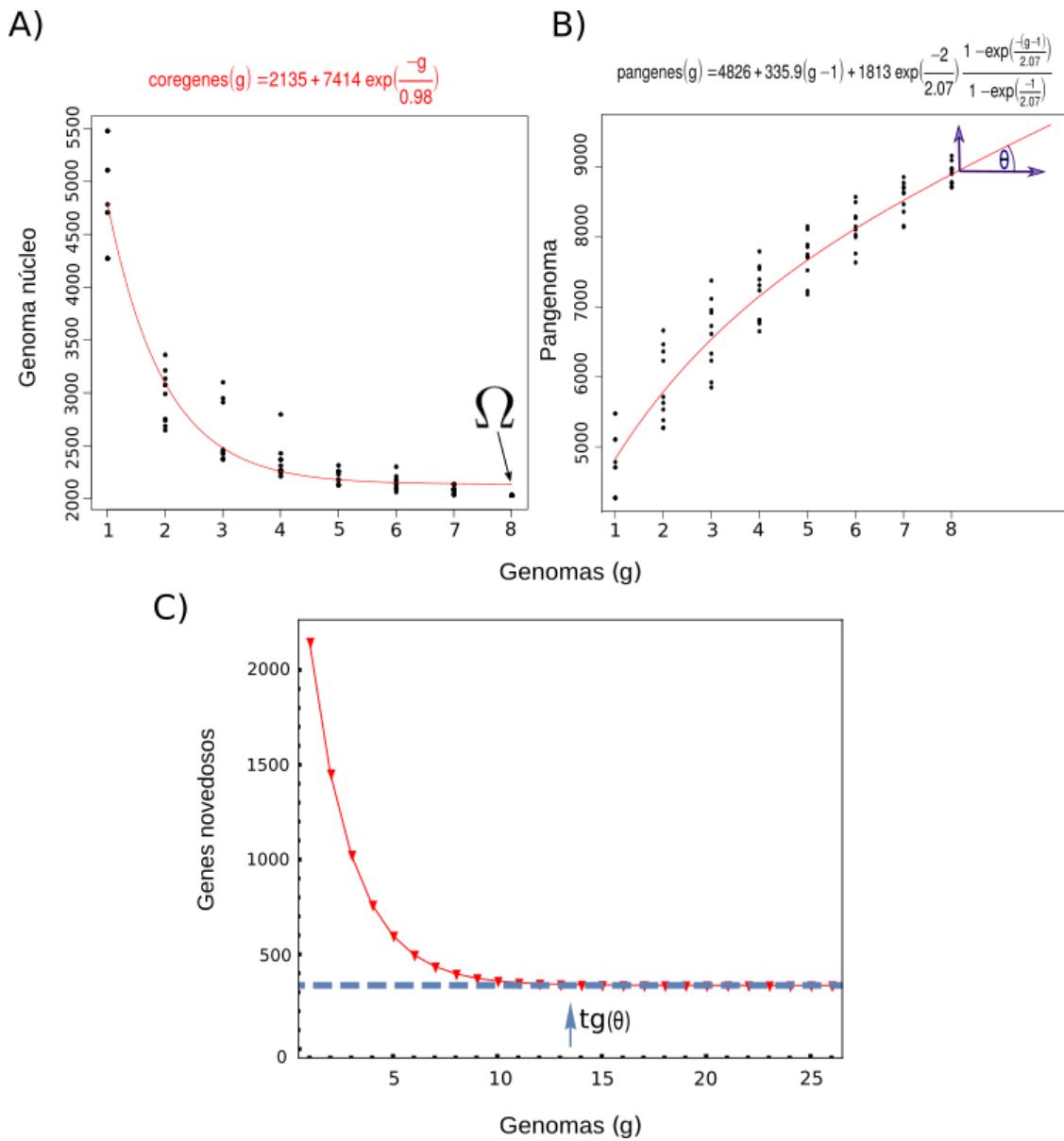


Figura 3-7: Estimación del tamaño del pangenoma y genoma núcleo de *R. palustris*. Se estimó el tamaño del genoma núcleo y del pangenoma partir del *clustering* de secuencias realizado por el algoritmo OMCL dentro del *software* GH. A) Genes compartidos por las cepas y extrapolación al genoma núcleo. Para esta estimación, el valor promedio de los genes compartidos se ajusta mediante la función de decaimiento exponencial 3.1. El valor de ω (2135) indica el tamaño del genoma núcleo cuando el número de $g \rightarrow \infty$ B) Tamaño del pangenoma de la especie estimado a partir de la ecuación 3.2. C) Genes novedosos encontrados a medida que se agregan genomas al análisis. La $\tan(\theta)$ (335.9) corresponde al valor promedio de genes novedosos que se agregan con cada genoma.

Además del modelo presentado anteriormente, se han desarrollado otros modelos como por ejemplo el modelo mixto [74]. Snipen y col. ampliaron modelos previos con el objetivo de evitar las restricciones impuestas anteriormente que muchas veces generan una interpretación de la biología no del todo realista [75]. Este modelo agrega categorías de *clusters* de genes según lo que se especifica en la tabla 3.6, en la que se encuentran los resultados del análisis de GH para este modelo.

Para este último, el análisis se realizó en base al algoritmo de agrupación OMCL, dado que presenta una estrategia de *clustering* más robusta en comparación con COGt. El modelo exponencial presentado anteriormente (Fig. 3-7) se basa en un modelo de dos componentes: el genoma núcleo y el flexible. La tabla 3.6 muestra el componente en común (genoma núcleo) junto con los componentes propuestos dentro del genoma flexible según Snipen y col.: *cloud* y *shell*.

Clase	Definición (genes)	OMCL-GH
Núcleo (<i>core</i>)	Compartidos por todas las cepas	1960
Núcleo relajado (<i>soft core</i>)	Presentes en el 95 % de las cepas	2472
Nube (<i>cloud</i>)	Específicos o compartidos por algunas cepas	2529
Prescindible	Moderadamente conservados	1374

Cuadro 3.6: Definición y análisis de la estructura del pangenoma según el modelo binomial mixto. Se realizó un análisis de composición de las 3 clases propuestas por [77]: *core* (y *soft core*), *cloud* y *shell*. Tanto Roary como GH poseen las herramientas para la estimación de la estructura del pangenoma de las cepas utilizando este modelo.

El genoma núcleo según el algoritmo OMCL fue de 1960 OMCL genes. La cantidad de genes que componen el *cloud* fue mayor en comparación al *shell*, aproximadamente el doble, lo cual evidencia que la mayoría de los genes del pangenoma de la especie *R. palustris* son aquellos únicos, raros o compartidos por sólo un par de cepas.

En lo que respecta al estudio específicamente de *R. palustris* AZUL, se procedió a caracterizar su genoma en base a sus características únicas o raras, es decir, compartidas sólo con unas pocas cepas. Para ello, se decidió continuar con el *clustering* realizado por Roary dado que se consideró que representaba de una manera más ade-

cuada la diversidad de genes de la especie. Cabe destacar que el programa consideró secuencias como específicas de una cepa a aquellas que presentaron una divergencia mayor al 20 % entre especies (línea de corte de identidad de 80 %). Dentro de este grupo, se puede encontrar por ejemplo, una proteína que también se encuentre en otra cepa pero que presente una identidad menor al 80 %. Esta es una limitación inneitable en este tipo de análisis dado que siempre debe establecerse una línea de corte. En este sentido, en bibliografía se ha sugerido que el valor de 80 % resulta adecuado para determinación intra-específica de ortólogos [92].

3.3.4. Características relevantes del genoma de *R. palustris* AZUL

Como primer aproximación a la caracterización del genoma de *R. palustris* AZUL, se utilizó la plataforma de anotación de genomas RAST-Server, que provee en su servicio un mapeo de genes en subsistemas y una reconstrucción metabólica. Estos subsistemas representan la colección de roles funcionales que conforman, por ejemplo, un camino metabólico, un complejo o una clase de proteína. De esta manera, es posible obtener un panorama general de la presencia y distribución de funciones para esta bacteria [84]. Esta información, junto con la anotación de genomas y comparación genómica realizada por los programas Prokka y RAST, se utilizaron para la interrogación de las características relevantes de AZUL comparándola, para ciertos grupos de genes, con las demás cepas.

En la figura 3-8, se muestra la distribución de los subsistemas metabólicos para *R. palustris* AZUL. Se puede observar que 20 genes codifican proteínas relacionadas con el metabolismo fotosintético. Éstas incluyen los complejos colectores de energía y proteínas encargadas del transporte de electrones y foto-fosforilación. *R. palustris* AZUL posee las formas I y II de la enzima RuBisCO (CbbM y CbbS) y una RuBisCO-*like protein* (Rlp2), las cuales le permiten llevar a cabo un crecimiento autotrófico. Los genes relacionados a la biosíntesis de pigmentos se encuentran dentro del subsistema de cofactores, vitaminas, grupos prostéticos y pigmentos, señalado con color rojo en

la figura 3-8.

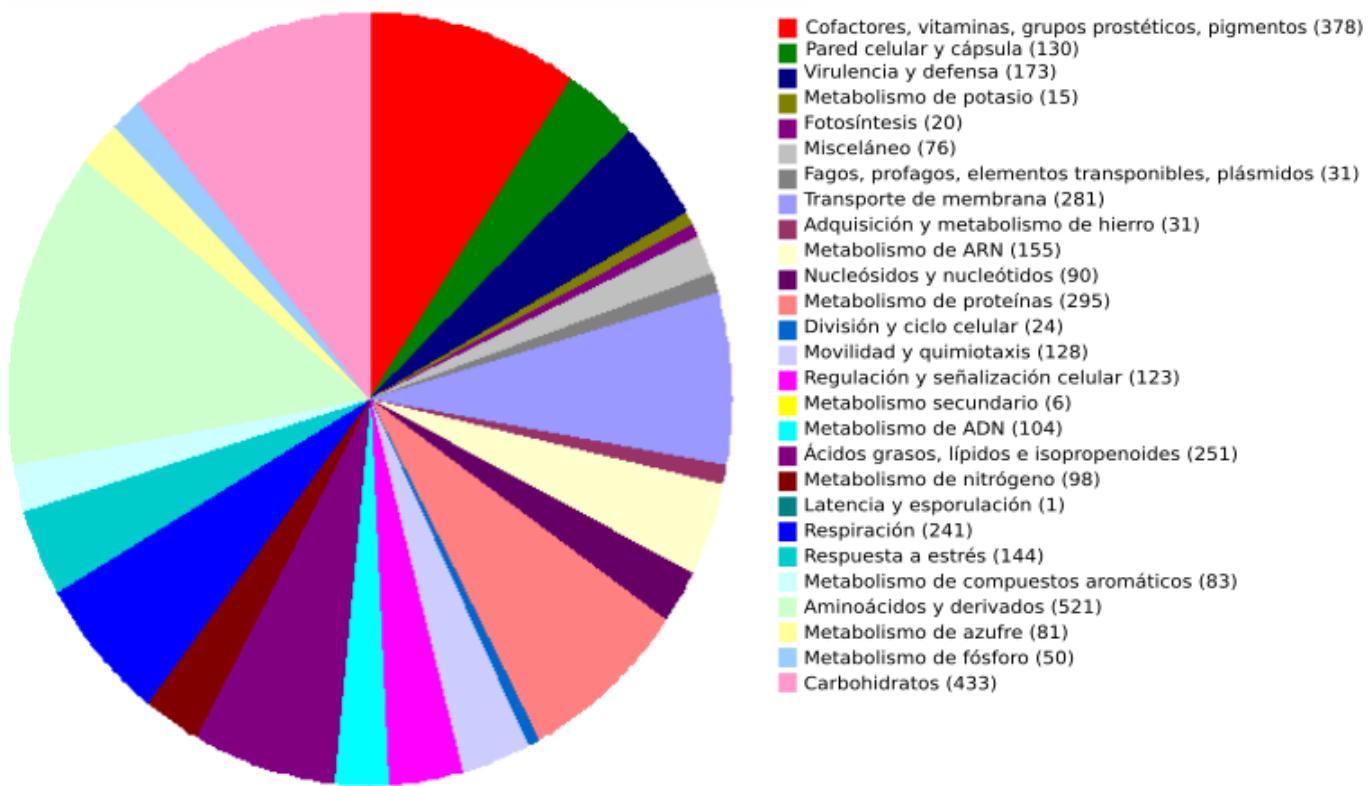


Figura 3-8: Distribución categórica de subsistemas para *R. palustris* AZUL según el RAST-Server. El genoma de *R. palustris* AZUL se secuenció (INDEAR) y se anotó mediante el servicio proporcionado por el servidor RAST. A partir de las tablas generadas contenido la información funcional de las secuencias, se generó la distribución de subsistemas con los distintos roles funcionales.

Uno de los subsistemas con mayor número de secuencias es el de carbohidratos (casi un 11% de la distribución total definida), dentro del cual se encuentran los genes relacionados con las vías centrales de metabolismo de carbohidratos como la glucólisis, gluconeogénesis, ciclo TCA, vía pentosa fosfato, entre otras. Dentro de este subsistema también podemos encontrar genes asociados al metabolismo de oligosacáridos, ácidos orgánicos, fermentación y desde ya aquellos relacionados a la fijación de CO₂, que le permiten a esta especie crecer bajo un metabolismo fotoautótrofo o fotoheterótrofo. Una característica distintiva en cuanto a la utilización de carbono en este género es la degradación de compuestos aromáticos. El análisis del RAST definió 83 genes relacionados a este tipo de metabolismo (Fig. 3-8).

Para el subsistema Respiración se encontraron 241 secuencias codificantes y se identificó una gran variedad de enzimas del tipo óxido-reductasa, citocromos y las proteínas relacionadas a su biogénesis, entre otras. Las enzimas oxidoreductasas en este organismo se encuentran relacionadas tanto a procesos de respiración aeróbica como anaeróbica. Un ejemplo es el del gen *dmsA* que codifica para una di-metil sulfóxido tri-etanolamin N-oxido reductasa, una enzima que cataliza la reducción de DMSO y TMAO a DMS y TMA, respectivamente [93, 94]. A su vez, esta enzima puede utilizar otros compuestos como aceptores finales de electrones [95].

Como ya se mencionó, el género *Rhodopseudomonas* se caracteriza también por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. El subsistema Metabolismo de Nitrógeno contiene secuencias tanto de proteínas involucradas en la fijación de nitrógeno, como también amonificación de nitrito y nitrato, hidrólisis de cianato, estrés nitrosilativo, asimilación de amonio y también aquellas relacionadas al proceso de denitrificación. De manera similar al genoma de BisA53, CGA009 y TIE-1, AZUL presenta los genes que codifican para los tres tipos de nitrogenasas (hierro, molibdeno y vanadio) lo cual denota su posible capacidad de crecer en ambientes con escaso N. Otros dos subsistemas que evidencian la versatilidad de esta bacteria son: Metabolismo y adquisición de hierro y Metabolismo de azufre (Fig. 3-8). En el primer caso se observan secuencias codificantes para el sensado de hierro y su toma mediante sideróforos, como también la incorporación y uso de grupos hemo. Para el segundo, se definieron genes para la asimilación orgánica e inorgánica de azufre y su metabolismo. AZUL presenta genes que codifican para la toma sulfato/tiosulfato (*cysA*), tiosulfato sulfutransferasa (*rhdA* y *glpE*), proteína de unión a tiosulfato (*cysP*) y los genes *hoxL* y *hoxK* que codifican para hidrogenasas, los cuales permitirían a esta cepa utilizar al tiosulfato como dador inorgánico bajo un metabolismo fotoautótrofo. AZUL también presenta las enzimas monóxido de carbono y formato deshidrogenasas, que también podrían contribuir a generar poder reductor mediante la oxidación de estos compuestos orgánicos. Otras deshidrogenasas presentes están relacionadas con el metabolismo de etanol, metanol y fenil-etanol. La presencia de estas hidrogenasas puede estar relacionada con la utilización de hidrógeno catódico que se presentó en el capítulo 2 y podría dar sustento

molecular a la captación indirecta de electrones de un electrodo.

Dado que los integrantes de este género son oportunistas existosos, los genes relacionados a la regulación de procesos, señalización y respuesta a estrés también son una parte importante de la batería génica de AZUL (123 y 144 secuencias, respectivamente, en cada subsistema).

3.3.5. Anotación funcional de genes específicos de *R. palustris* AZUL

Con el objetivo de caracterizar mejor las particularidades de AZUL, se decidió llevar a cabo una búsqueda de las secuencias específicas de esta cepa y compararlas con las cepas restantes utilizando el *output* del programa Roary. Se estableció la opción de separar parálogos en distintos *clusters* con el objetivo de evitar subestimar la diversidad génica. Los resultados completos de este análisis se encuentran en el Anexo.

A partir del agrupamiento de secuencias establecido por Roary, se definió un conjunto de 1559 secuencias específicas para la cepa AZUL. Aunque de ahora en más se hará referencia a ellas como cepa-específicas, se debe tener en cuenta que estas secuencias codifican para proteínas que también pueden encontrarse en alguna de las cepas restantes. La diferencia radica entonces, en el porcentaje de identidad de las mismas, ya que se estableció como requisito que dos secuencias deben presentar un 80 % de identidad para tratarse de la misma proteína. En otras palabras, el conjunto de secuencias cepa-específicas de AZUL puede contener integrantes que codifiquen para la misma proteína en el genoma de otra cepa, pero que la misma difiera en más de un 20 % de identidad de la secuencia.

Estas secuencias cepa específicas constituyen un 28 % del total del genoma, de las cuales aproximadamente la mitad se definieron como proteínas hipotéticas (HP, por *hypothetical proteins*). Para poder conocer la identidad de la mayor cantidad de secuencias posible, las HP fueron analizadas mediante un escaneo con HMMER contra

la base de datos de dominios Pfam¹⁰, y con el programa Blast2GO¹¹. A partir de estos análisis se logró conocer la identidad de 453 secuencias codificantes adicionales, reduciendo así el porcentaje de HP cepa-específicas (7.5 % del total del genoma).

Al analizar la lista de secuencias específicas de AZUL (Anexo), se observó una gran cantidad de genes que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo de distintos metales como cobre, cromo, cobalto, arsénico, mercurio, cadmio y zinc, entre otros (Tabla 3-9). A continuación se describirán los aspectos más relevantes de estos genes en función de los mecanismos de resistencia, como también de aquellos compartidos por una o algunas pocas cepas analizadas. En algunos casos, esos genes son los suficientemente diferentes como para ser separados en distintos grupos de ortólogos; mientras que en otros, algunas secuencias están simplemente ausentes en otras cepas. Se encontraron en AZUL proteínas predichas para diversos mecanismos como transporte activo de iones metálicos (eflujo), secuestro extracelular e intracelular (incorporación de metales) y reducción de metales.

¹⁰HMMER realiza principalmente búsquedas de homólogos. Se compara una secuencia con un modelo estadístico que describe un familia o patrón de secuencias, en oposición a la simple comparación de aminoácidos individuales de dos secuencias, como es el caso de BLAST. Pfam es una base de datos de familias de proteínas basada en los perfiles HMMER, que son alineamientos de múltiples secuencias de distintas familias de proteínas.

¹¹Software que realiza una anotación funcional de secuencias novedosas de manera automatizada y high-throughput. Hace uso del algoritmo BLAST para identificar secuencias similares y transferir información existente sobre la anotación funcional de secuencias ya caracterizadas a las secuencias de interés.

Sistema de resistencia a metales	Componente de resistencia	Genes	ID AZUL*	Nro. Homólogos**
<i>Sistema de resistencia a cadmio, cobalto y zinc RND-MFP-OMF (czcCBA)</i>	Proteína RND de resistencia cadmio-cobalto-zinc protein CzcA	czcA_1 czcA_2 czcA_3 czcA_4 czcA_5 czcA_6 czcA_7	RpalAzul2_00545 RpalAzul2_01338 RpalAzul2_01341 RpalAzul2_02854 RpalAzul2_04227 RpalAzul2_04574 RpalAzul2_04826	5 6 8 1 1 1 1
	Resistencia cadmio-cobalto-zinc MFP CzcB	czcB_1 czcB_2 czcB_3 czcB_4 czcB_4	RpalAzul2_00544 RpalAzul2_01339 RpalAzul2_04228 RpalAzul2_04573 RpalAzul2_02855	5 6 1 1 1
	Resistencia cadmio-cobalto-zinc OMF CzcC	czcC_1 czcC_2	RpalAzul2_04229 RpalAzul2_04572	1 1
<i>Proteínas adicionales relacionadas al operón czc</i>	Sistema de eflujo de metales catiónicos CzcD	czcD_2 czcD	RpalAzul2_04230 RpalAzul2_03063	1 6
	Proteína de resistencia a cobalto/níquel A	craA	RpalAzul2_04220	7
<i>Sistema de resistencia a cobre/plata RND-MFP-OMF (cusCFBA)</i>	Proteína RND de resistencia a cobre/plata CusA	cusA_1 cusA_1 cusA_2 cusA	RpalAzul2_00487 RpalAzul2_01014 RpalAzul2_01961 RpalAzul2_03749	5 1 1 4
	Proteína MFP de resistencia a cobre/plata CusB	cusB_1 cusB_2 cusB_4	RpalAzul2_01015 RpalAzul2_01962 RpalAzul2_03750	1 1 1
	Proteína periplasmática de unión a cobre CusF	cusF_1 cusF_2	RpalAzul2_01007 RpalAzul2_01013	1 1
	Regulador transcripcional CusR	cusR	RpalAzul2_00701	8
	Kinasa CusS	cusS	RpalAzul2_00703	8
<i>Exporte por ATPasas tipo-P</i>	Exporte de zinc por ATPasas tipo-P	zntA	RpalAzul2_04225	1
	Exporte de cobre por ATPasas tipo-P	copA copA_1 copA_2 copA_3 copB actP	RpalAzul2_04438 RpalAzul2_01004 RpalAzul2_01009 RpalAzul2_01959 RpalAzul2_02053 RpalAzul2_02028	8 3 2 1 1 1
	Resistencia a plata por ATPasas tipo-P	sllP_1 sllP	RpalAzul2_01000 RpalAzul2_04674	1 6
<i>Proteínas adicionales relacionadas al operón cop</i>	Proteínas periplasmáticas	pcoC copD	RpalAzul2_01010 RpalAzul2_01011	1 1
	Represores transcripcionales	csfR richR_1 richR_2	RpalAzul2_04675 RpalAzul2_01001 RpalAzul2_01983	8 1 1
<i>Sistema de eflujo de cromo (operón chrBACF)</i>	Proteínas transmembrana de eflujo de cromato	chrA1 chrA_1 chrA_2 srpC_1 srpC_2	RpalAzul2_01433 RpalAzul2_02163 RpalAzul2_04318 RpalAzul2_01432 RpalAzul2_01990	1 1 2 4 1
	Regulador transcripcional de sensado de cromato chrB	chrB	RpalAzul2_01989	1
	Superóxido dismutasa [Fe] dependiente de cromo	chrC	RpalAzul2_01988	1
<i>Sistema de reducción de cromo</i>	Cromato reductasas	chrR_2 chrR_3 chrR_1	RpalAzul2_02681 RpalAzul2_02817 RpalAzul2_03861	7 3 8
<i>Sistema de resistencia a mercurio (operón mer)</i>	Mercurio reductasa	merA	RpalAzul2_02004	1
	Proteínas transportadoras de resistencia a mercurio MerF	merF merT	RpalAzul2_02005 RpalAzul2_02007	1 1
	Componente periplasmático de resistencia a mercurio	merP	RpalAzul2_02006	1
	Regulador de resistencia a mercurio	merR1	RpalAzul2_02008	1
<i>Sistema de resistencia a arsénico (operón ars)</i>	Arsenato reductasas	arsC_1 arsC_3	RpalAzul2_00540 RpalAzul2_02159	7 1
	Arsenato reductasa (glutarredoxina)	arsC_3 arsC_4	RpalAzul2_01400 RpalAzul2_02160	8 1
	Reductasa FMN NADPH-dependiente ArsH	arsH_1 arsH_2	RpalAzul2_00542 RpalAzul2_02162	1 1
	Pemeasas	acr3 acr3_2	RpalAzul2_00539 RpalAzul2_02161	7 1
	Activadores transcripcionales de resistencia a arsénico	hlyU	RpalAzul2_02158	1
	Represores transcripcionales de resistencia a arsénico	arsR_1	RpalAzul2_00541	5

Figura 3-9: Genes principales involucrados en la resistencia a metales en *R. palustris*. * ID interno de cada secuencia generado por Prokka/Roary. ** Número de secuencias homólogas provenientes de las otras cepas en el mismo cluster.

Resistencia por eflujo de metales

El mecanismo de resistencia más frecuente es el control del transporte de especies iónicas para disminuir la concentración interna del metal. Esto se puede lograr mediante la pérdida de un sistema de incorporación de metales o por la modificación en los sistemas de eflujo [31].

Varios miembros de la superfamilia de División-Celular-Resistencia-Nodulación (RND, por *Resistance-Nodulation-cell Division*) se identificaron en el genoma de AZUL (Tabla 3-9 y Anexo). También se encontraron varias de las proteínas que normalmente se asocian a las proteínas RND, como las de fusión de membrana (MFP, del inglés *Membrane Fusion Protein family*) y los factores externos de membrana (OMF, del inglés *Outer Membrane Factors*). Estas proteínas permiten exportar sustratos desde el citoplasma, membrana citoplasmática o periplasma, a través de la membrana externa hacia el medio extracelular [31]. Un complejo multiproteico asociado a un alto nivel de resistencia a cadmio, cobalto y zinc es CzcA, del tipo RND. Esta proteína se localiza en el mismo operón que contiene las secuencias para la MFP CzcB y un OMF CzcC [96]. Se encontraron varias copias de los genes *czcA*, *czcB* y *czcC* en el grupo de secuencias específicas de AZUL (Anexo). Esto sugiere que más de un operón estaría involucrado en la resistencia a estos metales. Además, otras seis secuencias *czcABC* se comparten entre AZUL y otras cepas. En total, 26 clusters de ortólogos *czcABC* se encontraron en *R. palustris*, de los cuales 14 se encuentran en AZUL, 2 en BisA53 y BisB18, 9 en CGA009 y DX-1, 5 HaA2 y 12 en TIE-1 (Tabla 3-9 y Anexo).

Otra proteína del tipo RND que otorga resistencia al metal plata y (en condiciones anaeróbicas) al cobre es CusA, cuyo gen pertenece al operón *cusCFBA*, en conjunto con la MFP CusB, la OMF CusC y una proteína adicional pequeña CusF [97]. Se encontraron 25 de grupos de ortólogos en las cepas analizadas, de los cuales 10 se encontraron en AZUL, 6 en BisB5 y TIE-1, 5 en BisB18, 3 en BisA53, CGA009 y HaA2 y 2 DX-1 (Fig. 3-9). Esto sugiere que AZUL está equipada con una batería más variada de componentes de resistencia a este metal en comparación a las demás cepas.

El eflujo de metales también puede darse por facilitadores de difusión catiónica (CDF, por *Cation Diffusion Facilitators*) que actúan como intercambiadores divalentes catión/protón. Una de las proteínas mejor caracterizada de esta familia está codificada por el gen *czcD* que es un regulador del sistema CzcCBA [31]. Se encontraron en AZUL copias simples de *czcD1* y *czcD2*, y secuencias de *czcD2* en los genomas de BisB5 y TIE-1 (Tabla 3-9). Esta proteína además de ser reguladora, puede mediar en la resistencia a zinc, cobalto y cadmio en bajos niveles en ausencia del sistema de alta resistencia czcCBA [98]. Esto implica que las cepas que expresan esta proteína tienen la habilidad de activar un mecanismo de eflujo de metales, ya sea a bajas concentraciones de los mismos, o con bajas tasas de eflujo.

Las ATPasas del tipo-P forman una superfamilia de proteínas transportadoras impulsadas por la hidrólisis de ATP. Estas proteínas son miembros importantes en lo que respecta a resistencia a metales debido a que pueden funcionar en ambas direcciones, transportando el sustrato tanto desde el medio externo (o periplasma) hacia el citoplasma, o exportar desde el citoplasma al medio externo (o periplasma) [31]. Este grupo de transportadores es particularmente importante en la resistencia a cadmio, cobre y plomo en muchos microorganismos. La secuencia codificante de la ATPasa tipo-P *ZntA* se encontró en AZUL, BisB5, CGA009 y TIE-1. Esta proteína está involucrada en la resistencia a zinc (y probablemente cadmio) en situaciones de sobre-acumulación del metal [99].

De manera contraria a la CusA, CopA y CopB son transportadores del tipo ATPasa tipo-P que participan en la detoxificación de cobre en condiciones aeróbicas. El genoma de AZUL presenta 3 secuencias de *copA*: *copA1*, *copA2* y *copA3*; mientras que en el genoma de TIE-1 se encontraron copias simples de *copA1* y *copA2*; y BisB5 posee una secuencia de *copA*. No se encontraron ortólogos de *copA* en el resto de las cepas. Se encontró además, una copia de *copB* en AZUL, ausente en el resto de las cepas (Tabla 3-9).

ActP es otra ATPasa tipo-P importante en los grupos *Rhizobium* y *Sinorhizobium* para la resistencia a cobre a pH bajos [100]. La secuencia codificante de ActP se encontró sólo en AZUL y BisB5. Por otro lado, secuencias homólogas a SilP (resistencia

a plata) se encontraron en todas las cepas, con una copia adicional sólo en AZUL y TIE-1 (Tabla 3-9).

La familia de proteínas CHR constituyen otro tipo de mecanismo de resistencia por eflujo compuesto por proteínas de membrana que actúan como bombas de eflujo de cromato por gradiente quimiosmótico [101]. Se encontraron copias simples de *chrA* y *chrA2* en el genoma de AZUL; en tanto que *chrA2* (BisB5) o *chrA1* (el resto) pero no ambas, se detectaron en las demás cepas (Tabla 3-9). Además, dos copias de *srpC* (homólogo de *chrA*) se identificaron en el genoma de AZUL (*srpC1* y *srpC2*), mientras que sólo una copia de *srpC1* se identificó en CGA001, DX-1, y TIE-1 (Tabla 3-9).

Reducción de metales

Cuando las especies iónicas acumuladas intracelularmente no pueden ser expulsadas directamente del citoplasma, se pueden modificar enzimáticamente volviéndose especies menos tóxicas. La modificación más frecuente es la reducción [31].

El sistema de detoxificación enzimática más estudiado es el del operón *mer*. Debido a su alta afinidad por grupos tioles y la ausencia de una función fisiológica para este metal, el mercurio es altamente tóxico para las células [31]. Se identificaron en AZUL secuencias homólogas al gen *mer*: 1 *merA*, 1 *merR*, 2 *merT* y 1 *merP*. MerA es una mercurio reductasa que cataliza la reducción de Hg(II) a Hg(0) (volátil), mientras que el resto de los genes *mer* codifican proteínas involucradas en la regulación (MerR), transporte citoplasmático (MerT), y unión en el periplasma (MerP) [102]. Secuencias del operón *mer* se encontraron también en BisB5, CGA009 y TIE-1.

El arsenato puede entrar a la célula por medio de transportadores de fosfato de expresión diferencial según la concentración de fosfato en el medio. Este metal no puede ser excretado a menos que se convierta en arsenito por actividad enzimática. Se detectaron secuencias homólogas de los genes de los operones *ars1* y *ars2*, los cuales confieren resistencia a arsenito y arsenato en varias especies. Específicamente, *arsC1* y *arsC2* (arsenato reductasas), *acr3* (arsenito permeasa del tipo BART), *arsB* (bomba de membrana) y *arsR* (represor transcripcional) se identificaron en todas las cepas. Se encontraron secuencias adicionales de *arsH1* y *arsH2* sólo en AZUL,

con sólo un ortólogo de copia simple en CGA009 (*arsH*), previamente reportado por [103]. Las proteínas ArsH son oxidasas organoarsénicas que detoxifican compuestos de arsénico aromáticos y metilados trivalentemente. De manera contraria a lo reportado por Qin et al (2006), no se detectaron en AZUL secuencias correspondientes al gen que codifica para la S-adenosilmetionina metil-transferasa (*arsM*), lo cual sugiere que el mecanismo de metilación y consecuente volatilización de compuestos organoarsénicos, no es el mismo que presenta CGA009. Ortólogos de *arsM* se identificaron en TIE-1, DX-1, HaA2 y BisB5 (Anexo).

El cromato es una de las formas más tóxicas del cromo y varios microorganismos presentan dos mecanismos de detoxificación, por eflujo y enzimático [31]. Se encontraron tres secuencias que codifican para cromato reductasas (*chr1*, *chr2*, *chr3*) en los genomas de AZUL, BisA53 y HaA2, mientras que se identificaron sólo ortólogos de *chr1* y *chr2* en las demás cepas.

Los oxoaniones de metaloides como el selenio y el telurio también pueden resultar tóxicos para las células. En ambos casos las formas químicas selenito/selenato y telurito/telurato se convierten en Se(0) y Te(0) en el citoplasma o periplasma en muchos microorganismos [31]. Esta modificación convierte los compuestos solubles y altamente reactivos en formas no-tóxicas e insolubles. El gen *dsbB*, involucrado en la reducción de telurito [104] se identificó en todas las cepas analizadas (Anexo). Por otro lado, se encontró en AZUL el gen codificador de SerB, proveniente del operón *ser* relacionado con la reducción de selenito/selenato.

Cabe recordar en este punto, que alguna/s de estas reductasas podría/n ser responsables de las señales redox detectadas en las voltametrías cíclicas. Es por ello que resultaría interesante explorar la localización subcelular de estas enzimas en futuras investigaciones en el tema.



Se identificaron en el genoma de AZUL varias secuencias codificantes de proteínas extracelulares involucradas en el secuestro de metales. Dos ejemplos ya se mencionaron junto con los operones *czc* y *cop*: las proteínas del tipo MFP y OMP. Por otro lado, se

detectaron en AZUL dos copias del gen *pcoC*; además de un ortólogo en BisB5. PcoC es una proteína periplasmática que une iones que se encuentren en exceso y provoca un aumento en el nivel de resistencia por sobre el conferido sólo por *copA* [105].

Otro ejemplo es el de la oxidasa MmcO asociada a membrana, la cual se identificó por primera vez en *Mycobacterium tuberculosis* y que actúa probablemente oxidando el óxido de cobre en periplasma [106]. En el genoma de AZUL se encontraron dos secuencias *mmcO*, y copias simples en el resto de los genomas, agrupadas en *clusters* de ortólogos diferentes al de AZUL.

3.3.6. Incorporación de metales

El genoma de AZUL presenta amplia evidencia de mecanismos involucrados en la incorporación de metales. Por ejemplo, se detectaron secuencias de copia simple de *ycnJ* en AZUL, BisB18 y HaA2. Este gen es un homólogo de *copCD* que se induce bajo condiciones limitantes de cobre [107].

Por otro lado, se detectaron 5 secuencias ortólogas de genes que codifican a los transportadores protón-dependientes Mnth, los cuales juegan un papel crucial en la incorporación de óxido de manganeso. En el resto de las cepas se encontraron de 1 a 3 copias. En algunas bacterias, el gen *copA* mencionado anteriormente se encuentra regulado transcripcionalmente por una proteína CsoR, capaz de sensar cobre, o su parálogo RicR. En condiciones de bajas concentraciones de cobre, estas proteínas se unen al ADN en sus respectivos regulones, e impiden el eflujo del mismo [108]. Se identificaron copias simples de ortólogos de *csoR* en las cepas analizadas, mientras que las secuencias *ricR* (*ricR1* y *ricR2*) se detectaron sólo en AZUL. Esto sugiere que esta cepa presentaría algún mecanismo adicional para sobrevivir ante condiciones limitantes de cobre.

El genoma de AZUL evidencia su habilidad de sintetizar múltiples sideróforos. Se identificaron 11 secuencias que corresponden al receptor ferricromo extracelular (5 *fcuA* y 6 *fhuA*), como también 3 secuencias correspondientes al receptor FpvA. De manera similar se detectaron estas secuencias en las demás cepas, aunque en un número más bajo, con ausencia en las cepas Bis.

El gen *mgtB* que codifica para una ATPasa tipo-P involucrada en la toma de magnesio en condiciones limitantes del mismo, sólo se encontró en AZUL.

La incorporación de zinc parece estar bien distribuida entre las cepas de *R. palustris*. Se encontraron secuencias *zntb*, *znuC* y *yciC* en todas las cepas que codifican para proteínas relacionadas a la incorporación de zinc, aunque bajo distintos mecanismos [31]. Nuestros resultados sugieren que la especie *R. palustris* presenta esta habilidad basal (Anexo), pero que las secuencias han divergido lo suficiente como para estar separadas en distintos *clusters* de ortólogos.

3.3.7. Respuesta general a estrés

La gran mayoría de los genes relacionados al estrés oxidativo se comparten entre todas las cepas. Sin embargo, se identificaron algunas particularidades en el genoma de AZUL. Además de las típicas superóxido dismutasas de hierro (Fe-SOD) y manganeso (Mn-SOD) (codificadas por *sobB* y *sodA*), el genoma de AZUL posee una secuencia adicional *chrC* que codifica una Fe-SOD. Esta enzima se reportó previamente en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno inducida por cromato [109]. Esta secuencia presente en AZUL es parte del operón de resistencia a cromato que contiene al gen *srpC2* mencionado anteriormente y participaría reduciendo el estrés oxidativo causado por el cromato. Otro ejemplo es la NADPH-ferredoxina oxidoreductasa involucrada en la respuesta a estrés mediada por superóxido, la cual se encontró sólo en AZUL y HaA2.

Las secuencias relacionadas a la respuesta a UV también se comparten entre las cepas de *R. palustris*. Sin embargo, hay algunos genes que parecen haber divergido lo suficiente entre sí. Por ejemplo, una copia extra de *rvuB*, una de las subunidades de una helicasa dependiente de ATP se encontró en el genoma de AZUL; mientras que todas las cepas presentan copias simples de los genes de las subunidades *rvuA* y *rvuB* de la proteína. Por último, se encontraron múltiples operones relacionados a genes de resistencia a antibióticos en todas las cepas analizadas. Notablemente, copias simples de los genes *emrK* y *emrY* del sistema *emrKY* [110] se identificaron en las distintas cepas; mientras 5 homólogos se identificaron en AZUL. De manera similar,

se encontraron homólogos adicionales del gen de resistencia a antibióticos *mdtE* [111]. Estos resultados evidencian la presencia de operones accesorios de estos sistemas en *R. palustris* AZUL.

3.4. Discusión

En este capítulo se llevó a cabo un análisis general del genoma de *R. palustris* AZUL, el cual también se comparó con el de otras cepas con el objetivo de identificar los principales componentes génicos que caracterizan a la especie. La cepa AZUL se aisló de una Laguna en la región andina de Argentina, y es el primer microorganismo del género *Rhodopseudomonas* cuyo genoma es secuenciado de la zona. Este ambiente presenta condiciones extremas y muy cambiantes que permiten predecir una gran versatilidad metabólica para este aislamiento. Los análisis presentados en este tesis no sólo mostraron la complejidad del genoma núcleo sino también, una alta especialización en la homeostasis de metales por parte de AZUL.

En primer lugar, se realizó una filogenia en base al gen 23S y se observó que AZUL se encuentra en un mismo clado junto con las cepas CGA009, TIE-1 y DX-1. Este clado forma un grupo monofilético junto con HaA2, mientras que las cepas Bis se encuentran por fuera del mismo. En la filogenia realizada en base al conjunto de genes que conforman el genoma núcleo de *R. palustris* se observó la misma topología de árbol. Oda y col. (2008) reportaron una filogenia de la especie basada en el gen 16S, en la que se puede observar un clado formado por las cepas CGA009 y TIE-1 y su grupo hermano DX-1 [77], al igual que en las filogenias obtenidas en esta tesis. Dado que la designación de las relaciones entre los taxones resulta ser más robusta al realizarse en base al alineamiento de las secuencias que pertenecen al genoma núcleo, se puede decir que tanto el 23S (esta tesis) como el 16S [77] permiten obtener una buena estimación de las relaciones filogenéticas de la especie.

El número de genes pertenecientes al genoma núcleo de la especie se estimó mediante distintos algoritmos con el fin de realizar la comparación genómica de las cepas. Los algoritmos utilizados por el programa GET HOMOLOGUES arrojaron resultados similares: 1873 (BDBH), 1856 (COG) y 1960 (OMCL) secuencias pertenecientes al genoma núcleo, siendo el tamaño consenso de 1778 genes. El primer algoritmo se basa en la estrategia del *best bidirectional hits*, en la que dos secuencias son ortólogas si y sólo si ambas resultan ser el mejor hit (mayor similitud), considerando todos

los genes del organismo. Este método puede traer aparejado tanto resultados falsos positivos como falsos negativos [112]. En el primer caso por ejemplo, BDBH puede incluir genes con distintas funciones en un mismo grupo de ortólogos, también llamado transitividad. Esta es una propiedad de los genes ortólogos que implica que si el gen A es ortólogo de B, y B es ortólogo de C, entonces A y C son ortólogos [112]. En el segundo caso se pueden perder secuencias correspondientes a parálogos recientes que aún no hayan evolucionado nuevas funciones. Para evitar esto, el ajuste de ciertos parámetros como el *e-value*, el *score*, o la longitud de las secuencias puede variarse. COGt evita la transitividad de ortólogos al basarse en vínculos complejos (de a tres) en vez de simples o bidireccionales. Con este método, si un gen pertenece a un grupo de ortólogos, el mismo no solo debe tener otros dos genes en el grupo que sean *best-hits* sino que además, esos dos genes deben ser *best-hits* entre ellos [113]. A pesar de que se ha dicho que basarse sólo en BDBH muchas veces no resulta confiable para la búsqueda de ortólogos [112], los resultados presentados muestran prácticamente el mismo número de *clusters* de genes pertenecientes al genoma núcleo de *R. palustris*. Además, el análisis realizado por OMCL arrojó un genoma núcleo también similar, con aproximadamente 100 secuencias extra. Este algoritmo se basa en el método de Cadena de Markov y es más eficiente a la hora de reconocer parálogos recientes, que aún no han adquirido nuevas funciones, siendo importante para el caso de organismos con altas tasas de duplicación de genes y por ende con mayor subfuncionalización [114, 115, 112]. Por último, mediante el análisis con Roary se estimó un núcleo de 1418 genes. Los resultados con ambos paquetes mostraron que el genoma núcleo representa una proporción relativamente baja de los genes de cada genoma y del pangenoma total.

Oda y col. (2008) realizaron una comparación genómica de la especie teniendo en cuenta 5 cepas de *R. palustris*, en la que estimaron un genoma núcleo de 3319 genes. Es importante destacar que en dicho estudio, la designación del núcleo se basó en la condición de que los *clusters* de ortólogos estuvieran en al menos 4 cepas, pero no necesariamente en todas, lo cual se denomina genoma núcleo extendido o *soft core*. El genoma núcleo estricto, compartido por el total de las cepas analizadas fue lógi-

camente menor, de 2750 secuencias ortólogas. Como se mencionó en la introducción, los trabajos relacionados al análisis genómico poseen un alto grado de arbitrariedad donde cada autor tiene la posibilidad de fijar las condiciones del estudio. De todos modos, el valor obtenido en dicho trabajo es similar al de esta tesis si se tiene en cuenta el uso de cinco cepas.

Otro aspecto interesante que surge de nuestro análisis es que sólo un 36 % de las secuencias codificantes promedio de *R. palustris* corresponde al genoma núcleo compartido entre todas las cepas, apoyando la idea de que las distintas cepas han evolucionado como ecotipos adaptados a los distintos microambientes que habitan [77], presentando una gran cantidad de secuencias que son propias de cada cepa o compartidas por unas pocas. En los últimos años, se ha sugerido que el genoma núcleo es una unidad genómica fundamental para la designación de especies procariotas [116]. Por ejemplo, Lefébure y col. mostraron que existe algún tipo de resistencia en la recombinación entre secuencias del genoma núcleo de dos especies hermanas cercanas: *Campylobacter coli* y *C. jejuni* [117]. Es así, que se ha comparado al genoma núcleo como la columna vertebral de una especie bacteriana.

Junto con estos genes pertenecientes al núcleo de la especie, se encuentran los genes accesorios que, como ya se mencionó, contribuyen a la diversidad de la especie y le confieren a las distintas cepas ciertas ventajas adaptativas tales como adaptación a un nicho o resistencia a antibióticos.

Con el objetivo de estimar el comportamiento del genoma núcleo y repertorio génico total o pangenoma de *R. palustris* se utilizaron los modelos de Tettelin y Snipen [70, 75]. En el primer caso, se observó que el tamaño del genoma núcleo disminuye a medida que nuevas cepas se agregan al análisis. Este resultado es lógico al tratarse de una especie tan versátil. Si se observa la curva del comportamiento del genoma núcleo ante el agregado de cepas al análisis, la estimación del tamaño del núcleo ante el agregado de la quinta cepa fue de 2200 secuencias aproximadamente. Oda y col. (2008) obtuvieron un total de 2750 genes compartidos por cinco genomas. Los resultados presentados indican que el número de cepas utilizado por Oda y col. no fue suficiente para la estimación del genoma núcleo, y que 8 cepas o más resulta

ser más eficiente. Además, la varianza de los puntos correspondientes al número de *clusters* de genes del núcleo que es aportado por cada cepa disminuye hasta llegar prácticamente a un mínimo valor ante el agregado de la octava cepa. Tettelin y col. (2005) obtuvieron un genoma núcleo que representaba aproximadamente un 80 % del total de las secuencias para cada cepa de *S. agalactiae*, donde el aporte de cada cepa presenta valores más dispersos [70]. Esto último, indica que se necesita un mayor número de genomas para estimar el tamaño del genoma núcleo de *S. agalactiae*. Las diferencias en el porcentaje de secuencias pertenecientes al núcleo radican en los distintos estilos de vida de los microorganismos.

En lo que respecta a la estimación del pangéoma de *R. palustris*, se observó a partir de este modelo que el repertorio génico total de la especie sigue el comportamiento de un pangéoma abierto y que, en promedio, 336 genes novedosos son agregados al mismo ante la adición de una nueva cepa al análisis. El análisis pangéomico permite estimar la diversidad de una especie a partir de los datos (o genomas) disponibles, pero también permite realizar una extrapolación de cuántos genomas adicionales serían necesarios para caracterizar el repertorio génico total [118]. Nuestros resultados indican que se necesitarían aproximadamente 14 cepas para alcanzar el valor asintótico estable de genes novedosos que aporta cada cepa. Ambas estimaciones, del pangéoma y del núcleo, son las primeras realizadas para *R. palustris* según nuestros conocimientos.

A partir de que los genomas de gran cantidad de especies bacterianas se han vuelto accesibles, resulta evidente que la delimitación de especie bacteriana se ha vuelto difusa. Para algunos microorganismos la cuestión resulta más fácil debido a estilos de vida particulares, como aquellos que presentan pangéomas cerrados. Este es el caso de la bacteria endosimbionte *Buchnera aphidicola*, cuyo cromosoma no presenta re-arreglos o adquisición de nuevos genes en los últimos 50-70 millones de años [119]. Otras especies que habiten nichos aislados o que posean una baja capacidad de adquirir genes extraños también presentan esta característica. El pangéoma de *B. anthracis*, por ejemplo, puede ser descripto en su totalidad sólo ante el análisis de cuatro cepas.

Los modelos de ajuste exponencial para el núcleo y pangenoma propuestos por Tettelin y col. han sido criticados en base a dos objeciones. En primer lugar, los modelos exponenciales asumen implícitamente un tamaño infinito para los pangenomas abiertos. A pesar de que el *pool* génico disponible para estas especies es notablemente grande, no es una afirmación biológicamente realista. Por otro lado, se asume que la estructura del pangenoma consiste sólo en genes universalmente conservados y aquellos menos conservados o genes accesorios que formarían parte del genoma flexible. Se han agregado otras clasificaciones en vista de la alta variabilidad en la distribución de las frecuencias de los genes en *clusters* de homólogos de los distintos taxa.

Es por ello, que se decidió realizar el análisis del pangenoma de *R. palustris* mediante el modelo binomial mixto propuesto por Snipen y col. (2009). Mediante la aplicación de este modelo a los datos, fue posible obtener el número de *clusters* de ortólogos presentes en 4 componentes: genoma núcleo (*core* y *soft core*) y genoma flexible (*cloud* y *shell*). Estas categorías incluyen las ya nombradas secuencias pertenecientes al núcleo, en principio presentes en todas las cepas incluídas en el análisis, aquellas moderadamente conservadas pertenecientes al *shell* y las que se comparten entre algunos pocos genomas agrupadas como *cloud*. La cuarta categoría se basa en un núcleo extendido, ya que se ha objetado que la restricción de que una secuencia perteneciente al núcleo debe estar presente en la totalidad de los genomas analizados resulta muy estricta [72]. Es por ello, que el genoma núcleo extendido incluye las secuencias del núcleo sumado a secuencias presentes en la mayoría pero no en todos los genomas ($n - 1$).

Se ha propuesto que el *clustering* realizado por el OMCL bajo el programa GH resulta ser el mejor método de agrupamiento y análisis pangenómico [120, 112]. Se aplicó el modelo mixto binomial a los datos provenientes del OMCL y se observó un total de 6375 *clusters* de ortólogos total para *R. palustris*. Este número es bajo en comparación al obtenido utilizando COGt (12724) lo cual podría deberse a que COGt no resuelve bien los *clusters* de ortólogos que presenten secuencias provenientes de menos de 3 genomas, algo que también ocurre con Roary. Esto sugiere que COGt y Roary sobre-estiman la diversidad de genes raros. Sin embargo, el ajuste de los datos

de OMCL-GH al modelo de Tettelin y al modelo binomial mixto sugiere que el OMCL subestima la diversidad de dichas secuencias. Es debido a ello que, para realizar el análisis comparativo entre los genes de AZUL y el resto de las cepas, elegimos el output de Roary.

De la totalidad de *clusters* una gran proporción pertenece al *cloud*. Esta observación se basa por un lado en la flexibilidad adaptativa de la especie, ya que cada cepa posee secuencias cepa-específicas particulares a sus nichos. Por otro lado, este grupo suele incluir a los denominados ORFans. Estos genes codifican proteínas que no presentan similitud con ninguna otra secuencia disponible en las bases de datos, y pueden representar hasta un 10 - 15 % de un genoma [73]. Se ha propuesto además que muchas de estas secuencias son derivadas de bacteriófagos y que rara vez son reclutadas para alguna función celular. A pesar de constituir un fracción muy pequeña si nos referimos a un genoma individual, cuando se analizan secuencias provenientes de varios genomas, estos ORFans representan una mayoría en el espacio génico del *cloud*. En este espacio, cada punto es en realidad un *cluster* de ortólogos, y es posible que muchos de estos sólo contengan una, o unas pocas secuencias provenientes de distintos genomas [73].

En conjunto estos resultados dan cuenta de la gran versatilidad que caracteriza a esta especie, y apoya la idea de que cada cepa ha evolucionado como un ecotipo adaptado al ambiente que habita. Mediante la observación de las proteínas predichas para *R. palustris* AZUL, se determinó la presencia de aquellas que le permiten llevar a cabo las funciones metabólicas para supervivencia bajo los cuatro tipos de metabolismo. Entre ellas se encontraron las enzimas necesarias para llevar a cabo un metabolismo respiratorio tanto aerobio como anaerobio. Es probable que AZUL posea la capacidad de reducir compuestos como el DMSO o TMAO dada la presencia de reductasas específicas para estos compuestos. Mediante el análisis de las secuencias cepa-específicas de AZUL, se observó un gran número de secuencias que codifican proteínas involucradas en procesos de resistencia a metales, como también a antibióticos (Anexo). Se ha visto que la aparición de ambos tipos de genes en los genomas no es casual, sino que estarían relacionados. Estudios sobre otros microorganismos presen-

tes en la Laguna Azul mostraron que existe una relación entre la multiresistencia a radiación UVB, metales (particularmente arsénico) y la resistencia a antibióticos en estos lugares donde no existe, o no debería existir, una presión selectiva por parte de antibióticos (Dib et al 2008). Se ha propuesto que, bajo condiciones de estrés por UV, las bacterias tienden a aumentar la tasa mutacional como mecanismo de resistencia, el cual se denomina reparación propensa a errores (del inglés *error-prone repair*). Esto permite que se haga un *bypass* de las lesiones al momento de la replicación, que en condiciones normales bloquearía la acción de la ADN polimerasa III. En consecuencia, la célula sobrevive pero presenta una alta tasa mutacional que aumenta las posibilidades de que surjan distintas resistencias a antibióticos [121]. Por otro lado, se han reportado muchos casos de co-selección entre genes de resistencia a metales y antibióticos. Estos mecanismos de co-selección incluyen: co-resistencia (determinantes asociados a diferentes resistencias en un mismo elemento genético) o resistencia cruzada (el mismo determinante genético responsable de la resistencia tanto de metales como de antibióticos). Dib y col. demostraron que la resistencia a arsénico y antibióticos estaba presente en todos los aislamientos que se obtuvieron en Laguna Azul. Dado que la mutagénesis inducida por radiación UV no pareció ser la causante de un aumento en la tasa de aparición de resistencia a antibióticos, la idea de una co-selección resultó la más lógica a la hora de explicar los datos [121].

Nuestros resultados confirman la presencia de gran cantidad de genes relacionados con la homeostasis de distintos metales en el genoma de AZUL. Uno de los ejemplos más notables es el del cobre. *R. palustris* AZUL posee genes homólogos adicionales relacionados con este metal que, en otras bacterias, participan en la incorporación o detoxificación del cobre bajo distintas condiciones ambientales. AZUL posee en su genoma secuencias que sugieren que esta cepa estaría adaptada a exportar cobre en condiciones tanto aeróbicas (genes *cop*) [122] como anaeróbicas (genes *cus*) [97], como también a pH bajo (*actP*) [100]. Además, presenta genes que le permitirían neutralizar iones cobre en el periplasma (*pcoC* y *mmcO*). La presencia de secuencias homólogas extras de *ycnJ* y *ricR* evidencia que AZUL tiene la capacidad de responder a la limitación de cobre con mecanismos supplementarios [107, 108].

La presencia de copias adicionales dentro del sistema *czc*, junto con las secuencias relacionadas a la resistencia a cadmio, cobalto y zinc conferidas por el operón *czcCBA*, evidencian que AZUL estaría adaptada al exporte de estos metales [98].

R. palustris AZUL estaría también especializada en la detoxificación de cromo tal como evidencian los genes accesorios relacionados al transporte de cromo, como también su reducción. Por otro lado, la presencia del operón *mer* indica que esta cepa tiene la capacidad de tolerar iones mercurio, una característica que no parece relevante en el resto de las cepas. Además, se encontró un sistema Tn5053 que indica un evento de transposición para la adquisición de este operón en AZUL.

La resistencia a arsénico en esta bacteria proviene de dos operones que presentan genes duplicados, los cuales podrían permitirle a AZUL responder a niveles fluctuantes de este metal. Además de los mecanismos de detoxificación de arsénico comunes a todas las cepas, las cepas AZUL y CGA009 serían capaces de detoxificar compuestos de arsénico aromáticos y metilados trivalentemente.

En el capítulo 2 se mencionó que *R. sphaeroides* y *R. capsulatus* presentan mecanismos que les permiten utilizar selenio y telurio como aceptores finales de electrones [63, 104]. *R. palustris* AZUL posee en su genoma genes relacionados a la reducción de estos compuestos por lo que resultaría interesante profundizar en el futuro en posibles vías de transferencia extracelular de electrones hacia estos compuestos.

Otra característica interesante de AZUL es la presencia de las secuencias codificantes de los tres tipos de nitrogenasas en su genoma. De las cepas analizadas, CGA009 es la única que también posee estas enzimas, mientras que el resto de las cepas sólo poseen dos o incluso un solo tipo de nitrogenasa [77]. La presencia de los tres tipos, particularmente de la nitrogenasa dependiente de vanadio indicaría la habilidad de sobrevivir en ambientes con escaso nitrógeno, dada su gran capacidad de fijar el N₂ atmosférico.

La gran diversidad que sugieren las secuencias del tipo cepa-específicos dentro del género *Rhodopseudomonas* proveen nuevas oportunidades para analizar de manera integrada el funcionamiento de una gran variedad de proteínas; como por ejemplo aquellas implicadas en procesos de metabolismo de carbono o nitrógeno. Este último

recibe particularmente gran atención ya que la fijación de N₂ produce obligadamente hidrógeno molecular. Esta característica aumenta el potencial de la especie, siendo necesario el entendimiento de la regulación de las enzimas involucradas, para así manipular la producción H₂ de forma eficiente con objetivos biotecnológicos [123, 77].

Dado que *R. palustris* AZUL se aisló a partir de un ambiente prístino, el análisis en mayor profundidad de su genoma resulta de gran interés en relación a genes que codifiquen proteínas que le confieran a esta, y probablemente a otras especies, ventajas adaptativas para este tipo de ambiente.

Capítulo 4

Caracterización electroquímica de la microalga *Scenedesmus dimorphus*.

4.1. Introducción

4.1.1. Conceptos básicos sobre microalgas

Las microalgas son un grupo de microorganismos eucariotas que se encuentran distribuidos por todo el planeta. Habitán principalmente cuerpos de agua y suelen ser microorganismos de vida libre, aunque también se pueden encontrar aquellos que presentan asociaciones simbióticas con otros organismos, por ejemplo líquenes [124].

Dentro de los grupos que conforman a las algas eucariotas encontramos a las clorofitas, o algas verdes, que han sido ampliamente estudiadas a lo largo de los años. Éste es un grupo que incluye alrededor de 8200 especies y presenta gran variabilidad morfológica, integrado por organismos microscópicos y por algas macroscópicas. Las algas verdes comparten algunas características con las plantas superiores: poseen cloroplastos, clorofila a y b, y varios carotenoides como pigmentos fotosintéticos [124]. Son típicamente abundantes en ambientes de agua dulce como lagos, arroyos, estanques y humedales.

4.1.2. Fotosíntesis oxigénica

Las microalgas llevan a cabo una fotosíntesis oxigénica que se puede expresar como una reacción redox impulsada por la energía proveniente de la luz, en la que el CO₂ y el agua son convertidos a carbohidratos y oxígeno. En la fase dependiente de la luz solar, la energía lumínica se convierte en energía química generando, además del oxígeno, cofactores bioquímicos como el NADPH₂ y el ATP. Mientras que en las reacciones que son independientes de la luz solar, el poder reductor y el ATP se utilizan para la reducción bioquímica del CO₂ a carbohidratos, a través del ciclo de Calvin (Fig. 4-1).

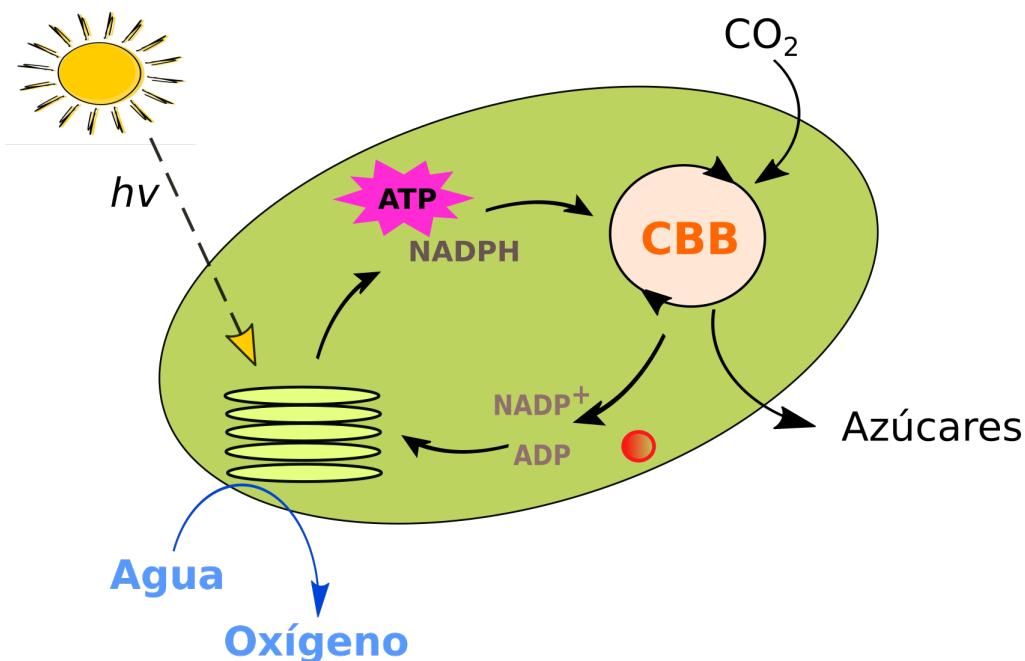


Figura 4-1: Esquema general del metabolismo fotosintético de las microalgas. La energía lumínica en forma de fotones ($h\nu$) se convierte en energía química gracias al proceso de fotosíntesis y produce ATP y NADPH. Estas moléculas se utilizan durante el ciclo de Calvin para fijar CO₂ y obtener azúcares como producto. Adaptado de [29].

Las algas llevan a cabo este proceso y juegan además un rol importante en los ciclos de nitrógeno como productores primarios. A diferencia de la fotosíntesis anoxigénica discutida en capítulos anteriores, la oxigénica consiste en el secuestro de moléculas de CO₂, utilizando agua y luz como fuente de energía [124].

Flujo de electrones y síntesis de ATP

En los organismos fotótrofos oxigénicos, los electrones fluyen por dos fotosistemas: el sistema fotosintético I, por *photosynthetic system* o también P700 (PSI), que posee un CR del tipo hierro-azufre (Fe-S) y sistema fotosintético II, por *photosynthetic system* o también P680 (PSII) que posee un CR del tipo quinona [29]. Ambos fotosistemas interactúan mediante el "esquema Z" de fotosíntesis (Fig. 4-2). Las reacciones fotosintéticas ocurren en membranas especializadas; en el caso de microalgas eucariotas, en las membranas tilacoides de los cloroplastos.

En el PSII se lleva a cabo el primer paso de la fotosíntesis oxigénica, en el cual una molécula de agua se oxida a O_2 y electrones. Ante la absorción de luz, la clorofila *a* en el PSII se excita y alcanza un potencial de reducción muy electronegativo, que permite donar un electrón a una molécula de feofitina. Esto genera una separación de cargas que causa que el PSII se vuelva tan electropositivo que le permite aceptar electrones del agua. Los electrones provenientes del PSII reducen luego a la plastoquinona (PQ) a PQH_2 , generándose en este paso FPM, que luego se utiliza para impulsar la producción de ATP [29] (Fig. 4-2). En segundo lugar, la absorción de luz por parte del PSI le permite aceptar electrones provenientes de la PQH_2 . Éstos viajan por distintos intermediarios hasta reducir el $NADP^+$ a NADPH.

Como se observa en la figura 4-2, la fotosíntesis oxigénica consiste en un flujo no-cíclico de electrones, ya que éstos no son ciclados al PSII para su reducción sino que son utilizados para la producción de NADPH.

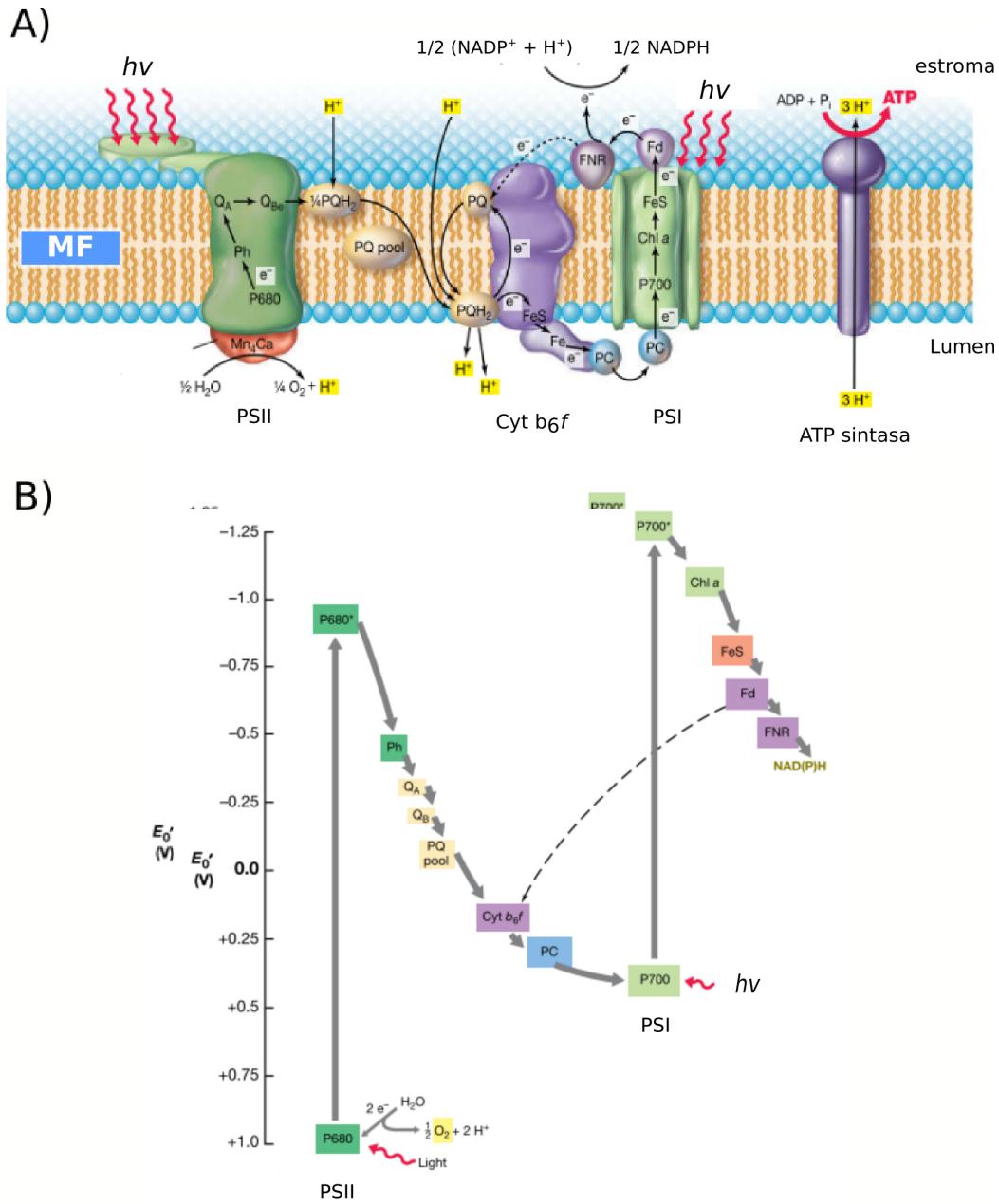


Figura 4-2: Flujo de electrones en la fotosíntesis oxigenica. A) Esquema general de los componentes de membrana que actúan en el transporte de electrones durante la fotosíntesis oxigenica. El fotosistema II (PSII) se activa ante la incidencia de luz solar ($h\nu$) lo que causa la oxidación del agua mediante el complejo oxidante del tipo Mn_4Ca . Los electrones se transfieren desde el PSII al *pool* de quinonas (PQ/PQH₂) y los protones se intercambian a través de la membrana al oxidarse la plastoquinona por el complejo citocromo-b₆f (Cyt b₆f). Los electrones se transfieren a la plastocianina y luego al fotosistema I (PSI). Ante la excitación por parte de la luz, el PSI reduce de manera secuencial a la ferrodoxina (Fd), la NADP oxidoreductasa (FNR) y luego al NADP⁺. B) Esquema Z que ilustra los potenciales que adoptan los componentes mencionados anteriormente. Adaptado de [29].

Asimilación de carbono y fotorespiración

La asimilación (fijación) de CO₂ en carbohidratos mediante el ciclo de Calvin ocurre durante la fase independiente de la luz, utilizando el NADPH₂ y el ATP generados por las reacciones fotosintéticas (Fig. 4-1). Este proceso consta en primer lugar de una reacción de carboxilación catalizada por la enzima RuBisCO, que genera moléculas de fosfoglicerato a partir de la adición de CO₂ a la ribulosa bi-fosfato. Los principales productos de esta reacción son los carbohidratos; sin embargo, también pueden ser sintetizados ácidos grasos, aminoácidos y ácidos orgánicos por esta vía [124].

La fotorespiración es un proceso que compite con el de carboxilación, en el cual el carbono orgánico se convierte en CO₂ sin una ganancia metabólica. En este proceso, la enzima RuBisCO funciona como oxigenasa y se obtienen serina, amonio y CO₂ como productos. La fotorespiración depende de la concentración relativa de oxígeno y CO₂, una relación alta O₂:CO₂ estimula este proceso, mientras que una baja favorece la carboxilación. En cuanto a la aplicación de microalgas con fines productivos, se intenta minimizar el proceso de fotorespiración con el fin de favorecer la producción de biomasa. Es por ello que los cultivos masivos se crecen usualmente en ambientes ricos en CO₂, con una relación CO₂:O₂ más alta que la del ambiente [124].

4.2. Electroquímica de microalgas

McCormick y col. (2011) sugirieron que la capacidad electrogénica dependiente de la luz no estaría solo confinada a organismos procariotas, como es el caso de *R. palustris* estudiada en capítulos anteriores, sino que microalgas como *Chlorella vulgaris* también presentan estas particularidades [125]. De la misma manera, Wu y col. (2013), aislaron una cepa identificada como *Desmodesmus sp.* con aparente actividad electrogénica, siendo capaz de establecer una transferencia directa de electrones con el electrodo y una indirecta utilizando el oxígeno como mediador [126]. Estos trabajos, sin embargo, no presentaron datos categóricos respecto de la electroactividad directa de las microalgas, que sigue sin ser demostrada. Por otro lado, cabe destacar que no todos los autores especifican si las especies utilizadas presentan capacidad

electrogénica y sólo describen el funcionamiento y el desempeño de los sistemas electroquímicos. Sin embargo, algunos hacen hincapié en la ausencia de señales redox en análisis voltamétricos, los cuales indican que estos microorganismos no serían capaces de intercambiar electrones con el medio extracelular [127].

4.2.1. Rol de las microalgas en los biocátodos

En la introducción de esta tesis se desarrollaron los conceptos relacionados con la electroquímica de célula completa y se puntualizó que los microorganismos pueden catalizar las reacciones de electrodo en sistemas bioelectroquímicos. Existen diversos diseños que involucran la acción de microorganismos fotosintéticos en estos sistemas, siendo su incorporación como proveedores de O₂ en el cátodo de un sistema electroquímico, una de las opciones más exploradas (Fig. 4-3).

La investigación del desempeño de organismos fotosintéticos en biocátodos surge como una solución potencial para eliminar la aireación mecánica y superar las limitaciones relacionadas a la tasa de reducción de oxígeno [128]. En los sistemas electroquímicos que utilizan la reducción de oxígeno como reacción catódica, se inyecta aire a presión en el líquido hasta equilibrar su contenido disuelto con la presión parcial de cada uno de estos gases en la atmósfera. Este método implica un elevado costo energético y tiene como límite la concentración de oxígeno del aire, la cual no supera los 9 ppm [129]. Por otro lado, inyectar oxígeno puro en un sistema tiene un costo muy elevado difícilmente abordable en una aplicación real a gran escala.

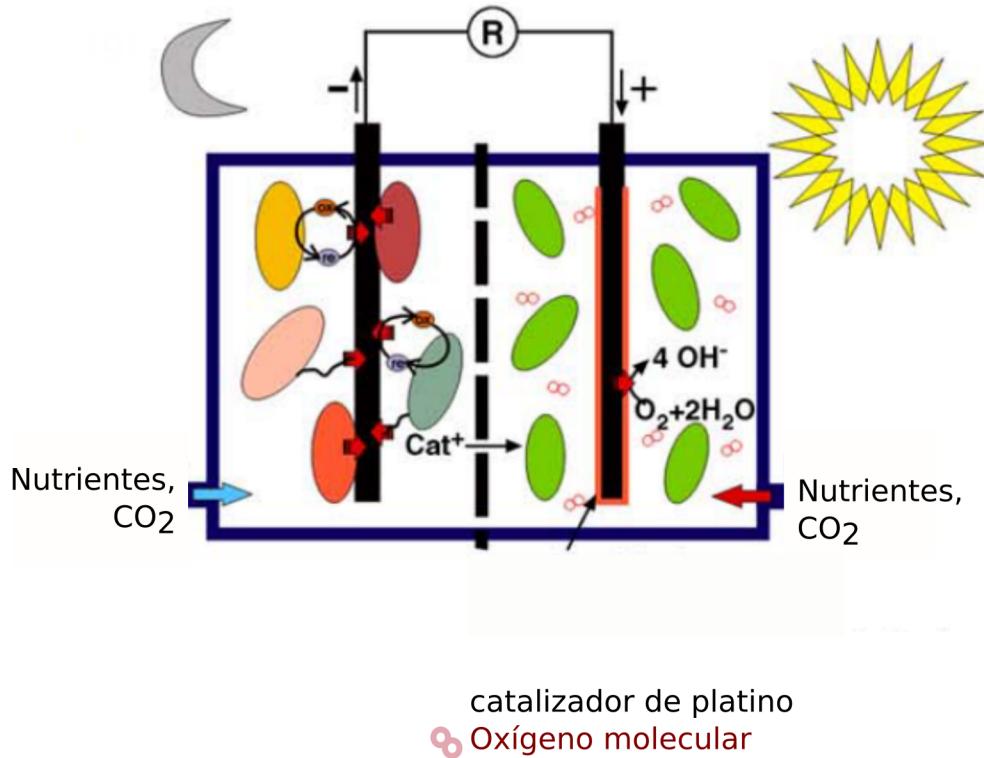


Figura 4-3: Incorporación de microalgas en biocátodos. Esquema general de una MFC, en la cual las reacciones anódicas son catalizadas por bacterias electrogénicas y las reacciones catódicas por microalgas de manera indirecta. En esta implementación, el oxígeno generado por las microalgas se reduce electroquímicamente sobre el electrodo mejorando el desempeño de la MFC. Adaptado de [22].

Las microalgas constituyen un sistema promisorio para su uso en los cátodos de sistemas electroquímicos ya que proveen oxígeno de forma continua para su reducción por parte del electrodo y asimilan contaminantes, siendo una opción interesante para su utilización en limpieza de aguas residuales [130].

Berk y Canfield (1964) desarrollaron este concepto utilizando la bacteria *R. rubrum* en el ánodo y algas verde-azuladas en el cátodo de una MFC con el objetivo de examinar la interacción entre estos microorganismos fotosintéticos y los electrodos [27]. Así, estos autores registraron una corriente fotoinducida en un sistema bioelectroquímico con microalgas. Años más tarde, se demostró que el uso de microalgas como suministradoras de O₂ resulta beneficioso en comparación con la aireación mecánica, consumiendo una menor cantidad de energía en el proceso [131]. Estos autores además, sugirieron que los *biofilms* formados por la microalga *Scenedesmus obliquus* facilitaban la reducción electroquímica del gas al producirlo directamente sobre el elec-

trodo, disminuyendo las resistencias catódicas internas e incrementando la corriente [131]. De la misma manera, la formación de un *biofilm* fotosintético de microalgas y cianobacterias sobre electrodos de fieltro de carbono, generó un voltaje de manera constante en condiciones lumínicas, otro indicio de que es posible obtener energía a partir del metabolismo fotosintético oxigénico [132].

Aunque en la bibliografía son numerosos los estudios que sugieren que los *biofilms* fotosintéticos son beneficiosos para la catálisis de las reacciones catódicas [133, 125, 132, 134, 135, 131], otros muestran que el desempeño es mejor cuando se favorece el crecimiento planctónico de estos microorganismos [127, 136, 137]. Esto se debe a que la producción de corriente está directamente relacionada con la reducción del oxígeno disuelto sobre la superficie del material, en los sitios activos que el electrodo ofrece para tal fin. Es de notar sin embargo, que este proceso se puede ver obstaculizado por la adherencia de las células. Estos conceptos no han sido desarrollados o resultan confusos en gran parte de los trabajos. Es por ello que no queda claro si la formación de un *biofilm* fotosintético presenta una ventaja o no, lo que a su vez está relacionado con la existencia o no de actividad electroquímica directa de las células en cuestión.

En base a lo mencionado anteriormente, en este capítulo se abordará la exploración electroquímica de la microalga *Scenedesmus dimorphus* con el objetivo de caracterizar las condiciones óptimas de crecimiento en bioreactores y de generación de oxígeno. A su vez, se realizarán ensayos electroquímicos que muestren la relación entre las microalgas y la generación de corriente eléctrica, como también la presencia o ausencia de señales redox relacionadas a la transferencia directa o indirecta de electrones con el electrodo. Se evaluarán también distintos materiales de electrodo para comparar su utilidad para catalizar la reacción de reducción de oxígeno a fin de evaluar su posible aplicación en sistemas bioelectroquímicos escalables.

4.2.2. Potencial uso de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales

El 80 % del agua residual que se produce en el mundo se vierte al ambiente sin ningún tratamiento y esto constituye la principal razón por la cual aproximadamente un tercio de la población mundial se ve obligado a consumir agua contaminada cada día. El tratamiento de aguas residuales con el objetivo de preservar el medio ambiente y las reservas de agua es una tarea impostergable para la sociedad, y resulta fundamental hacerla de una manera sustentable. Esto promueve la investigación y el avance sobre el tema [138]. En términos generales, el agua residual es una mezcla compleja que contiene contaminantes orgánicos, sólidos o disueltos, que se miden en conjunto por su demanda química de oxígeno (DQO)¹ y por su demanda bioquímica de oxígeno (DBQ)². Los contaminantes suelen eliminarse por oxidación biológica y es en estos procesos que se genera gran cantidad de gases de efecto invernadero, como el CO₂, el metano (CH₄) y el óxido nitroso (N₂O), entre otros; además de una gran cantidad de lodos. Por otra parte, la recuperación de nutrientes como el P o N resulta escasa en los tratamientos convencionales y esto contribuye a la contaminación de los cuerpos de agua y produce eutrofificación.

Los tratamientos de aguas residuales tienen el potencial de volverse más sustentables si se desarrollan y adoptan las tecnologías apropiadas [138]. Las MFC son tecnologías emergentes prometedoras en este sentido ya que: 1) permiten la recuperación directa de energía y permiten obtener productos con valor agregado, 2) combinan procesos biológicos y electroquímicos que permiten obtener un efluente de buena calidad disminuyendo la huella de carbono, y 3) se pueden monitorear y controlar en tiempo real, lo cual otorga estabilidad operativa [139, 138]. A pesar de las ventajas de utilizar sistemas bioelectroquímicos para la limpieza de aguas, todavía existen desafíos en cuanto a los costos operativos y al escalado, lo que hace que estas tecnologías aún se encuentren lejos de la aplicación real.

¹Parámetro que mide la cantidad de sustancias susceptibles a ser oxidadas por un medio químico que se encuentran disueltas o en suspensión en una muestra líquida.

²Parámetro que mide la cantidad de oxígeno consumido al degradar por medios biológicos la materia orgánica presente en una muestra líquida

Las microalgas son capaces de contribuir a la generación de energía, al mismo tiempo que minimizan las emisiones de CO₂ [130, 140]. Wang y col. (2010) demostraron este concepto al utilizar una MFC en la que el gas generado durante las oxidaciones biológicas en el ánodo se introducía en un biocátodo de *C. vulgaris*. Mediante esta aproximación, se obtuvo un aumento en la obtención de energía (medida como potencia de la MFC) conforme aumentaba la población de algas en el cultivo y en ausencia de aireación mecánica. Al mismo tiempo, el CO₂ generado en el ánodo fue totalmente eliminado del catolito [140].

Además, varios estudios demostraron la eficacia de las microalgas en la remoción de nutrientes a través de la aceleración de la reacción catódica. Zhang y col (2011) desarrollaron una fotocelda sedimentaria alimentada con agua residual en la que, mediante la incorporación de *C. vulgaris*, se removió un 99.6, 87.6 y 69.8 % del carbono, de nitrógeno y de fósforo, respectivamente [141].

En lo que respecta a la producción de energía, Stirk y col. (2008) describieron una MFC basada en microalgas y bacterias electrogénicas seleccionadas naturalmente en un sistema abierto, sin el uso de mediadores inestables o tóxicos [134]. Este sistema logró mantener una producción de energía eléctrica estable durante 100 días, alcanzando un máximo de corriente de 539 mA m⁻² y un máximo de potencia de 110 mW m⁻² [134].

El funcionamiento de sistemas electroquímicos integrados por microalgas depende de varios aspectos: el tipo de biocatalizador, el modo de alimentación y operación, las proporciones de carbono orgánico, nitrógeno, fósforo y potasio, la concentración de dióxido de carbono, el diseño del sistema y el tiempo de operación, el uso o no de membranas, la intensidad de luz, el tamaño y el tipo de material de electrodo, entre otras variables [130]. Este área de investigación ha crecido enormemente en los últimos años pero las exploraciones detalladas de optimización de estos parámetros son aún limitadas. Por este motivo, a pesar de ser una tecnología prometedora, no se ha avanzado lo suficiente en su desarrollo.

Uno de los aspectos que más limita la aplicación de los sistemas bioelectroquímicos, como las MFC, es el alto costo de las membranas de intercambio iónico que separan el

ánodo del cátodo. Por esta razón, las tecnologías que evitan el uso de estos materiales son las que muestran mayor potencialidad [137, 141, 142]. Un ejemplo son las celdas del tipo sedimentarias, en las que las bacterias electrogénicas habitan en un sedimento sumergido que hace las veces de ánodo, mientras que el agua aireada que lo cubre es el compartimento catódico. En estas celdas, la separación entre ánodo (anaerobio) y cátodo (aireado) se genera naturalmente por el desarrollo de microorganismos aerobios en la interfase agua/sedimento [143].

Recientemente la construcción de humedales electroquímicos para la limpieza de aguas ha cobrado gran interés. Un humedal artificial es una especie de bioreactor que imita los procesos naturales de degradación que se llevan a cabo en un humedal natural, a través de mecanismos biológicos y físicos. Este tipo de tecnología es famosa por su bajo costo de instalación y de operación, pero presenta la gran desventaja del uso intensivo de espacio, además de una limitada capacidad de remoción de nutrientes [144, 145].

Los humedales son básicamente un contenedor lleno con un material poroso (grava o arena) que puede estar vegetado o no, a través de la cual se mantiene un flujo de agua residual (vertical u horizontal) para su tratamiento (Fig. 4-4). En los humedales, al igual que en las celdas de combustible sedimentarias se producen naturalmente zonas aireadas por el contacto con la atmósfera y zonas anaeróbicas en el fondo del lecho. Si se colocan electrodos dentro del sistema, es posible combinar las ventajas de este tipo de tratamiento con la producción de energía eléctrica y la remoción de nutrientes gracias a la utilización de principios bioelectroquímicos y sin la necesidad de usar costosas membranas de intercambio iónico [145]. Fang y col. (2013) pusieron a prueba este concepto mediante la degradación biológica de colorantes azo en un humedal electroquímico [146]. Este sistema alcanzó una tasa máxima de decoloración de 91.24 % generando 0.302 W m^{-3} . Además, se determinó que la presencia de plantas impulsó el potencial catódico, mientras que se registró el crecimiento de bacterias electrogénicas del género *Geobacter* junto con β -Proteobacterias en el ánodo [146]. De la misma manera, Zhao y col. (2013) utilizaron agua residual proveniente de granjas porcícolas en un humedal electroquímico de flujo continuo ascendente, obteniendo

una densidad de potencia de 9.4 mW m^{-2} [147].

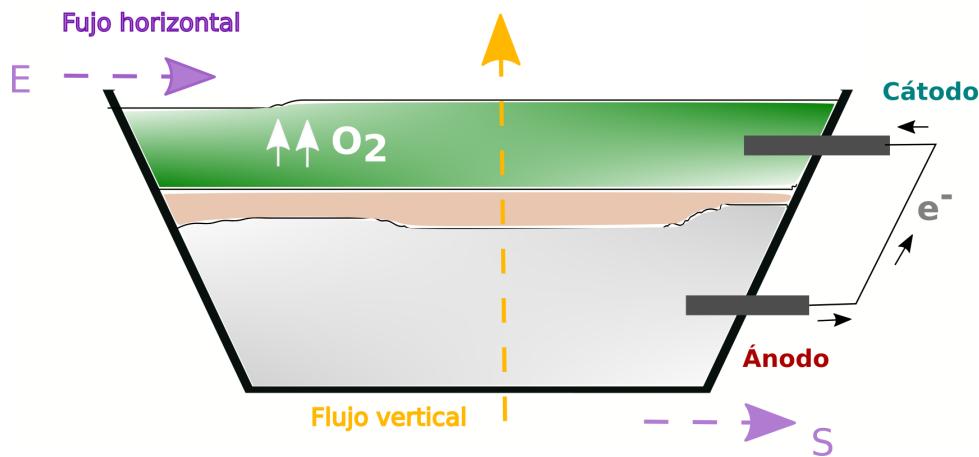


Figura 4-4: Esquema representativo de un humedal electroquímico. Las flechas punteadas corresponden a los tipos de flujo posible de alimentación del sistema: vertical ascendente u horizontal descendente (E: entrada, S: salida). En el cátodo del sistema se pueden incorporar organismos como plantas que generen un aumento en la concentración de oxígeno. El cátodo y el ánodo se separan por un material no conductor.

A pesar de ser una tecnología prometedora, los humedales electroquímicos no escapan a las limitaciones operacionales que presentan los sistemas electroquímicos convencionales. Las bajas densidades de energía obtenidas pueden deberse, entre otras cosas, a las limitaciones impuestas a la reacción catódica de reducción de oxígeno debido a la baja tasa de difusión de oxígeno en el líquido.

Con el objetivo de aprovechar la información obtenida en esta tesis sobre la interacción de *S. dimorphus* con electrodos, en este capítulo se presentarán los resultados de una aproximación experimental orientada a determinar si el uso de microalgas en la zona catódica de un humedal electroquímico puede contribuir a la recuperación de energía eléctrica a partir del tratamiento de agua residual. En dicha aproximación, se utilizó un sistema bioelectroquímico del tipo columna con la intención de imitar la configuración vertical de un humedal electroquímico. Para ello, se combinaron las capacidades oxidativas de *G. sulfurreducens* en la zona anódica con la reducción de oxígeno en la zona catódica, en presencia y ausencia de microalgas como proveedo-

ras de oxígeno. Los ensayos realizados en este sistema sirven como punto de partida para la exploración futura en sistemas con posibilidades de aplicación real, como los humedales electroquímicos.

4.3. Materiales y Métodos

4.3.1. Material biológico y condiciones de cultivo

Para el desarrollo de esta sección se utilizó la microalga *Scenedesmus dimorphus*, un alga verde unicelular perteneciente al grupo de las clorofitas. Los cultivos se mantuvieron en condiciones fotoautótrofas en una incubadora operada a 20°C, dentro de erlenmeyers con un tapón de algodón y gasa, el cual permitió el intercambio de gases manteniendo la esterilidad del cultivo. Se utilizó una variante del medio de cultivo estándar Guillard (medio COMBO): NaNO₃ 10 ml/L, CaCl₂ 2H₂O 10 ml/L, MgSO₄ 7H₂O 10 ml/L, NaHCO₃ 10 ml/L, Na₂SiO₃ 9H₂O 10 ml/L, K₂PO₄ 1 ml/L, H₃BO₃ 10 ml/L, KCl 10 ml/L, solución de elementos traza 10 ml/L, vitamina B12 1 ml/L, biotina 1 ml/L, solución de tiamina 1 ml/L.

Las curvas de crecimiento de los cultivos de *S. dimorphus* se realizaron mediante la toma de muestra y medición de la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro (2800 UV/VIS, UNICO). El oxígeno disuelto en el medio se midió de manera continua con un sensor de oxígeno de fibra óptica (Trace Oxygen Sensor PSt3, PreSens). Los controles de pH se realizaron mediante el uso de un pHmetro (HANNA).

4.3.2. Celda electroquímica

Los cultivos de *S. dimorphus* se crecieron en reactores de tres electrodos, como los descriptos en el capítulo 2.

Para los experimentos en reactores se utilizaron barras de grafito (excepto que se indique lo contrario) de igual diámetro y área sumergida que los usados en el capítulo 2. Como CE se utilizó alambre de platino y como RE electrodos de Ag/AgCl - NaCl 3M.

Se utilizaron potencióstatos (AUTOLAB PGSTAT101 y μ AUTOLAB tipo III controlados por el software NOVA en sus distintas versiones (1.1, 1.6, 2.0)) para establecer las condiciones electroquímicas. Se polarizaron los WE a -0.45 V y se inocularon los reactores con *S. dimorphus*. Se registró la corriente en el tiempo hasta finalizar

los ensayos. Las cronoamperometrías se interrumpieron solamente para realizar voltametrías cíclicas, las cuales comenzaron en todos los casos a partir del potencial de polarización.

4.3.3. Sistema bioelectroquímico de tipo columna

Este sistema experimental consistió en columnas de acrílico de 6 cm de diámetro y 40 cm de altura (Fig. 4-5). Las mismas se sellaron en la parte inferior de manera hermética con un tapón, y se utilizó un sello de algodón y gasa en la parte superior para permitir el intercambio de gases. La parte inferior de las columnas se llenó con grafito granular para formar un lecho conductor (ánodo). Por sobre el grafito se colocó una capa de piedras de pecera de 2 cm de espesor que sirvió para separar la zona anódica y catódica, haciendo las veces de una membrana de intercambio iónico. Sobre las piedras se dejó una zona rellena de líquido en la que, dependiendo del experimento, se colocó un cátodo de lámina de platino, de barras de grafito o de grafito granular según se indique en el texto (Fig. 4-5). Las columnas se mantuvieron en una incubadora con una temperatura de 20°C.

Las columnas se alimentaron con medio de cultivo desde abajo y en los casos en los que se alimentó de manera continua, el rebalse fue por la parte superior de la columna. Se utilizó agua residual sintética (Syntho) como medio de cultivo, adaptada según [148]: NaCl 439.5 mg/L, NH₄Cl 218.2 mg/L, FeSO₄ · 7H₂O 5.8 mg/L, KH₂PO₄ 23.4 mg/L, Na₂HPO₄ 23.64 mg/L, MgSO₄·7 H₂O 41.02 mg/L (DQO= 437.5 mg/L, Nitrógeno Total=60.23 mg/L). Esta formulación imita las características de un agua residual doméstica.

El sistema se inoculó con un cultivo de *G. sulfurreducens* y se operó en *batch*, en una configuración de 3 electrodos y aplicando un potencial de 0.05 V (Ag/AgCl - 3M NaCl) (Fig. 4-5), con el objetivo de lograr la formación y estabilización de un *biofilm* anódico (WE). Durante el crecimiento de Geobacter sobre el ánodo, se utilizó un electrodo de platino como cátodo. En estas condiciones, se registró la corriente en el tiempo hasta lograr un valor estable compatible con la formación de un *biofilm* anódico.

Una vez alcanzada una corriente anódica estable, el electrodo de platino fue reemplazado por barras de grafito y se realizaron distintos ensayos utilizando microalgas en el cátodo. En estos ensayos, se utilizó una configuración de 2 electrodos (Fig. 4-5) para evaluar la interacción entre el ánodo y cátodo sin la interferencia externa de un electrodo de referencia. En esta configuración el equipo establece una diferencia de potencial entre el ánodo y el cátodo, y sobre cada electrodo ocurre la reacción más favorable. En este estudio, estas reacciones fueron las de oxidación de *Geobacter* (ánodo) y las de reducción de oxígeno por *S. dimorphus* (cátodo).

La incorporación de microalgas en el sistema se ensayó de dos maneras: por incorporación directa en el cátodo y por circulación sin reciclado desde un cultivo externo. En el último caso, se mantuvo un fotobioreactor externo bajo una condición de luz, en la que el oxígeno, el pH y la agitación fueron controladas.

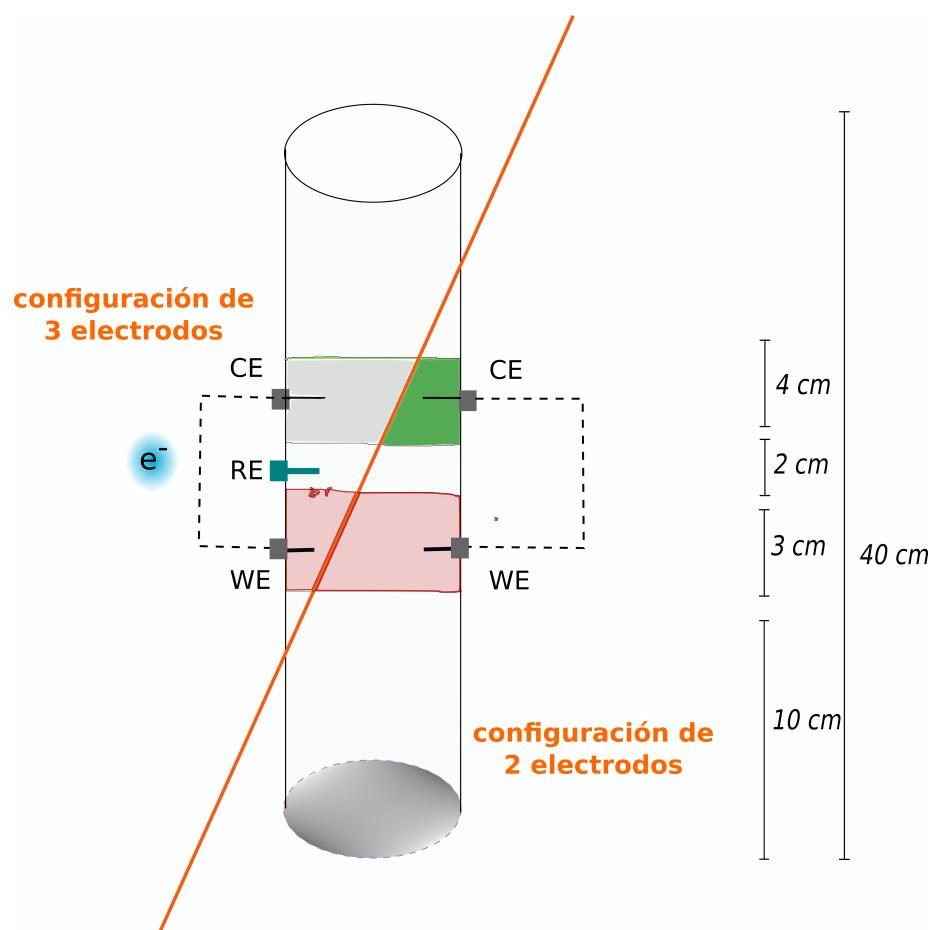


Figura 4-5: Esquema representativo del sistema bioelectroquímico del tipo columna. Se utilizaron columnas de acrílico de 40 cm de altura, llenadas de material conductor para el compartimento anódico y el catódico, según se indique en el texto. Para el crecimiento del cultivo electrogénico en el ánodo, se utilizó una configuración de celda de 3 electrodos: el WE de grafito colocado en el ánodo relleno de coque, el CE de platino incorporado en el cátodo, y un RE. Una vez estabilizada la corriente del sistema, la eficiencia relacionada a la incorporación de microalgas se evaluó utilizando una configuración de 2 electrodos mediante la conexión del ánodo con el cátodo.

Habiendo establecido un *biofilm* anódico estable, se agregaron las microalgas en el cátodo y se realizaron curvas de potencia. Se conectó un potenciómetro en configuración de dos electrodos, utilizando el ánodo como WE. Se varió la diferencia de potencial aplicada en un intervalo de 0.4 a 0.8 V, en pasos de 0.05 V, registrando la corriente de estabilización a cada paso luego de dos minutos.

La potencia (P) se definió como la cantidad de energía transferida por el circuito eléctrico en un tiempo dado. En otras palabras, es la cantidad de energía que se puede ingresar u obtener de un sistema. Para calcular la potencia generada a partir de las

columnas se utilizó la siguiente ecuación:

$$P = \left[\frac{I}{\Delta E} \right]$$

donde I es la intensidad de la corriente medida y ΔE la diferencia de potencial aplicada.

4.4. Resultados

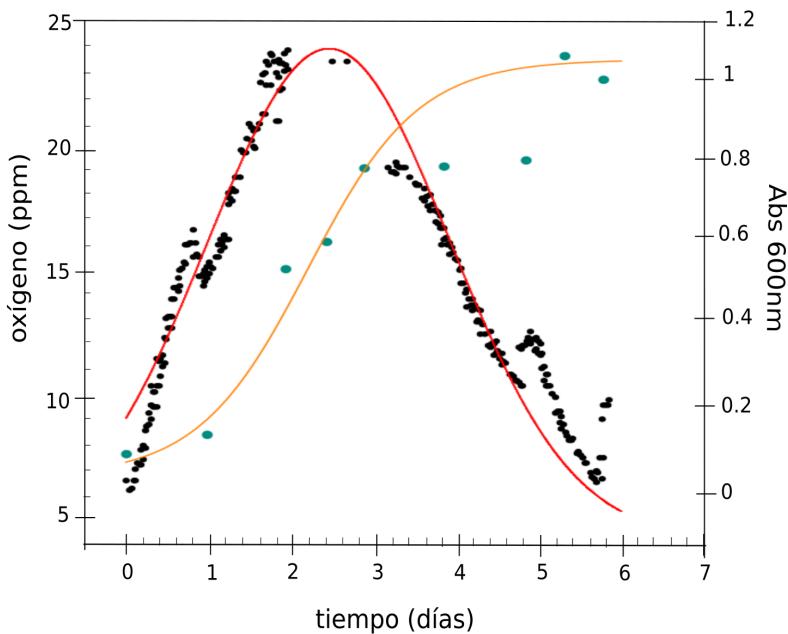
Gran parte de los estudios realizados con biocátodos se valen de la fotosíntesis oxigénica que realizan estos microorganismos para la aceleración de las reacciones de reducción. Esto se debe a que, para que un sistema bioelectroquímico típico tenga un buen desempeño, se debe dar en el cátodo un proceso de reducción de oxígeno a una velocidad tal que no limite la obtención de corriente. Dado que la aireación mecánica implica un gasto de energía, la incorporación de organismos fotosintéticos productores de oxígeno resulta más sustentable para el desarrollo de estos sistemas. Para avanzar en esta dirección, se cultivó *S. dimorphus* en reactores electroquímicos de 3 electrodos con el objetivo de evaluar su influencia sobre el comportamiento catódico y obtener información para su utilización en sistemas bioelectroquímicos.

4.4.1. Crecimiento y producción de oxígeno

En la figura 4-6 A se observa la curva de crecimiento y la tasa de producción de O₂ de *S. dimorphus* en reactores operados en *batch*, bajo condiciones de luz continua, sin polarización. *S. dimorphus* formó cultivos densos de una coloración verde característica de las microalgas clorofitas (Fig. 4-6 B). La tasa de duplicación de esta microalga en las condiciones ensayadas fue de 12 hs. Los cultivos presentaron su mayor tasa de producción de oxígeno durante la fase de crecimiento exponencial, alcanzando valores cercanos a las 24 ppm (Fig. 4-6 A), muy por encima de la concentración de oxígeno disuelta en agua en equilibrio con la atmósfera (9 ppm) [149]. La concentración de oxígeno disuelto en el medio disminuyó al cabo de unos días bajo estas condiciones. Éste es un comportamiento usual en el desarrollo intensivo de algas ya que a medida que el cultivo crece y se pone denso, las células comienzan a hacerse sombra entre ellas, disminuyendo la incidencia promedio de la luz sobre la población y, por ende, la cantidad de oxígeno que ésta produce. De esto se desprende que, el cambio a una alimentación intermitente (*batch* alimentado) o bien a una alimentación continua, resultarían propicias para el funcionamiento de los biocátodos ya que la remoción de cultivo y el suministro de medio fresco evitan el efecto de sombreado celular sobre

la eficiencia fotosintética. Durante estos ensayos, el potencial de circuito abierto se mantuvo entre los 0.08 - 0.10 V a un pH de 7.5 (resultados no mostrados).

A)



B)



Figura 4-6: Crecimiento de *S. dimorphus* en bioreactores. Se crecieron cultivos de esta microalga en bioreactores operados en *batch* con configuración de 3 electrodos y se tomaron muestras para medir la Abs a 600nm. El oxígeno se monitoreó de manera continua a lo largo de los días. A) Relación entre el crecimiento celular y el oxígeno disuelto en el medio. B) Fotografía de un cultivo de *S. dimorphus* en un reactor. Las curvas son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

4.4.2. Análisis electroquímico utilizando el electrodo como dador de electrones

En la figura 4-7 se muestra la evolución de la corriente medida a -0.45 V a lo largo de varios días. Se eligió un potencial lo suficientemente negativo para favorecer la reacción de reducción del oxígeno, sin impulsar la reducción de protones. En simultáneo, se registró la evolución de la concentración de oxígeno disuelto en función del fotoperíodo impuesto (14:10 luz:osc) (Fig. 4-7).

Estos resultados mostraron un aumento en la concentración del oxígeno disuelto al comienzo del período de luz del fotoperíodo. Luego, al apagarse la luz, el oxígeno disuelto disminuyó abruptamente y se mantuvo alrededor de los 5 ppm hasta el comienzo del nuevo ciclo (Fig. 4-7). La corriente catódica siguió este comportamiento, aumentando con la exposición a la luz y disminuyendo en oscuridad. Estos resultados muestran de manera muy clara que el desempeño del cátodo depende de las variaciones en la concentración de oxígeno disuelto, producto de la actividad fotosintética de las microalgas. Sin embargo, en las curvas de la figura 4-7 se observa también, que la respuesta de la corriente se desacopla (baja) de la concentración de oxígeno a medida que el cultivo madura. Dado que la concentración de oxígeno sigue aún siendo máxima después de 4 días de cultivo, esto evidencia algún tipo de condicionamiento en la reactividad del electrodo para con la reducción del oxígeno.

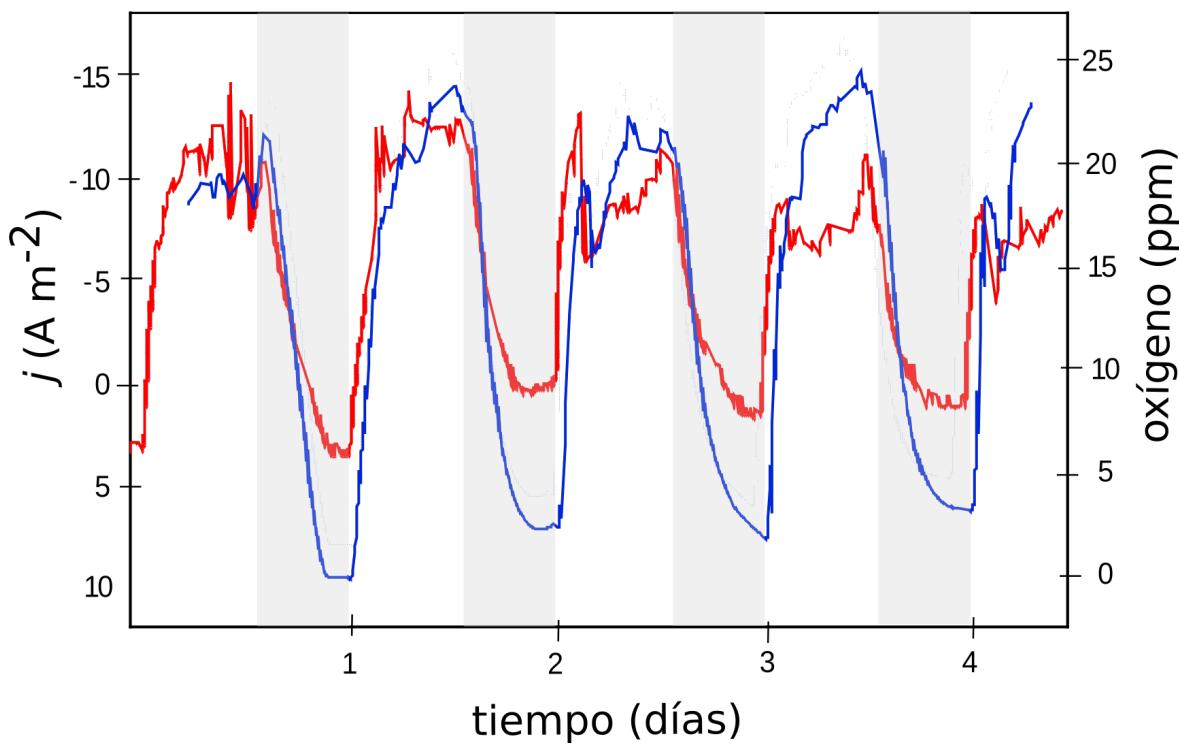


Figura 4-7: Relación entre la biomasa y el oxígeno en bioreactores de *S. dimorphus*. Se crecieron cultivos en *batch* de esta microalga en bioreactores electroquímicos de 3 electrodos, en condiciones fotoautótrofas con fotoperíodo luz:oscuridad de 14hs : 10hs. Se polarizaron electrodos de grafito a -0.45 V vs Ag/AgCl y se registró la corriente (curva roja) y el oxígeno (curva azul) a lo largo de los días. Las curvas son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

Con el objetivo de corroborar la dependencia entre la corriente catódica y la concentración de oxígeno disuelto, se crecieron cultivos en reactores operados en *batch* y se realizaron voltametrías cíclicas a distintas concentraciones de oxígeno producido por las microalgas. Para ello, se crecieron los cultivos y se agregó un electrodo nuevo y estéril una vez alcanzada la concentración de oxígeno deseada. Se registró un aumento en la corriente catódica respecto del control sin microalgas a medida que el oxígeno aumentaba en el catolito utilizando electrodos libres de *biofilms* (Fig. 4-8). Al aumentar la concentración de oxígeno gracias a la presencia de las microalgas, la corriente aumentó alcanzando los -3 A m^{-2} (Fig. 4-8 A, curva roja). No se observaron señales de óxido-reducción que indiquen una posible capacidad electrogénica directa por parte de las microalgas en suspensión (Fig. 4-8).

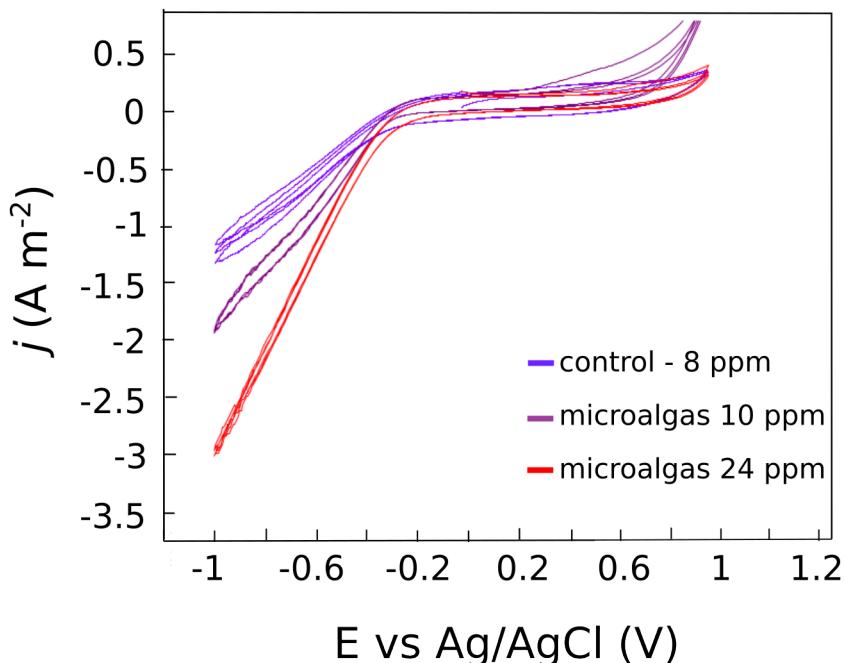


Figura 4-8: Análisis electroquímico mediante voltametría cíclica de *S. dimorphus* en bio-reactores. Se crecieron cultivos de *S. dimorphus* en reactores y se realizaron voltametrías cíclicas a 5 mV seg^{-1} bajo distintas concentraciones de oxígeno disuelto. Se realizaron CVs sobre electrodos libres de *biofilms* colocados en cultivos bajo distintas condiciones de oxígeno generado por las microalgas. Las curvas son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

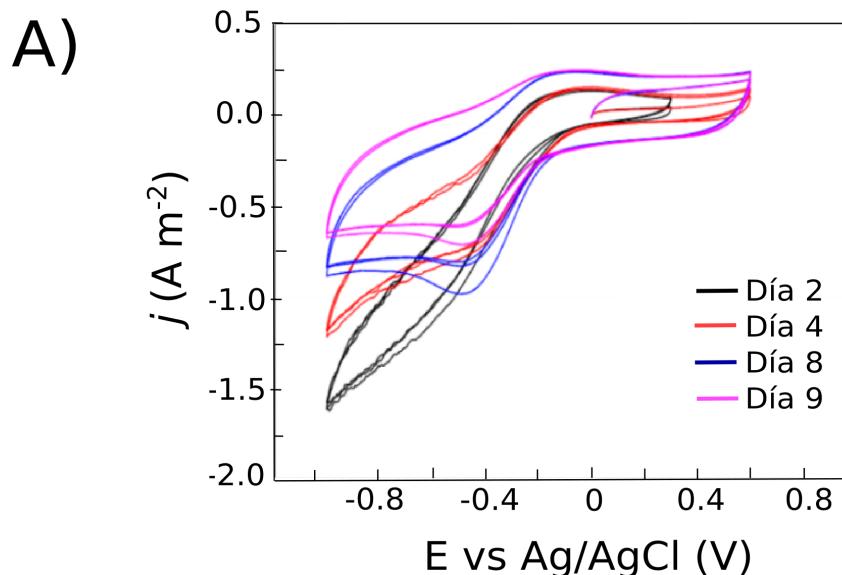
Influencia de los *biofilms* de *S. dimorphus* en la reacción catódica

Varios autores han mostrado la relación entre la corriente de reducción y la producción de oxígeno por las algas, y han sugerido que la formación de *biofilms* sobre electrodos contribuye a la generación de corriente. Estos *biofilms* facilitarían el oxígeno al electrodo de manera directa, evitando limitaciones como la difusión pasiva desde el seno del líquido hacia el mismo. En base a estos antecedentes, se decidió continuar la caracterización electroquímica de los biocátodos analizando su desempeño ante la ausencia o presencia de *biofilms* formados sobre los electrodos.

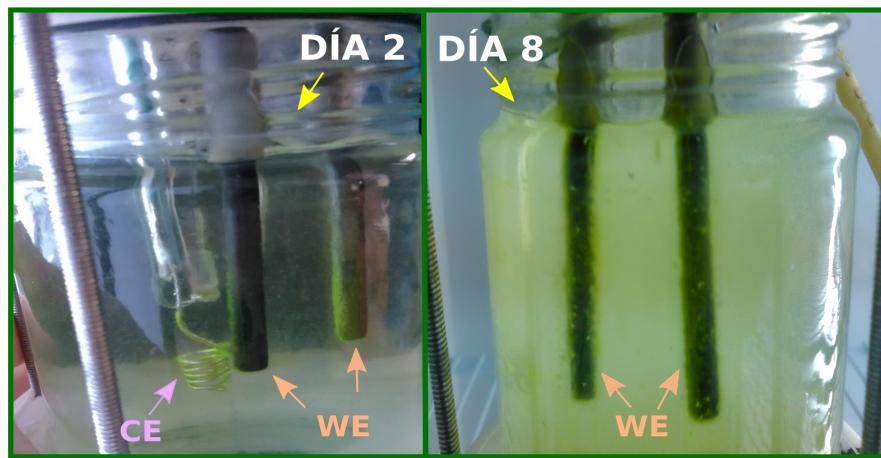
Se utilizaron reactores con electrodos polarizados a -0.45 V en los cuales se crecieron cultivos de *S. dimorphus* y se observó macroscópicamente el crecimiento de *biofilms*. En la figura 4-9 se observan las voltametrías realizadas diariamente a lo largo del crecimiento del *biofilm* (4-9 A) y las fotografías de los electrodos en dos

estadíos de crecimiento (4-9 B). Las curvas muestran la progresión de la adherencia celular de manera clara, evidenciada por la disminución de la corriente catódica a lo largo de los días y la aparición clara de una corriente límite (curva azul, día 8). Esta corriente límite, que puede observarse como una meseta alrededor de los -0.8 A m^{-2} en la curva azul y -0.65 A m^{-2} en la curva rosa a potenciales negativos, surge de una limitación a la difusión del oxígeno desde el seno del líquido y hacia el electrodo. Este último a su vez, es consecuencia de que el electrodo presenta gran parte de sus sitios activos bloqueados por la adherencia de las microalgas.

Con el fin de corroborar lo mencionado anteriormente, se comparó la curva correspondiente al noveno día de crecimiento del *biofilm* con una voltametría realizada sobre un electrodo libre de *biofilm* que se introdujo en el reactor para exponerlo a la misma concentración de oxígeno en el medio. La figura 4-9 C muestra ambas voltametrías. La reacción de reducción que ocurrió sobre el electrodo nuevo presentó una mayor corriente catódica en comparación con la CV de los electrodos cubiertos de *biofilm*. En conjunto, la figura 4-9 evidencia que la presencia de *biofilms* sobre electrodos no favorece las reacciones de reducción electroquímica del oxígeno sino que, por el contrario, disminuye el desempeño catódico del sistema.



B)



C)

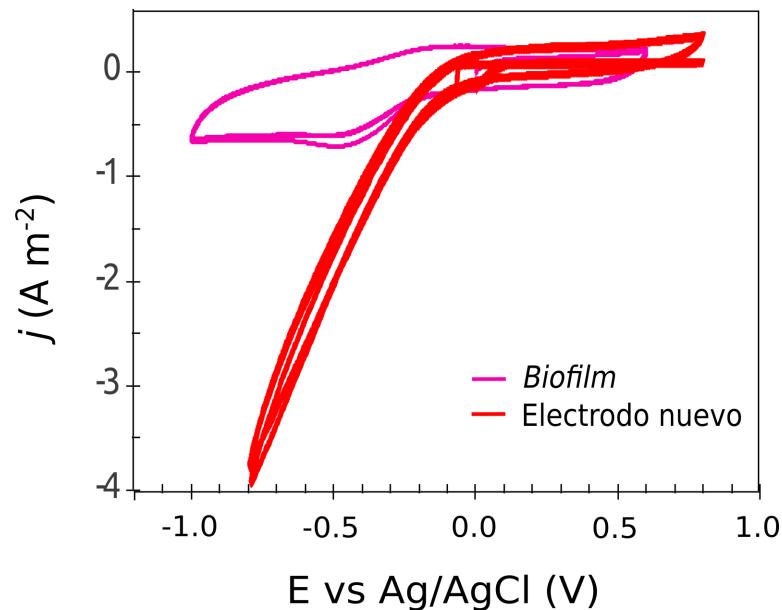


Figura 4-9: Perfil voltamétrico de *S. dimorphus* a lo largo de los días. Se crecieron cultivos de *S. dimorphus* en reactores con electrodos polarizados a -0.45 V y se realizaron voltametrías cíclicas a 5mV seg^{-1} diariamente. A) Fotografías de reactores con electrodos cubiertos por *biofilms* al día 2 y 8 del experimento. CE: contra electrodo, WE: electrodo de trabajo. B) Evolución del perfil voltamétrico de electrodos de grafito que se mantuvieron polarizados a -0.45 V en un cultivo en crecimiento de *S. dimorphus*. La formación de un *biofilm* sobre los electrodos fue visible macroscópicamente y se muestra en el panel (B). La respuesta sobre un electrodo nuevo (curva roja) expuesto al mismo medio se muestra en (C). La curva rosa corresponde a la CV en presencia de un *biofilm* (día 9, panel A).

Influencia del material de electrodo

Como última instancia de la caracterización electroquímica, se evaluó el desempeño de distintos materiales conductores utilizados como WE. El material de electrodo a utilizar cumple un rol muy importante en la reacción de reducción electroquímica de oxígeno y esto implica un gran desafío para el diseño de sistemas escalables que presenten una buena relación costo-beneficio. En lo que respecta a estos materiales, el platino presenta la mayor capacidad catalítica. Sin embargo, dado que es un material costoso, no resulta propicio para su implementación en sistemas electroquímicos de gran escala. En base a esto, se evaluó el desempeño de la reducción de oxígeno sobre electrodos de grafito y de acero inoxidable como materiales de electrodo de potencial aplicación. En la figura 4-10 se observan las curvas correspondientes a las CVs de ambos materiales (y comparadas con el platino) en cultivos fotoautotróficos de *S. dimorphus* crecidos en reactores con electrodos polarizados a -0.45 V.

Los resultados indicaron efectivamente que el platino es el mejor material electrocatalítico. Por otro lado, se observó que el grafito posee un mejor desempeño en la reducción de oxígeno al compararlo con el acero inoxidable (Fig. 4-10). Éste alcanzó una mayor densidad de corriente catódica máxima (-2.4 Am^{-2} vs -0.64 Am^{-2}) y el potencial óptimo para la reducción del oxígeno también se alcanzó antes (-0.14 V vs -0.31 V, Fig. 4-10).

El grafito es un material ampliamente utilizado en las implementaciones bioelectroquímicas por su excelente biocompatibilidad y su bajo costo en relación con los metales. Dado que, además, este material tiene un buen desempeño en la catálisis de reducción de oxígeno aparece como una buena opción para los sistemas que incorporen algas para mejorar el desempeño catódico.

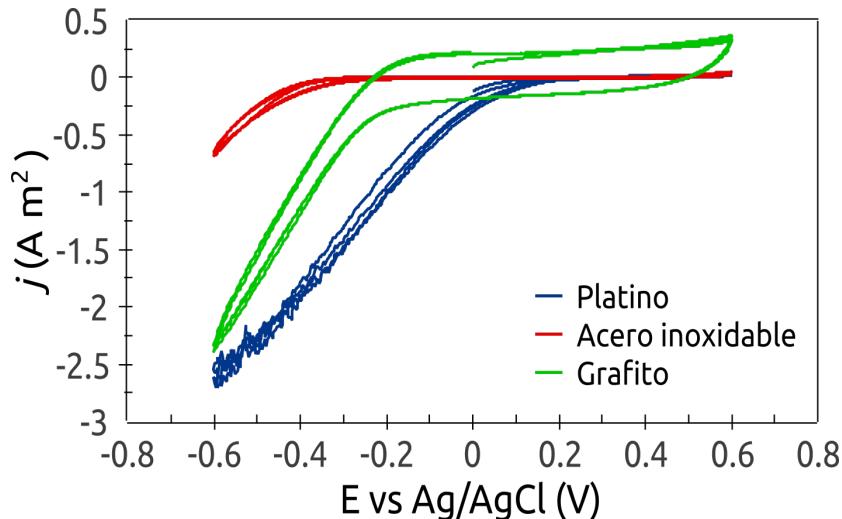


Figura 4-10: Evaluación de la reacción catódica sobre electrodos de distintos materiales. Se crecieron cultivos de *S. dimorphus* en reactores y se realizaron voltametrías cíclicas a 5 mV seg⁻¹ sobre electrodos de platino (azul), acero inoxidable (rojo) y grafito (verde).

4.4.3. Utilización de *S. dimorphus* para mejorar el desempeño catódico en humedales bioelectroquímicos

En un humedal electroquímico el potencial redox varía con la profundidad. Adop-
ta valores positivos de alrededor de 0.3 V en la zona superior aireada debido a la
presencia de oxígeno y se vuelve paulatinamente más negativo a medida que la con-
centración de éste disminuye, alcanzando valores de hasta -0.45 V en el fondo del
lecho. En la zona anódica (anaeróbica) de un humedal electroquímico se favorece el
crecimiento de bacterias que pueden utilizar el material conductor que compone el
lecho como acceptor de electrones. Como se dijo anteriormente, la bacteria modelo
para este tipo de procesos es *G. sulfurreducens* que ha sido ampliamente estudiada
en nuestro laboratorio [12, 16, 17, 150]. Los electrones producidos por bacterias como
Geobacter en la zona anódica del humedal son utilizados para impulsar la reacción
de reducción de oxígeno como proceso dominante en la zona catódica. Ambos proce-
sos se comunican eléctricamente a través de un circuito externo que permite además,
utilizar la corriente.

Con el objetivo de avanzar hacia la incorporación de organismos fotosintéticos
para mejorar la obtención de energía a partir de un efluente en humedales bioelec-

troquímicos, se realizaron experimentos en un sistema de columnas que permitieron copiar simplificadamente la producción de electrones en la zona anaeróbica de un humedal, e introducir las microalgas como proveedoras de oxígeno en la zona catódica. Para interpretar el funcionamiento de estos sistemas, es necesario comparar la información electroquímica disponible para cada hemireacción.

La figura 4-11 muestra una voltametría obtenida en nuestro laboratorio a partir de un cultivo electrogénico de *G. sulfurreducens* superpuesta con la voltametría realizada sobre un electrodo de grafito en un cultivo de microalgas (Fig. 4-11). En la misma se observa que *G. sulfurreducens* tiene la potencialidad de producir una corriente anódica a partir de los -0.4 V, en dirección a potenciales positivos (potencial en el cual comienza a aumentar la corriente hasta estabilizarse alrededor de los -0.3 V a 1.5 A m²) mientras que el cultivo de *S. dimorphus* es capaz de promover la producción de una corriente catódica a partir de los -0.4 V en dirección a potenciales negativos. Como se mencionó anteriormente los sistemas bioelectroquímicos buscan promover el flujo eficiente de electrones (corriente) desde el ánodo (*G. sulfurreducens*) hacia el cátodo (*S. dimorphus*). Para que esto suceda, el potencial de cada uno de los electrodos debe ser adecuado para que las reacciones ocurran. Además, debe tenerse en cuenta que la corriente que se puede obtener será igual a la que pueda dar la más lenta de las dos reacciones ya que ambas reacciones utilizan los mismos electrones. A partir de los resultados de la figura 4-11, se puede estimar que el potencial al cual la velocidad de ambas reacciones (anódica y catódica) se iguala, ronda los -0.35 V. La corriente máxima que se podría obtener al conectar los electrodos sería entonces de 1 A m² (Fig. 4-11). Por debajo del potencial indicado, se reduce más oxígeno electroquímicamente sobre el electrodo (curva verde), pero la reacción anódica es pobre o nula (curva rosa). Por encima de ese potencial, la reacción anódica es capaz de entregar más electrones (mayor corriente), pero la reducción del oxígeno es muy lenta o nula.

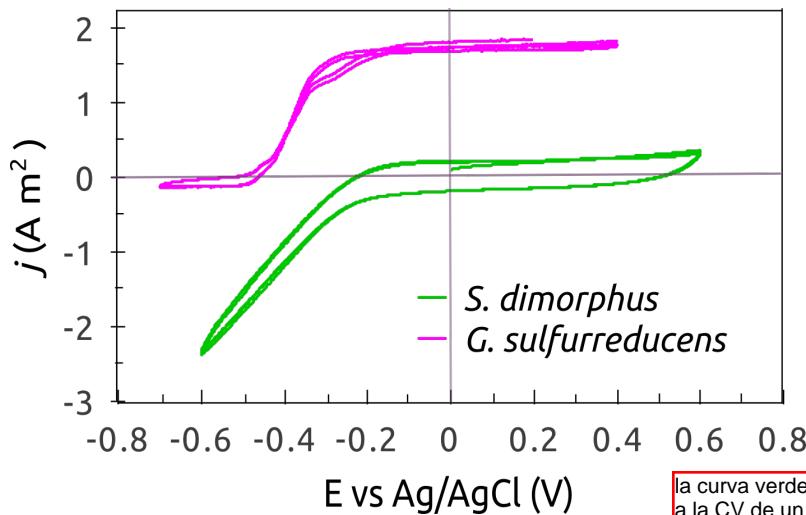


Figura 4-11: Hemireacciones de un sistema electroquímico utilizando *S. dimorphus* y *G. sulfurreducens*. La curva rosa corresponde a la CV realizada sobre un electrodo de grafito cubierto por un *biofilm* electrogénico de *G. sulfurreducens*. El crecimiento de estos *biofilms* se realizó en nuestro laboratorio mediante la polarización de electrodos a 0.2 V.

la curva verde corresponde a la CV de un electrodo de grafito en un cultivo de *S. dimorphus* según se indicó en el texto.

Los experimentos con las columnas consistieron en favorecer primeramente el crecimiento de *G. sulfurreducens* en la zona anódica, para luego introducir las microalgas en la zona catódica y medir el desempeño del sistema a través de la realización de curvas de potencia.

en a leyenda de la figura dice otro valor!

En primer lugar, se inoculó un cultivo de *G. sulfurreducens* en el ánodo y se polarizó el sistema a un potencial propicio para su crecimiento (0,05 V vs Ag/AgCl). Se colocaron un RE y un CE de platino para lograr un crecimiento controlado y efectivo de *G. sulfurreducens* en batch (configuración de tres electrodos).

Una vez estabilizada la corriente generada por las bacterias electrogénicas, se utilizaron distintas estrategias para evaluar la acción de las microalgas. En una primera instancia, se intentó copiar la configuración habitual de un humedal llenando la zona catódica con coque granular, para luego agregarle un cultivo de microalgas previamente crecido (Fig 4-12 A). Utilizando esta estrategia, se observó la precipitación total de las células sobre la superficie del material al cabo de las primeras tres horas (resultados no mostrados). En una segunda instancia, se reemplazó el lecho granular por barras de grafito, buscando favorecer las condiciones de iluminación sobre el cultivo de microalgas (Fig. 4-12 B). De esta manera, se intentó verificar si era posible sostener la producción de oxígeno en el tiempo. Al igual que en los ensayos anteriores,

una disminución pronunciada de la concentración de O₂ en la zona catódica y

la precipitación de las algas sobre las barras de grafito tuvo como consecuencia una disminución en la concentración de oxígeno, desde 19 ppm a 3 ppm aproximadamente. Este comportamiento se debió a un cambio brusco de las condiciones ambientales que experimentaron las microalgas a lo largo del ensayo.

Dado que resulta indispensable mantener altas concentraciones de oxígeno en el cátodo, el siguiente diseño consistió en crecer las microalgas en un fotobioreactor externo, controlando las condiciones de luz, oxígeno y pH (Fig. 4-12 C). Para ello, se creció nuevamente a *G. sulfurreducens* en el ánodo de la columna y una vez estabilizada la corriente, se procedió a circular el cultivo de microalgas a través del cátodo (Fig 4-12 C). En estas condiciones se obtuvo una concentración de oxígeno estable en la zona catódica de las columnas y se decidió entonces a proceder a evaluar el desempeño del sistema en la producción de potencia eléctrica.

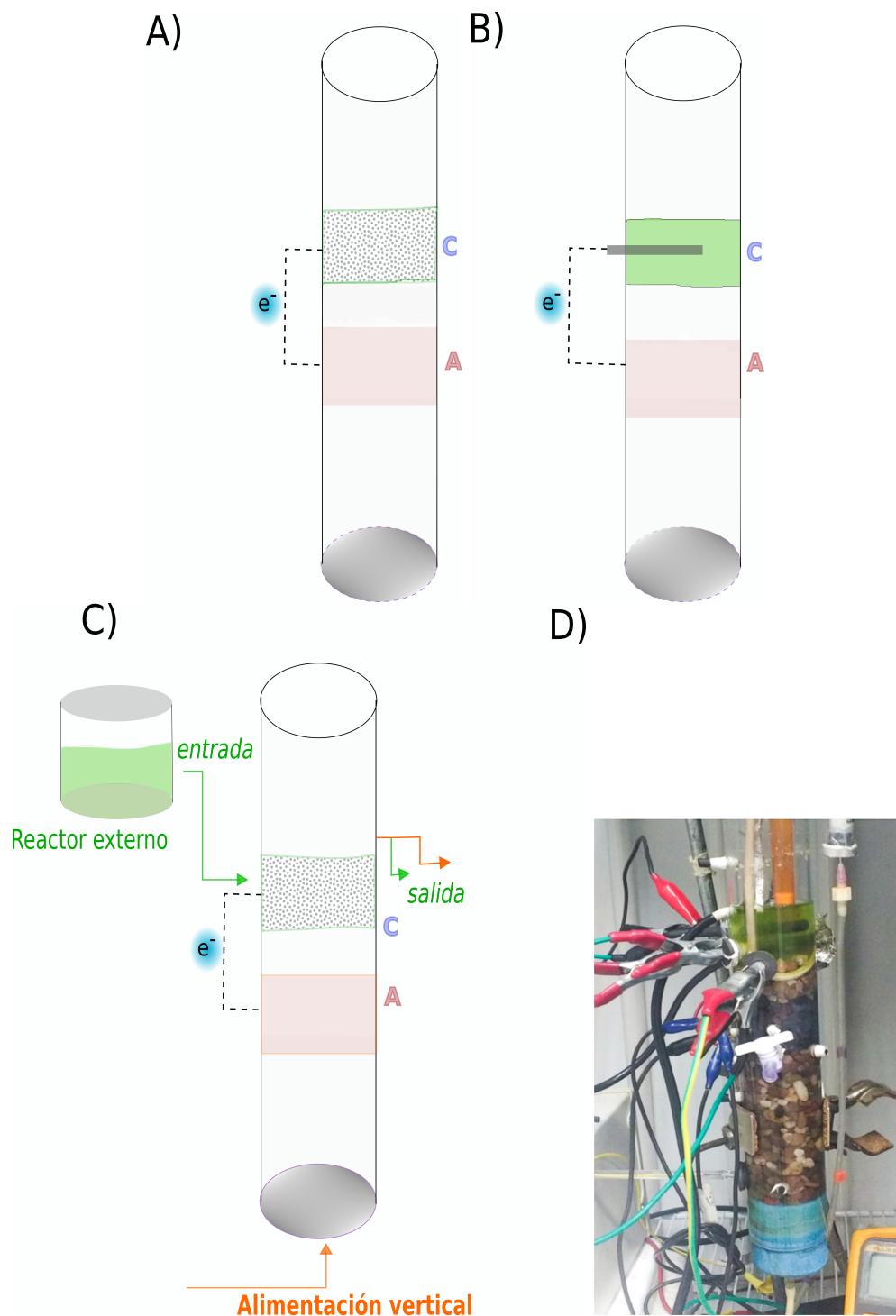


Figura 4-12: Incorporación de microalgas en sistemas de tipo columna. A) - C) Esquemas representativos de las columnas utilizando coque (A), barras de grafito (B) o grafito granular (C) como material catódico. Los colores rojo y verde hacen referencia a los cultivos de *G. sulfurreducens* y de *S. dimorphus*, respectivamente. A, ánodo; C, cátodo. D) Fotografía de una columna.

Análisis de desempeño: curvas de potencia

Esta evaluación se hizo para dos configuraciones de cátodo, una utilizando barras de grafito y la otra utilizando un lecho de grafito granular. Los resultados se compararon con aquellos obtenidos mediante el uso de aireación mecánica como alternativa abiótica de referencia.

Se conectó el sistema con una configuración de dos electrodos, utilizando el ánodo (*G. sulfurreducens*) como WE y el cátodo (*S. dimorphus*) como CE y RE. Las curvas de potencia se obtuvieron variando la diferencia de potencial aplicada en un intervalo de -0.4 a 0.8 V, en pasos de 0.05 V. Para variar la diferencia de potencial entre ánodo y cátodo, el instrumento varía su resistencia interna al flujo de electrones y eso determina un cambio en la intensidad de la corriente que puede circular por el circuito. De acuerdo a la ley de Ohm ($V = I.R$), cuando la diferencia de potencial o voltaje (V) aplicado es alto, la resistencia (R) interna del circuito es alta y limita a la corriente (I), resultando en valores bajos de potencia ($P = I.V$). A medida que el equipo reduce su resistencia interna para aplicar una diferencia de potencial paulatinamente menor, la corriente ~~deja de estar limitada~~^{sobre los electrodos} por la resistencia del equipo y sube. En este punto, la I se puede ver sólo limitada por la velocidad a la cual pueden ocurrir las hemireacciones. De esta manera, se puede determinar cual es la mejor combinación entre el potencial aplicado y la corriente obtenida, ~~o~~ P , para utilizar la energía que puede proveer el sistema bioelectroquímico. ~~a la máxima potencia (P).~~

En la figura 4-13 se muestran las curvas de potencia obtenidas utilizando aireación mecánica (control) o el oxígeno generado por las microalgas para dos configuraciones de cátodo: grafito granular o barras.

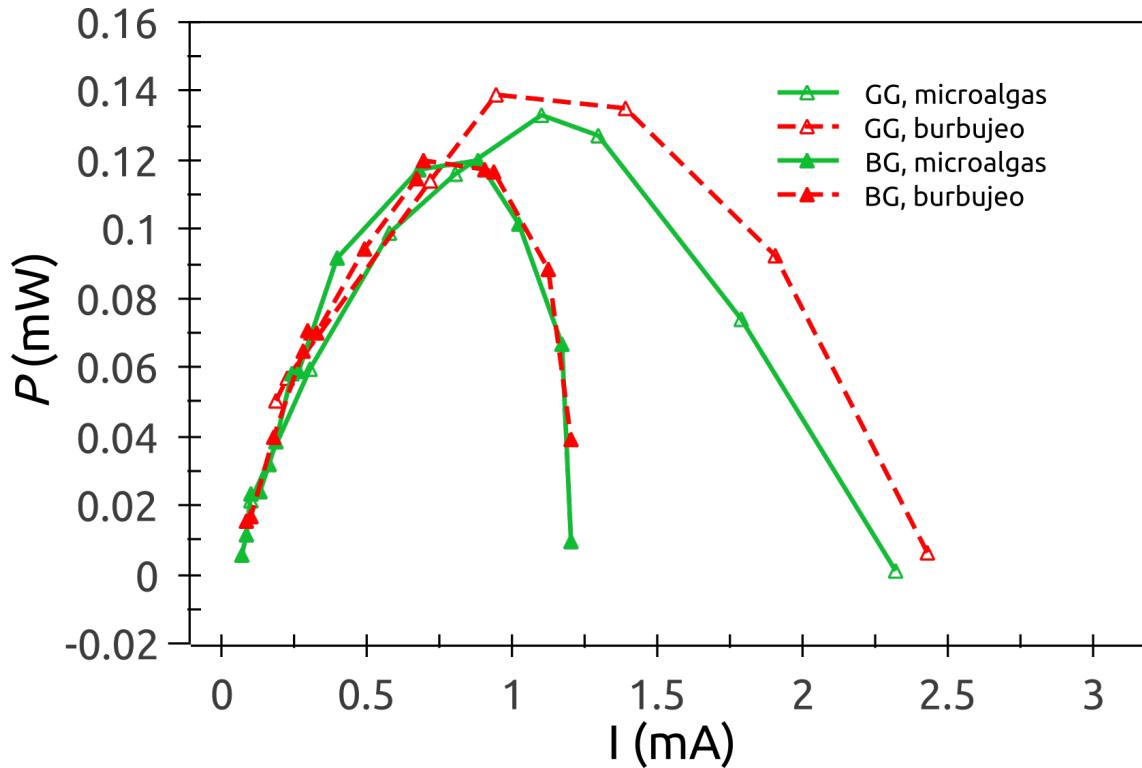


Figura 4-13: Curvas de potencia en presencia o ausencia de microalgas en el cátodo. Se crecieron cultivos de *G. sulfurreducens* en el ánodo del sistema de columna manteniendo un diseño de 3 electrodos y polarizando el WE a 0.05 V. Las microalgas se incorporaron una vez estabilizada la corriente anódica y se obtuvieron las curvas de potencia bajo un diseño de dos electrodos conectando el ánodo con el cátodo. Se varió la diferencia de potencial entre ambos en un intervalo de -0.4 a 0.8 V, en pasos de 0.05 V y se registró el potencial del ánodo, cátodo y la corriente luego de dos minutos. La potencia se calculó como $P = I\Delta E$ en presencia de microalgas (curvas verdes continuas) como generadoras de oxígeno en el cátodo o en ausencia de las mismas mediante el uso de un aireador (curvas rojas discontinuas) para la inyección de aire. GG: grafito granular como material de electrodo. BG: barras de grafito como material de electrodo. Estas curvas son representativas de al menos 5 experimentos independientes.

En la figura 4-13 se puede observar que el desempeño del sistema con microalgas igualó al logrado mediante aireación mecánica, tanto en los experimentos con electrodos de barra como en los de lecho de grafito granular. La máxima potencia obtenida fue de 0.12 mW para los electrodos de barra y 0.14 mW para el grafito granular (Fig. 4-13). Como era de esperarse, la corriente a la cual se obtuvo la máxima potencia fue mayor cuando se utilizó grafito granular, debido a que este electrodo permite trabajar con una mayor relación área/volumen. El potencial al cual se obtuvo la máxima potencia fue ~~mayor~~ similar en ambos casos y estuvo alrededor de los 0.14

V. De acuerdo a estos resultados y asumiendo que con experimentación adicional sería posible que la corriente obtenida fuera de 1 A m^2 (Fig. 4-11 y discusión al respecto), la potencia que sería posible obtener de un sistema con las características ensayadas sería de 0.14 W m^2 de electrodo. Esta potencia es aún baja para abastecer una aplicación real, pero no debe perderse de vista que la energía puede almacenarse, por ejemplo, en baterías recargables. Dado que los humedales electroquímicos son en general de varios metros cuadrados y que operan las 24 horas del día, resulta factible la incorporación de microalgas en futuras aplicaciones. En este contexto, y teniendo en cuenta que la investigación sobre sistemas bioelectroquímicos que incluyan microorganismos fotosintéticos se encuentra aún en sus inicios, no puede descartarse la posibilidad de que en un futuro se encuentren los caminos para utilizarlos como fuente de producción de energía.

4.5. Discusión

En este capítulo se evaluó el desempeño de la microalga *S. dimorphus* como microorganismo suministrador para oxígeno de las reacciones catódicas en sistemas electroquímicos. La incorporación de microorganismos fotosintéticos en el cátodo surge como una potencial solución para eliminar la aireación mecánica, la cual implica un gasto de energía adicional en el sistema [22].

Se obtuvieron concentraciones de oxígeno de hasta 24 ppm mediante el crecimiento de *S. dimorphus* en bioreactores, por encima de la concentración de este gas en el agua en equilibrio con la atmósfera (9 ppm) [129]. La determinación de parámetros fisiológicos de las microalgas es importante para el desarrollo de biocátodos. Dado que el objetivo de su incorporación en estos sistemas es el suministro de oxígeno, conocer las condiciones que favorezcan su metabolismo fotosintético resultan de vital importancia. Los resultados presentados indican que *S. dimorphus* produce las mayores concentraciones de oxígeno durante la fase de crecimiento exponencial. Esto sugiere que la elección de un flujo de alimentación continua o *fed-batch* sería ideal para mantener las condiciones óptimas de tasa fotosintética.

Las cronoamperometrías realizadas mostraron una relación entre la concentración de oxígeno presente en el medio y la corriente catódica. Una vez iniciado el período de luz, el valor de la corriente catódica aumentó conforme aumentaba la concentración de oxígeno generado por las microalgas. De la misma manera, se observó la disminución de la corriente al comenzar el período de oscuridad del fotoperíodo. Estos resultados indican que existe una relación directa entre la concentración de oxígeno y la generación de corriente en el sistema. Diversos autores han informado esto en bibliografía [133, 132, 134, 135, 131, 127, 136, 137]. Por otra parte, la influencia de la formación de un *biofilm* en el desempeño de los biocátodos no parece estar clara.

Por un lado, se ha sugerido que la presencia de un *biofilm* fotosintético facilitaría de manera directa el oxígeno producido por las microalgas para su reducción por parte del electrodo [133, 125, 132, 134, 135, 131] pero no se han aportado datos concretos sobre la electroactividad directa en las microalgas. En base a esto, en esta tesis se

evaluó la relación entre *biofilms* de *S. dimorphus* y la generación de corriente en sistemas electroquímicos.

A partir de los resultados presentados en este capítulo, resultó evidente que la formación de *biofilms* sobre los electrodos bloquea los sitios activos del mismo dificultando la reducción del oxígeno. La adherencia celular progresiva provocó la aparición de una corriente límite a potenciales catódicos, lo cual sugiere una limitación difusiva del oxígeno desde el seno del líquido al electrodo. Por otro lado, el reemplazo de electrodos recubiertos de *biofilms* por electrodos nuevos, confirmó que la presencia de los mismos perjudica el desempeño de la reacción catódica.

En conjunto, estos resultados muestran que la incorporación de microalgas como suministradoras de oxígeno para las reacciones de reducción en el cátodo es efectiva frente al método de aireación mecánica. También evidenciaron que un correcto diseño del sistema bioelectroquímico permite mantener estos cultivos en condiciones de luz, pH y número de células apropiadas para asegurar la mayor tasa de producción de oxígeno. A su vez, se debe priorizar el cultivo planctónico frente a la formación de *biofilms*. Esto concuerda con lo obtenido por algunos autores, cuyos resultados sugieren que los cultivos planctónicos favorecen la generación de energía en estos sistemas [127? , 137].

Los trabajos que apoyan la idea de que los *biofilms* fotosintéticos facilitan el oxígeno para su reducción directa por parte del electrodo, se basan en un mecanismo de supersaturación de oxígeno dentro del *biofilm* [132]. Sin embargo, los *biofilms* fotosintéticos presentan gran heterogeneidad fisiológica al haber distintos microambientes dentro del mismo [151, 152, 153, 154]. Es así, que sólo los primeros cientos de micrómetros se encuentran en la zona fótica y lo que pase en las capas de más abajo se vuelve complejo y dependerá de la composición del *biofilm*. Estudios realizados con *biofilms* de cianobacterias mostraron que existe una capa difusiva límite, que limita la difusión del oxígeno hacia dentro y fuera del *biofilm*, lo cual lleva a la supersaturación del gas dentro del mismo. Esto ocasiona un aumento en el pH y un aumento en la relación O₂:CO₂, induciendo la fotorespiración por parte de las células. De esta manera, la fotorespiración permite balancear la relación de ambos gases impulsando

la fijación de CO₂ por el complejo RuBisCO [154, 155]. Por otro lado, la tasa de fotorespiración depende de la capacidad de los microorganismos de elevar el *pool* de carbono inorgánico disuelto dentro del *biofilm* y por ende, la concentración de CO₂. Al mismo tiempo, este parámetro no puede sobrepasar el suministro por difusión y es por esta razón que, en una condición de supersaturación, no se facilita la reducción del oxígeno por parte del electrodo. Contrariamente, existiría un aumento en la tasa de fotorespiración y, por ende, del consumo de oxígeno por parte de las células [152, 151].

En cuanto a la elección del material de electrodo, nuestros resultados indican que el grafito es apropiado para el desarrollo de aplicaciones debido principalmente a su baja relación costo-beneficio, presentando mejor capacidad como material catalítico en comparación al acero inoxidable. De esta manera, es posible utilizarlo en reemplazo del platino como material conductor, el cual resulta muy costoso.

En la segunda parte de este capítulo se abordó el estudio de la incorporación de microalgas en un sistema del tipo columna, en el cual el compartimento anódico y cátodo se encontraban separados por material no conductor. En las celdas de combustible microbianas el material utilizado para separar ánodo y cátodo es originalmente una membrana de intercambio iónico [6], la cual resulta muy costosa imposibilitando escalar esos sistemas. El sistema utilizado en este trabajo no utiliza membranas y copia la situación real de un humedal electroquímico. Para la utilización de este sistema se favoreció el desarrollo de un *biofilm* de *G. sulfurreducens* en el ánodo mediante polarización externa.

Otra opción para este sistema sería no polarizar el ánodo para el crecimiento del cultivo electrogénico sino que, en su lugar, ánodo y cátodo podrían conectarse dejando que el sistema se estabilice en función de las reacciones de oxidación dadas por las bacterias electrogénicas, y las de reducción en el cátodo mediante burbujeo de aire. De esta manera, se fijarían los potenciales de las reacciones individuales del sistema sin la necesidad de aplicar energía mediante la polarización. Este último procedimiento se ha ensayado en prototipos de mayor escala en nuestro laboratorio y aunque demanda un mayor tiempo de maduración, mostró ser efectivo.

La incorporación de las microalgas en el cátodo también presenta un desafío ya que, como se comentó anteriormente, se debe favorecer el cultivo planctónico con el fin de obtener la mayor concentración de oxígeno posible. El decantamiento de las células en el cátodo lleno de coque evidenció esto. Al cabo de unas horas tras inocular y operar en *batch* el cultivo de microalgas, las células decantaron sobre los fragmentos de coque, lo cual ocasionó una disminución en la concentración de oxígeno significando un impedimento para la efectividad del sistema. Es por ello, que se agregó un fotobioreactor al sistema, en el cual se creció el cultivo de *S. dimorphus* en condiciones controladas de agitación, luz y pH.

El sistema se operó, entonces, mediante el flujo continuo de microalgas a través del cátodo de la columna donde la concentración de oxígeno alcanzada al momento de realizar el ensayo fue alrededor de 16-18 ppm. En base a los ensayos realizados con coque como material de electrodo, se decidió utilizar barras de grafito y grafito granular. Este último presenta una mayor superficie catódica.

Las curvas de potencia obtenidas a partir de la polarización del ánodo (WE) a distintos potenciales utilizando el cátodo como RE y CE (configuración de dos electrodos), confirmaron el beneficio de aumentar el área catódica. Se obtuvo una mayor potencia en las columnas con grafito granular (0,14 mW) como material catódico en comparación con aquellas donde se utilizaron barras de grafito (0,12 mW). A su vez, la corriente de cortocircuito alcanzada utilizando grafito granular fue mayor (2,4 mA vs 1,2 mA). En ambos casos, el suministro por parte de las algas significó una obtención de energía similar al control con aireación mecánica. A pesar de esperarse un mejor desempeño debido a la alta concentración de oxígeno generado por las microalgas, estos resultados muestran que el reemplazo de un burbujeo mecánico (el cual implica un gasto adicional de energía) es de todas formas viable. A partir de estos resultados y la estimación teórica al comparar las voltametrías de *G. sulfurreducens* y *S. dimorphus*, sería posible obtener 0.14 W m^{-2} de electrodo. Se necesita de más investigación para conocer los valores aproximados de potencia que se podrían obtener en humedales electroquímicos que se valgan de microalgas para salvar las limitaciones relacionadas a la reducción de oxígeno. Sin embargo, los resultados presentados en este capítulo

evidencian la potencialidad de este tipo de aplicación, teniendo en cuenta que estos sistemas suelen tener varios metros cuadrados y que operan las 24 hs del día.

Capítulo 5

Conclusiones Generales

A lo largo de esta tesis se llevó a cabo la caracterización electroquímica de dos microorganismos fotosintéticos en sistemas bioelectroquímicos.

Por un lado, los ensayos realizados con la bacteria *R. palustris* arrojaron resultados muy interesantes que indicaron la capacidad de la misma de intercambiar electrones con un electrodo. *R. palustris* cepa AZUL fue capaz de incorporar electrones a partir de un electrodo polarizado a potenciales negativos (catódicos) probablemente generando equivalentes de reducción que le permitan así sobrevivir, por ejemplo, en condiciones deficientes en sustratos orgánicos. Si bien se necesita una investigación más profunda en lo que respecta a los mecanismos de transferencia de electrones, los experimentos realizados sugieren que co-existirían mecanismos directos e indirectos en esta bacteria. Por otro lado, en los experimentos en los que se usaron electrodos polarizados a potenciales positivos (anódicos) se observó que esta bacteria es capaz de transferir electrones a un aceptor externo, aunque a una tasa lenta. Además, los ensayos de acumulación de carga mostraron que *R. palustris* AZUL tiene la capacidad de almacenar carga posiblemente en moléculas externas ante la ausencia repentina del aceptor externo de electrones. En futuras investigaciones, la complementación con ensayos fisiológicos y bioquímicos permitirá asociar estas estrategias con mecanismos que funcionen como sumideros de exceso de cofactores redox, mantención del estado redox de los componentes de la cadena fotosintética, o ambos. Distintas aproximaciones, como por ejemplo el uso de inhibidores de los distintos componentes de la

cadena fotosintética, permitirían evaluar el comportamiento de la corriente obtenida a distintos potenciales y comprender su relación con el metabolismo fotosintético.

En base a los resultados electroquímicos obtenidos a partir del análisis de *R. palustris* AZUL, resultó interesante explorar las particularidades de su genoma. La comparación genómica de las distintas cepas de la especie dejó en evidencia que sólo un pequeño porcentaje del genoma se comparte entre todas las cepas analizadas y que existe un gran número de secuencias que le son propias a sólo algunas, o a una cepa específicamente. Los resultados presentados apoyan la idea de que cada cepa ha evolucionado como un ecotipo diferente [77]. En bibliografía existen dos trabajos que hacen mención a la capacidad de intercambiar electrones en cepas de *R. palustris*. Debido a las grandes diferencias intra-específicas que presentan estas cepas, es probable que los mecanismos por los cuales se llevan a cabo estos procesos sean diferentes. Por otro lado, la secuencia genómica de la cepa A_{Ambientales} gran cantidad de genes relacionados a distintos mecanismos de resistencia a metales. Esto último es de gran importancia teniendo en cuenta que la cepa AZUL se aisló de un ambiente sujeto a grandes fluctuaciones en las condiciones, por ejemplo, en relación a regímenes de lluvia que podrían ocasionar cambios en las concentraciones de metales. a o en condiciones

En conjunto, los resultados presentados en el capítulo 2 y 3 sugieren la existencia de mecanismos que le permiten a *R. palustris* AZUL sobrevenir fundamental, los resultados electroquímicos indican que la cepa se comunica eléctricamente con el exterior, por lo que no se descarta el nitrógeno o los metales. emple, una baja tasa de crecimiento, el estado re el nitrógeno es inorgánico! estrés ocasionado por situaciones fluctuantes de elementos tanto orgánicos (como la disponibilidad de nitrógeno) o inorgánicos (metales). Si bien el abordaje de este estudio fue de carácter básico y los resultados electroquímicos no indicarían factible la incorporación de *R. palustris* AZUL en un sistema bioelectroquímico, no se descarta que en el futuro nuevos estudios determine óptimas para la utilización de esta especie en distintas aplicaciones de este estilo. A su vez, esta especie presenta un gran potencial de aplicación en estrategias relacionadas a la bioremediación.

En último lugar, se presentaron los resultados de la incorporación de microalgas como suministradoras de oxígeno en cátodos de sistemas bioelectroquímicos. En ter-

Ainhoa Guardia

el crecimiento planctónico
y en consecuencia la
producción de

minos generales, se concluyó que se necesit

los cultivos planetónicos y, en consecuencia, las altas concentraciones de oxígeno en estos sistemas. Por otro lado, el análisis electroquímico indicó que *S. dimorphus* no

presenta actividad electrogénica (transferencia directa de electrones entre la célula y el electrodo).

Se utilizaron sistemas de columnas con cátodos de microalgas que imitan la configuración de un humedal electroquímico. Las curvas de potencia realizadas indican que sería factible obtener 0.14 W m^2 de electrodo. Si bien esta potencia es baja para abastecer una aplicación real, se debe tener en cuenta que los humedales electroquímicos presentan en general varios metros cuadrados y que operan las 24 horas del día. Es así, que la incorporación de microalgas en futuras aplicaciones resulta posible.

Finalmente y en función de los resultados obtenidos se utilizaron...

empezaría el párrafo con la zona resaltada y luego diría lo de la provisión de O₂

El análisis electroquímico indicó que.... pero los resultado de la incorporación de microalgas en cátodos...

Conclusiones generales

iculares que favorezcan

en una aplicación real optimizada sería posible...

merece ser explorada con mayor profundidad.

Anexo

En el siguiente link se encuentran las tablas con la información del análisis proveniente del *clustering* realizado por el programa Roary.

[https://drive.google.com/file/d/1xrrGpcdElDZOAMnY9mkMnRkDsdqWXmw0/view?
usp=sharing](https://drive.google.com/file/d/1xrrGpcdElDZOAMnY9mkMnRkDsdqWXmw0/view?usp=sharing)

Tabla 1. Agrupamiento y anotación del genoma de *R. palustris* utilizando Roary, cut-off identidad 80 %, opción separar parálogos.

Tabla 2. Anotación del genoma completo de *R. palustris* AZUL según Roary, cut-off identidad 80 %, opción separar parálogos.

Tabla 3. Secuencias codificantes de proteínas hipotéticas específicas de *R. palustris* AZUL según Roary, utilizando Blast2Go (*default parameters*).

Tabla 4. Secuencias codificantes de proteínas hipotéticas específicas de *R. palustris* AZUL según Roary, utilizando HMMER (escaneo de dominios Pfam - hmmscan).

Bibliografía

- [1] Philip N Bartlett. *Bioelectrochemistry. Fundamentals, Experimental Techniques and Applications.* Number 5. 2010. ISBN 9780470843642. doi: 10.1365/s10337-010-1601-2.
- [2] Daniel R Bond and Derek R Lovley. Electricity Production by Geobacter sulfurreducens Attached to Electrodes Electricity Production by Geobacter sulfurreducens Attached to Electrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3):1548–1555, 2003. ISSN 00992240. doi: 10.1128/AEM.69.3.1548.
- [3] Uwe Schröder, Falk Harnisch, and Largus T. Angenent. Microbial electrochemistry and technology: Terminology and classification. *Energy and Environmental Science*, 8(2):513–519, 2015. ISSN 17545706. doi: 10.1039/c4ee03359k.
- [4] Michaela A. Teravest, Zhongjian Li, and Largus T. Angenent. Bacteria-based biocomputing with Cellular Computing Circuits to sense, decide, signal, and act. *Energy and Environmental Science*, 4(12):4907–4916, 2011. ISSN 17545692. doi: 10.1039/c1ee02455h.
- [5] Derek R. Lovley. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 4(7):497–508, 2006. ISSN 1740-1526. doi: 10.1038/nrmicro1442. URL <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro1442>.
- [6] Korneel Rabaey and Willy Verstraete. Microbial fuel cells: Novel biotechnology for energy generation. *Trends in Biotechnology*, 23(6):291–298, 2005. ISSN 01677799. doi: 10.1016/j.tibtech.2005.04.008.

- [7] Bruce E. Logan, Bert Hamelers, René Rozendal, Uwe Schröder, Jürg Keller, Stefano Freguia, Peter Aelterman, Willy Verstraete, and Korneel Rabaey. Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environmental Science and Technology*, 40(17):5181–5192, 2006. ISSN 0013936X. doi: 10.1021/es0605016.
- [8] Clare E. Reimers, Leonard M. Tender, Stephanie Fertig, and Wei Wang. Harvesting energy from the marine sediment - Water interface. *Environmental Science and Technology*, 35(1):192–195, 2001. ISSN 0013936X. doi: 10.1021/es001223s.
- [9] M. C. Potter. Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 84(571):260–276, 1911. ISSN 0950-1193. doi: 10.1098/rspb.1911.0073.
- [10] Hyung Joo Kim, Hyung Soo Park, Moon Sik Hyun, In Seop Chang, Mia Kim, and Byung Hong Kim. A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(2):145–152, 2002. ISSN 01410229. doi: 10.1016/S0141-0229(01)00478-1.
- [11] Dianne K. Newman and Roberto Kolter. A role for excreted quinones in extracellular electron transfer. *Nature*, 405(6782):94–97, 2000. ISSN 00280836. doi: 10.1038/35011098.
- [12] M. V Ordóñez, G. Schrott, D. A. Massazza, and J. P. Busalmen. The relay network of *Geobacter* biofilms. *Energy & Environmental Science*, 2016. ISSN 2040-3364. doi: 10.1039/x0xx00000x. URL <http://arxiv.org/abs/1612.08814>.
- [13] Christin Koch and Falk Harnisch. Is there a Specific Ecological Niche for Electroactive Microorganisms? *ChemElectroChem*, 3(9):1282–1295, 2016. ISSN 21960216. doi: 10.1002/celc.201600079.
- [14] Heidi H. Hau and Jeffrey A. Gralnick. Ecology and Biotechnology of the Genus *Shewanella*. *Annual Review of Microbiology*, 61(1):237–258, 2007. ISSN 0066-4227. doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093257.

- [15] Abraham Esteve-Núñez, Cinthia Núñez, and Derek R. Lovley. Preferential Reduction of Fe(III) over Fumarate by *Geobacter sulfurreducens*. *Journal of Bacteriology*, 186(9):2897–2899, 2004. ISSN 00219193. doi: 10.1128/JB.186.9.2897-2899.2004.
- [16] Germán D. Schrott, P. Sebastian Bonanni, Luciana Robuschi, Abraham Esteve-Núñez, and Juan Pablo Busalmen. Electrochemical insight into the mechanism of electron transport in biofilms of *Geobacter sulfurreducens*. *Electrochimica Acta*, 56(28):10791–10795, 2011. ISSN 00134686. doi: 10.1016/j.electacta.2011.07.001.
- [17] Pablo Sebastián Bonanni, Germán David Schrott, and Juan Pablo Busalmen. A long way to the electrode: How do *Geobacter* cells transport their electrons? *Biochemical Society Transactions*, 40(6):1274–1279, 2012. ISSN 03005127. doi: 10.1042/BST20120046.
- [18] Derek R. Lovley. Reach out and touch someone: Potential impact of DIET (direct interspecies energy transfer) on anaerobic biogeochemistry, bioremediation, and bioenergy. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 10(2):101–105, 2011. ISSN 15691705. doi: 10.1007/s11157-011-9236-9.
- [19] Diana Pocaznoi, Benjamin Erable, Luc Etcheverry, Marie Line Delia, and Alain Bergel. Towards an engineering-oriented strategy for building microbial anodes for microbial fuel cells. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(38):13332–13343, 2012. ISSN 14639076. doi: 10.1039/c2cp42571h.
- [20] César I. Torres, Andrew Kato Marcus, and Bruce E. Rittmann. Kinetics of consumption of fermentation products by anode-respiring bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(3):689–697, 2007. ISSN 01757598. doi: 10.1007/s00253-007-1198-z.
- [21] Anode-respiring Bacteria Arb, Andrew Kato Marcus, and Bruce E Rittmann. Kinetic Experiments for Evaluating. *Environmental Science & Technology*, 42(17):6593–6597, 2008.

- [22] Miriam Rosenbaum, Zhen He, and Largus T. Angenent. Light energy to bioelectricity: photosynthetic microbial fuel cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(3):259–264, 2010. ISSN 09581669. doi: 10.1016/j.copbio.2010.03.010. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.010>.
- [23] Fabian Fischer. Photoelectrode, photovoltaic and photosynthetic microbial fuel cells. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90(June 2017):16–27, 2018. ISSN 18790690. doi: 10.1016/j.rser.2018.03.053. URL <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.053>.
- [24] Kazuko Tanaka, Reita Tamamushi, and Teruo Ogawa. Bioelectrochemical Fuel-Cells Operated By the Cyanobacterium, *Anabaena Variabilis*. *Journal of chemical technology and biotechnology. Biotechnology*, 35 B(3):191–197, 1985. ISSN 02643421. doi: 10.1002/jctb.280350304.
- [25] Kazuko Tanaka, Noriko Kashiwagi, and Teruo Ogawa. Effects of light on the electrical output of bioelectrochemical fuel-cells containing *Anabaena variabilis* M-2: Mechanism of the post-illumination burst. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 42(3):235–240, 1988. ISSN 10974660. doi: 10.1002/jctb.280420307.
- [26] Tatsuo Yagishita, Shigeki Sawayama, Ken Ichiro Tsukahara, and Tomoko Ogi. Behavior of glucose degradation in *Synechocystis* sp. M-203 in bioelectrochemical fuel cells. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 43(1):177–180, 1997. ISSN 03024598. doi: 10.1016/S0302-4598(96)05145-8.
- [27] R. S. Berk and J. H. Canfield. Bioelectrochemical Energy Conversion. *Applied microbiology*, 12(1):10–12, 1964. ISSN 00036919. doi: 10.1128/aem.12.1.10-12. 1964.
- [28] Miriam Rosenbaum, Uwe Schröder, and Fritz Scholz. Utilizing the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* for microbial electricity generation: A living solar cell. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(6):753–756, 2005. ISSN 01757598. doi: 10.1007/s00253-005-1915-4.

-
- [29] Michael T. Madigan, Kelly S. Bender, Daniel H. Buckley, Matthew W. Sattley, and David A. Stahl. *Brock Biology of Microorganisms*. 2019. ISBN 9781292235103.
 - [30] Johannes F. Imhoff, Akira Hiraishi, and Jörg Süling. *Anoxygenic Phototrophic Purple Bacteria*. 2015. ISBN 9781118960608. doi: 10.1002/9781118960608. bm00002.
 - [31] C.N. Hunter, Fevzi Daldal, Marion C. Thurnauer, and J. Thomas Beatty. *The Purple Phototrophic Bacteria*, volume 28. 2009. ISBN 978-1-4020-8814-8. doi: 10.1007/978-1-4020-8815-5. URL <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-8815-5>.
 - [32] C. B. van Niel. On the morphology and physiology of the purple and green sulfur bacteria. *Archives of Microbiology*, 3, 1932. ISSN 1098-6596. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
 - [33] R Y Stanier and C B Van Niel. The Main Outlines of Bacterial Classification. *Journal of bacteriology*, 42(4):437–43766, 1941. ISSN 0021-9193. doi: 10.1128/jb.42.4.437-466.1941.
 - [34] Theo A. Hansen and Hans van Gemerden. Sulfide utilization by purple nonsulfur bacteria. *Archiv für Mikrobiologie*, 86(1):49–56, 1972. ISSN 03028933. doi: 10.1007/BF00412399.
 - [35] a G McEwan. Photosynthetic electron transport and anaerobic metabolism in purple non-sulfur phototrophic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66(1-3): 151–64, 1994. ISSN 0003-6072. doi: 10.1007/BF00871637. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7747929>.
 - [36] Frank W Larimer, Patrick Chain, Loren Hauser, Jane Lamerdin, Stephanie Malfatti, Long Do, Miriam L Land, Dale a Pelletier, J Thomas Beatty, Andrew S Lang, F Robert Tabita, Janet L Gibson, Thomas E Hanson, Cedric Bobst, Janelle L Torres Y Torres, Caroline Peres, Faith H Harrison, Jane Gibson, and

- Caroline S Harwood. Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. *Nature Biotechnology*, 22(1):55–61, 2004. ISSN 1087-0156. doi: 10.1038/nbt923. URL <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nbt923>.
- [37] F. M. Muller. On the metabolism of the purple sulphur bacteria in organic media. *Archiv f??r Mikrobiologie*, 4(1-4):131–166, 1933. ISSN 03028933. doi: 10.1007/BF00407535.
- [38] P. Hillmer and H. Gest. H₂ metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas capsulata*: H₂ production by growing cultures. *Journal of Bacteriology*, 129(2):724–731, 1977. ISSN 00219193.
- [39] David J. Richardson, Glenn F. King, David J. Kelly, Alastair G. McEwan, Stuart J. Ferguson, and J. Barry Jackson. The role of auxiliary oxidants in maintaining redox balance during phototrophic growth of *Rhodobacter capsulatus* on propionate or butyrate. *Archives of Microbiology*, 150(2):131–137, 1988. ISSN 03028933. doi: 10.1007/BF00425152.
- [40] James B McKinlay and Caroline S Harwood. Carbon dioxide fixation as a central redox cofactor recycling mechanism in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26):11669–11675, 2010. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1006175107.
- [41] Byung Hong Kim and Geoffrey Michael Gadd. *Bacterial Physiology and Metabolism*. 2008. ISBN 9780521846363.
- [42] James B Mckinlay and Caroline S Harwood. Calvin Cycle Flux , Pathway Constraints , and Substrate Oxidation State Bacteria. *mBio*, 2(7):1–9, 2011. doi: 10.1128/mBio.00323-10.Editor.
- [43] Rick Laguna, F. Robert Tabita, and Birgit E. Alber. Acetate-dependent photoheterotrophic growth and the differential requirement for the Calvin-Benson-Bassham reductive pentose phosphate cycle in *Rhodobacter sphaeroides* and

- Rhodopseudomonas palustris. *Archives of Microbiology*, 193(2):151–154, 2011. ISSN 03028933. doi: 10.1007/s00203-010-0652-y.
- [44] Di Wang, Yaoping Zhang, Emily Welch, Jilun Li, and Gary P. Roberts. Elimination of Rubisco alters the regulation of nitrogenase activity and increases hydrogen production in *Rhodospirillum rubrum*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010. ISSN 03603199. doi: 10.1016/j.ijhydene.2010.04.183.
- [45] Yongqin Jiao. *PHYSIOLOGICAL AND MECHANISTIC STUDIES OF PHOTOTROPHIC Fe(II) OXIDATION IN PURPLE NON-SULFUR BACTERIA*. PhD thesis, 2007. URL <http://hdl.handle.net/1993/2170>{%}5Cnpapers2://publication/uuid/4512D8B2-FF88-48DB-A7AD-B17393B3AAFD.
- [46] Yongqin Jiao, Andreas Kappler, Laura R Croal, K Newman, and Dianne K Newman. Isolation and Characterization of a Genetically Tractable Photoautotrophic Isolation and Characterization of a Genetically Tractable Photoautotrophic Fe (II) -Oxidizing Bacterium , *Rhodopseudomonas palustris* Strain TIE-1. *Applied and environmental microbiology*, 71(8):4487–4496, 2005. doi: 10.1128/AEM.71.8.4487.
- [47] Yongqin Jiao and Dianne K. Newman. The pio operon is essential for phototrophic Fe(II) oxidation in *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1. *Journal of Bacteriology*, 189(5):1765–1773, 2007. ISSN 00219193. doi: 10.1128/JB.00776-06.
- [48] Stuart J. Ferguson, J. Barry Jackson, and Alastair G. McEwan. Anaerobic respiration in the Rhodospirillaceae: characterisation of pathways and evaluation of roles in redox balancing during photosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 46(2):117–143, 1987. ISSN 15746968. doi: 10.1016/0378-1097(87)90060-7.
- [49] Michael T. Madigan and Howard Gest. Growth of a photosynthetic bacterium anaerobically in darkness, supported by 'oxidant-dependent' sugar fermentation. *Archives of Microbiology*, 117(78):119–122, 1978. ISSN 0302-8933. doi: 10.1007/BF00402298.

- [50] Kassem Alef. Light Dependent Ammonium Inhibition of Nitrate Assimilation in *Rhodopseudomonas capsulata* AD2. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 39(1-2):85–89, 1984. ISSN 18657125. doi: 10.1515/znc-1984-1-214.
- [51] Gina C. Gordon and James B. McKinlay. Calvin cycle mutants of photoheterotrophic purple nonsulfur bacteria fail to grow due to an electron imbalance rather than toxic metabolite accumulation. *Journal of Bacteriology*, 196(6):1231–1237, 2014. ISSN 00219193. doi: 10.1128/JB.01299-13.
- [52] Stuart J. Ferguson, J. Barry Jackson, and Alastair G. McEwan. Anaerobic respiration in the Rhodospirillaceae: characterisation of pathways and evaluation of roles in redox balancing during photosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 46(2):117–143, 1987. ISSN 15746968. doi: 10.1016/0378-1097(87)90060-7.
- [53] MOORE, M. D., and Kaplan S. Members of the family Rhodospirillaceae reduce heavy-metal oxyanions to maintain redox poise during photosynthetic growth. *ASM News*, 60:17–23, 1994. URL <http://ci.nii.ac.jp/naid/10003539917/en/>.
- [54] a Bose, E J Gardel, C Vidoudez, E a Parra, and P R Girguis. Electron uptake by iron-oxidizing phototrophic bacteria. *Nat Commun*, 5:3391, 2014. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/ncomms4391. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24569675>.
- [55] Michael S. Guzman, Karthikeyan Rengasamy, Michael M. Binkley, Clive Jones, Tahina Onina Ranaivoarisoa, Rajesh Singh, David A. Fike, J. Mark Meacham, and Arpita Bose. Phototrophic extracellular electron uptake is linked to carbon dioxide fixation in the bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. *Nature Communications*, 10(1):1355, 2019. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/s41467-019-09377-6. URL <http://www.nature.com/articles/s41467-019-09377-6>.
- [56] Defeng Xing, Yi Zuo, Shaoan Cheng, John M. Regan, and Bruce E. Logan. Electricity Generation by *Rhodopseudomonas palustris* DX-1. *Environmental*

- Science and Technology*, 42(11):4146–4151, 2008. ISSN 0013936X. doi: 10.1021/es800312v.
- [57] Cecilia Di Capua. *Defensa antioxidante bacteriana. Determinantes funcionales de la superóxido dismutasa*. PhD thesis, 2011.
- [58] Abraham Esteve-Núñez, Mary Rothermich, Manju Sharma, and Derek Lovley. Growth of *Geobacter sulfurreducens* under nutrient-limiting conditions in continuous culture. *Environmental Microbiology*, 7(5):641–648, 2005. ISSN 14622912. doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00731.x.
- [59] Krishnaveni Venkidusamy, Mallavarapu Megharaj, Uwe Schröder, Fouad Karouta, S Venkata Mohan, and Ravi Naidu. Electron transport through electrically conductive nanofilaments in *Rhodopseudomonas palustris* strain RP2. *RSC Adv.*, 5(122):100790–100798, 2015. ISSN 2046-2069. doi: 10.1039/C5RA08742B. URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA08742B>.
- [60] Annette R. Rowe, Pournami Rajeev, Abhiney Jain, Sahand Pirbadian, Akihiro Okamoto, Jeffrey A. Gralnick, Mohamed Y. El-Naggar, and Kenneth H. Nealson. Tracking electron uptake from a cathode into *Shewanella* cells: Implications for energy acquisition from solid-substrate electron donors. *mBio*, 9(1):1–19, 2018. ISSN 21507511. doi: 10.1128/mBio.02203-17.
- [61] David J Richardson, Glenn F King, David J Kelly, Alastair G McEwan, Stuart J Ferguson, and J Barry Jackson. The role of auxiliary oxidants in maintaining redox balance during phototrophic growth of *Rhodobacter capsulatus* on propionate or butyrate. *Archives of Microbiology*, 150(2):131–137, 1988. ISSN 03028933. doi: 10.1007/BF00425152.
- [62] Francesca Borsetti, Francesco Francia, Raymond J Turner, and Davide Zannoni. The thiol:disulfide oxidoreductase DsbB mediates the oxidizing effects of the toxic metalloid tellurite (TeO_3^{2-}) on the plasma membrane redox system of the facultative phototroph *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology*, 189(3):851–859, 2007. ISSN 00219193. doi: 10.1128/JB.01080-06.

- [63] a. Yamada, M. Miyashita, K. Inoue, and T. Matsunaga. Extracellular reduction of selenite by a novel marine photosynthetic bacterium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(3):367–372, 1997. ISSN 01757598. doi: 10.1007/s002530051064.
- [64] Alastair G McEwan, Christina L George, Stuart J Ferguson, and J Barry Jackson. A nitrate reductase linked to electron activity in Rhodopseudomonas capsulata transfer and generation of a membrane potential. *FEBS LETTERS*, 150(2):277–280, 1982.
- [65] A. Culbert-Runquist, R. M. Hadsell and P. A. Loach. Dependency on Environmental Redox Potential of Photophosphorylation in Rhodopseudononas sphaeroides. *FEBS LETTERS*, 12(18):3508–3514, 1972.
- [66] D. ZANNONI MARRS and B.L. REDOX CHAIN AND ENERGY TRANSDUCTION IN CHROMATOPHORES FROM RHODOPSEUDOMONAS CAPSULATA CELLS GROWN ANAEROBICALLY IN THE DARK ON GLUCOSE AND DIMETHYL SULFOXIDE. *Biochimica et biophysica acta*, 637:271–274, 1981.
- [67] Nichola Hartigan, Hazel A Tharia, Frank Sweeney, Anna M Lawless, and Miroslav Z Papiz. The 7.5-Åelectron density and spectroscopic properties of a novel low-light B800 LH₂ from Rhodopseudomonas palustris. *Biophysical Journal*, 82(2):963–977, 2002. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(02)75456-8. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75456-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75456-8).
- [68] Duccio Medini, Claudio Donati, Hervé Tettelin, Vega Masignani, and Rino Rappuoli. The microbial pan-genome. *Current Opinion in Genetics and Development*, 15(6):589–594, 2005. ISSN 0959437X. doi: 10.1016/j.gde.2005.09.006.
- [69] Herv?? Tettelin, David Riley, Ciro Cattuto, and Duccio Medini. Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Current Opinion in Microbiology*, 11(5):472–477, 2008. ISSN 13695274. doi: 10.1016/j.mib.2008.09.006.

- [70] H. Tettelin, V. Masignani, M. J. Cieslewicz, C. Donati, D. Medini, N. L. Ward, S. V. Angiuoli, J. Crabtree, A. L. Jones, A. S. Durkin, R. T. DeBoy, T. M. Davidsen, M. Mora, M. Scarselli, I. Margarit y Ros, J. D. Peterson, C. R. Hauser, J. P. Sundaram, W. C. Nelson, R. Madupu, L. M. Brinkac, R. J. Dodson, M. J. Rosovitz, S. A. Sullivan, S. C. Daugherty, D. H. Haft, J. Selengut, M. L. Gwinn, L. Zhou, N. Zafar, H. Khouri, D. Radune, G. Dimetrov, K. Watkins, K. J. B. O'Connor, S. Smith, T. R. Utterback, O. White, C. E. Rubens, G. Grandi, L. C. Madoff, D. L. Kasper, J. L. Telford, M. R. Wessels, R. Rappuoli, and C. M. Fraser. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial "pan-genome". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(39):13950–13955, 2005. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.0506758102. URL <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0506758102>.
- [71] N. Luisa Hiller, Benjamin Janto, Justin S. Hogg, Robert Boissy, Susan Yu, Evan Powell, Randy Keefe, Nathan E. Ehrlich, Kai Shen, Jay Hayes, Karen Barbadora, William Klimke, Dmitry Dernovoy, Tatiana Tatusova, Julian Parkhill, Stephen D. Bentley, J. Christopher Post, Garth D. Ehrlich, and Fen Z. Hu. Comparative genomic analyses of seventeen *Streptococcus pneumoniae* strains: Insights into the pneumococcal supragenome. *Journal of Bacteriology*, 189(22):8186–8195, 2007. ISSN 00219193. doi: 10.1128/JB.00690-07.
- [72] Pascal Lapierre and J. Peter Gogarten. Estimating the size of the bacterial pan-genome. *Trends in Genetics*, 25(3):107–110, 2009. ISSN 01689525. doi: 10.1016/j.tig.2008.12.004.
- [73] Eugene V. Koonin and Yuri I. Wolf. Genomics of bacteria and archaea: The emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Research*, 36(21):6688–6719, 2008. ISSN 03051048. doi: 10.1093/nar/gkn668.
- [74] Justin S. Hogg, Fen Z. Hu, Benjamin Janto, Robert Boissy, Jay Hayes, Randy Keefe, J. Christopher Post, and Garth D. Ehrlich. Characterization and mode-

- ling of the *Haemophilus influenzae* core and supragenomes based on the complete genomic sequences of Rd and 12 clinical nontypeable strains. *Genome Biology*, 8(6), 2007. ISSN 14747596. doi: 10.1186/gb-2007-8-6-r103.
- [75] Lars Snipen, Trygve Almøy, and David W. Ussery. Microbial comparative pan-genomics using binomial mixture models. *BMC Genomics*, 10:1–8, 2009. ISSN 14712164. doi: 10.1186/1471-2164-10-385.
- [76] Yasuhiro Oda, Wouter Wanders, Louis A. Huisman, Wim G. Meijer, Jan C. Gottschal, and Larry J. Forney. Genotypic and phenotypic diversity within species of purple nonsulfur bacteria isolated from aquatic sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7):3467–3477, 2002. ISSN 00992240. doi: 10.1128/AEM.68.7.3467-3477.2002.
- [77] Yasuhiro Oda, Frank W Larimer, Patrick S G Chain, Stephanie Malfatti, Maria V Shin, Lisa M Vergez, Loren Hauser, Miriam L Land, Stephan Braatsch, J Thomas Beatty, Dale A Pelletier, Amy L Schaefer, and Caroline S Harwood. Multiple genome sequences reveal adaptations of a phototrophic bacterium to sediment microenvironments. *PNAS*, 105(47), 2008.
- [78] John D. Heimann. *The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors*, volume 46. 2002. ISBN 0120277468. doi: 10.1016/S0065-2911(02)46002-X.
- [79] Yasuhiro Oda, Wouter Wanders, Louis A. Huisman, Wim G. Meijer, Jan C. Gottschal, and Larry J. Forney. Genotypic and phenotypic diversity within species of purple nonsulfur bacteria isolated from aquatic sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7):3467–3477, 2002. ISSN 00992240. doi: 10.1128/AEM.68.7.3467-3477.2002.
- [80] Bruno Contreras-Moreira and Pablo Vinuesa. GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24):7696–7701, 2013. ISSN 00992240. doi: 10.1128/AEM.02411-13.

- [81] Andrew J. Page, Vanessa K. Wong, Sandra Reuter, Martin Hunt, Matthew T.G. Holden, Maria Fookes, Julian Parkhill, Jacqueline A. Keane, Daniel Falush, and Carla A. Cummins. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22):3691–3693, 2015. ISSN 1367-4803. doi: 10.1093/bioinformatics/btv421.
- [82] Torsten Seemann. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14):2068–2069, 2014. ISSN 14602059. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153.
- [83] Arthur L. Delcher, Douglas Harmon, Simon Kasif, Owen White, and Steven L. Salzberg. Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Research*, 27(23):4636–4641, 1999. ISSN 03051048. doi: 10.1093/nar/27.23.4636.
- [84] Ramy K. Aziz, Daniela Bartels, Aaron Best, Matthew DeJongh, Terrence Disz, Robert A. Edwards, Kevin Formsmma, Svetlana Gerdes, Elizabeth M. Glass, Michael Kubal, Folker Meyer, Gary J. Olsen, Robert Olson, Andrei L. Osterman, Ross A. Overbeek, Leslie K. McNeil, Daniel Paarmann, Tobias Paczian, Bruce Parrello, Gordon D. Pusch, Claudia Reich, Rick Stevens, Olga Vassieva, Veronika Vonstein, Andreas Wilke, and Olga Zagnitko. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9:1–15, 2008. ISSN 14712164. doi: 10.1186/1471-2164-9-75.
- [85] Kazutaka Katoh, Kazuharu Misawa, Kei Ichi Kuma, and Takashi Miyata. MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14):3059–3066, 2002. ISSN 03051048. doi: 10.1093/nar/gkf436.
- [86] Alexis Criscuolo and Simonetta Gribaldo. BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): A new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 2010. ISSN 14712148. doi: 10.1186/1471-2148-10-210.

- [87] Fredrik Ronquist, Maxim Teslenko, Paul Van Der Mark, Daniel L Ayres, Sebastian Höhna, Bret Larget, Liang Liu, Marc A Suchard, P John, Fredrik Ronquist, Maxim Teslenko, Paul Van Der Mark, Daniel L Ayres, Aaron Darling, Sebastian Höhna, Bret Larget, Liang Liu, Marc A Suchard, and John P Huelsenbeck. MrBayes 3 . 2 : Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space Huelsenbeck Source : Systematic Biology. *Systematic Biology*, 61(3):539–542, 2012.
- [88] Daniel H Huson and Celine Scornavacca. Dendroscope 3: An Interactive Tool for Rooted Phylogenetic Trees and Networks. *Systematic Biology*, 61(6):1061–1067, 2016.
- [89] Ivica Letunic and Peer Bork. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic acids research*, 44(W1):W242–W245, 2016. ISSN 13624962. doi: 10.1093/nar/gkw290.
- [90] Omar F. Ordoñez, María R. Flores, Julian R. Dib, Agustín Paz, and María E. Farías. Extremophile culture collection from Andean lakes: Extreme pristine environments that host a wide diversity of microorganisms with tolerance to UV radiation. *Microbial Ecology*, 2009. ISSN 00953628. doi: 10.1007/s00248-009-9527-7.
- [91] Florent Lassalle, Séverine Périan, Thomas Bataillon, Xavier Nesme, Laurent Duret, and Vincent Daubin. GC-Content Evolution in Bacterial Genomes: The Biased Gene Conversion Hypothesis Expands. *PLoS Genetics*, 11(2):1–20, 2015. ISSN 15537404. doi: 10.1371/journal.pgen.1004941.
- [92] David A. Rasko, M. J. Rosovitz, Garry S.A. Myers, Emmanuel F. Mongodin, W. Florian Fricke, Paweł Gajer, Jonathan Crabtree, Mohammed Sebaihia, Nicholas R. Thomson, Roy Chaudhuri, Ian R. Henderson, Vanessa Sperandio, and Jacques Ravel. The pangenome structure of *Escherichia coli*: Comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *Journal of Bacteriology*, 190(20):6881–6893, 2008. ISSN 00219193. doi: 10.1128/JB.00619-08.

- [93] P. T. Bilous and J. H. Weiner. Dimethyl sulfoxide reductase activity by anaerobically grown *Escherichia coli* HB101. *Journal of Bacteriology*, 162(3):1151–1155, 1985. ISSN 00219193. doi: 10.1128/jb.162.3.1151-1155.1985.
- [94] Sharon L. McCrindle, Ulrike Kappler, and Alastair G. McEwan. *Microbial dimethylsulfoxide and trimethylamine-N-oxide respiration*, volume 50. 2005. ISBN 0120277506. doi: 10.1016/S0065-2911(05)50004-3.
- [95] Adeline Valentine-Serano, M. E.S. Hudspeth, and R. Meganathan. Reduction of N-oxides and sulfoxide by the same terminal reductase in *Proteus mirabilis*. *Current Microbiology*, 23(5):271–276, 1991. ISSN 03438651. doi: 10.1007/BF02092029.
- [96] Christopher Rensing, Thomas Pribyl, and Dietrich H. Nies. New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *Journal of Bacteriology*, 179(22):6871–6879, 1997. ISSN 00219193. doi: 10.1128/jb.179.22.6871-6879.1997.
- [97] Tiffany D. Mealman, Ninian J. Blackburn, and Megan M. McEvoy. Metal Export by CusCFBA, the Periplasmic Cu(I)/Ag(I) Transport System of *Escherichia coli*. In *Current Topics in Membranes*, volume 69, pages 163–196. Elsevier, 2012. ISBN 9780123943903. doi: 10.1016/B978-0-12-394390-3.00007-0. URL <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394390-3.00007-0>.
- [98] Andreas Anton, Cornelia Grobe, Jana Reibmann, Thomas Pribyl, and Dietrich H. Nies. CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. strain CH34. *Journal of Bacteriology*, 181(22):6876–6881, 1999. ISSN 00219193. doi: 10.1128/jb.181.22.6876-6881.1999.
- [99] Christopher Rensing, Bharati Mitra, and Barry P Rosen. The zntA gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(December):14326–14331, 1997.

- [100] Wayne G. Reeve, Ravi P. Tiwari, Neetin B. Kale, Michael J. Dilworth, and Andrew R. Glenn. ActP controls copper homeostasis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and *Sinorhizobium meliloti* preventing low pH-induced copper toxicity. *Molecular Microbiology*, 43(4):981–991, 2002. ISSN 0950382X. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02791.x.
- [101] Betzabe E Pimentel, Rafael Moreno-sanchez, and Carlos Cervantes. Efflux of chromate by *Pseudomonas aeruginosa* cells expressing the ChrA protein. *FEMS Microbiology Letters*, 212:249–254, 2002.
- [102] Eric S. Boyd and Tamar Barkay. The mercury resistance operon: From an origin in a geothermal environment to an efficient detoxification machine. *Frontiers in Microbiology*, 3(OCT):1–13, 2012. ISSN 1664302X. doi: 10.3389/fmicb.2012.00349.
- [103] Jie Qin, Rosen Barry, Yang Zhang, Gejiao Wang, Sylvia Franke, and Christopher Rensing. Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. 103(7), 2006. ISSN 0027-8424.
- [104] Francesca Borsetti, Francesco Francia, Raymond J. Turner, and Davide Zannoni. The thiol:disulfide oxidoreductase DsbB mediates the oxidizing effects of the toxic metalloid tellurite (TeO_3^{2-}) on the plasma membrane redox system of the facultative phototroph *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology*, 189(3):851–859, 2007. ISSN 00219193. doi: 10.1128/JB.01080-06.
- [105] Sun Mi Lee, Gregor Grass, Christopher Rensing, Siobhán R. Barrett, Christopher J.D. Yates, Jivko V. Stoyanov, and Nigel L. Brown. The Pco proteins are involved in periplasmic copper handling in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295(3):616–620, 2002. ISSN 0006291X. doi: 10.1016/S0006-291X(02)00726-X.
- [106] Jennifer L. Rowland and Michael Niederweis. A multicopper oxidase is required

- for copper resistance in mycobacterium tuberculosis. *Journal of Bacteriology*, 195(16):3724–3733, 2013. ISSN 00219193. doi: 10.1128/JB.00546-13.
- [107] Shashi Chillappagari, Marcus Miethke, Hein Trip, Oscar P. Kuipers, and Mohamed A. Marahiel. Copper acquisition is mediated by YcnJ and regulated by YcnK and CsoR in bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, 191(7):2362–2370, 2009. ISSN 00219193. doi: 10.1128/JB.01616-08.
- [108] Richard A. Festa, Marcus B. Jones, Susan Butler-Wu, Daniel Sinsimer, Russell Gerads, William R. Bishai, Scott N. Peterson, and K. Heran Darwin. A novel copper-responsive regulon in Mycobacterium tuberculosis. *Molecular Microbiology*, 79(1):133–148, 2011. ISSN 0950382X. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07431.x.
- [109] Rita Branco, Ana Paula Chung, and Paula V. Morais. Sequencing and expression of two arsenic resistance operons with different functions in the highly arsenic-resistant strain Ochrobactrum tritici SCII24T. *BMC Microbiology*, 8: 1–12, 2008. ISSN 14712180. doi: 10.1186/1471-2180-8-95.
- [110] Martina Pasqua, Milena Grossi, Sara Scinicariello, Laurent Aussel, Frédéric Barras, Bianca Colonna, and Gianni Grosseda. The MFS efflux pump EmrKY contributes to the survival of Shigella within macrophages. *Scientific Reports*, 9(1):1–11, 2019. ISSN 20452322. doi: 10.1038/s41598-019-39749-3.
- [111] Asuka Kobayashi, Hidetada Hirakawa, Takahiro Hirata, Kunihiko Nishino, and Akihito Yamaguchi. Growth phase-dependent expression of drug exporters in Escherichia coli and its contribution to drug tolerance. *Journal of Bacteriology*, 188(16):5693–5703, 2006. ISSN 00219193. doi: 10.1128/JB.00217-06.
- [112] Gang Fang, Nitin Bhardwaj, Rebecca Robilotto, and Mark B. Gerstein. Getting started in gene orthology and functional analysis. *PLoS Computational Biology*, 6(3), 2010. ISSN 1553734X. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000703.

- [113] David M. Kristensen, Lavanya Kannan, Michael K. Coleman, Yuri I. Wolf, Alexander Sorokin, Eugene V. Koonin, and Arcady Mushegian. A low-polynomial algorithm for assembling clusters of orthologous groups from intergenomic symmetric best matches. *Bioinformatics*, 26(12):1481–1487, 2010. ISSN 13674803. doi: 10.1093/bioinformatics/btq229.
- [114] Li Li, Christian J Jr Stoeckert, and David S Roos. OrthoMCL: Identification of Ortholog Groups for Eukaryotic Genomes. *Genome Research*, 13(9):2178–2189, 2003. ISSN 1088-9051. doi: 10.1101/gr.1224503.candidates. URL <http://genome.cshlp.org/cgi/content/full/13/9/2178>.
- [115] Michael Lynch and John S. Conery. The Origins of Genome Complexity. *Science*, 302(5649):1401–1404, 2003. ISSN 00368075. doi: 10.1126/science.1089370.
- [116] Ruiting Lan and Peter R. Reeves. Escherichia coli in disguise: Molecular origins of Shigella. *Microbes and Infection*, 4(11):1125–1132, 2002. ISSN 12864579. doi: 10.1016/S1286-4579(02)01637-4.
- [117] Tristan Lefébure, Paulina D. Pavinski Bitar, Haruo Suzuki, and Michael J. Stanhope. Evolutionary dynamics of complete *Campylobacter* pan-genomes and the bacterial species concept. *Genome Biology and Evolution*, 2(1):646–655, 2010. ISSN 17596653. doi: 10.1093/gbe/evq048.
- [118] George Vernikos, Duccio Medini, David R. Riley, and Herv?? Tettelin. Ten years of pan-genome analyses. *Current Opinion in Microbiology*, 23:148–154, 2015. ISSN 18790364. doi: 10.1016/j.mib.2014.11.016.
- [119] Ivica Tamas, Lissa Klasson, Björn Canbäck, A. Kristina Näslund, Ann Sophie Eriksson, Jennifer J. Wernegreen, Jonas P. Sandström, Nancy A. Moran, and Siv G.E. Andersson. 50 Million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. *Science*, 296(5577):2376–2379, 2002. ISSN 00368075. doi: 10.1126/science.1071278.

- [120] Pablo Vinuesa. *Bacterial Pangenomics*, volume 1231. 2015. ISBN 978-1-4939-1719-8. doi: 10.1007/978-1-4939-1720-4. URL <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-1720-4>.
- [121] Julián Dib, Jessica Motok, Verónica Fernández Zenoff, Omar Ordoñez, and María Eugenia Farías. Occurrence of resistance to antibiotics, UV-B, and arsenic in bacteria isolated from extreme environments in high-altitude (above 4400 m) Andean wetlands. *Current Microbiology*, 2008. ISSN 03438651. doi: 10.1007/s00284-008-9103-2.
- [122] Christian Völlmecke, Steffen L. Drees, Julia Reimann, Sonja Verena Albers, and Mathias Lübben. The ATPases CopA and CopB both contribute to copper resistance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Microbiology (United Kingdom)*, 158(6):1622–1633, 2012. ISSN 13500872. doi: 10.1099/mic.0.055905-0.
- [123] Frank W Larimer, Patrick Chain, Loren Hauser, Jane Lamerdin, Stephanie Malfatti, Long Do, Miriam L Land, Dale a Pelletier, J Thomas Beatty, Andrew S Lang, F Robert Tabita, Janet L Gibson, Thomas E Hanson, Cedric Bobst, Janelle L Torres Y Torres, Caroline Peres, Faith H Harrison, Jane Gibson, and Caroline S Harwood. Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. *Nature Biotechnology*, 22(1):55–61, 2004. ISSN 1087-0156. doi: 10.1038/nbt923. URL <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nbt923>.
- [124] Amos Richmond. *Handbook of Microalgal Culture*. 2004.
- [125] Alistair J. McCormick, Paolo Bombelli, Amanda M. Scott, Alexander J. Philips, Alison G. Smith, Adrian C. Fisher, and Christopher J. Howe. Photosynthetic biofilms in pure culture harness solar energy in a mediatorless bio-photovoltaic cell (BPV) system. *Energy & Environmental Science*, 4:4699–4709, 2011. ISSN 1754-5692. doi: 10.1039/c1ee01965a.

- [126] Yicheng Wu, Kai Guan, Zejie Wang, Bing Xu, and Feng Zhao. Isolation, Identification and Characterization of an Electrogenic Microalgae Strain. *PLoS ONE*, 8(9), 2013. ISSN 19326203. doi: 10.1371/journal.pone.0073442.
- [127] Xia-yuan Wu, Tian-shun Song, Xu-jun Zhu, Ping Wei, and Charles C. Zhou. Construction and Operation of Microbial Fuel Cell with Chlorella vulgaris Biocathode for Electricity Generation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(8):2082–2092, 2013. ISSN 0273-2289. doi: 10.1007/s12010-013-0476-8. URL <http://link.springer.com/10.1007/s12010-013-0476-8>.
- [128] Hai T.H. Nguyen, Ramesh Kakarla, and Booki Min. Algae cathode microbial fuel cells for electricity generation and nutrient removal from landfill leachate wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(49):29433–29442, 2017. ISSN 03603199. doi: 10.1016/j.ijhydene.2017.10.011. URL <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.10.011>.
- [129] R. F. Weiss. The solubility of nitrogen, oxygen and argon in water and seawater. *Deep-Sea Research and Oceanographic Abstracts*, 17(4):721–735, 1970. ISSN 00117471. doi: 10.1016/0011-7471(70)90037-9.
- [130] C. Nagendranatha Reddy, Ramesh Kakarla, and Booki Min. Algal biocathodes. *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Microbial Electrochemical Technology: Sustainable Platform for Fuels, Chemicals and Remediation*, pages 525–547, 2018. doi: 10.1016/B978-0-444-64052-9.00021-2.
- [131] Ramesh Kakarla and Booki Min. Evaluation of microbial fuel cell operation using algae as an oxygen supplier: carbon paper cathode vs. carbon brush cathode. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(12):2453–2461, 2014. ISSN 16157605. doi: 10.1007/s00449-014-1223-4.
- [132] X. Alexis Walter, John Greenman, and Ioannis A. Ieropoulos. Oxygenic phototrophic biofilms for improved cathode performance in microbial fuel cells. *Algal Research*, 2(3):183–187, 2013. ISSN 22119264. doi: 10.1016/j.algal.2013.02.002. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2013.02.002>.

- [133] Iwona Gajda, John Greenman, Chris Melhuish, and Ioannis Ieropoulos. Self-sustainable electricity production from algae grown in a microbial fuel cell system. *Biomass and Bioenergy*, 82:87–93, 2015. ISSN 09619534. doi: 10.1016/j.biombioe.2015.05.017. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.05.017>.
- [134] D. P B T B Strik, Hilde Terlouw, H. V M Hamelers, and C. J N Buisman. Renewable sustainable biocatalyzed electricity production in a photosynthetic algal microbial fuel cell (PAMFC). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4):659–668, 2008. ISSN 01757598. doi: 10.1007/s00253-008-1679-8.
- [135] David Strik, Ruud A. Timmers, Marjolein Helder, Kirsten J. J. Steinbusch, Hubertus V. M. Hamelers, and Cees J. N. Buisman. Microbial solar cells: Applying photosynthetic and electrochemically active organisms. *Trends in Biotechnology*, 29(1):41–49, 2011. ISSN 01677799. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.10.001. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.10.001>.
- [136] Araceli González Del Campo, Pablo Cañizares, Manuel A. Rodrigo, Francisco J. Fernández, and Justo Lobato. Microbial fuel cell with an algae-assisted cathode: A preliminary assessment. *Journal of Power Sources*, 242:638–645, 2013. ISSN 03787753. doi: 10.1016/j.jpowsour.2013.05.110. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpowsour.2013.05.110>.
- [137] A. S. Commault, G. Lear, P. Novis, and R. J. Weld. Photosynthetic biocathode enhances the power output of a sediment-type microbial fuel cell. *New Zealand Journal of Botany*, 52(1):48–59, 2014. ISSN 11758643. doi: 10.1080/0028825X.2013.870217.
- [138] Wen Wei Li, Han Qing Yu, and Zhen He. Towards sustainable wastewater treatment by using microbial fuel cells-centered technologies. *Energy and Environmental Science*, 7(3):911–924, 2014. ISSN 17545692. doi: 10.1039/c3ee43106a.
- [139] Korneel Rabaey, Largus Angenent, Uwe Schröder, and Jürg Keller. *Bioelectro-*

- chemical systems*. 2010. ISBN 9781843392330. URL <http://www.google.com/patents/US20140069806>.
- [140] Xin Wang, Yujie Feng, Jia Liu, He Lee, Chao Li, Nan Li, and Nanqi Ren. Sequestration of CO₂ discharged from anode by algal cathode in microbial carbon capture cells (MCCs). *Biosensors and Bioelectronics*, 25(12):2639–2643, 2010. ISSN 09565663. doi: 10.1016/j.bios.2010.04.036. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2010.04.036>.
- [141] Yifeng Zhang, Jafar Safaa Noori, and Irini Angelidaki. Simultaneous organic carbon, nutrients removal and energy production in a photomicrobial fuel cell (PFC). *Energy & Environmental Science*, 4(10):4340, 2011. ISSN 1754-5692. doi: 10.1039/c1ee02089g. URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=c1ee02089g>.
- [142] Hyeon Jin Jeon, Kyu Won Seo, Sang Hyun Lee, Yung Hun Yang, Rangarajulu Senthil Kumaran, Sunghyun Kim, Seok Won Hong, Yong Su Choi, and Hyung Joo Kim. Production of algal biomass (*Chlorella vulgaris*) using sediment microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 109:308–311, 2012. ISSN 09608524. doi: 10.1016/j.biortech.2011.06.039. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.039>.
- [143] Leda H. Orfei, Silvia Simison, and Juan Pablo Busalmen. Stainless steels can be cathodically protected using energy stored at the marine sediment/seawater interface. *Environmental Science and Technology*, 40(20):6473–6478, 2006. ISSN 0013936X. doi: 10.1021/es060912m.
- [144] Gabriela Dotro, Langergraber Gunter, Molle Pascal, Nicola Jaime, Puigagut Jaume, Stein Otto, and von Sperling Marcos. *Treatment Wetlands*, volume 7. 2017. ISBN 9781780408774. doi: 10.2166/9781780408774. URL www.iwapublishing.com.
- [145] Liam Doherty, Yaqian Zhao, Xiaohong Zhao, Yuansheng Hu, Xiaodi Hao, Lei Xu, and Ranbin Liu. A review of a recently emerged technology: Constructed wetland - Microbial fuel cells. *Water Research*, 85:38–45, 2015.

- [146] Zhou Fang, Hai Liang Song, Ning Cang, and Xian Ning Li. Performance of microbial fuel cell coupled constructed wetland system for decolorization of azo dye and bioelectricity generation. *Bioresource Technology*, 144:165–171, 2013. ISSN 18732976. doi: 10.1016/j.biortech.2013.06.073. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.073>.
- [147] Yaqian Zhao, Sean Collum, Mark Phelan, Tristan Goodbody, Liam Doherty, and Yuansheng Hu. Preliminary investigation of constructed wetland incorporating microbial fuel cell: Batch and continuous flow trials. *Chemical Engineering Journal*, 229:364–370, 2013. ISSN 13858947. doi: 10.1016/j.cej.2013.06.023. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2013.06.023>.
- [148] Ingmar Nopens, Carlo Capalozza, and Peter A Vanrolleghem. Technical report : Stability analysis of a synthetic municipal wastewater. 32(July), 2001.
- [149] Laura T. Wey, Paolo Bombelli, Xiaolong Chen, Joshua M. Lawrence, Clayton M. Rabideau, Stephen J.L. Rowden, Jenny Z. Zhang, and Christopher J. Howe. The Development of Biophotovoltaic Systems for Power Generation and Biological Analysis. *ChemElectroChem*, 6(21):5375–5386, 2019. ISSN 21960216. doi: 10.1002/celc.201900997.
- [150] Luciana Robuschi, J. Pablo Tomba, Germán D. Schrott, P. Sebastián Bonanni, P. Mariela Desimone, and Juan Pablo Busalmen. Spectroscopic slicing to reveal internal redox gradients in electricity-producing biofilms. *Angewandte Chemie - International Edition*, 52(3):925–928, 2013. ISSN 14337851. doi: 10.1002/anie.201205440.
- [151] Michael Kühl, Ronnie N. Glud, Helle Ploug, and Niels Birger Ramsing. Photosynthesis-Coupled Respiration in an. *Journal of Phycology*, 32:799–812, 1996.
- [152] Patrick C. Hallenbeck. *Modern topics in the phototrophic prokaryotes: Environmental and applied aspects*. 2017. ISBN 9783319462615. doi: 10.1007/978-3-319-46261-5.

- [153] A. Larkum, E. Koch, and M. Kühl. Diffusive boundary layers and photosynthesis of the epilithic algal community of coral reefs. *Marine Biology*, 142(6): 1073–1082, 2003. ISSN 00253162. doi: 10.1007/s00227-003-1022-y.
- [154] Hans C. Bernstein, Maureen Kesaano, Karen Moll, Terence Smith, Robin Gerlach, Ross P. Carlson, Charles D. Miller, Brent M. Peyton, Keith E. Coakley, Robert D. Gardner, and Ronald C. Sims. Direct measurement and characterization of active photosynthesis zones inside wastewater remediating and biofuel producing microalgal biofilms. *Bioresource Technology*, 156: 206–215, 2014. ISSN 18732976. doi: 10.1016/j.biortech.2014.01.001. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.001>.
- [155] Anna M.J. Kliphuis, Dirk E. Martens, Marcel Janssen, and René H. Wijffels. Effect of O₂:CO₂ ratio on the primary metabolism of Chlamydomonas reinhardtii. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(10):2390–2402, 2011. ISSN 00063592. doi: 10.1002/bit.23194.