



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Programa de Magíster en Ciencias con Mención Microbiología

**EVALUACIÓN COMPARATIVA DE ELECTRODOS DE
ÓXIDO DE GRAFENO Y ÓXIDO DE GRAFENO REDUCIDO
COMO SOPORTES EN LA FORMACIÓN DE
BIOPELÍCULAS ELECTROGÉNICAS DE *Shewanella*
oneidensis MR-1**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias con Mención
Microbiología

CARLA RAMÍREZ RAMÍREZ

CONCEPCIÓN-CHILE

2025

Profesor Guía: Dr. Homero Urrutia Briones

Dpto. de Microbiología

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Comisión Evaluadora



Dr. Homero Urrutia Briones
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Carla León Lemus
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Andrés Opazo Capurro
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Evaluador Externo

Dr. Mauricio Schoebitz Cid
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dr. Gerardo González Rocha
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción



ÍDICE DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	15
1.1	Sistemas bio-electroquímicos.....	17
1.2	Microorganismos electrogénicos.....	21
1.3	Biopelículas.....	25
1.4	Biopelículas electroactivas.....	30
1.5	Electrodos.....	34
1.6	Grafeno.....	36
1.7	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	46
1.8	Voltamperometría cíclica.....	51
2	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS.....	53
2.1	Pregunta de investigación.....	53
2.2	Hipótesis.....	53
3	OBJETIVOS.....	54

3.1	Objetivo general	54
3.2	Objetivos específicos.....	54
4	MATERIALES Y MÉTODOS	56
4.1	Materiales	56
4.1.1	Microorganismos	56
4.1.2	Medios de cultivo.....	56
4.1.3	Soluciones	61
4.1.4	Reactivos y kit.....	63
4.1.5	Electrodos y soportes	63
4.1.6	Equipos.....	64
4.2	MÉTODOS.....	66
4.2.1	Cultivo de cepas.....	68
4.2.2	Confirmación de la identidad de la cepa.....	69
4.2.3	Identificación de contaminación.....	71
4.2.4	Curva de crecimiento de <i>Shewanella oneidensis</i> en medio anaerobio	71
4.2.5	Ensayo de formación de biopelícula sobre los diferentes soportes.....	72

4.2.6	Ensayos de viabilidad	73
4.2.7	Extracción del EPS	76
4.2.8	Cuantificación de proteínas	77
4.2.9	Cuantificación de carbohidratos	79
4.2.10	Cuantificación de ADNe	80
4.2.11	Voltamperometría cíclica	81
4.2.12	Análisis estadísticos	83
4.2.13	Eliminación de muestras biológicas	84
5	RESULTADOS.....	85
5.1	Confirmación de la identidad de la cepa.....	85
5.2	Curva de crecimiento plantónico de <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 en medio anaerobio.....	88
5.3	Determinación de la viabilidad de las biopelículas de <i>Shewanella</i> <i>oneidensis</i> MR-1 sobre los soportes de GO y rGO	90
5.4	Determinación de la concentración de proteínas del EPS de biopelículas de <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 desarrolladas sobre GO y rGO.....	94

5.5	Determinación de la concentración de carbohidratos del EPS de biopelículas de <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 desarrolladas sobre GO y rGO.....	97
5.6	Determinación de la concentración de la razón de proteínas versus carbohidratos (P/C) del EPS de biopelículas de <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 desarrolladas sobre GO y rGO	100
5.7	Determinación de la concentración de ADN extracelular (ADNe) del EPS de biopelículas de <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 desarrolladas sobre GO y rGO.....	102
5.8	Análisis de voltamperometría cíclica (VC) sobre soportes de GO y rGO colonizados con <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	104
6	DISCUSIÓN.....	108
6.1	Viabilidad de las biopelículas desarrolladas sobre los diferentes soportes	108
6.2	Composición de las SPEs de las biopelículas desarrolladas sobre los diferentes soportes.....	110
6.3	Análisis de voltamperometría cíclica	115

7 CONCLUSIONES 123

8 REFERENCIAS 126

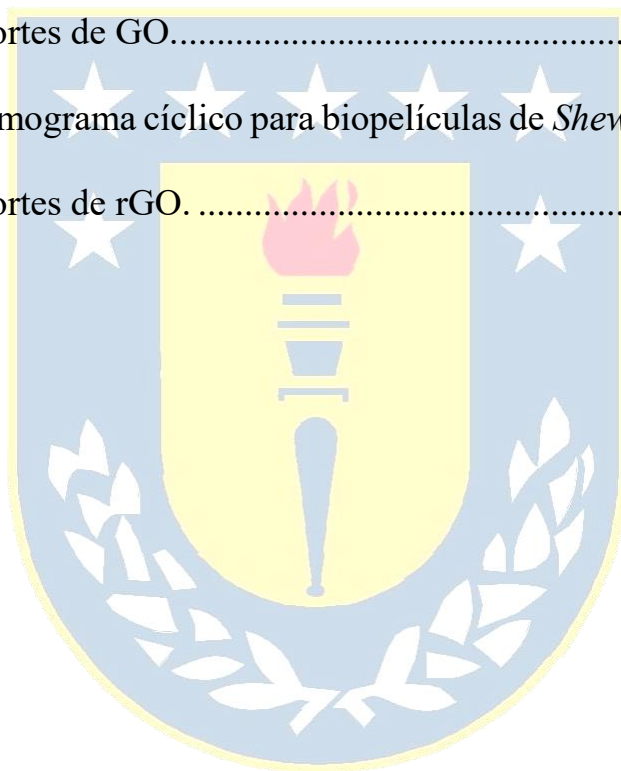


ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los sistemas bioelectroquímicos (SBEs) y sus aplicaciones.	20
Figura 2. Representación esquemática de los tres principales mecanismos de transferencia de electrones en microorganismos electrogénicos.	24
Figura 3. Etapas de desarrollo de la biopelícula.	29
Figura 4. Conductividad eléctrica de distintos bio-materiales.	33
Figura 5. Representación esquemática de la estructura química del grafeno, óxido de grafeno (GO) y óxido de grafeno reducido (rGO).	45
Figura 6. Esquema general de la metodología.	67
Figura 7. Colonias de la cepa <i>Shewanella oneidensis</i> TCC® BAA-1096™ en agar LB.	86
Figura 8. Detección de los genes <i>16S rRNA</i> y <i>gyrB</i> de <i>S. oneidensis</i>	87
Figura 9. Visualización de células viables y no viables de <i>Shewanella oneidensis</i> ATCC® BAA-1096™ por microscopía de epifluorescencia utilizando LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability Kit.	88

Figura 10. Gráfica de crecimiento plantónico de <i>Shewanella oneidensis</i> TCC® BAA-1096™ en medio anaerobio a 30° durante 90 horas.....	89
Figura 11. Montaje del ensayo sobre biopelículas para el análisis de viabilidad, proteínas, carbohidratos y ADN extracelular.....	91
Figura 12. Viabilidad celular a las 48 h de las biopelículas de <i>S. oneidensis</i> MR-1 en los soportes GO y rGO.	92
Figura 13. Viabilidad celular a los 15 días de las biopelículas de <i>S. oneidensis</i> MR-1 en los soportes GO y rGO.	93
Figura 14. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas utilizando el método de Bradford.....	95
Figura 15. Concentración de proteínas en las biopelículas desarrolladas sobre los soportes de GO y rGO.	96
Figure 16. Curva de calibración para la cuantificación de carbohidratos mediante el método de fenol ácido sulfúrico.....	98
Figura 17. Concentración de carbohidratos en las biopelículas desarrolladas sobre los soportes de GO y rGO.	99
Figure 18. Razón de proteínas/carbohidratos (P/C) de las SPEs de las biopelículas desarrolladas sobre los soportes de GO y rGO.....	101

Figura 19. Concentración de ADN extracelular del EPS obtenido de las biopelículas desarrolladas sobre los soportes de GO y rGO.....	103
Figura 20. Montaje del ensayo sobre soportes para el análisis de voltamperometría cíclica.....	105
Figura 21. Voltamograma cíclico para biopelículas de <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 sobre soportes de GO.....	106
Figura 22. Voltamograma cíclico para biopelículas de <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 sobre soportes de rGO.	107



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición de caldo LB.....	57
Tabla 2: Composición medio ATCC 1957	58
Tabla 3: Composición de la solución de vitaminas de Wolfe	59
Tabla 4: Composición de la solución de minerales de Wolfe	60
Tabla 5: Composición de la solución de minerales de Wolfe modificada ..	61
Tabla 6: Composición del tampón fosfato salino (PBS).....	62
Tabla 7: Composición del stock de glicerol	62
Tabla 8: Partidores utilizados para la identificación de <i>Shewanella</i> sp.....	70

ABSTRACT

Climate change and water scarcity represent significant threats to environmental sustainability on a global scale. Bioelectrochemical systems (BES) are a promising and eco-friendly solution for both wastewater treatment and clean energy generation, and even for both in the same process. However, their adoption has been limited by high costs, long startup periods, and low energy efficiency. Over the past decade, optimizing electrode materials has emerged as a key strategy to improve the performance of BES. Graphene-based electrodes, particularly graphene oxide (GO) and reduced graphene oxide (rGO), have garnered significant interest due to their biocompatibility, high conductivity, and superior mechanical properties. Nevertheless, the literature presents conflicting results regarding the effect of graphene on bacteria; some studies suggest antibacterial properties, while others highlight increased biofilm adhesion and electron transfer in microorganisms cultivated on this material. To address this uncertainty, this research conducted a comparative study of GO and rGO electrodes using pure cultures of *Shewanella oneidensis* MR-1, focusing on the surface effect

on biofilm formation. Biofilms of *S. oneidensis* MR-1 were cultivated under controlled anaerobic conditions, and their composition was characterized, evaluating the abundance of proteins, carbohydrates, and extracellular DNA, as well as viability through LIVE/DEAD BacLight staining. Furthermore, cyclic voltammetry (CV) was employed to explore the redox behavior of the biofilms and the differences in electron transfer mechanisms. The results showed that *S. oneidensis* MR-1 biofilms on GO electrodes exhibited higher cell viability compared to those developed on rGO. However, this difference tended to diminish over time, suggesting that the antibacterial effect of rGO is transient and weakens as the biofilm matures. A protein/carbohydrate (P/C) ratio of 1.01 ± 0.22 was recorded for the GO biofilms and 1.75 ± 0.20 for the rGO biofilms. Finally, the VC analysis revealed distinct redox behaviors between the two biofilms, indicated by differences in redox peaks. This may be attributed to the higher amount of oxygenated functionalities in GO compared to rGO.

RESUMEN

El cambio climático y la escasez de agua representan amenazas significativas para la sostenibilidad ambiental a nivel mundial. Los sistemas bioelectroquímicos (BES) son una solución prometedora y ecológica tanto para el tratamiento de aguas residuales como para la generación de energía limpia, e incluso para ambas en un mismo proceso. Sin embargo, su adopción ha sido limitada por altos costos, largos periodos de puesta en marcha y baja eficiencia energética. En la última década, la optimización de los materiales de los electrodos ha surgido como una estrategia clave para mejorar el rendimiento de los BES. Los electrodos basados en grafeno, especialmente el óxido de grafeno (GO) y el óxido de grafeno reducido (rGO), han despertado un gran interés por su biocompatibilidad, alta conductividad y propiedades mecánicas superiores. Esta biocompatibilidad se debe a que el grafeno en general bien tolerado por organismos vivos, lo que lo convierte en un material prometedor para aplicaciones en biotecnología y medicina. No obstante, la literatura presenta resultados contradictorios respecto al efecto del grafeno sobre las bacterias; algunos estudios sugieren propiedades

antibacterianas, mientras que otros destacan la mayor adhesión de biopelículas y transferencia de electrones en microorganismos cultivados sobre este material. Para abordar esta incertidumbre, esta investigación realizó un estudio comparativo de electrodos de GO y rGO utilizando cultivos puros de *Shewanella oneidensis* MR-1, enfocándose en el efecto de la superficie en la formación de biopelículas. Se cultivaron biopelículas de *S. oneidensis* MR-1 en condiciones anaeróbicas controladas y se caracterizó su composición, evaluando la abundancia de proteínas, carbohidratos y ADN extracelular, así como la viabilidad mediante tinción LIVE/DEAD BacLight. Además, se empleó voltamperometría cíclica (VC) para explorar el comportamiento redox de las biopelículas y las diferencias en los mecanismos de transferencia de electrones. Los resultados mostraron que las biopelículas de *S. oneidensis* MR-1 sobre electrodos de GO presentaron mayor viabilidad celular en comparación con las desarrolladas sobre rGO. No obstante, esta diferencia tendió a disminuir con el tiempo, lo que sugiere que el efecto antibacteriano del rGO es transitorio y se atenúa a medida que la biopelícula madura. Se registró una relación proteína/carbohidrato (P/C) de $1,01 \pm 0,22$ para las biopelículas de GO y $1,75 \pm 0,20$ para las de rGO. Finalmente, el análisis por VC reveló comportamientos redox distintos entre

ambas biopelículas, evidenciados por diferencias en los picos de oxidoreducción. Esto puede deberse a la mayor cantidad de funcionalidades oxigenadas en el GO en comparación con el rGO.



1 INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el calentamiento global y la escasez hídrica se han posicionado como desafíos críticos, captando la atención mundial debido a la grave amenaza que representan para la economía, la salud, el medio ambiente y la vida humana (Zandalinas et al., 2021). Actualmente, se estima que aproximadamente la mitad de los cerca de 8 mil millones de habitantes del planeta experimentan escasez severa de agua, debido a factores climáticos y no climáticos (IPCC, 2023). Además, entre 3 y 4 mil millones de personas más podrían enfrentar escasez de agua si el aumento de la temperatura global alcanza los 2°C o 4°C (Caretta et al., 2022). Para el 2050, se proyecta que entre el 42% y el 79% de las cuencas hidrográficas del mundo se verán afectadas por los cambios de flujo fluvial asociados al cambio climático, lo que impactará negativamente los ecosistemas de agua dulce y la disponibilidad hídrica en ciudades, especialmente en países en desarrollo (Caretta et al., 2022).

El aumento del nivel del mar, la multiplicación de fenómenos meteorológicos extremos y el déficit de agua son algunas de las consecuencias advertidas en

el sexto Informe de Evaluación del IPCC (2022) con relación al calentamiento global, presentando un escenario donde identificar causas y proponer soluciones es urgente. Desde la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático, se ha atribuido a los gases de efecto invernadero (GEI) la principal responsabilidad del calentamiento global, enfatizando la apremiante necesidad de mitigar su producción (COP26, 2021). En particular, el sector energético sigue siendo la mayor fuente de emisiones de GEI, ya que el uso de combustibles fósiles representa el 81% de la demanda energética global (IEA, 2023).

Paralelamente, el aumento en la descarga de contaminantes tóxicos en cuerpos de agua compromete la biodiversidad acuática y reduce la disponibilidad de agua dulce, agravando aún más la crisis hídrica (Madhav et al., 2020; Ukaogo et al., 2020; Akhtar et al., 2021). Según el Global Oceanic Environmental Survey (GOES), la contaminación del agua es una de las problemáticas ambientales más graves y podría poner en peligro la vida en la Tierra en las próximas décadas. Entre sus efectos está la destrucción del fitoplancton marino, responsable del 70% de la producción de oxígeno y de la eliminación de una cantidad significativa de dióxido de carbono de la atmósfera (Nivedan, 2019). Además, la crisis del agua no es exclusiva de los

países en desarrollo: mientras que en China el 90% del agua en las ciudades está contaminada, en India mueren alrededor de 580 personas al día debido a enfermedades relacionadas con la contaminación del agua (Nivedan, 2019).

En este escenario, los sistemas bioelectroquímicos (SBE) han emergido como una alternativa tecnológica prometedora, ya que permiten abordar simultáneamente los problemas medioambientales y energéticos al ofrecer tanto la generación de energía limpia como la biorremediación de aguas contaminadas (Lovley, 2008; Wang et al., 2015; Santoro et al., 2017; Adeloju, 2024).

1.1 Sistemas bio-electroquímicos

Los sistemas bio-electroquímicos (SBEs) son sistemas que integran microorganismos u otros biocatalizadores, como las enzimas, con técnicas electroquímicas impulsadas por reacciones redox para interconvertir la energía química contenida en un sustrato en energía eléctrica (Slate et al., 2019; Zheng et al., 2020, Ahmadi et al, 2023). Los SBEs están constituidos típicamente por un cátodo, un ánodo, una membrana de intercambio catiónico o protónico y un circuito eléctrico por el cual fluyen los electrones desde el

ánodo hacia el cátodo. Tanto la reacción de oxidación que ocurre en el ánodo, como la reacción de reducción que ocurre en el cátodo, pueden ser catalizadas por microorganismos electrogénicos, microorganismos capaces de transportar electrones de forma extracelular, intercambiando electrones con el sustrato conductor al cual se encuentran adheridos.

En los SBEs la cámara anódica tiene un ambiente anaeróbico, lo que permite la transferencia de electrones hacia el ánodo en lugar del oxígeno del aire, el cual normalmente constituye el aceptor terminal de electrones dado su mayor potencial. La oxidación del sustrato da origen a electrones y protones que fluyen por un circuito externo y una membrana hacia el cátodo (Bhattacharya et al., 2023). Aunque las reacciones de oxidación anódica son similares entre los distintos SBEs, las diferentes reacciones catódicas dan origen a los diferentes tipos de SBEs (Zheng et al., 2020). En términos energéticos, los SBEs pueden ser divididos en dos grandes categorías: productores de energía y consumidores de energía, dependiendo de la espontaneidad de la reacción involucrada (Sleutels et al., 2012). Entre los productores de energía se encuentran las celdas de combustible microbianas (MFC por sus siglas en inglés) que pueden generar bio-electricidad desde residuos orgánicos sin aporte energético externo (Zhang et al., 2021), y las celdas de desalinización

microbiana (MDC por sus siglas en inglés) que son MFCs modificadas para generar la desalinización de agua *in situ* mediante la incorporación de membranas de intercambio iónico (Zhang & Liu, 2021). Dentro de categoría de consumidores energéticos están las celdas de electrólisis microbiana (MEC por sus siglas en inglés) que utiliza la aplicación de voltajes para reducir el potencial del cátodo y permitir la generación de biocombustibles como H₂ o metano (Wang et al., 2022); y las celdas de electrosíntesis microbiana (MESC por sus siglas en inglés) que utiliza la aplicación de voltaje para la producción de compuestos químicos reducidos (Wang et al., 2021). Los distintos tipos de SBEs y sus productos han sido representados en la Figura 1.

En los SBEs cualquier sustrato susceptible de ser degradado por microorganismos puede ser utilizado como fuente energética, incluidos sustratos normalmente considerados como desechos como los lodos digeridos, efluentes de la agroindustria, efluentes de la industria alimentaria y las aguas residuales urbanas (Pant et al., 2011; Logan et al., 2019; Prathiba et al., 2022). En medio de un cambio de paradigma de la gestión de residuos, los SBEs han rápidamente emergido como tecnologías prometedoras no sólo para valorizar una amplia gama de residuos convirtiéndolos en productos

útiles como electricidad, compuestos químicos, combustibles líquidos y gaseosos, sino también para aplicaciones de biorremediación y biosensores.

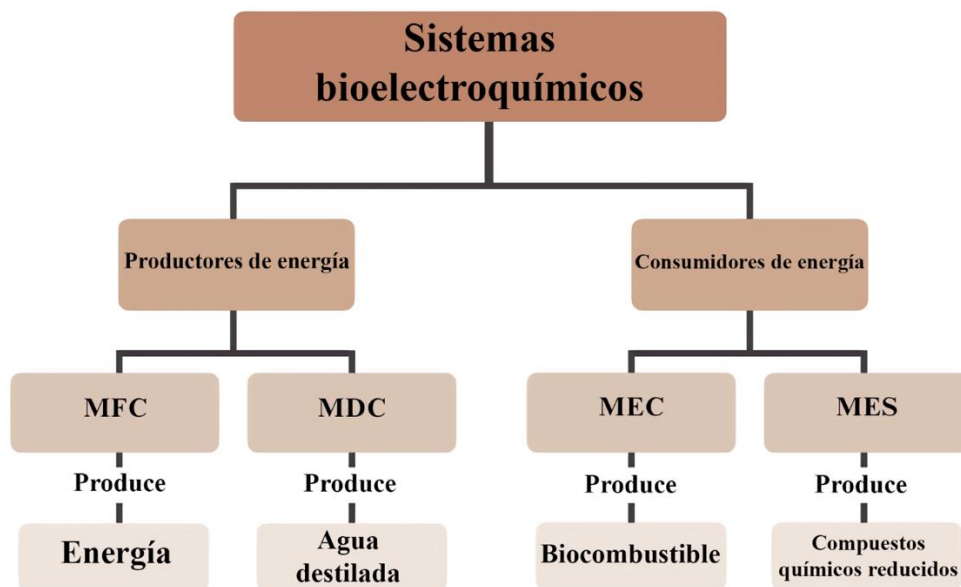


Figura 1. Clasificación de los sistemas bioelectroquímicos (SBEs) y sus aplicaciones. Esta figura muestra las principales categorías de BES, diferenciadas por si las reacciones que ocurren son espontáneas o requieren aporte energético externo. Se incluyen ejemplos de aplicaciones clave en cada tipo, como la generación de energía y la producción de compuestos químicos.

1.2 Microorganismos electrogénicos

Los microorganismos electrogénicos son un grupo especial de microorganismos capaces de transferir electrones extracelularmente a través de su envoltura celular a diferentes aceptores de electrones, como minerales insolubles, electrodos e incluso otros microorganismos (Logan et al., 2019, Lovley & Holmes, 2021). Estos microorganismos son utilizados en los SBEs, donde la transferencia de electrones se produce desde los microorganismos hacia un electrodo sólido (exoelectrógenos) o desde el electrodo hacia los microorganismos (electrótrofos) (Logan, 2009). Los primeros reportes de microorganismos electrogénicos provienen del estudio de Potter (1911), donde demostró que era posible obtener energía eléctrica a partir de un cultivo de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* en glucosa. Estudios posteriores en cultivos puros han demostrado que existen microorganismos electrogénicos en los tres dominios de la vida, incluyendo bacterias del phylum Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria, algunas arqueas como *Pyrococcus furiosus* y eucariontes como *S. cerevisiae* (Logan et al., 2019; McCormick et al., 2015).

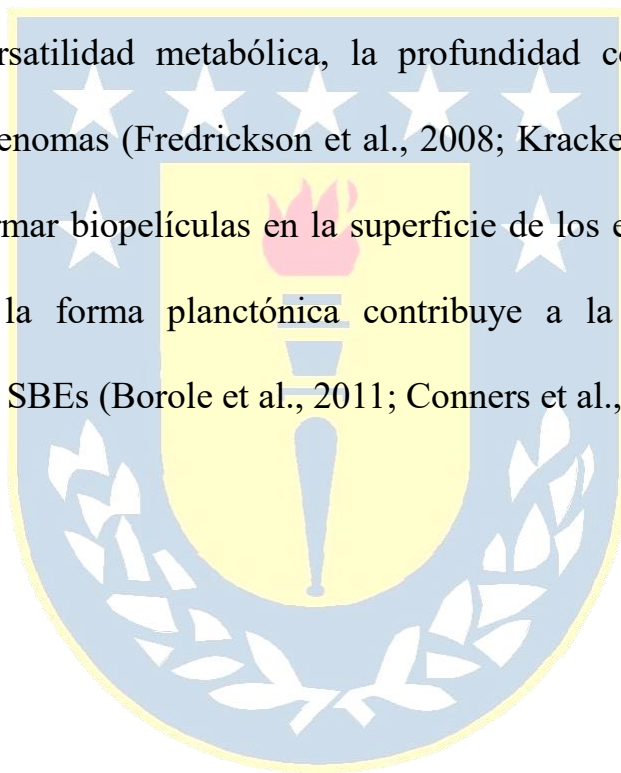
Los mecanismos de transferencia electrónica en los microorganismos electrogénicos pueden ser clasificados en dos grandes categorías:

mecanismos directos e indirectos (Zhang et al, 2024). La transferencia directa ocurre por contacto con el ánodo y ocurre a través de proteínas redox situadas en la membrana externa (conocidas como citocromos c) o mediante apéndices proteicos denominados nanocables, que corresponden a pilis tipo IV capaces de traspasar los electrones desde la célula hacia el ánodo. Por otro lado, la transferencia indirecta utiliza mediadores redox, los cuales pueden ser endógenos (producidos por la propia célula) o exógenos (añadidos artificialmente) (Lovley, 2008; Yang et al., 2012; Yu et al., 2015). Una representación esquemática de los mecanismos de transferencia electrónica entre microorganismos y el ánodo es presentada en la Figura 2.

Los microorganismos electrogénicos se han aislado de océanos, lagos, ríos e incluso ambientes extremos como zonas polares, volcanes y ambientes hipersalinos. En estos hábitats, utilizan aceptores terminales insolubles, como óxidos de manganeso y óxidos de hierro, que se encuentran en sedimentos anaeróbicos de ambientes marinos y lacustres (Zhang et al., 2023). Debido a que estos aceptores de electrones insolubles no pueden atravesar las membranas celulares, estos microorganismos han desarrollado vías metabólicas especializadas que les permiten transferir electrones a estos aceptores externos. Este proceso, fundamental para su crecimiento,

respiración, comunicación, detección y cooperación con los entornos circundantes, es un testimonio de su adaptabilidad y capacidad de aprovechamiento de recursos (Jayathilake et al., 2024).

En los SBEs, dos de los microorganismos electrogénicos más conocidos y utilizados son *Geobacter sulfurreducens* y *Shewanella oneidensis*, preferidos por su gran versatilidad metabólica, la profundidad con que han sido estudiados sus genomas (Fredrickson et al., 2008; Kracke et al., 2015) y la capacidad de formar biopelículas en la superficie de los electrodos, que en comparación a la forma planctónica contribuye a la transferencia de electrones en los SBEs (Borole et al., 2011; Conners et al., 2022).



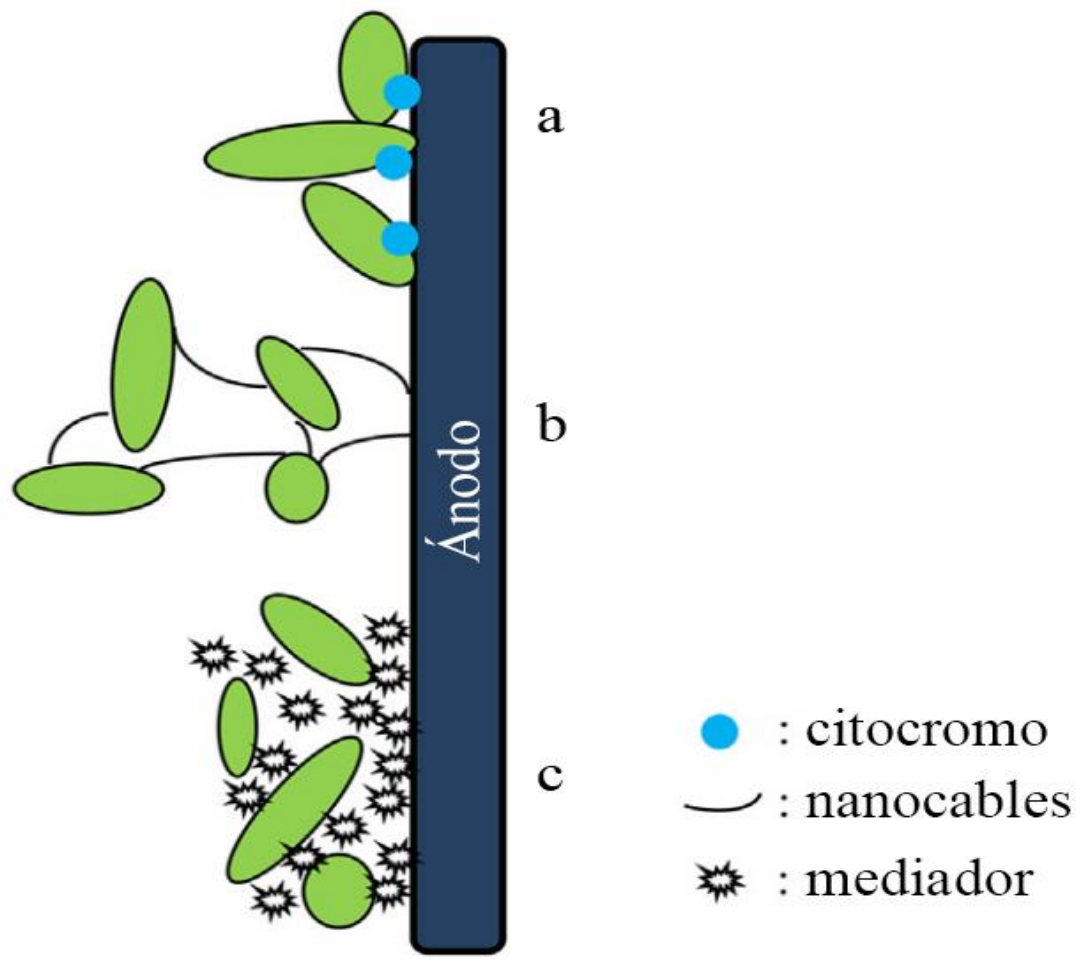


Figura 2. Representación esquemática de los tres principales mecanismos de transferencia de electrones en microorganismos electrogénicos. Esta figura muestra la interacción entre los microorganismos y el ánodo. Los mecanismos incluyen: (a) proteínas de membrana tipo citocromo; (b) pilis conductivos o nanocables; y (c) mediadores redox. Adaptado de Li, 2018.

1.3 Biopelículas

Las biopelículas, también conocidas como biofilms, son ecosistemas microbianos organizados formados por una o varias especies de microorganismos, que generalmente se adhieren a una superficie y presentan características funcionales y estructuras complejas (Sauer et al., 2022). La biopelícula está compuesta principalmente por una matriz extracelular, constituida por diversos biopolímeros denominados sustancias poliméricas extracelulares (SPEs o EPS por sus siglas en inglés), que representan más del 90% de su masa seca (Pinto et al, 2020). En contraste, los microorganismos constituyen menos del 10% de la masa seca total, y son responsables de la producción de estas SPEs (Flemming et al., 2016).

Las SPEs están formadas por exopolisacáridos, ácidos nucleicos (ADNe y ARNe), proteínas, lípidos y otras biomoléculas (Karygianni et al., 2020). Estas sustancias son fundamentales para el desarrollo y la estabilidad de las biopelículas microbianas, actuando como un cemento que une a los microorganismos entre sí y a la superficie de adhesión. Esta adhesión facilita interacciones estrechas, como la comunicación entre células y la formación de microconsorcios sinérgicos (Mahto et al., 2022). Además, las SPEs permiten retener enzimas extracelulares, creando así un sistema digestivo

externo que capta nutrientes disueltos y particulados del medio acuático, lo que les permite ser utilizados como fuente de nutrientes y energía. También brindan protección y resistencia frente a condiciones adversas, como la desecación, la presencia de depredadores, el estrés mecánico y la acción de agentes antimicrobianos. Las SPEs soportan funciones extracelulares, que incluyen actividades enzimáticas y redox, así como el intercambio de material genético (Flemming & Wingender, 2010; Harimawan & Ting, 2016). La composición y la estructura de las SPEs pueden variar considerablemente según el tipo de microorganismos, la disponibilidad de nutrientes, el tipo de sustrato, la tensión de cizallamiento y las condiciones ambientales, lo que determina de diversas maneras la estructura, estabilidad y función de la matriz (Flemming et al., 2016, 2022).

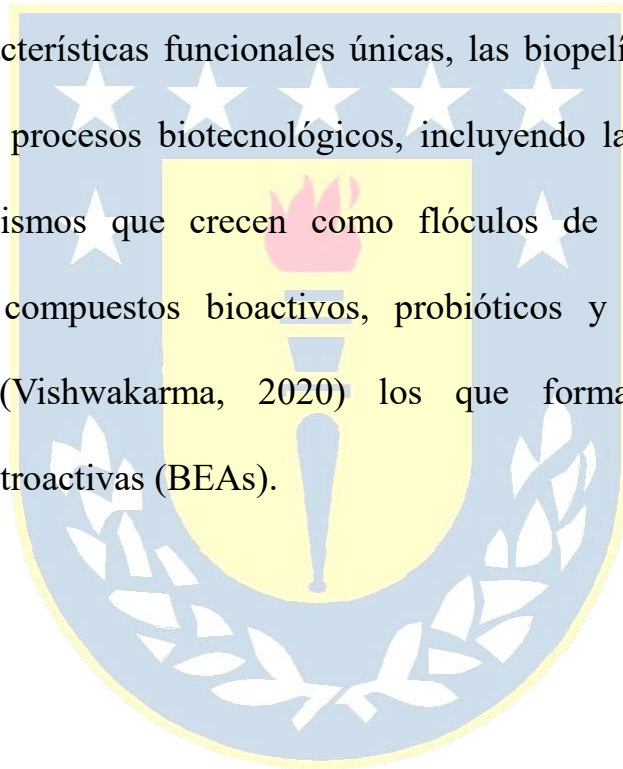
La matriz extracelular basada en SPEs proporciona la infraestructura para una forma de vida microbiana multicelular extremadamente flexible, versátil y adaptable que demuestra propiedades emergentes que no comparten las células planctónicas o sésiles individuales (Flemming et al., 2016; Karygianni et al., 2020). Dado la magnitud de los cambios que experimentan los microorganismos durante su transición de organismos planctónicos a formar parte de una comunidad compleja, no es de extrañar que la transición

del modo de crecimiento planctónico a la de biopelícula sea un proceso intrincado y muy regulado que relaciona con los múltiples fenotipos y cambios fisiológicos (Sauer et al., 2002), en el que se pueden reconocer cinco etapas: (1) unión reversible, (2) unión irreversible, (3) maduración inicial o producción de SPEs, (4) maduración final y (5) dispersión (Sauer, 2003). Cada una de estas etapas de desarrollo de la biopelícula se corresponde con patrones únicos de expresión génica (Davey y O'toole, 2000; Petrova et al., 2017). En la Figura 3 se presenta un diagrama de las etapas de desarrollo de la biopelícula.

La etapa de unión reversible comienza con la adhesión inicial de células planctónicas libres a la superficie de soporte, pero esta adhesión es inestable. En la etapa de unión irreversible las células se unen a la superficie de forma sostenida en el tiempo (mediada por las SPEs), y ocurre una cascada de cambios en las células bacterianas, que incluye el cese de la motilidad mediada por flagelos y alteraciones en la expresión génica. La primera etapa de maduración comprende el crecimiento de la biopelícula y desarrollo temprano de su arquitectura. La segunda etapa de maduración continúa el desarrollo de la arquitectura a una más compleja, caracterizada por la formación de canales y gradientes de nutrientes y oxígeno dentro de la

biopelícula. Por último, la etapa de dispersión comprende la liberación de microorganismos desde la biopelícula al ambiente de forma activa (con la participación de mecanismos de liberación controlada) o pasiva (debido a la degradación de la matriz o a las fuerzas ambientales) (Dunne, 2002; Sauer, 2003; Hall-Stoodley et al., 2004; Sauer et al., 2022).

Dado a sus características funcionales únicas, las biopelículas se emplean ampliamente en procesos biotecnológicos, incluyendo la biorremediación con microorganismos que crecen como flóculos de aguas residuales, producción de compuestos bioactivos, probióticos y microorganismos electrogénicos (Vishwakarma, 2020) los que forman las llamadas biopelículas electroactivas (BEAs).



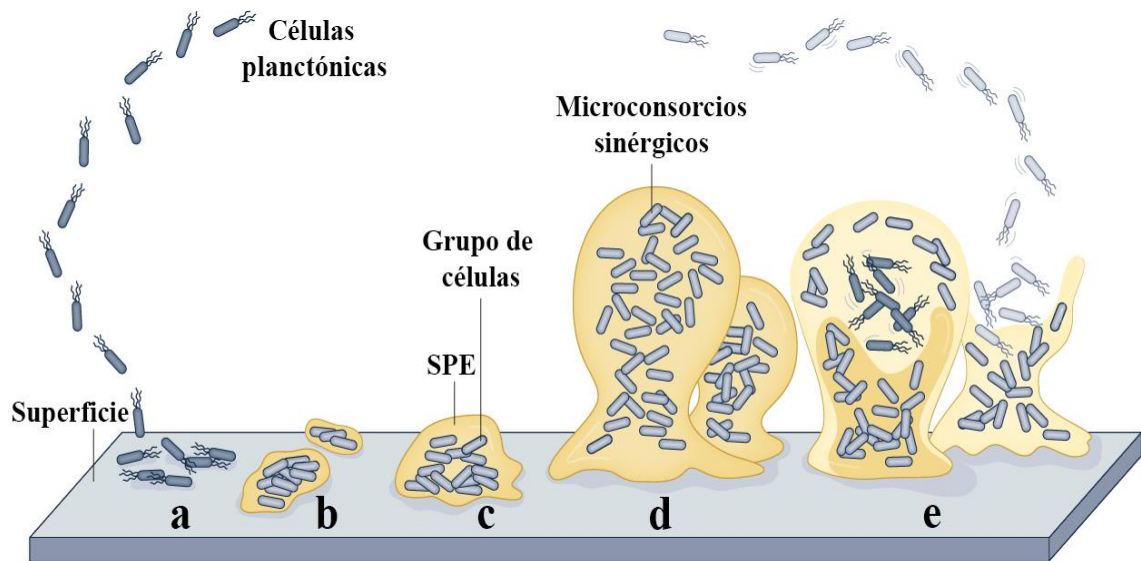


Figura 3. Etapas de desarrollo de la biopelícula. (a) durante la unión reversible, las bacterias se adhieren a la superficie mediante el polo celular o el flagelo; (b) en la unión irreversible, se reduce la expresión de genes del flagelo y comienza la expresión de genes relacionados a la producción de SPE; (c) en la etapa de maduración, las células forman grupos incrustados en la matriz de SPE; (d) en la maduración final se forman microconsorcios sinérgicos; (e) durante la dispersión se degrada parte de la matriz de SPE y se dispersan células flageladas. Figura modificada de Sauer et al., 2022.

1.4 Biopelículas electroactivas

Las biopelículas electroactivas (BEAs) son biopelículas formadas por microorganismos electrogénicos, que tienen la capacidad de intercambiar electrones con superficies conductoras conocidas como electrodos (Babauta et al., 2012). En comparación con los microorganismos planctónicos, las BEAs presentan una ventaja significativa al estar en estrecha proximidad con el electrodo, lo que facilita la transferencia directa de electrones y la acumulación de mediadores en los SBEs. Además, la alta densidad de microorganismos en las BEAs incrementa su capacidad para mejorar la eficiencia de estos sistemas (Logan, 2009; Kumar et al., 2018).

Numerosos estudios han relacionado la formación de biopelículas en SBEs con una mayor generación de energía. Se ha demostrado que las biopelículas multicapa tienen un mejor rendimiento en términos de corriente comparado con las biopelículas monocapa (Liu et al., 2015). En contraste, los microorganismos que no pueden formar biopelículas en el electrodo no generan densidades de corriente significativas (Borole et al., 2011). Esta diferencia se debe a la capacidad de las BEAs para transferir electrones al electrodo mediante nanocables o a través de una matriz conductora, lo cual resulta en tasas cinéticas de transferencia de electrones más altas que las

logradas por mecanismos que dependen solo de la difusión de mediadores redox (Marsili et al., 2008; Srikanth et al., 2008). Por lo tanto, la adhesión de un microorganismo a un electrodo, ya sea como biopelícula monocapa o, preferiblemente, multicapa, es un parámetro clave para aumentar la eficiencia de los SBEs (Logan, 2009).

Modelos cinéticos y análisis voltamétricos sugieren que la propia BEA puede actuar como una matriz conductora que facilita la transferencia de electrones entre los microorganismos y los electrodos. Esta conductividad les permite transportar electrones incluso a través de decenas de micrómetros, una distancia que supera con creces el tamaño típico de una sola bacteria ($\sim 1 \mu\text{m}$) (Malvankar et al., 2011; PrévotEAU & Rabaey, 2017). Marcus et al. (2007) y Torres et al. (2010) sugirieron que las SPEs de la matriz debe ser un semiconductor, con una conductividad en el rango de $10^{-9} \text{ S cm}^{-1}$ a 10^3 S cm^{-1} . A pesar de que los biopolímeros puros y secos, como los polisacáridos y las proteínas, suelen considerarse aislantes, se cree que una vez hidratados o ionizados pueden exhibir propiedades semiconductoras en la forma de electrolitos poliméricos (conducción iónica a través de sales) o polímeros conductores (π electrones a través de dobles enlaces conjugados) (Borole et

al., 2011). En la figura 4 se muestran valores de conductividad para diferentes bio-materiales.

Hasta ahora, el mecanismo de transferencia de electrones a través de las biopelículas sigue siendo objeto de debate (Kumar et al., 2017; PrévotEAU & Rabaey, 2017). Se especula que los cofactores redox extracelulares inmovilizados en la matriz (como los citocromos tipo c y los nanocables) estarían implicados en el transporte de electrones a larga distancia a través de las BEAs (PrévotEAU & Rabaey, 2017). Además, algunos citocromos de la membrana externa que están débilmente ligados podrían liberarse a la matriz de la biopelícula, contribuyendo así a su electroactividad (Borole et al., 2011). De este modo, la conducción eléctrica en las biopelículas se produciría a través de salto de electrones de varios pasos a través de los cofactores redox más cercanos, impulsado por un gradiente redox (electron-hopping), de forma similar a lo que ocurre dentro de los polímeros redox (PrévotEAU & Rabaey, 2017).

La relación entre la electroactividad y las características de la biopelícula es un aspecto relevante para los SBEs y los esfuerzos por mejorar su eficiencia (Conners et al., 2022). En este contexto, los electrodos desempeñan un papel

fundamental en los SBEs, ya que son cruciales para el intercambio de electrones con la biopelícula y la formación de las BEAs (Sonawane et al., 2017).

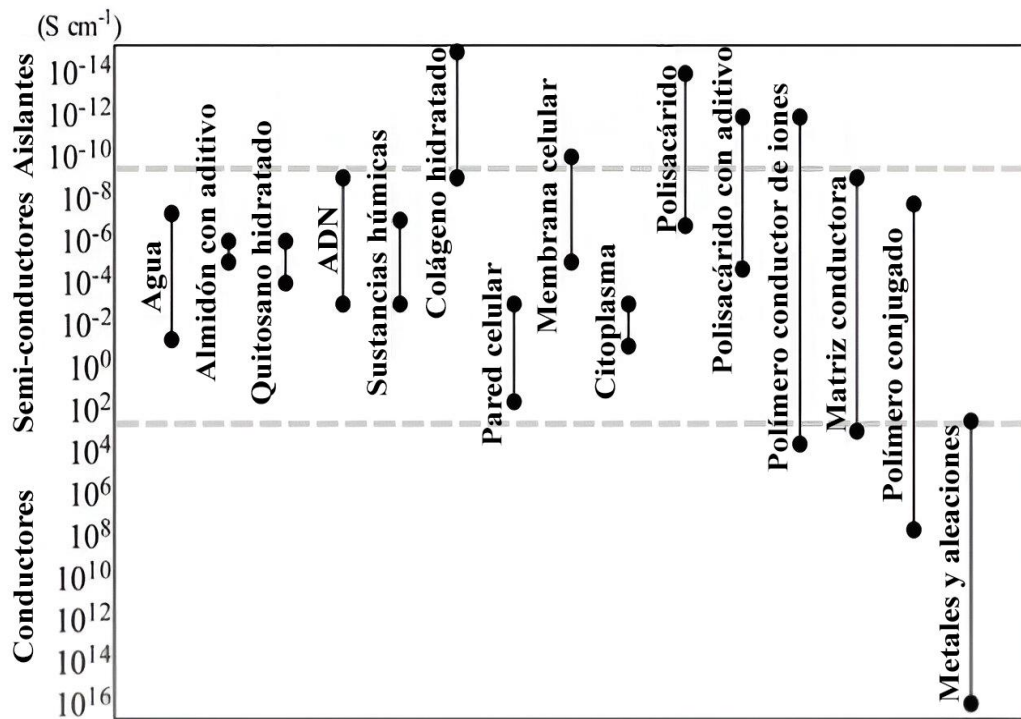


Figura 4. Conductividad eléctrica de distintos bio-materiales. Se incluye la conductividad de biopelículas desarrolladas en ánodos. Figura modificada de Borole et al., 2011.

1.5 Electrodo

Los electrodo son dispositivos conductores que permiten la transferencia de corriente eléctrica entre un medio conductor y un circuito eléctrico. En el contexto de los SBEs, los electrodo son componentes fundamentales tanto estructural como funcionalmente, ya que brindan soporte para la adhesión bacteriana y facilitan la transferencia de electrones entre las BEAs y un circuito externo, permitiendo la generación de corriente eléctrica (Hindatu et al., 2017). El circuito de un SBE se compone de dos electrodo: un ánodo y un cátodo. El ánodo es el electrodo donde ocurre la oxidación o liberación de electrones en una reacción electroquímica, actuando como aceptor terminal de electrones para la BEA. Por otro lado, el cátodo es el electrodo donde ocurre la reducción o la captación de electrones por la BEA (Mier et al., 2021).

En los últimos años, la búsqueda y desarrollo de nuevos materiales para electrodo se ha convertido en un tema de gran interés, emergiendo como una de las principales estrategias para aumentar los procesos de transferencia de electrones y, por lo tanto, el rendimiento de los SBEs (Mier et al., 2021; Yaqoob et al., 2020) (Carniello et al., 2018; Kreve & Reis, 2021; Nouri et al., 2023; Perchikov et al., 2024). Los electrodo que componen los SBEs pueden

estar fabricados con una amplia variedad de materiales, cada uno con distintas propiedades químicas, físicas y biológicas que influyen de manera significativa en el rendimiento de estos sistemas (Zhou et al., 2011; Rahimnejad et al., 2015; Sonawane et al., 2017; Yaqoob et al., 2020). El material empleado no solo es fundamental para la recolección y donación de electrones generados durante el metabolismo, sino que también proporciona soporte a la biopelícula (Agrahari et al., 2022; Hindatu et al., 2017; Mier et al., 2021). De hecho, la adhesión bacteriana y el comportamiento de la biopelícula se ven influenciados por la naturaleza del material de la superficie. Investigaciones han comenzado a mostrar que las bacterias ajustan su expresión génica y su fisiología en respuesta a las características del material, lo que puede tener implicaciones significativas en las propiedades funcionales de las biopelículas formadas (Guilbaud et al., 2017; Guo et al., 2020; Shemesh et al., 2010).

El impacto de la superficie del electrodo en la formación de biopelículas abarca desde la adhesión bacteriana inicial hasta lo que se ha denominado "crecimiento de biopelículas programado por la superficie". Este término se utiliza para resaltar la influencia de la superficie del sustrato en el desarrollo de las propiedades emergentes de las biopelículas (Carniello et al., 2018).

Así, las propiedades fisicoquímicas y estructurales de los materiales utilizados juegan un papel crucial en la generación de energía de dos principales maneras: determinando la cinética de las reacciones de transferencia de electrones y, por otro lado, determinando la adhesión y propiedades emergentes de la biopelícula (Agrahari et al., 2022). Esto es especialmente relevante, ya que la eficiencia de la transferencia de electrones desde los microorganismos electrogénicos hacia el ánodo se considera el factor más crítico que influye en la eficiencia de los SBEs (Schilirò et al., 2016). En este contexto, uno de los materiales que ha surgido como una de las alternativas preferidas en la última década es el grafeno (ElMekawy et al., 2017; Naina et al., 2022).

1.6 Grafeno

El grafeno es un alótropo del carbono que se caracteriza por estar constituido por una sola capa de átomos dispuestos en un entramado hexagonal bidimensional (Huang et al., 2012). Este material es ampliamente reconocido por su excepcional resistencia a la tracción, sobresaliente conductividad eléctrica, su transparencia y por ser el material bidimensional más fino

conocido. A escala microscópica, el grafeno se erige como el material más resistente que se ha medido hasta la fecha, una lámina de grafeno de un átomo de espesor es unas doscientas veces más resistente que el acero y es cinco veces más ligero que el aluminio (Chamoli et al., 2020).

El grafeno fue descubierto en 2004 por los físicos Andre Geim y Konstantin Novoselov en la Universidad de Manchester (Novoselov et al., 2004). Por sus innovadoras investigaciones sobre el grafeno, Geim y Novoselov fueron galardonados con el Premio Nobel de Física en 2010, consolidando al grafeno como un material de gran interés para diversas aplicaciones científicas y tecnológicas. Aunque sus potenciales aplicaciones son variadas, ha sido en la búsqueda de alternativas energéticas renovables donde su uso ha ganado particular relevancia, especialmente en sistemas de almacenamiento y conversión de energía, así como en la fabricación de electrodos (Pang et al., 2011). El grafeno presenta propiedades sobresalientes que lo convierten en un excelente material para electrodos, incluyendo su alta conductividad, amplia ventana de potencial, buena actividad electrocatalítica en reacciones redox, una estructura de carbono cristalina con dominio sp^2/sp^3 , además de una gran área de superficie teórica que favorece las reacciones químicas en su superficie (Chen et al., 2010).

Como se ha mencionado, la elección de los electrodos es un factor crucial para la eficiencia los SBEs, destacando el grafeno como una de las alternativas preferidas en la última década (ElMekawy et al., 2017; Naina et al., 2022). Algunas de las cualidades que le han otorgado esta privilegiada posición son: alta biocompatibilidad en comparación a los electrodos metálicos, facilitación de la transferencia de electrones, aumento de la distribución de sitios activos y aumento de la expresión de proteínas relacionadas con el transporte de electrones (Huang et al., 2011). A pesar de las numerosas ventajas competitivas del grafeno, su aplicación a gran escala ha sido limitada por su elevado costo de producción. En este contexto, han surgido dos alternativas más económicas con propiedades similares: el grafeno oxidado (GO) y el grafeno oxidado reducido (rGO). En los últimos años, numerosos estudios han propuesto el uso de ánodos de GO y rGO para mejorar el rendimiento de los SBEs de manera rentable Naina et al., 2022; Pareek et al., 2019; Starowicz et al., 2023).

1.6.1 Grafeno oxidado (GO)

El óxido de grafeno (GO), o grafeno oxidado, es un importante derivado del grafeno que se obtiene a través de la oxidación química del grafito y destaca por un costo de producción significativamente menor al del grafeno prístino. Aunque mantiene una estructura similar a la del grafeno, el GO se diferencia por contener grupos funcionales que se incorporan durante su producción.

Desde su descubrimiento, la estructura química del GO ha sido ampliamente estudiada. El modelo estructural más aceptado, inicialmente propuesto por Lerf y Klinowski, ha sido posteriormente refinado por diversos investigadores, incluyendo a Siklitskaya y colaboradores (2021). Generalmente, una lámina de GO está compuesta por una red bidimensional de anillos hexagonales de carbono, presentando tanto regiones conjugadas como oxidadas, donde los grupos funcionales oxigenados se unen covalentemente a los átomos de carbono. Las regiones conjugadas son zonas donde la red de carbono permanece intacta, mientras que las regiones oxidadas contienen numerosos grupos funcionales unidos covalentemente a los átomos de carbono. En el plano basal, los grupos hidroxilo y epoxi aumentan el contenido de oxígeno, mientras que los grupos carboxilo, lactona

y carbonilo se localizan en los bordes (Zhou et al., 2022). Otros grupos, resultantes de reacciones secundarias durante la oxidación, también están presentes. La presencia de grupos funcionales de oxígeno confiere al GO una variedad de propiedades fisicoquímicas interesantes, incluyendo características electrónicas, ópticas, térmicas, mecánicas y electroquímicas, además de su reactividad química. Estos grupos funcionales también funcionan como eficientes puntos de anclaje para la inmovilización de diversas especies electroactivas, posibilitando la modificación química o funcionalización del GO, haciendo posible ajustar sus propiedades fisicoquímicas mediante métodos químicos, térmicos o electroquímicos (Ahmed et al., 2023; Tian et al., 2021). Una de las modificaciones del GO implica emplear sus grupos oxigenados como centros activos para la nucleación de nanopartículas de materiales inorgánicos. Esta técnica resulta especialmente útil en la fabricación de electrodos, tanto ánodos como cátodos, en SBEs (Benito-Santiago et al., 2023).

Gracias a sus propiedades, el GO es un material sumamente versátil, con aplicaciones en la fabricación de sensores, electrodos y supercapacitores, así como en la purificación de agua. Además, se utiliza en plataformas para la liberación controlada de fármacos y como material base para la producción

de compuestos avanzados (Anegbe et al., 2024; Daniyal et al., 2020; Down et al., 2018; Tian et al., 2021). Cabe destacar que GO puede utilizarse tanto como material anódico como catódico. Por otro lado, el GO exhibe un efecto sinérgico al combinarse con otros materiales conductores, como compuestos carbonosos, óxidos, nitruros o sulfuros de metales de transición, y polímeros conductores. Esta sinergia genera beneficios en los electrodos, que incluyen una mayor área superficial, la creación de sitios de anclaje para la formación de electrodos compuestos de tamaño nanométrico y la inhibición de la agregación de materiales activos durante el ciclo de carga y descarga. Además, los grupos funcionales hidrófilos confieren al GO una alta conductividad iónica (Tian et al., 2021).

1.6.2 Grafeno oxidado reducido (rGO)

El óxido de grafeno reducido (rGO) es una forma de grafeno que se obtiene mediante la reducción del GO. Esta reducción puede llevarse a cabo de varias maneras, incluyendo el recocido térmico, la reducción química con sustancias reductoras como la hidracina, el ácido ascórbico o el hidrógeno, la reducción electroquímica y reducción biológica (Utkan et al., 2023;

Nanjundappa et al., 2023). Este proceso elimina parte de los grupos oxigenados que están presentes en el GO, lo que restaura en cierta medida las propiedades eléctricas y mecánicas del grafeno prístino (Yaqoob et al., 2020).

El rGO es una forma menos costosa de obtener una molécula similar al grafeno, aunque, debido a que el procedimiento de obtención no remueve totalmente grupos funcionales del grafeno oxidado, todavía tiene muchos defectos químicos y estructurales, lo que es un problema para algunas aplicaciones, pero una ventaja para otras (Tkachev et al., 2012). Como resultado, el rGO muestra una mayor conductividad eléctrica en comparación con su precursor oxigenado, lo que lo convierte en un material atractivo para diversas aplicaciones, especialmente en el ámbito de la tecnología energética y los dispositivos electrónicos. Además, el rGO conserva algunas características de funcionalización que le permiten ser utilizado en la elaboración de materiales compuestos, sensores, y electrodos en baterías y supercapacitores.

En resumen, una distinción importante entre el GO y el rGO es la concentración de grupos funcionales de oxígeno. La estructura química de ambos materiales se muestra en la Figura 5. El GO es hidrofílico debido a la

presencia de estos grupos funcionales en su superficie. Por otro lado, el rGO presenta una naturaleza parcialmente hidrofílica, dado que la reducción completa es difícil de alcanzar. Estas diferencias estructurales y químicas entre GO y rGO tienen implicancias directas en su interacción con las bacterias, en la formación de biopelículas y en la transferencia de electrones.

Transferencia de Electrones: La alta conductividad del rGO facilita la transferencia directa de electrones desde las bacterias a los electrodos (Pareek et al., 2019). Por otro lado, la menor conductividad del GO, junto con la presencia de grupos funcionales oxigenados que actúan como sitios de unión o bloqueo, puede afectar la eficiencia de la transferencia directa de electrones según varios autores (Boopathi et al., 2014; Kaplan et al., 2017). Sin embargo, en un estudio de Zuo et al. (2009) se determinó que el GO facilitaba la transferencia de electrones de metaloproteínas, particularmente de citocromo c, al electrodo de manera eficiente sin comprometer la integridad estructural o la actividad biológica de la proteína.

Formación de Biopelículas: La hidrofobicidad/hidrofilia de cada material influye en la adhesión bacteriana. Algunos estudios sugieren que la hidrofilia del GO promueve una mayor adhesión y formación de biopelículas debido a

las interacciones con los grupos funcionales (Huang et al., 2011; Jaworski et al., 2021; Charles, 2022). Sin embargo, la interacción del rGO con las bacterias puede ser más compleja, con estudios que indican tanto un efecto inhibidor como promotor de la formación de biopelículas, dependiendo de factores como la concentración del material y las características de la cepa bacteriana (Guo et al., 2017; Mokkapati et al., 2018). La biocompatibilidad, en términos de la toxicidad y el efecto en la viabilidad bacteriana, también varía entre el GO y el rGO, influyendo en el desarrollo y actividad de la biopelícula (Mokkapati et al., 2018).

Finalmente, tanto el GO como el rGO presentan características atractivas para su aplicación en SBEs; sin embargo, sus propiedades varían significativamente, afectando la formación y actividad de las biopelículas. La elección del material ideal dependerá de un equilibrio entre conductividad, biocompatibilidad y eficiencia en la transferencia de electrones. La comprensión de estas diferencias y su influencia en la formación de biopelículas es crucial para el diseño de electrodos eficientes en SBEs. No obstante, la actividad antibacteriana de GO y rGO es objeto de controversia en la literatura, probablemente debido a la variabilidad de los métodos experimentales. Este estudio comparativo, que emplea electrodos

de GO y rGO con cultivos puros de *S. oneidensis*, busca contribuir a esclarecer estos aspectos, analizando la formación de biopelículas electroactivas sobre ambos electrodos.

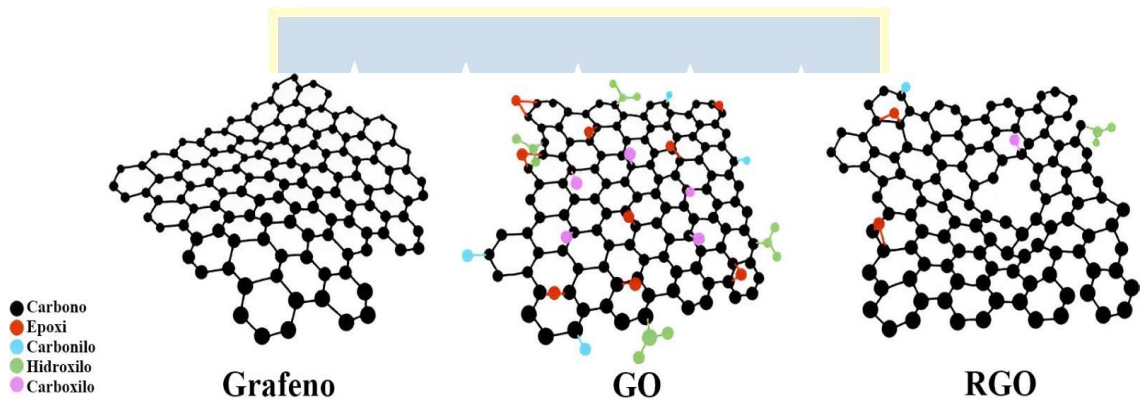


Figura 5. Representación esquemática de la estructura química del grafeno, óxido de grafeno (GO) y óxido de grafeno reducido (rGO). Figura modificada de Ahmed et al., 2023.

1.7 *Shewanella oneidensis* MR-1

Si bien los cultivos mixtos son los preferidos al momento de proyectar aplicaciones prácticas de los SBE, debido a su mayor rendimiento y facilidad de operación, varios autores sugieren que los cultivos puros son más adecuados para las investigaciones sobre los mecanismos de transferencia de electrones y el rendimiento bio-electroquímico, antes que los mixtos (Cao et al., 2019; Cereda et al., 2014; Yasri et al., 2019). Esto se debe a que los cultivos mixtos se asocian a una mayor variabilidad en las respuestas experimentales y a la presencia de respuestas menos consistentes, lo que podría dificultar la interpretación de los resultados y la identificación de mecanismos específicos y confiables (Cao et al., 2019). Uno de los microorganismos electrogénicos más usados y estudiados es *Shewanella oneidensis* debido a su facilidad de cultivo y buen desempeño en los SBE (Fredrickson et al., 2008), particularmente la cepa *S. oneidensis* MR-1 ha sido señalada como el mejor modelo para estudiar procesos de transferencia de electrones (Dundas et al., 2018).

S. oneidensis es una bacteria bacilar Gram negativa, anaerobia facultativa de la clase Gammaproteobacteria. Esta bacteria tiene la capacidad de utilizar un amplio rango de aceptores terminales de electrones, tanto orgánicos como

inorgánicos, solubles como insolubles. Pertenece al tipo de microorganismos conocidos como “reductores de metales desasimilatorios”, debido a su habilidad para acoplar la reducción de metales a su metabolismo, utilizando metales como aceptor terminal de electrones, comúnmente hierro (III) y manganeso (IV), los cuales son reducidos a hierro (II) y manganeso (II) (Fredrickson et al., 2008). El especial interés que ha surgido en torno a esta bacteria se relaciona principalmente a su comportamiento en ambientes contaminados en condiciones anaeróbicas, donde es capaz de reducir óxidos de metales pesados como magnetita y hematita, además de otros contaminantes como sulfatos, nitratos, arseniatos y cromatos (Ikeda et al., 2021). Esta capacidad se debe a la presencia de varias enzimas reductasas y vías de transporte de electrones, las que le permiten sobrevivir en diversas condiciones ambientales. Algunos de los aceptores terminales utilizados por *S. oneidensis*, como los óxidos metálicos, son insolubles, por lo que estas bacterias han desarrollado mecanismos de transporte de electrones especializados, denominados “mecanismos de transporte extracelular de electrones”, siendo estos mecanismos los que le permiten transferir electrones hacia y desde los electrodos (Ikeda et al., 2021). Esta bacteria ha servido como modelo para el estudio de los procesos electrogénicos y su uso

en los SBEs se encuentra ampliamente documentado, reconociéndose en *S. oneidensis* dos mecanismos mediante los cuales es capaz de transferir electrones hacia el electrodo: transferencia directa e indirecta de electrones (Jiang et al., 2010).

En el mecanismo directo *S. oneidensis* utiliza proteínas llamadas citocromos multiheme (citocromos-c). Los citocromos permiten conducir los electrones desde el interior de la célula hasta el aceptor externo (Brutinel & Gralnick, 2012), y se encuentran tanto en la superficie de la bacteria como en la superficie de apéndices denominados "nanocables", los que posibilitan el contacto directo con el electrodo y transferir electrones (Pirbadian et al., 2014). En mecanismo de transferencia indirecta la producción y acumulación de flavinas es el principal mecanismo de transferencia de electrones (Kotloski & Gralnick, 2013). *S. oneidensis* es capaz de producir mediadores solubles como riboflavina (B2) y flavín mononucleótido (FMN), que son reducidos por la bacteria y luego oxidados al ceder los electrones al aceptor externo, permitiendo ceder electrones sin necesidad de contacto directo con el aceptor final (Canstein et al., 2008; Marsili et al., 2008).

Las aplicaciones biotecnológicas de *S. oneidensis* incluyen bioremediación, biorecupación de metales y generación de bioenergía. En estos procesos, particularmente en los SBEs, es determinante la adhesión de las células bacterianas en soportes en donde crecen y forman agregados de células y matriz extracelular, o biopelículas (Hau & Gralnick, 2007). Por este motivo, se ha estudiado el efecto de diferentes parámetros sobre la formación de estas biopelículas (Muffler et al., 2014). En *Shewanella* spp. se ha estudiado la relación de sus biopelículas con algunos parámetros clave de los SBEs, como pH, la resistencia y el potencial aplicado (Babauta et al., 2011; Carmona-Martínez et al., 2013; Liu et al., 2015). Sin embargo, el efecto de los electrodos sobre el desarrollo y función de las biopelículas permanece escasamente estudiado (Lin et al., 2019).

Hasta el momento, los estudios en electrodos se han enfocado en estudiar la acumulación de biomasa microbiana en el electrodo, usualmente medida como grosor de la biopelícula formada (Connors et al., 2022), lo que significa una mayor concentración de bacterias electrogénicas y, en teoría, mayor traspaso de electrones hacia el ánodo. Sin embargo, esto no siempre garantiza una mayor eficiencia en la transferencia de electrones (Sun et al., 2016). Estudios han demostrado que la cantidad y composición de la matriz

extracelular también interfiere con la eficiencia en la producción de corriente, debido a que una mayor concentración de SPEs se relaciona con mayor resistencia al paso de electrones entre los citocromos y el electrodo, por lo que biopelículas con una mayor cantidad de matriz tendrían un peor desempeño con respecto a las biopelículas con menos cantidad de SPEs (Gao et al., 2019; Kitayama et al., 2017). Finalmente, una mayor expresión de proteínas también se relacionaría con una mayor producción de corriente eléctrica (M. Li et al., 2018; Min et al., 2017). De este modo, no solo la cantidad de biopelícula acumulada en el electrodo incide en el desempeño de la celda, sino que otros parámetros como la viabilidad, composición de la biopelícula, y fisiología celular juegan también un rol esencial en la actividad de BEA y, por lo tanto, en la eficiencia de estos sistemas. Sin embargo, la mayoría de los estudios que relacionan los soportes con las biopelículas sólo se han enfocado en cuantificar la cantidad de bacterias adheridas en diferentes superficies abióticas (Bedel et al., 2015; Guilbaud et al., 2017), sin existir hasta la fecha estudios que relacionen el tipo de biopelícula formada con las superficies utilizadas y particularmente con las superficies de grafeno.

1.8 Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica (VC) es una técnica electroquímica comúnmente utilizada para investigar los procesos de oxidación y reducción de especies moleculares. Las mediciones convencionales de VC se realizan en una celda de tres electrodos, compuesta por un electrodo de trabajo, un contraelectrodo y un electrodo de referencia. Durante un ensayo de VC el potencial del electrodo de trabajo se incrementa linealmente con el tiempo hasta alcanzar un valor predeterminado, una vez alcanzado este punto, el potencial se invierte, disminuyendo en sentido contrario hasta regresar al potencial inicial. La tasa de cambio de voltaje a lo largo del tiempo durante cada fase se denomina velocidad de barrido del experimento y se expresa en voltios por segundo (V/s). El potencial se mide entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, mientras que la corriente se mide entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo (Elgrishi et al., 2018; Wang et al., 2021). Esta técnica permite medir la corriente generada por el potencial de barrido aplicado a la muestra a través del electrodo de trabajo, el resultado se presenta en lo que se denomina voltamperograma cíclico, un gráfico que representa la corriente generada (i) frente al voltaje aplicado (E). Durante la exploración con VC el potencial de oxidación creciente causa un aumento inicial en la

corriente anódica hasta que los analitos oxidables se agotan; si el par redox es reversible se hace una exploración inversa, donde el analito oxidado se reduce nuevamente, produciendo una corriente catódica. El voltamperograma cíclico ofrece información valiosa sobre las reacciones que ocurren cerca de la superficie del electrodo y sobre la reactividad de las especies activas, tanto electroquímica como químicamente (Bard et al., 2022; Yamada, 2022.).

La interacción entre las biopelículas y los electrodos puede influir significativamente en las mediciones electroquímicas. Normalmente las reacciones electroquímicas se desarrollan en la interfaz entre el electrodo y la solución, mientras que, en el caso de la formación de una BEA sobre el electrodo, las reacciones ocurren en la interfaz entre la biopelícula y la superficie del electrodo (Harnisch & Freguia, 2012). La formación de una biopelícula sobre un electrodo puede alterar la resistencia de la transferencia de electrones, lo que afecta la corriente registrada durante un ensayo de VC. Esta técnica permite investigar de qué manera las interacciones dentro de las biopelículas impactan en las propiedades electroquímicas del sistema en su conjunto. En biopelículas, la VC se utiliza para cuantificar el potencial en el cual los sitios redox activos en la biopelícula formada se oxidan o reducen

(Babauta et al., 2012). Así, la VC es una herramienta poderosa para el estudio de las propiedades electroquímicas de sistemas biológicos complejos (Harnisch & Freguia, 2012; López Zavala et al., 2019).

2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS

2.1 Pregunta de investigación

¿Cómo influye el tipo de material del electrodo (óxido de grafeno y óxido de grafeno reducido) en la viabilidad, composición y actividad electrocatalítica de las biopelículas de *Shewanella oneidensis* MR-1?

2.2 Hipótesis

Las biopelículas de *Shewanella oneidensis* MR-1 desarrolladas sobre electrodos de óxido de grafeno reducido (rGO) presentarán una mayor viabilidad, proporción de proteínas por carbohidratos y actividad electrocatalítica en comparación con aquellas desarrolladas sobre óxido de grafeno (GO).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar y comparar la viabilidad, composición y actividad electrocatalítica entre las biopelículas de *Shewanella oneidensis* MR-1 desarrolladas sobre electrodos de óxido de grafeno (GO) y óxido de grafeno reducido (rGO).

3.2 Objetivos específicos

1. Analizar la composición de la biopelícula: Cuantificar las abundancias relativas de los componentes de las sustancias poliméricas extracelulares SPEs (proteínas, polisacáridos y ADN extracelular) en las biopelículas de *S. oneidensis* MR-1 desarrolladas sobre electrodos de óxido de grafeno (GO) y óxido de grafeno reducido (rGO).

2. Determinar la viabilidad de la biopelícula: Cuantificar el porcentaje de células viables de biopelículas de *S. oneidensis* MR-1 desarrolladas sobre electrodos de óxido de grafeno (GO) y óxido de grafeno reducido (rGO).
3. Evaluar el comportamiento redox de las biopelículas de *S. oneidensis* MR-1 desarrolladas sobre electrodos de GO y rGO mediante voltamperometría cíclica.



4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Microorganismos

La cepa de *S. oneidensis* MR-1 utilizada en este estudio se indica a continuación, así como los microorganismos utilizados como control negativo para ensayos de PCR.

- *Shewanella oneidensis* ATCC® BAA1096TM
- *Bacillus subtilis*
- *Ralstonia* sp.

4.1.2 Medios de cultivo

Caldo de Lisogenia o caldo LB

Medio utilizado para la activación y crecimiento de *Shewanella oneidensis* MR-1 en aerobiosis. En la tabla 1 se informa su composición.

Tabla 1: Composición de caldo LB

Compuesto	Concentración
Triptona	10 g/L
NaCl	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L

Medio ATCC 1957

Medio utilizado para el crecimiento de *Shewanella oneidensis* MR-1 en anaerobiosis, condición en la que se realizaron los ensayos de composición de la biopelícula y de voltamperometría cíclica. El medio se preparó inicialmente sin fuentes de carbono y sin aceptor final de electrones. Posteriormente se añadieron lactato de sodio y formiato de sodio como fuentes de carbono y fumarato de sodio como aceptor final de electrones a una concentración de 20 mM. En la tabla 2 se informa su composición. Como

indicador de anaerobiosis se utilizó resazurina a una concentración de 0.001%.

Tabla 2: Composición medio ATCC 1957

Compuesto	Concentración
NH ₄ Cl	1,5 g/L
NaH ₂ PO ₄	0,6 g/L
KCl	0,1 g/L
NaHCO ₃	2,5 g/L
Solución de vitaminas de Wolfe	10 (mL/L)
Solución de minerales de Wolfe modificada	10 (mL/L)

La solución de vitaminas se agregó al medio después de su esterilización, mediante filtración. Asimismo, el fumarato de sodio fue añadido a partir de una solución madre esterilizada por filtración y purgada con nitrógeno antes de la inoculación, alcanzando una concentración final de 20 mM. Las fuentes de carbono, como el lactato de sodio y el formiato de sodio, también se incorporaron desde una solución madre previamente esterilizada, a una

concentración final de 20 mM. La composición de las soluciones de vitaminas de Wolfe se presenta a continuación en la 3.

Tabla 3: Composición de la solución de vitaminas de Wolfe

Compuesto	Concentración
Biotina	2,0 mg/L
Ácido fólico	2,0 mg/L
Clorhidrato de piridoxina	10,0 mg/L
Tiamina	5,0 mg/L
Riboflavina	5,0 mg/L
Niacina	5,0 mg/L
D-pantotenato de calcio	5,0 mg/L
Vitamina B-12	0,1 mg/L
Ácido 4-aminobenzoico	5,0 mg/L
Ácido tióctico	5,0 mg/L

Para preparar la solución de minerales de Wolfe, se agregó ácido nitrilotriacético a aproximadamente 500 mL de agua, ajustando el pH a 6.5 con KOH para lograr la disolución del compuesto. A continuación, se

completó el volumen a 1.0 L con el agua restante y se añadieron los demás compuestos uno a uno. La solución de minerales de Wolfe (tabla 4) fue usada como base para la solución de minerales de Wolfe modificada (tabla 5). Esta solución fue esterilizada por medio de filtración.

Tabla 4: Composición de la solución de minerales de Wolfe

Compuesto	Concentración
Ácido nitrilotriacético	1,5 g/L
MgSO ₄ x 7H ₂ O	3,0 g/L
MnSO ₄ x H ₂ O	0,5 g/L
NaCl	1,0 g/L
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,1 g/L
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,1 g/L
CaCl ₂	0,1 g/L
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,1 g/L
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,01 g/L
AlK (SO ₄) ₂ x 12H ₂ O	0,01 g/L
H ₃ BO ₃	0,01 g/L

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 g/L
--	----------

Tabla 5: Composición de la solución de minerales de Wolfe modificada

Compuesto	Concentración
Na_2SeO_3	10,0 mg/L
$\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	10,0 mg/L
$\text{NaWO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	10,0 mg/L
Solución de minerales de Wolfe	1,0 L/L

Otros medio de cultivo

- Agar tripticasa (Difco) para evaluación de posible contaminación.
- Agar de Lisogenia o LB (Difco) para la visualización de colonias de *S. oneidensis* MR-1.

4.1.3 Soluciones

Tampón fosfato salino (PBS)

La composición del tampón fosfato salino (PBS) se presenta en la tabla 6.

Tabla 6: Composición del tampón fosfato salino (PBS)

Compuesto	Concentración
NaCl	8,06 g/L
KCl	0,22 g/L
Na ₂ HPO ₄	1,44 g/L
KH ₂ PO ₄	0,24 g/L

Stock de glicerol

La composición del stock de glicerol se presenta en la tabla 7.

Tabla 7: Composición del stock de glicerol

Compuesto	Composición
Glicerol	70 mL

Agua	30 mL
------	-------

4.1.4 Reactivos y kit

- Kit LIVE/DEAD BacLight (Invitrogen)
- Kit DNeasy® UltraClean® Microbial Kit (QIAGEN)
- Reactivo de fenol Folin-Ciocalteu (Merck)
- Quant-iT™ dsDNA (Invitrogen)
- Resazurina

4.1.5 Electrodo y soportes

- Electrodo de carbono modificado con óxido de grafeno 110GPHOX (Dropsens)
- Electrodo de carbono modificado con óxido de grafeno reducido 110RGPHOX (Dropsens)
- Biofilm chip HDPE
- Electrodo de referencia Ag/AgCl
- Contraelectrodo de alambre de platino

4.1.6 Equipos

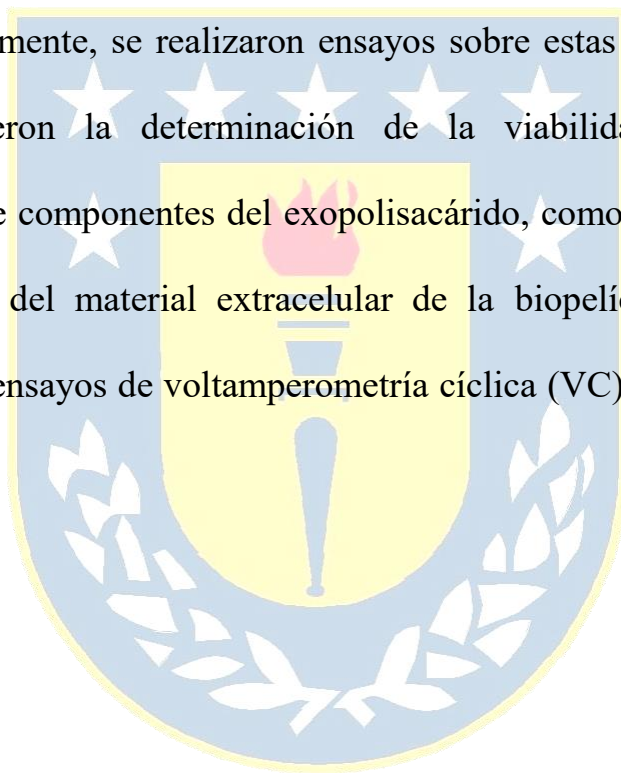
- Cámara electroforesis Power Pac 200 (Biorad)
- Termociclador Thermal Cycler 2.0 (Roche Systems)
- Microscopio Epifluorescencia BX51 (Olympus)
- Cámara de flujo PCR Workstation AC632 Series (Airclean System)
- Termobaño regulado SB3200D (InterBio Lab)
- Medidor de pH PHS 25 CW (Hilab InnovationSystems)
- Incubadora termoregurable Biochemistry Incubator BJPX-B450 (Biobase)
- Lector de placas Tecan infinite F200 Pro
- Espectrofotómetro UV-VIS Bel UV-M51
- Qubit 3.0 fluorimeter Thermo Fischer Scientific
- Potenciostato BP-300 (BioLogic)
- Cámara de Bioseguridad Nivel II ESCO AC2-451 (ESCO)

- Congelador -80°C MDF-U6086S Ultra Low Freezer (Sanyo)
- Balanza analítica AS 220/C/2 (Radwad Wagi Elektroniczne)
- Incubadora en agitación termoregurable HandyLab N- 205 (N-biotek)
- Agitador magnético termorregurable Arex (VELP)
- Baño seco Thermo Block BELL (VELP)
- Mini spin Ezee (Scilogex)
- Termobañó regulado SB3200D (InterBio Lab)



4.2 MÉTODOS

Inicialmente, se formaron biopelículas de *S. oneidensis* MR-1 ATCC® BAA-1096™ sobre soportes de óxido de grafeno (GO) y óxido de grafeno reducido (rGO). Posteriormente, se realizaron ensayos sobre estas biopelículas. Los ensayos incluyeron la determinación de la viabilidad celular y la cuantificación de componentes del exopolisacárido, como proteínas, ADNe y carbohidratos del material extracelular de la biopelícula. Además, se llevaron a cabo ensayos de voltamperometría cíclica (VC) en los electrodos colonizados.



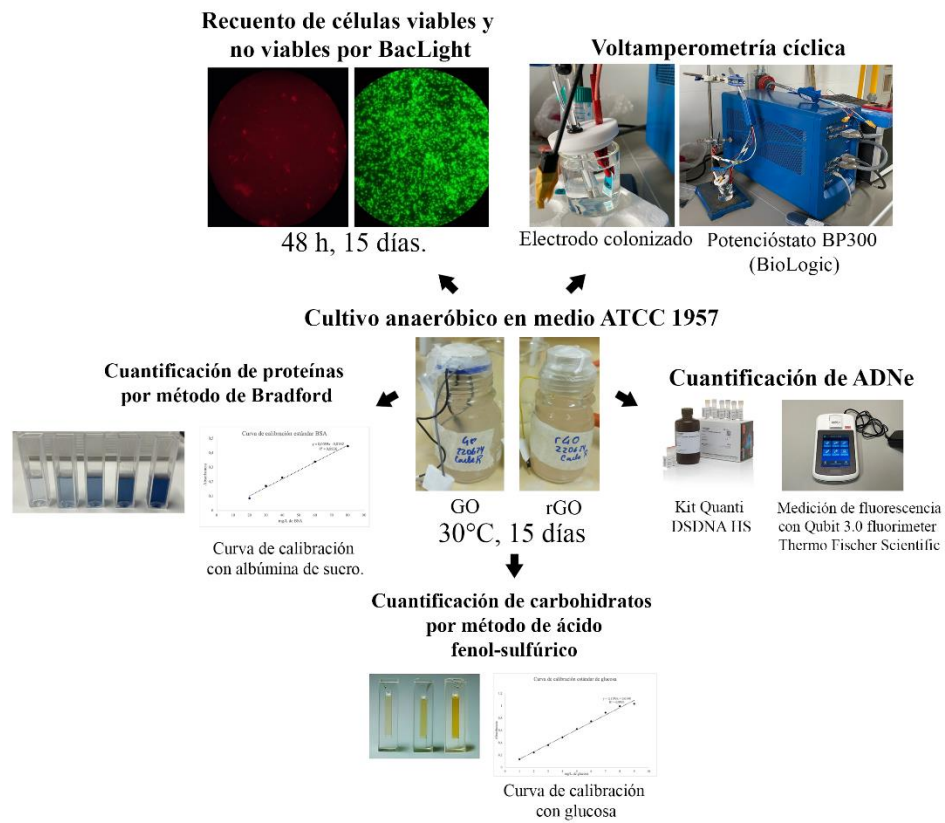


Figura 6. Esquema general de la metodología.

4.2.1 Cultivo de cepas

4.2.1.1 Activación de cepas

Previo a cada experimento, se preparó un inóculo como pre-cultivo incubando la cepa directamente desde cepario a -80°C en caldo de Lisogenia (LB) por una noche a 30°C en agitación. Posteriormente, este cultivo fue utilizado para inocular un cultivo fresco (1:100 v/v) el cual fue incubado a 30°C en agitación hasta alcanzar la fase exponencial (7 h). Este inóculo fue utilizado en todos los procedimientos descritos de acá en adelante, a excepción de que se indique lo contrario.

4.2.1.2 Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo se prepararon de acuerdo con la composición descrita para cada uno de ellos, para luego ser esterilizados en autoclave a 121°C por 15 minutos y ser almacenados a temperatura ambiente.

4.2.2 Confirmación de la identidad de la cepa

La verificación de la presencia de las cepas utilizadas se realizó mediante tinción de Gram y posterior visualización al microscopio. Sembrado en placa de agar de Lisogenia (LB) y realización de un PCR punto final con partidores específicos.

4.2.2.1 Detección de la cepa por PCR

La extracción de ADN se realizó mediante el kit DNeasy® UltraClean® Microbial Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la realización de la PCR se utilizó como control positivo *S. oneidensis* MR-1 y como control negativo *Bacillus subtilis* y *Ralstonia* sp.

Para cada ensayo, se agregó 19 µL de Máster Mix y 1 µL del ADN de la muestra para obtener un volumen final de 20 µL de mezcla de PCR. El Máster Mix se preparó agregando 4 µL de buffer; 1 µL de partidor F; 1 µL de partidor R; 1,2 µL de MgCl₂; 0,4 µL de DNTPs; 0,1 µL de enzima GoTaq; 11,3 de H₂O para PCR). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C/3 min, temperatura de desnaturalización 94°C/30 s, temperatura de hibridación de 62-57°C/30s y extensión a

72°C/40s. Se realizaron treinta ciclos para cada reacción de PCR utilizando un termociclador Termociclador BioRad T100. La amplificación del gen se confirmó por medio de la visualización en un gel de agarosa al 1,8% a 200 V durante 30 min, los geles se visualizaron bajo luz ultravioleta utilizando un sistema transiluminador de documentación de imagen de gel UVITEC.

Tabla 8: Partidores utilizados para la identificación de *Shewanella* sp.

Gen	Secuencia	Tm (°C)	Amplicón (pb)	Referencia
<i>16S rRNA</i>	5' TCAAGTCATCATGGCCCTTAC 3'	62°C	106	(Qiu et al., 2015)
	5' TACGACGAGCTTTGTGAGATTAG 3'	62°C		
<i>gyrB</i>	5'GCTTGATTGAAGTCGGTGGT 3'	58°C	100	(Schicklberger et al., 2010)
	5'CGTTTCGCTTCAGAAATGGT 3'	56°C		

4.2.3 Identificación de contaminación

Luego de la esterilización de los soportes, la presencia de contaminación por medio del sembrado desde la superficie del material a una placa con agar tripticasa, estas se incubaron durante 2 días en condiciones de aerofilia a 30°C. En caso de reportarse contaminación, se repitió el ensayo en el que el material involucrado hubiese sido utilizado.

4.2.4 Curva de crecimiento de *Shewanella oneidensis* en medio anaerobio

Se llevó a cabo una curva de crecimiento planctónico de *Shewanella oneidensis* ATCC® BAA-1096™ en un medio de cultivo anaerobio durante 15 días. Para ello, se utilizó un frasco de 200 mL con medio anaerobio, que fue inoculado con *S. oneidensis* a partir de una colonia aislada. El medio fue burbujeado con N₂ gaseoso para crear un entorno anaerobio. La incubación se realizó a 30 °C durante 15 días y se realizaron recambios de medio de forma periódica. Se tomaron muestras al tiempo inicial (t₀) y en los días consecutivos a aproximadamente la misma hora. Las mediciones de viabilidad celular se realizaron según lo descrito en la sección 4.2.6.1, y los

resultados se graficaron como células viables y no viables en función del tiempo de incubación.

4.2.5 Ensayo de formación de biopelícula sobre los diferentes soportes

Para los ensayos de formación de biopelícula se utilizaron frascos de 500 mL estériles con medio anaerobio ATCC 1957. En el caso de GO y rGO se introdujeron 15 soportes. Se montaron un total de 3 ensayos para cada uno de los materiales de estudio. Se burbujeó N₂ gaseoso para crear un ambiente anaerobio y fueron incubados a 30°C por 12 días. Se realizaron recambios de medio cada dos días y se volvió a burbujear N₂ gaseoso para crear un ambiente anaerobio. El día 12, la biopelícula se extrajo cuidadosamente de los electrodos de GO y rGO utilizando una pipeta Pasteur en un ambiente estéril. Luego, las muestras se colocaron en tubos Falcon para realizar las mediciones. Este procedimiento se repitió en tres ocasiones para los electrodos de GO y rGO para asegurar la obtención de suficiente biomasa para realizar los ensayos.

4.2.6 Ensayos de viabilidad

4.2.6.1 Recuento BacLight

Para los ensayos de viabilidad se utilizó el kit Live/Dead BacLight™ (Invitrogen) que permite diferenciar las células viables de las no viables en función de la integridad de su membrana. La solución BacLight se preparó añadiendo partes iguales de los colorantes Syto 9 y yoduro de propidio en 5 mL de agua purificada estéril. Se tomó 1 mL de cultivo de aproximadamente 20 horas de antigüedad y se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm en la minicentrífuga Eppendorf MiniSpin. El pellet obtenido se lavó con PBS y se realizaron tres diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) en PBS. Luego, se añadieron 100 μ L de cada muestra a tubos eppendorf a los que también se le añadieron 100 μ L de la solución BacLight previamente preparada y se dejaron reposar durante 15 minutos, a temperatura ambiente, en oscuridad. Transcurrido los 15 minutos, la solución de suspensión celular se montó en un filtro de policarbonato con la ayuda de una bomba de vacío. Este filtro se montó rápidamente en un portaobjetivo, y se selló con un cubreobjetos. Las muestras obtenidas fueron observadas mediante un microscopio de fluorescencia Olympus B51 con un aumento de 100X con los filtros FITC

para las células vivas, y el filtro PI para células muertas. Se utilizó como control negativo la misma cepa sometida a shock térmico. Para el recuento, sólo se consideró la dilución cuyo conteo de células por campo visual estuviese en el rango de las 30-300 células. Todas las mediciones se realizaron en triplicado.

4.2.6.2 Realización de curva de calibración BacLight

Para la curva de calibración se tomó como estándar una muestra con valores conocidos de células viables y no viables medidos previamente en 4.2.2.1. A partir de esta muestra se realizaron diluciones seriadas hasta el 10^{-10} , para estas diluciones se consideró como recuento celular la fracción correspondiente del recuento de la muestra estándar.

Se tomaron 100 μL de cada una de las diluciones obtenidas previamente y se añadieron a tubos Eppendorf a los que luego se le añadieron 100 μL de la solución BacLight preparada previamente, se incubaron durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Pasado los 15 minutos, la fluorescencia de las muestras fue leída mediante un lector de microplaca Tecan infinite F200 Pro utilizando los filtros de excitación/emisión a 485/535 nm y 485/635

nm para Syto9 y yoduro de propidio respectivamente. A partir de los datos obtenidos se realizó una curva de calibración graficando fluorescencia relativa frente a concentración de células viables y no viables.

4.2.6.3 Medición de viabilidad celular de la biopelícula

Para la medición de la viabilidad celular en los soportes, las células fueron obtenidas mediante remoción de la biopelícula con la ayuda de una pipeta Pasteur para los soportes de GO y rGO. Las muestras obtenidas fueron diluidas en 1 mL de PBS y se realizaron 3 diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) en PBS. Luego se tomó 100 μ L de cada muestra y se realizaron mediciones de fluorescencia según lo indicado en 4.2.6.1. Los datos de fluorescencia obtenidos fueron comparados con los de la curva de calibración para obtener la concentración de la muestra. Finalmente, se realizaron las conversiones necesarias para expresar el resultado en células viables y no viables por cm^2 de soporte.

4.2.7 Extracción del EPS

La extracción del EPS se realizó mediante dos protocolos: extracción química con el método de Formamida e hidróxido de sodio (4.2.7.1) y extracción física con el método de calentamiento (4.2.7.2). Previo a cada extracción del EPS se extrajo la biopelícula de los soportes por medio de una pipeta Pasteur para los soportes de GO y rGO.

4.2.7.1 Extracción de EPS por método de formamida e hidróxido de sodio

Se añadió 0,3 mL de formamida por mL de solución, se agitó la solución suavemente a mano y se dejó repostar en refrigeración durante 1 h. Posteriormente, se añadieron 20 mL de NaOH 1 M, se agitó suavemente, y se dejó reposar durante 3 h en refrigeración. La solución obtenida se transfirió a tubos Falcon de 50 mL para su centrifugación. Estos tubos se centrifugaron a 4000 x g a 4°C durante 20 minutos. Finalmente, se descartó el pellet y recolectó el sobrenadante en nuevos tubos. La solución final fue filtrada por filtros de 0,22 µM. La solución de EPS obtenida fue almacenada a -20°C para posteriores mediciones.

4.2.7.2 Extracción de EPS por método de calentamiento

Las muestras fueron incubadas a 60°C durante 30 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 20.000 x g por 20 minutos a 4°C en tres ocasiones, descartando el pellet. Finalmente, el sobrenadante fue filtrado usando filtros de 0,22 µM. La solución de EPS obtenida fue almacenada a -20°C para posteriores mediciones.

4.2.8 Cuantificación de proteínas

4.2.8.1 Curva de calibración

Para la cuantificación de proteínas se realizó primeramente curvas de calibración con muestras de concentración conocida de albúmina de suero bovino como patrón. Para esto, se realizó primeramente un stock de dos estándares de BSA en agua con concentración de 100 mg/mL y 10 mg/mL, a partir de los cuales se prepararon diluciones de 20, 40, 60, 80 mg/mL y diluciones de 2, 4, 6, 8 mg/mL. Las muestras se agitaron durante 1 hora antes de la medición. Las curvas de calibración se realizaron mediante el protocolo detallado en 4.2.5.5.2. A partir de los valores de absorbancia obtenidos se realizaron curvas para los cuales se determinó el rango lineal que permitió cuantificar la concentración de proteínas de las muestras problema.

4.2.8.2 Cuantificación de proteínas por método de Lowry

La cuantificación de proteínas se realizó según el método de Lowry (Chen et al., 2024; Lowry et al., 1951). Las muestras estándar y muestras problema fueron agitadas 1h previo a comenzar los ensayos. Posteriormente, se tomó 0,5 mL de cada muestra y se añadió a un tubo de 10 mL, a los cuales se le añadió también 0,7 mL de la solución de Lowry preparada en 3.1.6.8. Estos tubos se vortexearon suavemente para luego incubarlos por 20 minutos a temperatura ambiente. Antes de terminar el tiempo de incubación se preparó el reactivo de Folin según lo indicado en 3.1.6.9, y, al finalizar el tiempo de incubación se agregó 0,1 mL de este reactivo a cada tubo. Las muestras se vortexearon suavemente y se incubaron una vez más, por 30 minutos, a temperatura ambiente en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación, se vortexearon suavemente y se transfirieron a las cubetas para la medición en espectrofotómetro. Se usó agua destilada como blanco.

Se prepararon curvas de calibración midiendo la absorbancia de las muestras de 0-100 mg/mL a 750 nm, y las muestras de 0-20mg/mL a 550 nm usando un espectrofotómetro UV-VIS Bel UV-M51. La concentración de proteínas

de las muestras de EPS fue calculada interpolando los resultados de absorbancia obtenidos para cada una de las muestras con la zona lineal de las curvas de calibración previamente construidas. Se realizaron los cálculos necesarios para expresar la concentración de proteínas en mg/ (g de célula).

4.2.9 Cuantificación de carbohidratos

4.2.9.1 Curva de calibración

Para la determinación de azúcares totales primero se procedió a preparar la curva de calibración usando glucosa como patrón. Se prepararon soluciones de glucosa de concentraciones desde 0.01 a 1 mg/mL. Las curvas de calibración se realizaron graficando las concentraciones de la muestra patrón versus la absorbancia obtenida mediante el protocolo detallado en 4.2.5.6.2. A partir de estos resultados se determinó el rango lineal que permitió cuantificar la concentración de carbohidratos de las muestras problema.

4.2.9.2 Cuantificación de carbohidratos por método de fenol-ácido sulfúrico

La cuantificación de carbohidratos se realizó según el método de fenol-ácido sulfúrico (Masuko et al., 2005; Yan et al., 2021). Se tomó 1 ml de cada solución estándar y muestra problema y se le adicionó 1 ml de fenol al 5% más 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se agitaron por 10 minutos y luego se le colocó en un baño de agua a 30°C por 20 min. Finalmente, se procedió a leer la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS Bel UV-M51 a 490 nm. Se usó agua destilada como blanco. La concentración de carbohidratos de las muestras de EPS fue calculada interpolando los resultados de absorbancia obtenidos para cada una de las muestras con la zona lineal de las curvas de calibración previamente construidas. Se realizaron los cálculos necesarios para expresar la concentración de proteínas en mg/ (g de célula).

4.2.10 Cuantificación de ADNe

Se preparó un máster mix agregando el reactivo fluorométrico Quant-iT™ dsDNA HS y buffer de dilución Quant-iT™ dsDNA HS buffer en proporción volumétrica 1:200, ambos componentes del Kit Quanti DSDNA

HS (Invitrogen™). Se agregó 1 o 10 μL (dependiendo de la dilución escogida) de cada muestra y de cada estándar λDNA del Kit a un nuevo tubo y se añadió máster mix hasta alcanzar un volumen final de 200 μL . Las muestras se vortexearon y se incubaron durante 2 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a calibrar el equipo utilizando las muestras estándar λDNA . Una vez calibrado el equipo, se procedió a realizar la medición de fluorescencia utilizando Qubit 3.0 fluorimeter Thermo Fischer Scientific. El equipo entrega los datos de concentración de ADNe al compararlos con los datos de las muestras estándar de concentración conocida. Se realizaron los cálculos necesarios para expresar la concentración de ADNe en $\text{mg}/(\text{g de célula})$.

4.2.11 Voltamperometría cíclica

4.2.11.1 Montaje del ensayo

Para el ensayo de voltamperometría cíclica, se prepararon viales nuevos de 5 mL. En cada vial, se introdujeron 4,8 mL de medio anaerobio que contenía 20 mM de lactato de sodio, 20 mM de formiato de sodio y 20 mM de fumarato

de sodio. Se insertó un electrodo sujeto a la tapa en cada vial y se inoculó con aproximadamente 0,1 mL de un cultivo de *S. oneidensis* del día anterior. Se burbujeó CO₂ gaseoso para mantener un ambiente anaerobio hasta que el indicador de anaerobiosis cambió de color. Los viales se incubaron durante 12 días, realizando cambios de medio cada dos días. Al inicio y al final del ensayo, se llevaron a cabo recuentos celulares utilizando BacLight. Tras los 12 días, los viales se almacenaron en una cámara fría hasta la realización de la medición de voltamperometría cíclica.

4.2.11.2 Medición de voltamperometría cíclica

Las mediciones electroquímicas se realizaron utilizando un potenciostato BP-300 (BioLogic). Se utilizó una celda electroquímica con 3 electrodos, alambre de platino como contra electrodo, Ag/AgCl como electrodo de referencia y los electrodos de GO y rGO como electrodos de trabajo.

Las primeras mediciones se realizaron sobre los electrodos estériles en PBS purgado previamente con N₂ gaseoso. Los parámetros fueron E₁: 0,500 V, E₂: -0,800 V, velocidad de barrido 10 mV/s y las mediciones se realizaron en triplicado. Los datos fueron analizados mediante el software EC-Lab.

Las segundas mediciones se realizaron sobre los electrodos colonizados con biopelícula primeramente en PBS, y posteriormente en PBS con lactato 20 mM. Los parámetros fueron E_1 : 0,500 V, E_2 : -0,800 V, velocidad de barrido 10 mV/s y las mediciones se realizaron en triplicado. Los datos fueron analizados mediante el software EC-Lab y procesados utilizando el software OriginPro 2024B. En primer lugar, se aplicó un suavizado de los datos mediante un promedio adyacente con una ventana de 3 puntos para reducir el ruido. Posteriormente, se procedió a la sustracción de la línea base utilizando la segunda derivada, implementando el método de interpolación B-spline. Este enfoque permitió una corrección precisa de la señal, mejorando la resolución de los picos electroquímicos y optimizando la interpretación de los resultados.

4.2.12 Análisis estadísticos

Los datos de las mediciones de proteínas, carbohidratos y ADN extracelular fueron procesados utilizando el test T para determinar los valores de p y el tamaño del efecto, lo que permitió evaluar las diferencias significativas entre los grupos experimentales. Por otro lado, los datos de viabilidad celular al día

15, viabilidad a las 48 horas y la razón proteínas/carbohidratos también fueron analizados mediante el test T, con el fin de identificar variaciones significativas entre los diferentes tratamientos y condiciones. Para ambos análisis estadísticos, se consideró un valor de $p < 0.05$ como indicativo de significancia estadística. Se eligió este test porque los conjuntos de datos correspondían a variables cuantitativas continuas obtenidas bajo condiciones experimentales comparables, y los análisis preliminares confirmaron que seguían una distribución normal con varianzas homogéneas (Ruxton, 2006).

4.2.13 Eliminación de muestras biológicas

Las muestras biológicas utilizadas fueron eliminadas por medio de MATPEL, de acuerdo con el protocolo de eliminación de desperdicios biológicos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

5 RESULTADOS

5.1 Confirmación de la identidad de la cepa

Antes de cada ensayo, se verificó la identidad de la cepa utilizando tres métodos: observación macroscópica de las colonias en agar LB, tinción de Gram y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la figura 7 se pueden observar colonias de una coloración anaranjada típica de *Shewanella* sp. Las colonias son redondeadas, con bordes lisos, de tamaño medio y aspecto brillante. La amplificación de los genes *16S rRNA* y *gyrB*, marcadores específicos de *S. oneidensis*, se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 8). Los productos de PCR tienen el tamaño esperado: 106 pb para *16S rRNA* y 100 pb para *gyrB*. Estos resultados confirmaron que la cepa utilizada correspondía a *S. oneidensis*.

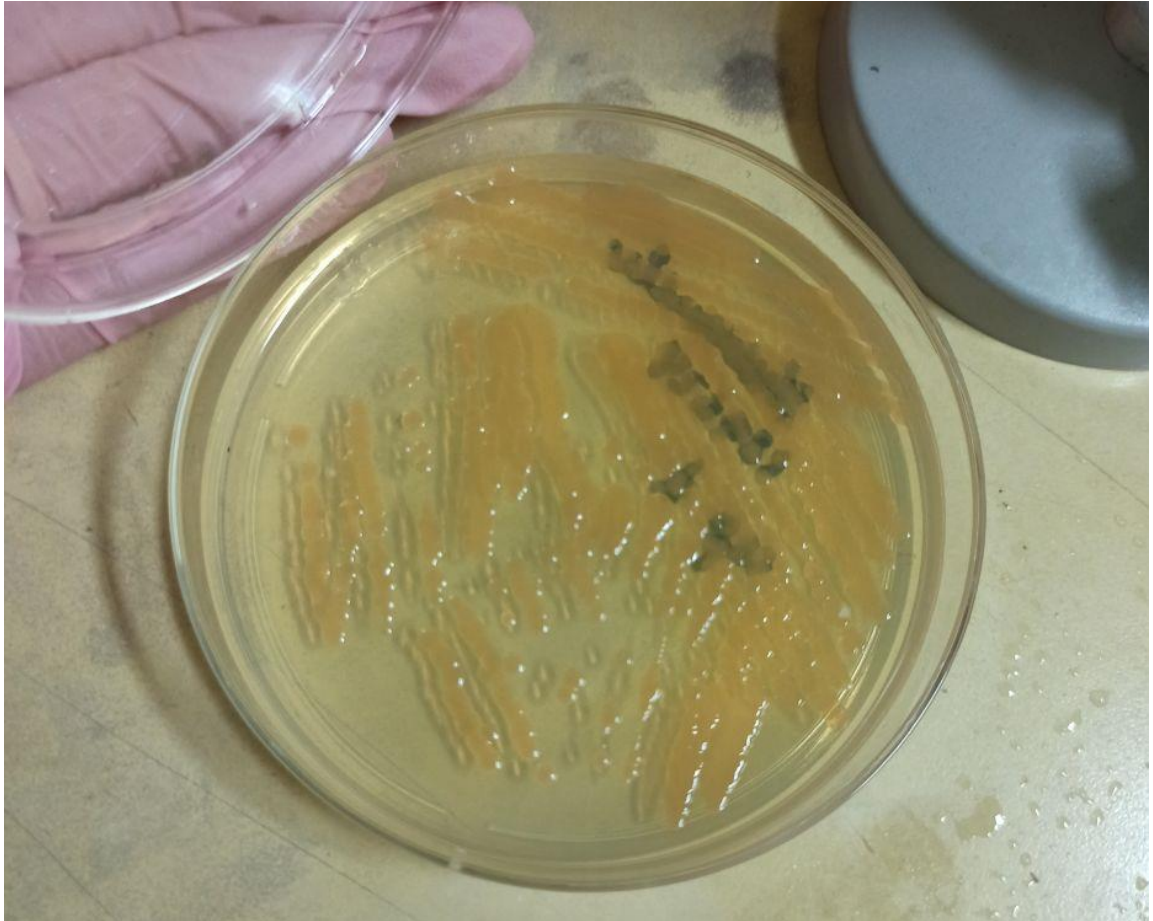


Figura 7. Colonias de la cepa *Shewanella oneidensis* TCC® BAA-1096™ en agar LB.



Figura 8. Detección de los genes 16S rRNA y gyrB de *S. oneidensis*. Gel de agarosa al 1,8% donde los carriles del 1 al 4 corresponden a PCR para el gen *16S rRNA*, y carriles del 6 al 9 corresponden a PCR para el gen *gyrB*. Carriles 1, 2, 6 y 7: colonias anaranjadas de *S. oneidensis*. Carriles 3 y 8: control negativo *B. subtilis*. Carriles 4 y 9: blanco, sin ADN. Carriles 5 y 10: marcador de peso molecular.

5.2 Curva de crecimiento platónico de *Shewanella oneidensis* MR-1 en medio anaerobio

El crecimiento de *S. oneidensis* en medio anaerobio a 30 °C se analizó mediante el recuento de células viables y no viables (figura 9). La figura 10 muestra la curva de crecimiento en medio anaerobio con fumarato como aceptor terminal de electrones.

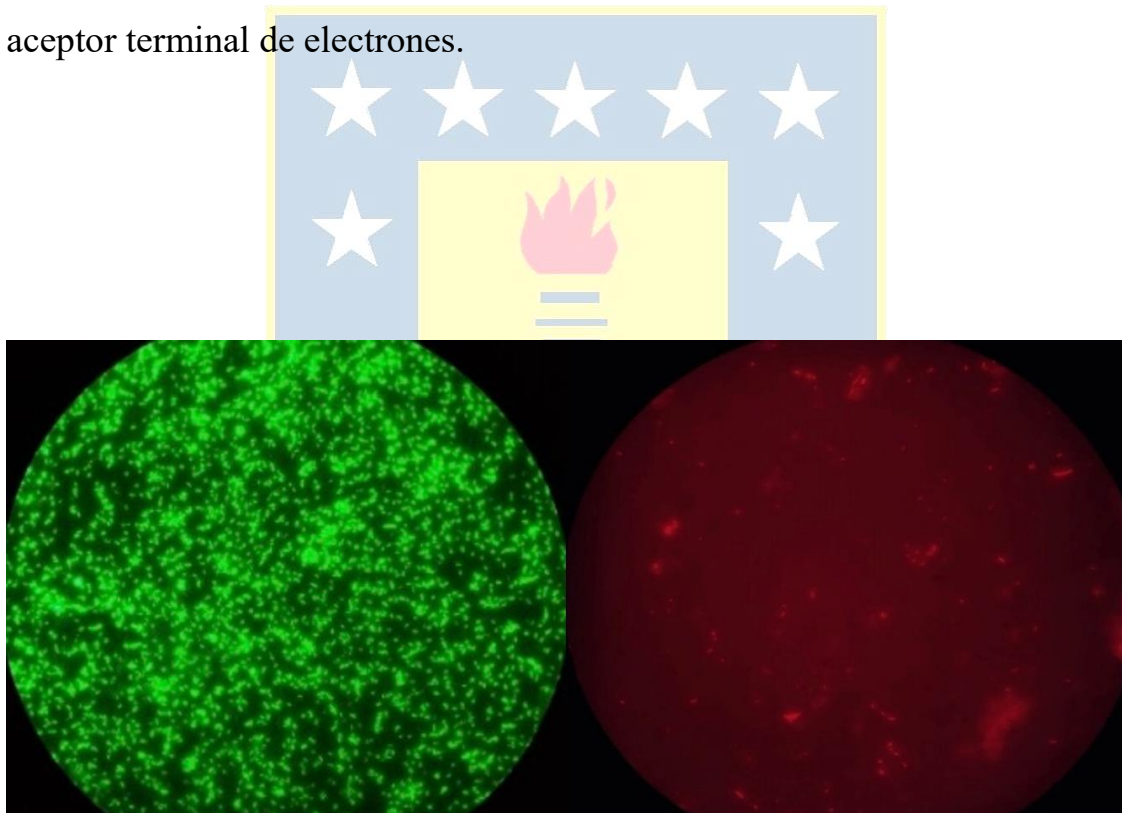


Figura 9. Visualización de células viables y no viables de *Shewanella oneidensis* ATCC® BAA-1096™ por microscopía de epifluorescencia utilizando LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability Kit. En verde se visualizan células viables, y en rojo células no viables.

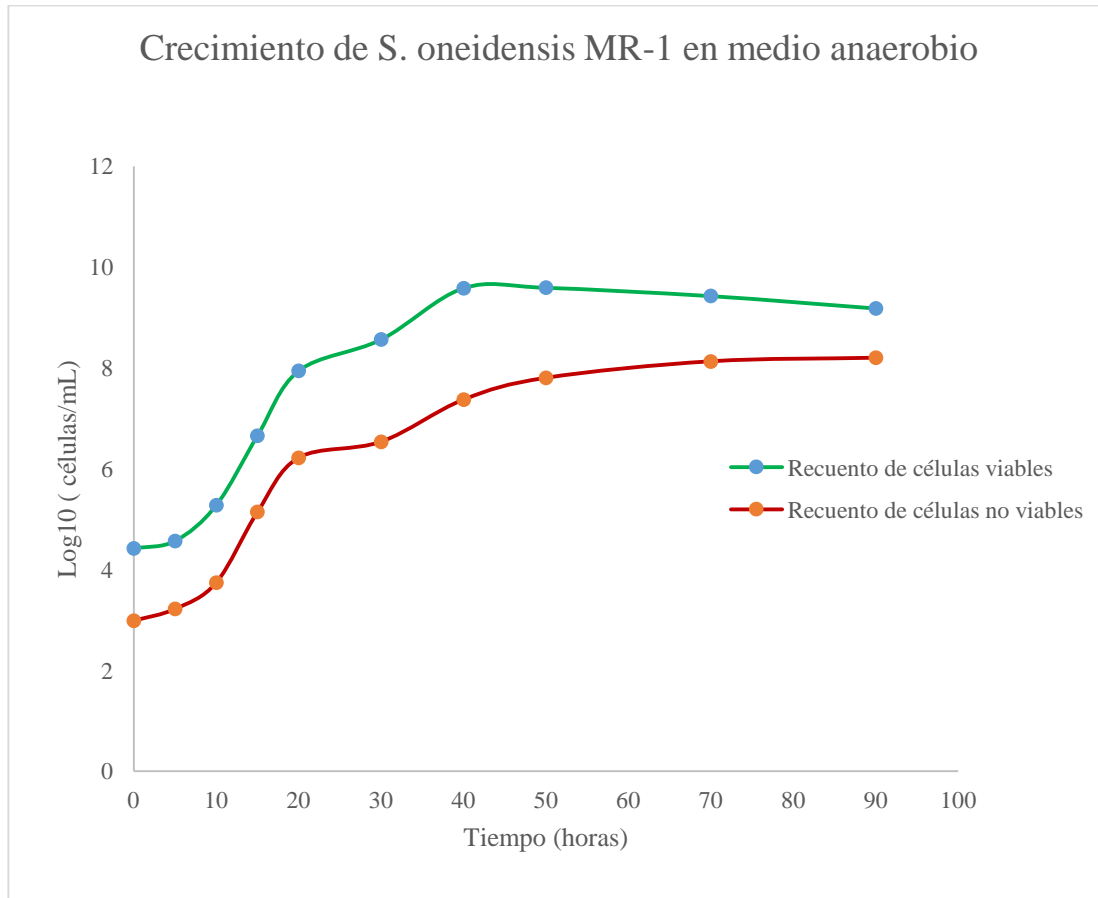


Figura 10. Gráfica de crecimiento plantónico de *Shewanella oneidensis* TCC® BAA-1096™ en medio anaerobio a 30° durante 90 horas. Recuento de células viables (verde) y no viables (rojo) de cultivo anaerobio de *S. oneidensis* a 30° C durante 90 horas.

5.3 Determinación de la viabilidad de las biopelículas de *Shewanella oneidensis* MR-1 sobre los soportes de GO y rGO

Se llevó a cabo un cultivo anaerobio utilizando los diferentes soportes durante un período de 15 días, como se ilustra en la figura 11. Se determinó el porcentaje de viabilidad celular de las biopelículas desarrolladas sobre los soportes GO y rGO. Las figuras 11 y 12 presentan los porcentajes de viabilidad correspondientes a las 48 horas y al día 15 de incubación. A las 48 horas, se observó que la mayor viabilidad celular se registró en los soportes de GO, con aproximadamente un 42%. En contraste, la menor viabilidad se encontró en los soportes de rGO, alcanzando aproximadamente un 24%. A los 15 días, se observó que la mayor viabilidad celular se registró en los soportes de GO, con aproximadamente un 86%.

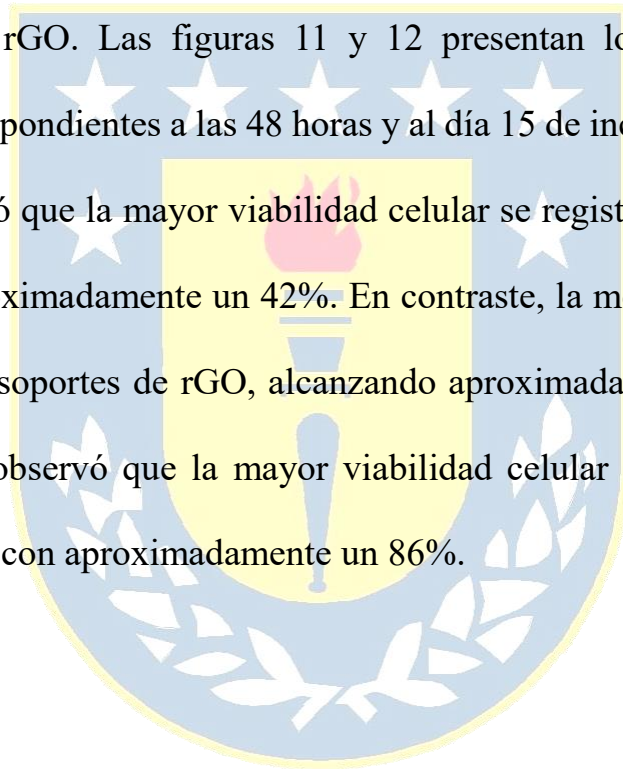




Figura 11. Montaje del ensayo sobre biopelículas para el análisis de viabilidad, proteínas, carbohidratos y ADN extracelular. Esta figura ilustra la configuración experimental utilizada para evaluar las diversas características de las biopelículas en los soportes GO y rGO.

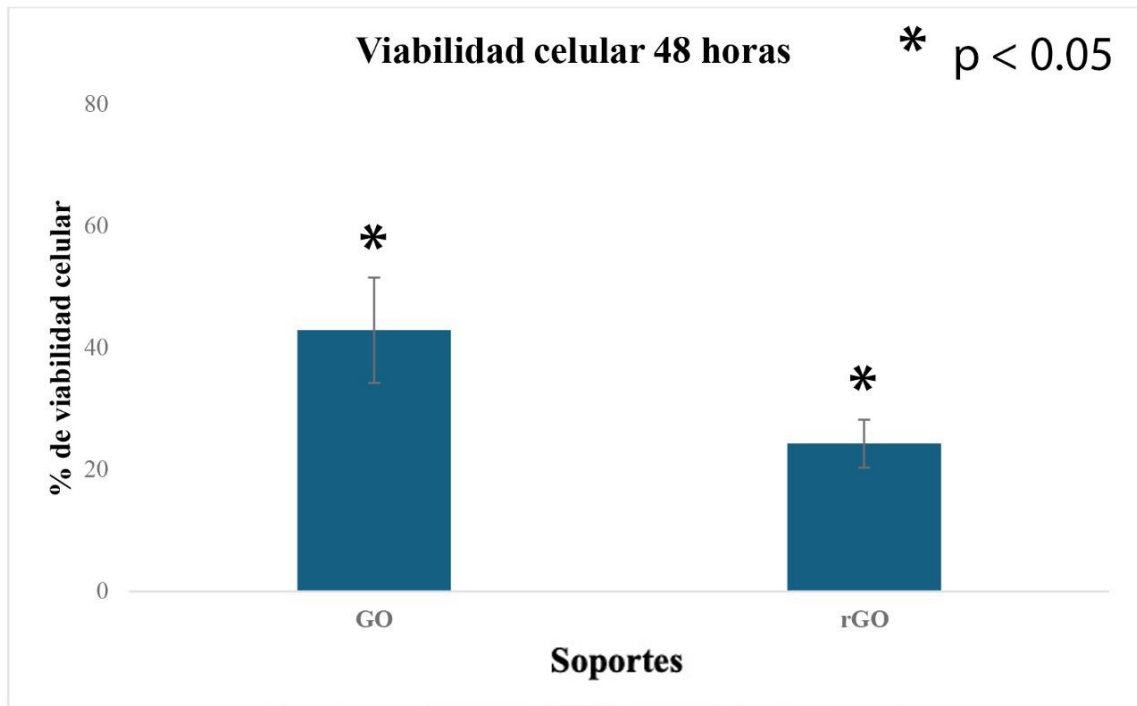


Figura 12. Viabilidad celular a las 48 h de las biopelículas de *S. oneidensis* MR-1 en los soportes GO y rGO. Las barras azules representan el promedio de los datos por categoría, mientras que las líneas verticales representan la desviación estándar de los datos. (*): Indica un p-valor menor a 0.05, lo que sugiere que la diferencia observada es estadísticamente significativa (determinado mediante el test T).

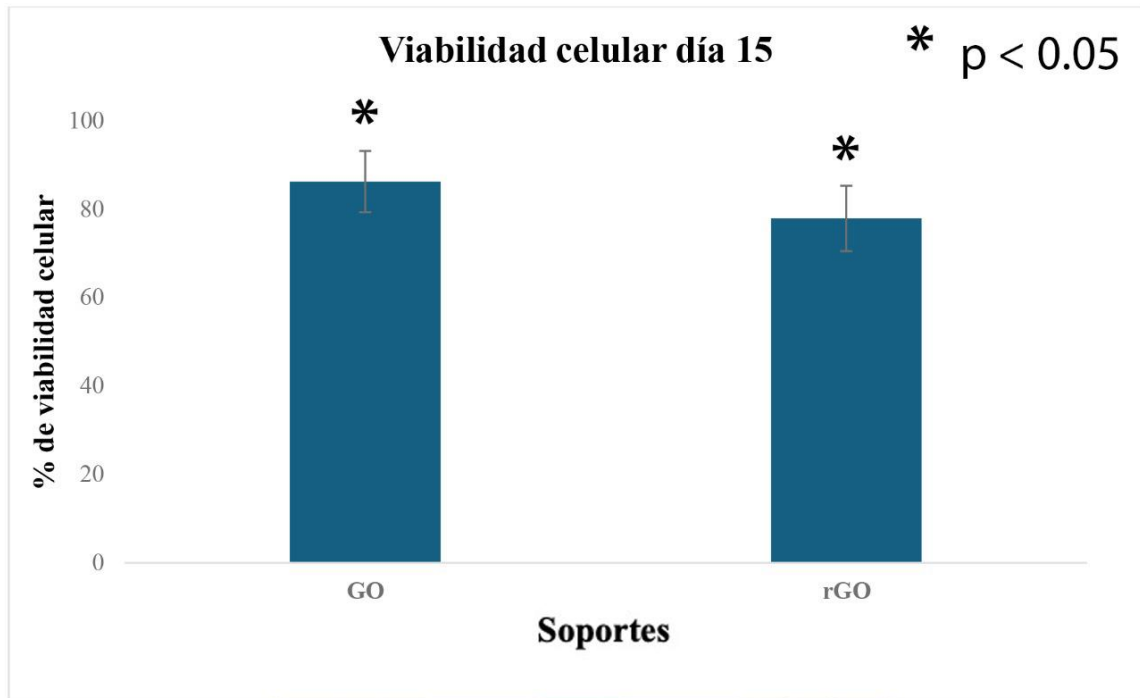


Figura 13. Viabilidad celular a los 15 días de las biopelículas de *S. oneidensis* MR-1 en los soportes GO y rGO. Las barras azules representan el promedio de los datos por categoría, mientras que las líneas verticales representan la desviación estándar de los datos. (*): Indica un p-valor menor a 0.05, lo que sugiere que la diferencia observada es estadísticamente significativa (determinado mediante el test T).

5.4 Determinación de la concentración de proteínas del EPS de biopelículas de *Shewanella oneidensis* MR-1 desarrolladas sobre GO y rGO

Se cuantificaron las proteínas de las biopelículas desarrolladas sobre los soportes de GO y rGO, utilizando el método de Bradford. Para ello, se realizó una curva de calibración, que se presenta en la figura 14. Se obtuvo una linealidad significativa, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,99. A partir de esta curva, se interpolaron los resultados de absorbancia para determinar la concentración de proteínas en cada muestra, expresándola finalmente en mg/g de biopelícula. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 15. Se registró una mayor concentración de proteínas en las biopelículas desarrolladas sobre los soportes de rGO, con un valor de $14,89 \pm 2,48$ mg/g de biopelícula húmeda, en comparación con las biopelículas formadas sobre los soportes de GO, que presentaron una concentración de $11,84 \pm 1,71$ mg/g de biopelícula húmeda.

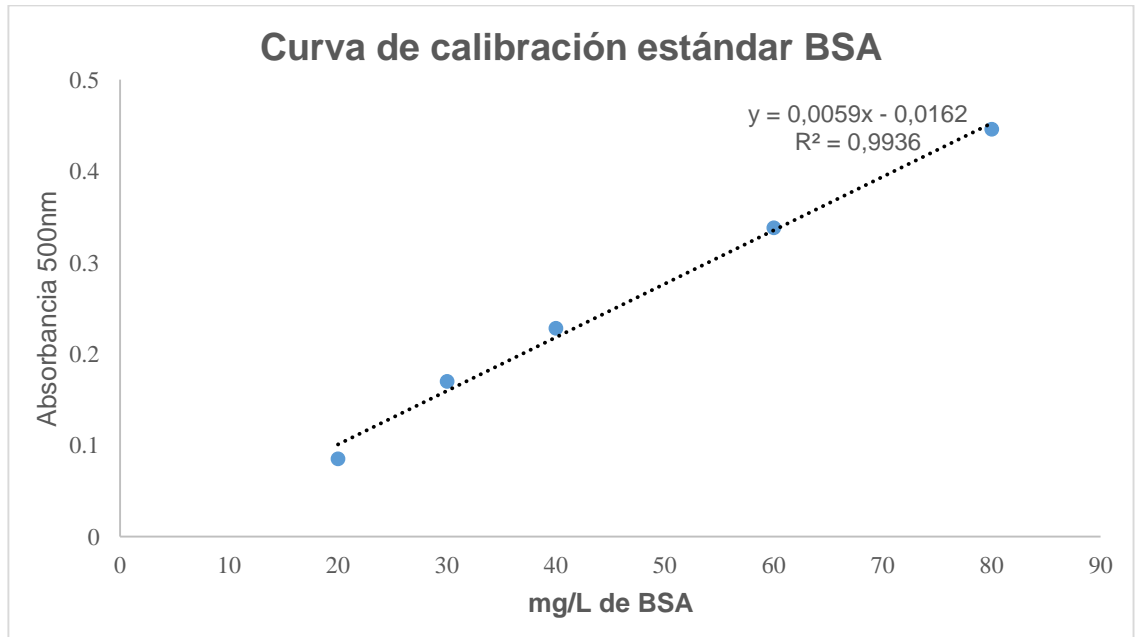


Figura 14. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas utilizando el método de Bradford. La gráfica muestra la relación lineal entre la concentración de proteínas (mg/mL) y la absorbancia medida a 500 nm. Se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 0,99, indicando una excelente linealidad en la respuesta. Esta curva se utilizó para interpolar las concentraciones de proteínas en las biopelículas desarrolladas sobre los soportes de GO y rGO.

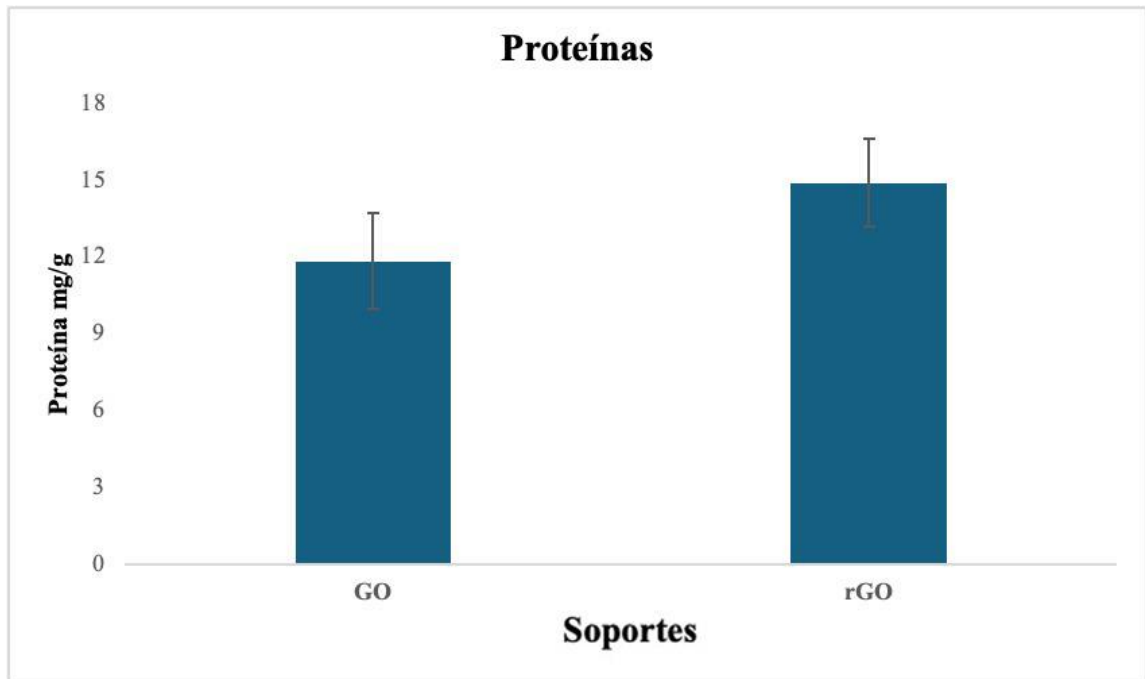


Figura 15. Concentración de proteínas en las biopelículas desarrolladas sobre los soportes de GO y rGO. Los valores se expresan en mg de proteínas por gramo de peso húmedo de biopelícula. Las barras azules representan el promedio de los datos por categoría, mientras que las líneas verticales representan la desviación estándar de los datos.

5.5 Determinación de la concentración de carbohidratos del EPS de biopelículas de *Shewanella oneidensis* MR-1 desarrolladas sobre GO y rGO

Se cuantificaron los carbohidratos presentes en las biopelículas desarrolladas sobre los soportes de GO y rGO empleando el método de fenol ácido sulfúrico. Para ello, se elaboró una curva de calibración que se muestra en la figura 16, la cual presentó una linealidad notable, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,99. A partir de esta curva, se interpolaron los datos de absorbancia para determinar la concentración de carbohidratos en cada muestra, expresándola finalmente en mg de carbohidratos por gramo de biopelícula. Los resultados obtenidos se ilustran en la figura 17. Se observó una mayor concentración de carbohidratos en las biopelículas desarrolladas sobre los soportes de GO, con un valor de $11,69 \pm 1,74$ mg/g de biopelícula húmeda, en comparación con las biopelículas formadas sobre los soportes de rGO, que mostraron una concentración de $8,57 \pm 2,02$ mg de carbohidratos por gramo de biopelícula húmeda.

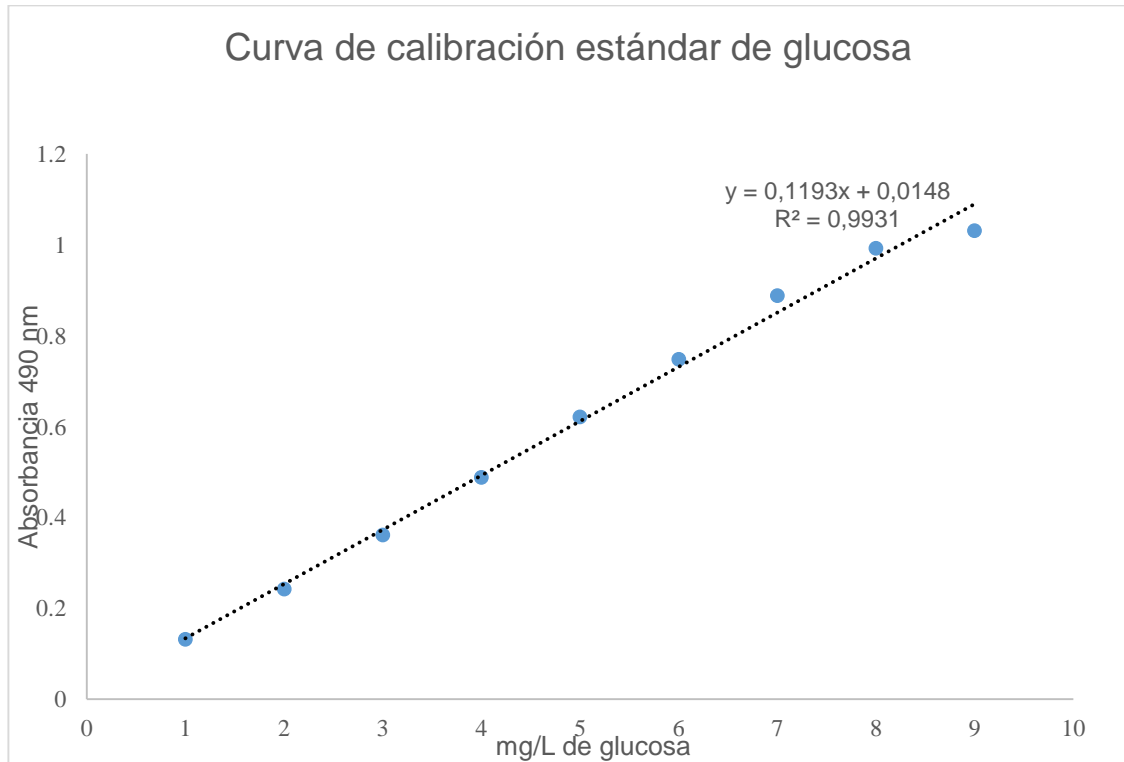


Figure 16. Curva de calibración para la cuantificación de carbohidratos mediante el método de fenol ácido sulfúrico. La gráfica muestra la relación lineal entre la concentración de carbohidratos (mg/mL) y la absorbancia medida a 490 nm. Se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 0,99, indicando una excelente linealidad en la respuesta. Esta curva se utilizó para interpolar las concentraciones de carbohidratos en las biopelículas desarrolladas sobre los soportes de GO y rGO.

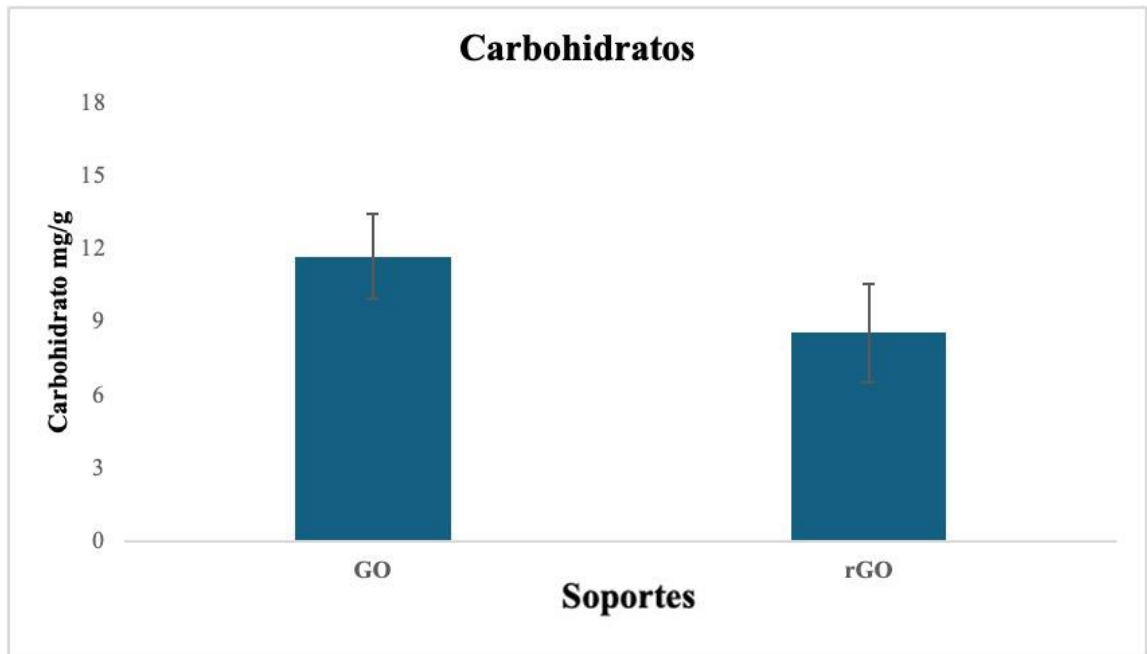


Figura 17. Concentración de carbohidratos en las biopelículas desarrolladas sobre los soportes de GO y rGO. Los valores se expresan en mg de carbohidratos por gramo de peso húmedo de biopelícula. Las barras azules representan el promedio de los datos por categoría, mientras que las líneas verticales representan la desviación estándar de los datos.

5.6 Determinación de la concentración de la razón de proteínas versus carbohidratos (P/C) del EPS de biopelículas de *Shewanella oneidensis* MR-1 desarrolladas sobre GO y rGO

Se determinó la razón entre proteínas y carbohidratos de las diferentes biopelículas desarrolladas sobre los soportes de GO y rGO. Este análisis permite evaluar la relación entre ambos componentes en las biopelículas, lo cual es esencial para comprender mejor su composición y potencial funcional en aplicaciones biotecnológicas. Los resultados se muestran en la figura 18. Se registró una mayor tasa de proteínas por carbohidratos (P/C) en las biopelículas desarrolladas sobre los soportes de rGO, con un valor de $1,76 \pm 0,20$ en comparación con las biopelículas formadas sobre los soportes de GO, que presentaron una tasa de $1,27 \pm 0,85$ g de proteína/g de carbohidrato.

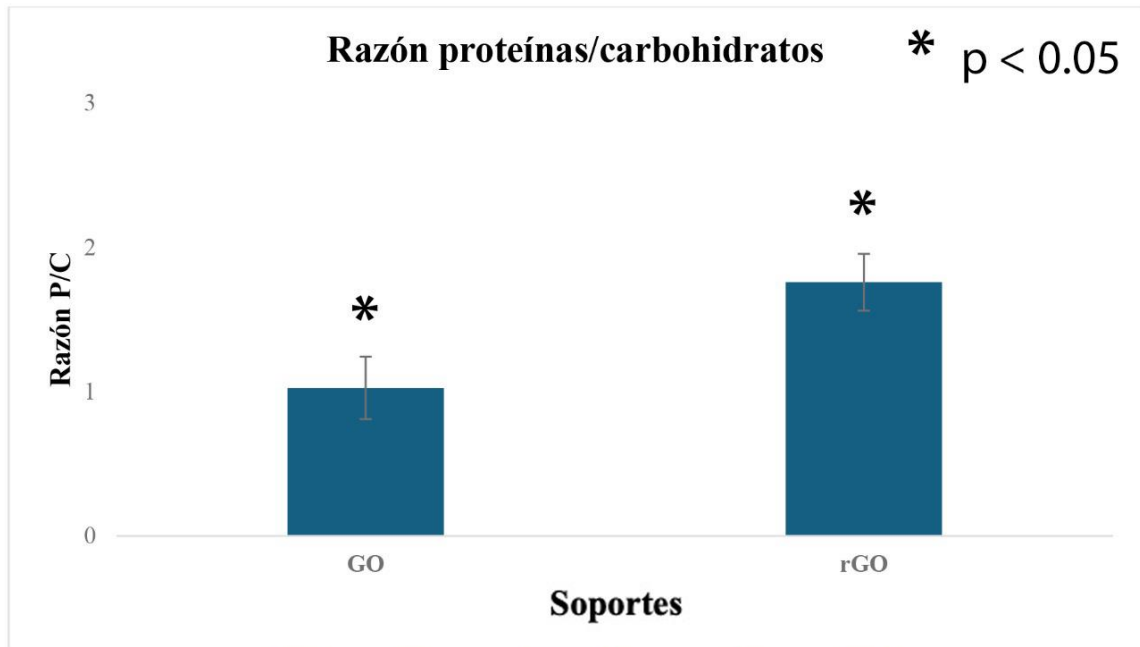
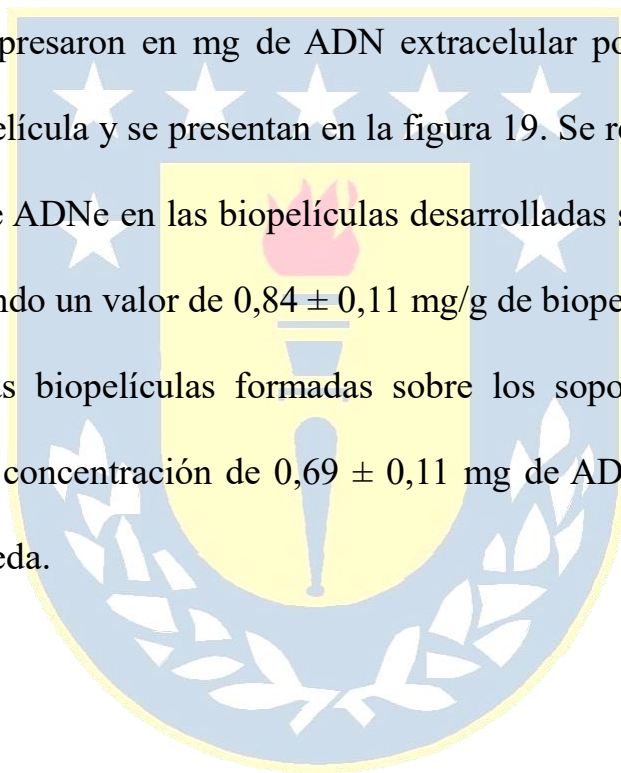


Figure 18. Razón de proteínas/carbohidratos (P/C) de las SPEs de las biopelículas desarrolladas sobre los soportes de GO y rGO. Las barras azules representan el promedio de los datos por categoría, mientras que las líneas verticales representan la desviación estándar de los datos. (*): Indica una p-valor menor a 0.05, lo que sugiere que la diferencia observada es estadísticamente significativa (determinado mediante el test T).

5.7 Determinación de la concentración de ADN extracelular (ADNe) del EPS de biopelículas de *Shewanella oneidensis* MR-1 desarrolladas sobre GO y rGO

Se cuantificó el ADN extracelular del exopolisacárido obtenido a partir de las biopelículas desarrolladas sobre los soportes de GO y rGO. Los resultados se expresaron en mg de ADN extracelular por gramo de peso húmedo de biopelícula y se presentan en la figura 19. Se registró una mayor concentración de ADNe en las biopelículas desarrolladas sobre los soportes de rGO, alcanzando un valor de $0,84 \pm 0,11$ mg/g de biopelícula húmeda, en contraste con las biopelículas formadas sobre los soportes de GO, que presentaron una concentración de $0,69 \pm 0,11$ mg de ADNe por gramo de biopelícula húmeda.



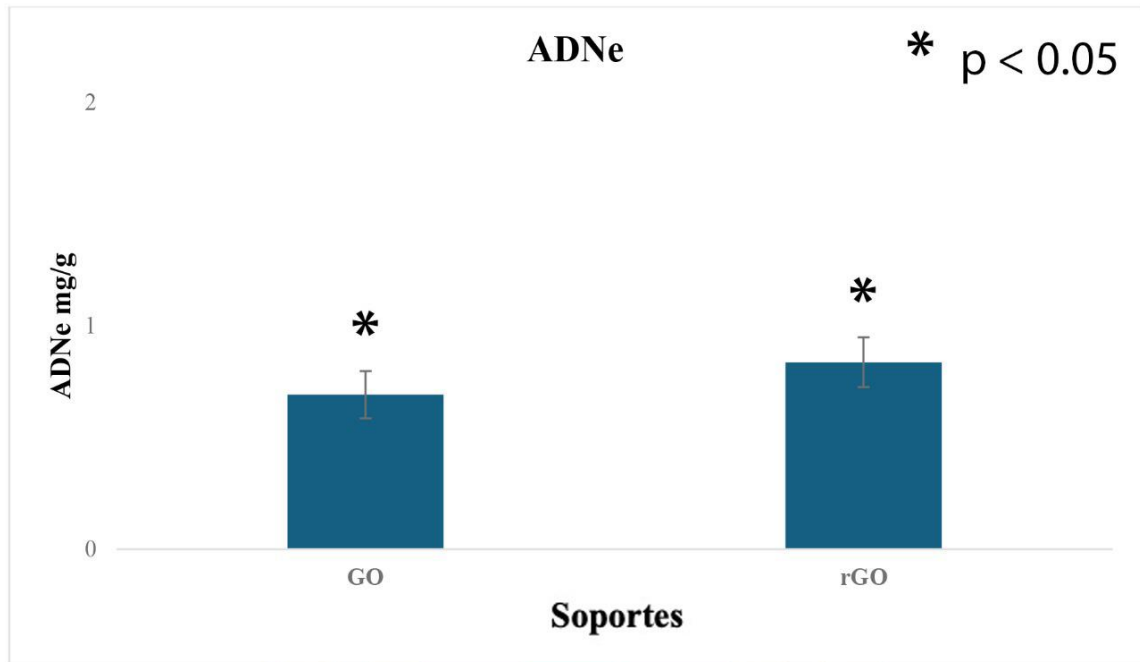


Figura 19. Concentración de ADN extracelular del EPS obtenido de las biopelículas desarrolladas sobre los soportes de GO y rGO. Los resultados se expresan en mg de ADN por gramo de peso húmedo de biopelícula. Las barras azules representan el promedio de los datos por categoría, mientras que las líneas verticales representan la desviación estándar de los datos. (*): Indica un p-valor menor a 0.05, lo que sugiere que la diferencia observada es estadísticamente significativa (determinado mediante el test T).

5.8 Análisis de voltamperometría cíclica (VC) sobre soportes de GO y rGO colonizados con *Shewanella oneidensis* MR-1

Para los análisis de voltamperometría cíclica se llevó a cabo un nuevo ensayo en frascos de 5 mL en los que se insertó en cada uno soportes de GO y rGO durante 15 días como se ilustra en la figura 20. Con base en este ensayo, se extrajeron cuidadosamente los soportes a los 15 días de incubación para llevar a cabo los ensayos de voltamperometría cíclica. Los resultados del primer voltamograma obtenido a 10 mV/s para los soportes de GO colonizados con *Shewanella oneidensis* MR-1 se presentan en la figura 21. El análisis de la primera derivada del voltamograma obtenido con GO revela la existencia de un centro redox, con un pico de oxidación alrededor de -0,298 V respecto a Ag/AgCl y un pico de reducción aproximadamente a -0,439 V respecto a Ag/AgCl. Además, se identifica un pico de oxidación adicional cerca de 0,401 V respecto a Ag/AgC. Por otro lado, durante el ensayo de voltamperometría cíclica realizado sobre biopelículas de rGO (figura 22), se observó un pico anódico (pico de oxidación) localizado en -0,2 V en relación con Ag/AgCl, así como un pico catódico (pico de reducción) ubicado en -0,38V respecto a Ag/AgCl.



Figura 20. Montaje del ensayo sobre soportes para el análisis de voltamperometría cíclica. En la imagen se muestran los soportes de rGO, mientras que el ensayo con soportes de GO se llevó a cabo de manera análoga.

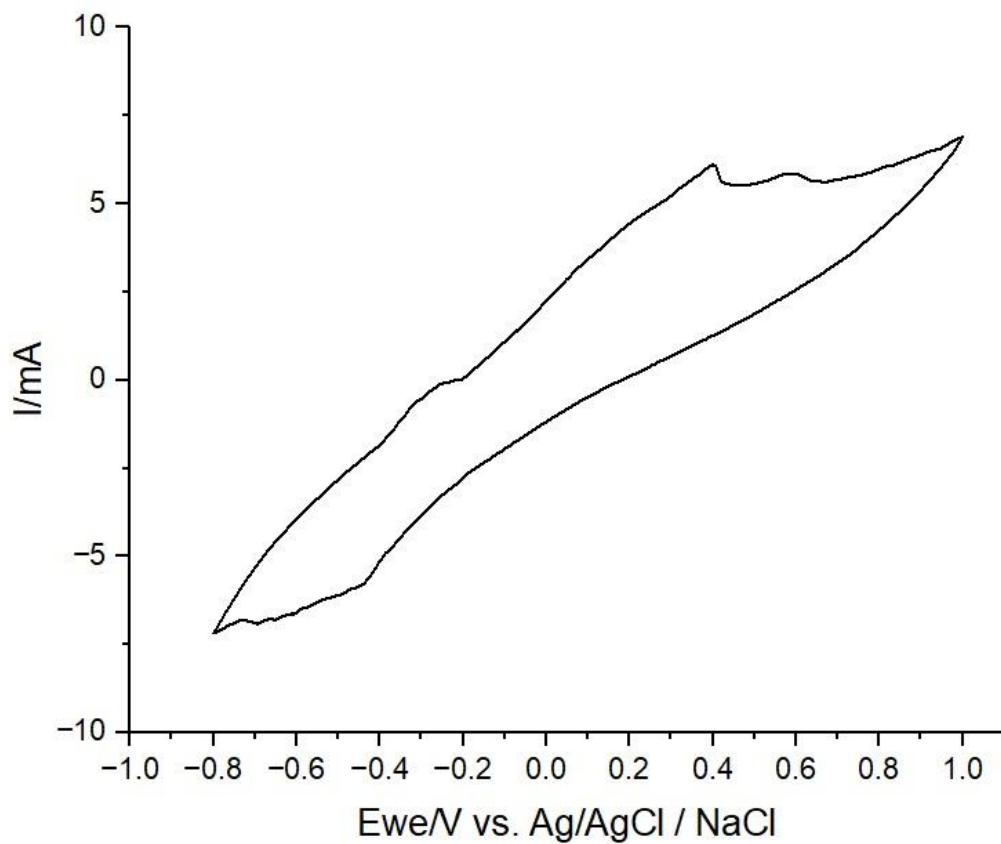


Figura 21. Voltamograma cíclico para biopelículas de *Shewanella oneidensis* MR-1 sobre soportes de GO. Este voltamograma fue obtenido en condiciones “recambio” utilizando lactato 20mM y usando una velocidad de barrido de 10 mV/s.

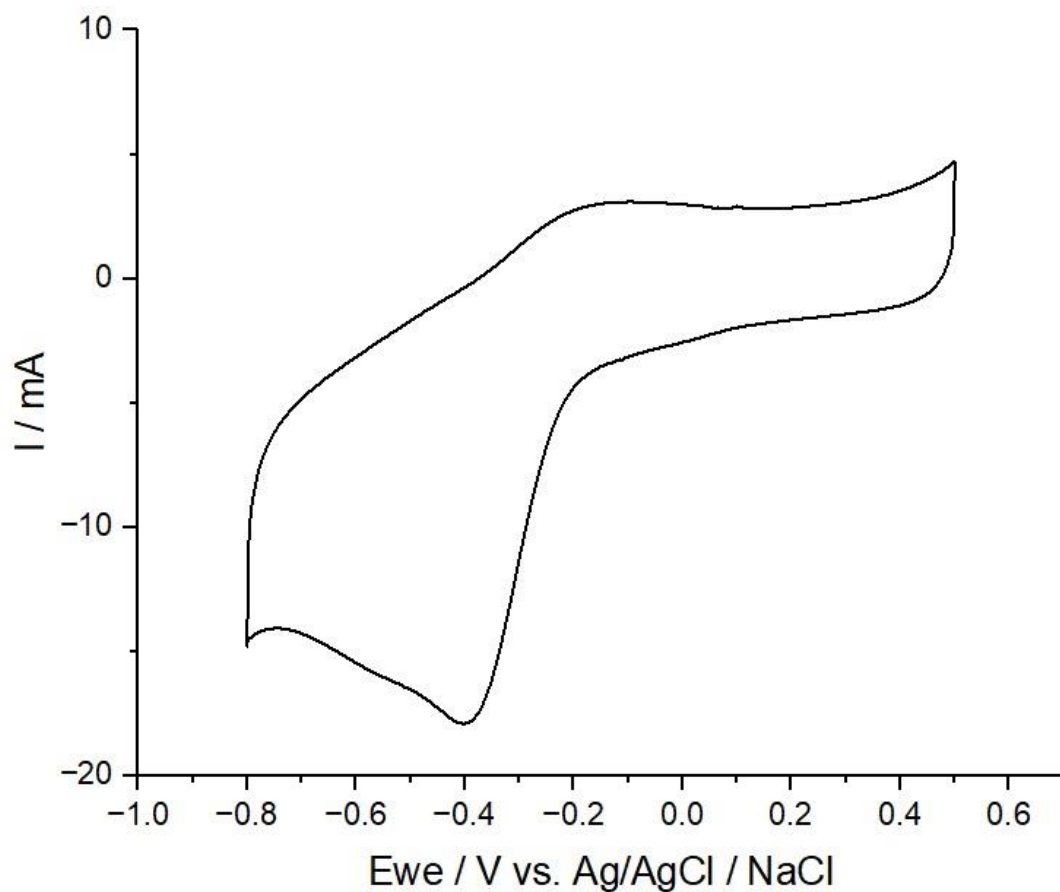


Figura 22. Voltamograma cíclico para biopelículas de *Shewanella oneidensis* MR-1 sobre soportes de rGO. Este voltamograma fue obtenido en condiciones de “recambio” utilizando lactato 20mM y usando una velocidad de barrido de 10 mV/s.

6 DISCUSIÓN

6.1 Viabilidad de las biopelículas desarrolladas sobre los diferentes soportes

En este trabajo, se llevó a cabo un ensayo de tinción BacLight Live/Dead con el objetivo de determinar la viabilidad de las células presentes en las biopelículas desarrolladas sobre soportes de óxido de grafeno (GO) y óxido de grafeno reducido (rGO), tanto a las 48 horas como en una etapa más avanzada de 15 días. La viabilidad se calculó como el porcentaje de células vivas en relación con el total de células contadas. Al tiempo de 48 horas, los resultados obtenidos evidencian una clara superioridad en la viabilidad de las biopelículas desarrolladas sobre GO, alcanzando un $42,90 \pm 8,65\%$, en comparación con las biopelículas formadas sobre rGO, que presentaron una viabilidad de $24,27 \pm 3,95\%$. Esta diferencia observada resultó ser estadísticamente significativa, con un valor de $p < 0,05$, lo que refuerza la relevancia de estos hallazgos.

En la evaluación de la viabilidad a los 15 días, se encontró que las biopelículas desarrolladas sobre GO mantenían una viabilidad del $86,2 \pm$

6,92%, mientras que las formadas sobre rGO mostraron una viabilidad de $77,87 \pm 7,39\%$, con un valor $p < 0,05$. Estos resultados concuerdan con estudios previos que compararon la actividad antibacteriana de ambos materiales utilizando distintos microorganismos como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Guo et al., 2017; Mokkapatil et al., 2018), en los que GO demostró ser un material con mejor biocompatibilidad en comparación a rGO. El efecto antibacteriano inicial observado en el rGO podría atribuirse al contacto directo entre el electrodo y las bacterias. Sin embargo, a medida que la biopelícula madura, el establecimiento de la matriz de secreciones poliméricas extracelulares (SPEs), reduciría ese contacto directo contribuyendo posiblemente a la disminución del efecto antibacteriano observado en etapas anteriores.

Es de suma importancia considerar que existen diversos métodos de producción tanto para el GO como para el rGO, y las propiedades de cada material podrían variar según el proceso aplicado, influyendo directamente en su biocompatibilidad.

6.2 Composición de las SPEs de las biopelículas desarrolladas sobre los diferentes soportes

Se aplicó el test T para comparar las mediciones de proteínas, carbohidratos y ADNe en las biopelículas desarrolladas sobre óxido de grafeno (GO) y óxido de grafeno reducido (rGO). En el caso de las proteínas, el valor p obtenido fue de 0,1549, lo que indica que no se puede rechazar la hipótesis nula; sin embargo, es importante destacar que la diferencia observada entre ambas condiciones es considerable, alcanzando un valor de 1,43, es decir, el promedio de los datos de cada condición difiere en 1,43 veces la desviación estándar, siendo las biopelículas sobre rGO las que presentan mayor concentración de proteínas. De manera análoga, al analizar los carbohidratos, el valor p obtenido fue de 0,1127, lo que también impide descartar la hipótesis nula, aunque la diferencia entre los promedios de cada condición alcanzó un valor de 1,65 veces la desviación estándar, donde las biopelículas desarrolladas sobre GO exhiben una mayor concentración de carbohidratos. A pesar de que los valores de p no se consideran estadísticamente significativos, las magnitudes de las diferencias observadas en las concentraciones de proteínas y carbohidratos son considerables. Para las mediciones de ADNe, el valor p obtenido fue $< 0,05$, y la diferencia entre

ambas condiciones alcanzó el valor de 1,34 veces la desviación estándar, concluyendo que sí existieron diferencias significativas entre las biopelículas desarrolladas sobre GO y rGO, siendo las biopelículas desarrolladas sobre rGO las que exhibían una mayor concentración de ADNe en las SPEs. En futuros ensayos sería recomendable aumentar el número de repeticiones para comprobar los hallazgos con una certidumbre estadística mayor.

Finalmente, se determinó la tasa de proteínas frente a carbohidratos, que refleja la proporción de proteínas en las biopelículas. Al aplicar el test T a los datos de esta relación, se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos, con un valor $p < 0,05$. Se observó una relación proteína/carbohidrato (P/C) de $1,01 \pm 0,22$ para las biopelículas cultivadas sobre GO, frente a una de $1,75 \pm 0,20$ para aquellas desarrolladas sobre rGO. Es un hallazgo clave de este estudio que las biopelículas de *S. oneidensis* desarrolladas sobre rGO presentaran una proporción significativamente mayor de proteínas en relación con los carbohidratos en su SPE, en comparación a las cultivadas sobre GO. Este incremento en la proporción de proteínas es relevante, ya que la composición de las SPEs de las bacterias reductoras de hierro disimilatorias, como *S. oneidensis* MR-1, son fundamentales en la transferencia extracelular de electrones, como evidencia

la investigación de Yan et al., en cuyo trabajo demostró que los efectos de estas SPEs dependen en gran medida de sus propiedades específicas (Yan et al., 2021), lo que apunta a que este cambio en la composición podría tener una incidencia en la capacidad de transferencia extracelular de electrones y, por lo tanto, en la eficiencia de los SBEs.

En otro estudio, Gao et al. (2019) logró una significativa reducción de la densidad de corriente producida por biopelículas de *S. oneidensis* MR-1 al tratarlas con proteinasa K y desoxirribonucleasa, concluyendo que tanto el ADN como las proteínas de las SPEs son esenciales para la transferencia de electrones (Gao et al., 2019). Por otra parte, estudios realizados por Jiang et al. (2023) revelaron una correlación positiva entre la relación de proteínas a carbohidratos y una mayor actividad redox en biopelículas de *G. sulfurreducens* desarrolladas sobre soportes de grafito, lo que sugiere que una mayor proporción de proteínas en comparación con los carbohidratos podría estar vinculada a una mejora en la transferencia de electrones; conclusión similar a la de Li et al (2024), quien proponen que una mayor proporción de proteínas en comparación con los carbohidratos en las SPEs contribuye a incrementar la actividad electroquímica. Estos resultados se suman a los

hallazgos de Torres et al., en cuyo trabajo propone que los carbohidratos actuarían como sustancias aislantes en los SBEs (Torres et al., 2010), lo que refuerza la hipótesis de que la composición de la SPE es un factor crítico para optimizar la transferencia de electrones. Sin embargo, es importante destacar que no se puede afirmar con certeza que una mayor relación P/C garantice una mayor eficiencia en la transferencia de electrones, debido a la complejidad de estos sistemas y a que muchos carbohidratos también desempeñan funciones esenciales (Rollefson et al., 2011). Por lo tanto, se requiere un análisis exhaustivo para desentrañar cómo la composición de la SPE afecta de manera precisa la transferencia de electrones en los SBEs.

Por otro lado, estudios han demostrado que las secreciones de carbohidratos podrían mejorar la estabilidad estructural de los microorganismos ante condiciones ambientales desfavorables (Liu & Tay, 2002; Zang et al., 2024). Además, Li et al. encontraron que la exposición de BEAs a condiciones de hipersalinidad reduce la relación P/C en las SPEs extraídas (Li et al., 2024), por lo que sería posible que una mayor proporción de carbohidratos ofrezca ventajas en determinadas condiciones ambientales.

Respecto al ADN_e, es posible que tenga un impacto significativo en la transferencia extracelular de electrones. En las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*, se ha observado que el ADN_e interactúa con los mediadores extracelulares redox, como la piocianina y las fenazinas, facilitando su retención en la matriz de la biopelícula. Además, se ha demostrado que el ADN_e favorece un rápido intercambio de electrones entre intercaladores redox. Estas interacciones sugieren que el ADN_e apoya un ciclo redox eficiente y una transferencia de electrones más rápida, subrayando su importancia en los procesos de transferencia de electrones en sistemas microbianos (Saunders et al., 2020). No obstante, actualmente no se dispone de estudios que establezcan una correlación entre la concentración de ADN_e y la actividad electrocatalítica en *S. oneidensis*. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo investigaciones adicionales para determinar si una mayor concentración de ADN_e está asociada con una mejor actividad electroquímica en las biopelículas desarrolladas sobre rGO.

Finalmente, las variaciones en las propiedades de las SPEs de ambas biopelículas sugieren que cada una podría ofrecer ventajas únicas que se adaptarían a diferentes sistemas aplicados. Por ejemplo, características como la resistencia a la salinidad, la capacidad de adhesión y el perfil de secreción

de carbohidratos son factores críticos que pueden influir en su eficacia en contextos específicos. No obstante, para aprovechar al máximo estas potencialidades, es fundamental llevar a cabo estudios más exhaustivos. Tales investigaciones permitirán identificar de manera más precisa qué tipo de biopelícula es más beneficiosa según las condiciones y requisitos de cada sistema, facilitando así su implementación en aplicaciones prácticas y optimizando su rendimiento en entornos diversos.

6.3 Análisis de voltamperometría cíclica

El análisis de voltametría cíclica (VC) reveló una actividad bioelectrocatalítica relativamente baja en las biopelículas de *Shewanella oneidensis* MR-1 sobre los electrodos GO y rGO, como lo indican las densidades de corriente con variaciones menores a un orden de magnitud entre las diferentes condiciones experimentales. Esto sugiere un efecto catalítico limitado, debido principalmente a la alta corriente de fondo, probablemente resultante de componentes microbianos redox-activos dentro de la matriz de la biopelícula, así como del EPS que rodea las células, y no a una mejora catalítica eficiente por parte de las propias biopelículas.

En el ensayo de voltamperometría cíclica sobre biopelículas de GO se detectó un pico anódico (pico de oxidación) centrado a $-0,298\text{ V vs Ag/AgCl}$, y un pico catódico (pico de reducción) centrado a $-0,439\text{ V vs Ag/AgCl}$. Esta posición de los picos es consistente con la literatura con la transformación electroquímica reversible de riboflavina (Carmona-Martinez et al., 2011; Cornejo et al., 2015; Jain et al., 2012; Marsili et al., 2008; Oram & Jeuken, 2016). Además, se observa otro pico anódico (de oxidación) a $0,401\text{ V vs. Ag/AgCl}$ en las biopelículas de GO. Este pico de oxidación irreversible podría atribuirse a la oxidación de los citocromos en la superficie del electrodo según lo indicado por algunos autores (Cornejo et al., 2015; Roy et al., 2013). Por lo tanto, los voltamogramas cíclicos, junto con sus derivadas de primer orden, podrían sugerir que tanto la transferencia de electrones directa (DET) como la mediada (MET) contribuyen a la corriente anódica total.

A la velocidad de barrido analizada (10 mV/s), la diferencia entre los potenciales de pico de oxidación y reducción relacionados con rivo flavina fue menor que $0,2\text{ V}$. Esto indica un proceso de transferencia electrónica relativamente rápido, lo cual es típico de las especies adsorbidas (Marsili et al., 2008). Para confirmar la hipótesis de que se trata de una especie

adsorbida, se propone llevar a cabo posteriormente nuevos ensayos de voltamperometría cíclica a diferentes velocidades de barrido. Esto debido a que las especies adsorbidas exhibirán un comportamiento característico al ser analizadas a diversas velocidades, como un aumento en la separación de los picos conforme la velocidad de barrido aumenta, ya que la cinética de transferencia electrónica se ve restringida a mayores velocidades. Además, se espera que la corriente de pico crezca de manera lineal con la velocidad de barrido, a diferencia de las especies solubles, que presentan una dependencia cuadrática con dicha velocidad (Marsili et al., 2008). Finalmente, para comprobar que la especie adsorbida corresponda a riboflavina, se sugiere incubar el electrodo estéril con riboflavina y comparar los picos obtenidos. Si los picos de oxidorreducción obtenidos se encuentran a potenciales equivalentes a los registrados en este ensayo será posible concluir que la especie adsorbida corresponde a riboflavina misma y no a otro subproducto de la actividad bacteriana (Marsili et al., 2008).

Por otro lado, en el ensayo de voltamperometría cíclica sobre biopelículas de rGO se detectó un pico anódico (pico de oxidación) centrado a $-0,20$ V vs Ag/AgCl, y un pico catódico (pico de reducción) centrado a $-0,38$ V vs Ag/AgCl. Esta posición de los picos es compatible con las observadas para

la transferencia directa de electrones mediada por omcA según lo indicado por algunos autores (Eggleston et al., 2008; Peng et al., 2010). Para obtener más información sobre la cinética de reacción es necesario realizar estudios de voltamperometría cíclica a diferentes velocidades barrido.

De este modo, se puede concluir que los electrodos modificados con GO y rGO muestran comportamientos voltamétricos únicos, claramente diferentes entre sí. Esto puede deberse a la mayor cantidad de funcionalidades oxigenadas en el GO respecto al rGO. Sin embargo, la complejidad inherente a los procesos microbianos y bioelectroquímicos dificulta la interpretación de los resultados obtenidos a través de la voltamperometría cíclica. Los valores de potenciales también pueden variar dependiendo de las condiciones experimentales específicas, como el pH, la fuerza iónica, y la naturaleza de la superficie del electrodo. De este modo, los resultados de voltamperometría cíclica no son suficientes para identificar con certeza el mecanismo de transferencia de electrones dominante; se requieren ensayos adicionales. Para abordar este desafío, la integración de los datos de voltamperometría cíclica con información adicional proveniente de biología molecular; espectroelectroquímica, que monitorea mediadores en la biopelícula; microscopía de alta resolución, como la microscopía electrónica de

transmisión, para evidenciar el contacto directo entre bacterias y el electrodo, lo que indicaría transferencia directa de electrones; y espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), que ofrece evidencia indirecta sobre la resistencia de transferencia de carga. Esta combinación permitiría lograr una comprensión más profunda de los mecanismos de interacción entre las células y el electrodo, lo que podría facilitar avances significativos en el campo

Finalmente, las biopelículas formadas sobre soportes de GO y rGO mostraron propiedades diferenciadas, evidenciando variaciones en la concentración de proteínas y carbohidratos, así como en los niveles de ADN extracelular, viabilidad y actividad redox, esta última evaluada mediante voltamperometría cíclica. Estos hallazgos indican que el tipo de soporte desempeña un papel fundamental en la formación y el desarrollo de la biopelícula, teniendo un impacto significativo en las características de la biopelícula generada, y sugiere que las funciones biológicas y fisiológicas de las bacterias pueden alterarse en función del material con el que interactúan. Esta reactividad fisiológica de las bacterias hacia distintos materiales es un aspecto crucial que considerar en el diseño de aplicaciones prácticas.

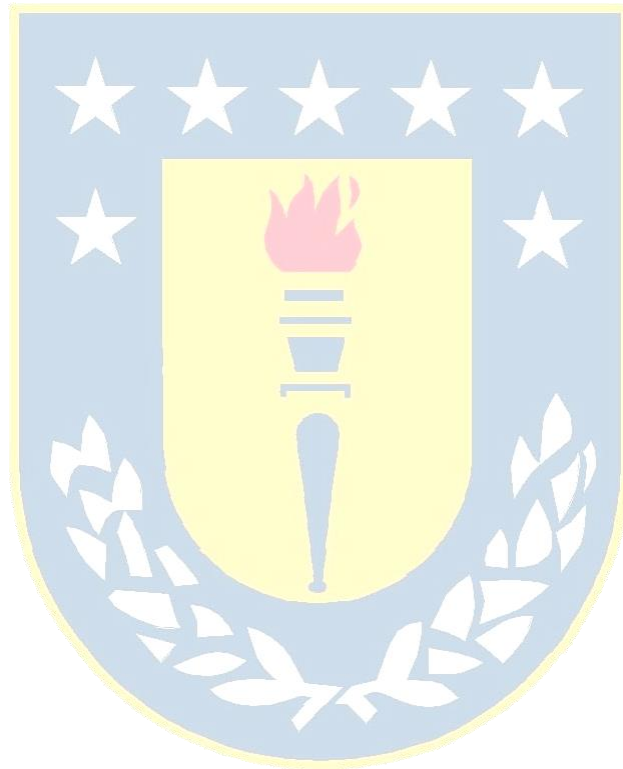
Así, la elección del tipo de electrodo adecuado dependerá de la aplicación específica, teniendo en cuenta no solo las propiedades intrínsecas del electrodo, sino también las características de la biopelícula que se desarrolla sobre este. Por lo tanto, es esencial realizar estudios detallados de las biopelículas en cada sistema para evaluar completamente el potencial de estos electrodos en diversas aplicaciones de los SBEs, incluyendo el tratamiento de aguas residuales, biosensores y la tecnología de pilas de combustible microbianas. La investigación para optimizar la interacción entre los materiales del electrodo, las características de la biopelícula y los procesos de transferencia de electrones tiene implicaciones significativas para mejorar la eficiencia y la rentabilidad de los SBEs en el futuro.

Si bien la mayoría de los estudios se centran en el rGO, el GO presenta ventajas competitivas significativas que no deben subestimarse, especialmente en aplicaciones donde se requiere una rápida puesta en marcha del sistema. La menor necesidad de tiempo para la formación de biopelículas de *Shewanella oneidensis* en GO, en comparación con rGO, puede traducirse en un menor tiempo de inicio y una mayor viabilidad en aplicaciones industriales, resultando en una optimización de los costos y la eficiencia del proceso.

Este trabajo destaca la necesidad de explorar el óxido de grafeno con diferentes grados de reducción, incluyendo el grafeno parcialmente reducido, un área de investigación aún poco explorada. El control sobre el grado de oxidación del grafeno permite la manipulación de sus propiedades fisicoquímicas, tales como la hidrofobicidad, la conductividad eléctrica, y la biocompatibilidad. Esta capacidad de ajuste fino abre un amplio abanico de posibilidades para optimizar el rendimiento de los SBE en diversas aplicaciones. Por ejemplo, en el tratamiento de aguas residuales, una más rápida colonización sobre sobre electrodos de GO podría acelerar la remoción de contaminantes, reduciendo los tiempos de procesamiento y los costos operativos. En la generación de bioenergía, una mayor eficiencia en la transferencia de electrones (como en el caso del rGO) podría llevar a una producción más rentable de electricidad o biocombustibles. Incluso en el ámbito de la biosensación, la biocompatibilidad del GO podría facilitar el desarrollo de sensores microbianos más sensibles y estables.

La investigación en materiales con propiedades intermedias entre GO y rGO, logradas mediante el ajuste del grado de reducción, podría conducir al descubrimiento de electrodos mejor optimizados para aplicaciones específicas. La capacidad de adaptar las propiedades del material a los

requisitos particulares de cada sistema - como la salinidad del agua residual o la necesidad de una alta resistencia a la corrosión - ampliaría significativamente las oportunidades de aplicación de la tecnología SBE en una amplia gama de sectores.

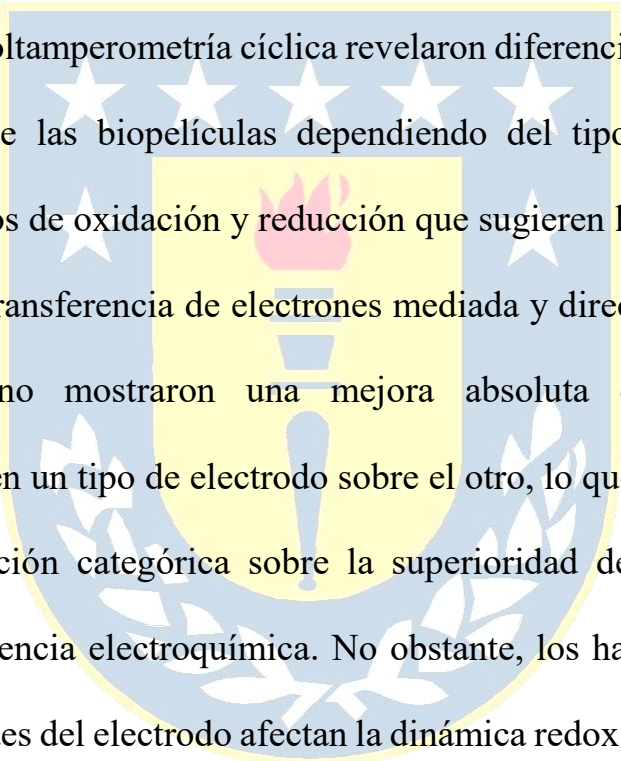


7 CONCLUSIONES

El análisis de las biopelículas de *Shewanella oneidensis* MR-1 desarrolladas sobre óxido de grafeno (GO) y óxido de grafeno reducido (rGO) permitió evaluar la influencia del material del electrodo en su composición, viabilidad y actividad electroquímica. Se observó que las biopelículas sobre rGO presentaron una mayor concentración de proteínas y ADN extracelular, mientras que las formadas sobre GO mostraron una mayor abundancia de carbohidratos. La relación proteínas/carbohidratos fue significativamente mayor en las biopelículas de rGO (1,75) en comparación con las de GO (1,01), lo que confirma que el tipo de soporte influye en la composición de las sustancias poliméricas extracelulares (SPEs) y, potencialmente, en la funcionalidad de la biopelícula en aplicaciones bioelectroquímicas.

La evaluación de la viabilidad celular mostró que las biopelículas formadas sobre GO tuvieron una mayor supervivencia tanto a las 48 horas como a los 15 días en comparación con aquellas desarrolladas sobre rGO. La mayor diferencia se observó a las 48 horas, indicando un efecto antibacteriano inicial del rGO, aunque esta diferencia se redujo con el tiempo. Estos

resultados conducen a una aceptación parcial de la hipótesis sobre la influencia del material del electrodo en la viabilidad celular: si bien el rGO parece tener un efecto inhibitorio inicial, este no se mantiene en biopelículas maduras, lo que contradice la idea de un impacto prolongado en la supervivencia celular.



Los análisis de voltamperometría cíclica revelaron diferencias en la actividad electroquímica de las biopelículas dependiendo del tipo de soporte. Se identificaron picos de oxidación y reducción que sugieren la coexistencia de mecanismos de transferencia de electrones mediada y directa. Sin embargo, los resultados no mostraron una mejora absoluta de la actividad electrocatalítica en un tipo de electrodo sobre el otro, lo que lleva a rechazar cualquier afirmación categórica sobre la superioridad de un material en términos de eficiencia electroquímica. No obstante, los hallazgos subrayan que las propiedades del electrodo afectan la dinámica redox de la biopelícula, lo que valida la importancia de su selección en aplicaciones bioelectroquímicas.

En conclusión, se acepta que el material del electrodo influye en la composición de las biopelículas y en su actividad electroquímica, aunque sin

una clara ventaja de un material sobre otro en términos de eficiencia electrocatalítica. Se acepta parcialmente la influencia del electrodo en la viabilidad celular, dado que el efecto inhibitor del rGO es transitorio. Finalmente, se rechaza la idea de que un material sea inherentemente superior en términos de rendimiento electroquímico, ya que ambos soportes mostraron mecanismos distintos de transferencia de electrones sin una diferencia definitiva en eficiencia.



8 REFERENCIAS

Adelaju, S. Bioelectrochemical Systems and Applications—Taking A Broader Perspective and Highlighting Relevance to the Circular Economy. *Bioelectrochemical Systems and Applications*. 2024. doi: Retrieved from <https://ojs.sciltp.com/journals/bsa/article/view/471>

Agrahari, R., Bayar, B., Abubackar, H. N., Giri, B. S., Rene, E. R., & Rani, R. (2022). Advances in the development of electrode materials for improving the reactor kinetics in microbial fuel cells. *Chemosphere*, 290, 133184. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133184>

Ahmadi, S., Rezaee, A., Ghosh, S., Malloum, A., & Banach, A. (2023). A review on bioelectrochemical systems for emerging pollutants remediation: A computational approaches. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(3), 110021. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110021>

Ahmed, A., Singh, A., Young, S.-J., Gupta, V., Singh, M., & Arya, S. (2023). Synthesis techniques and advances in sensing applications of reduced graphene oxide (rGO) Composites: A review. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 165, 107373. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2022.107373>

Akhtar, N., Syakir Ishak, M. I., Bhawani, S. A., & Umar, K. (2021). Various Natural and Anthropogenic Factors Responsible for Water Quality Degradation: A Review. *Water*, 13(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/w13192660>

Anegbe, B., Ifijen, I. H., Maliki, M., Uwidia, I. E., & Aigbodion, A. I. (2024). Graphene oxide synthesis and applications in emerging contaminant

removal: A comprehensive review. *Environmental Sciences Europe*, 36(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12302-023-00814-4>

Babauta, J., Renslow, R., Lewandowski, Z., & Beyenal, H. (2012). Electrochemically active biofilms: Facts and fiction. A review. *Biofouling*, 28(8), 789–812. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.710324>

Babauta, J. T., Nguyen, H. D., & Beyenal, H. (2011). Redox and pH Microenvironments within *Shewanella oneidensis* MR-1 Biofilms Reveal an Electron Transfer Mechanism. *Environmental Science & Technology*, 45(15), 6654–6660. <https://doi.org/10.1021/es200865u>

Bard, A. J., Faulkner, L. R., & White, H. S. (2022). *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons.

Bedel, S., Lepoittevin, B., Costa, L., Leroy, O., Dragoë, D., Bruzard, J., Herry, J.-M., Guilbaud, M., Bellon-Fontaine, M.-N., & Roger, P. (2015). Antibacterial poly(ethylene terephthalate) surfaces obtained from thymyl methacrylate polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 53(17), 1975–1985. <https://doi.org/10.1002/pola.27647>

Benito-Santiago, S. E., Gnanaseelan, N., Guerrero-Contreras, J., Kamaraj, S.-K., & Caballero-Briones, F. (2023). Chapter 16—Synthesis and application of graphene-based nanomaterials for microbial fuel cells. In N. Mubarak, A. Sattar, S. A. Mazari, & S. Nizamuddin (Eds.), *Advanced Nanomaterials and Nanocomposites for Bioelectrochemical Systems* (pp. 357–376). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90404-9.00005-X>

Bhattacharya, A., Garg, S., & Chatterjee, P. (2023). Examining current trends and future outlook of bio-electrochemical systems (BES) for nutrient conversion and recovery: An overview. *Environmental Science and Pollution*

Research, 30(37), 86699–86740. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-28500-1>

Boopathi, S., Narayanan, T. N., & Kumar, S. S. (2014). Improved heterogeneous electron transfer kinetics of fluorinated graphene derivatives. *Nanoscale*, 6(17), 10140–10146. <https://doi.org/10.1039/C4NR02563F>

Borole, A. P., Reguera, G., Ringeisen, B., Wang, Z.-W., Feng, Y., & Kim, B. H. (2011). Electroactive biofilms: Current status and future research needs. *Energy & Environmental Science*, 4(12), 4813–4834. <https://doi.org/10.1039/C1EE02511B>

Brutinel, E. D., & Gralnick, J. A. (2012). Shuttling happens: Soluble flavin mediators of extracellular electron transfer in *Shewanella*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(1), 41–48. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3653-0>

Canstein, H. von, Ogawa, J., Shimizu, S., & Lloyd, J. R. (2008). Secretion of Flavins by *Shewanella* Species and Their Role in Extracellular Electron Transfer. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3), 615–623. <https://doi.org/10.1128/AEM.01387-07>

Cao, Y., Mu, H., Liu, W., Zhang, R., Guo, J., Xian, M., & Liu, H. (2019). Electricigens in the anode of microbial fuel cells: Pure cultures versus mixed communities. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1087-z>

Caretta, M.A., A. Mukherji, M. Arfanuzzaman, R.A. Betts, A. Gelfan, Y. Hirabayashi, T.K. Lissner, J. Liu, E. Lopez Gunn, R. Morgan, S. Mwanga, and S. Supratid. (2022). Water. In: *Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability*. Contribution of Working Group II to the Sixth

Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, M. Tignor, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegría, M. Craig, S. Langsdorf, S. Löschke, V. Möller, A. Okem, B. Rama (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA, pp. 551–712, doi:10.1017/9781009325844.006.

Carmona-Martinez, A. A., Harnisch, F., Fitzgerald, L. A., Biffinger, J. C., Ringeisen, B. R., & Schröder, U. (2011). voltammetric analysis of the electron transfer of *Shewanella oneidensis* MR-1 and nanofilament and cytochrome knock-out mutants. *Bioelectrochemistry*, 81(2), 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2011.02.006>

Carmona-Martínez, A. A., Harnisch, F., Kuhlicke, U., Neu, T. R., & Schröder, U. (2013). Electron transfer and biofilm formation of *Shewanella putrefaciens* as function of anode potential. *Bioelectrochemistry* (Amsterdam, Netherlands), 93, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2012.05.002>

Carniello, V., Peterson, B. W., van der Mei, H. C., & Busscher, H. J. (2018). Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth. *Advances in Colloid and Interface Science*, 261, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.10.005>

Cereda, A., Hitchcock, A., Symes, M. D., Cronin, L., Bibby, T. S., & Jones, A. K. (2014). A Bioelectrochemical Approach to Characterize Extracellular Electron Transfer by *Synechocystis* sp. PCC6803. *PLOS ONE*, 9(3), e91484. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091484>

Chamoli, P., Banerjee, S., Raina, K. K., & Kar, K. K. (2020). Characteristics of Graphene/Reduced Graphene Oxide. In K. K. Kar (Ed.), *Handbook of Nanocomposite Supercapacitor Materials I: Characteristics* (pp. 155–177).

Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-43009-2_5

Charles, G. (2022). Graphene oxide improves electricity generation in soil microbial fuel cells and plant microbial fuel cells. *Research & Reviews in Electrochemistry*, 12(4), 1–2. <https://doi.org/10.37532/0974-7540.22.12.4.247>

Chen, D., Tang, L., & Li, J. (2010). Graphene-based materials in electrochemistry. *Chemical Society Reviews*, 39(8), 3157–3180. <https://doi.org/10.1039/B923596E>

Chen, G., Shen, R., Sun, Y., Wu, F., Yuan, C., Hu, Z., Li, X., Wu, X., Fang, Z., Liu, L., & Wang, G. (2024). Application of external voltage-applied enhances surface adhesion of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Journal of Water Process Engineering*, 66, 106073. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2024.106073>

Conners, E. M., Rengasamy, K., & Bose, A. (2022). Electroactive biofilms: How microbial electron transfer enables bioelectrochemical applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 49(4), kuac012. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuac012>

Cornejo, J. A., Lopez, C., Babanova, S., Santoro, C., Artyushkova, K., Ista, L., Schuler, A. J., & Atanassov, P. (2015). Surface Modification for Enhanced Biofilm Formation and Electron Transport in *Shewanella* Anodes. *Journal of The Electrochemical Society*, 162(9), H597. <https://doi.org/10.1149/2.0271509jes>

Daniyal, M., Liu, B., & Wang, W. (2020). Comprehensive Review on Graphene Oxide for Use in Drug Delivery System. *Current Medicinal*

Chemistry, 27(22), 3665–3685.
<https://doi.org/10.2174/13816128256661902011296290>

Davey, M. E., & O'toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 64(4), 847–867. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000>

Down, M. P., Rowley-Neale, S. J., Smith, G. C., & Banks, C. E. (2018). Fabrication of Graphene Oxide Supercapacitor Devices. *ACS Applied Energy Materials*, 1(2), 707–714. <https://doi.org/10.1021/acsaem.7b00164>

Dundas, C. M., Graham, A. J., Romanovicz, D. K., & Keitz, B. K. (2018). Extracellular Electron Transfer by *Shewanella oneidensis* Controls Palladium Nanoparticle Phenotype. *ACS Synthetic Biology*, 7(12), 2726–2736. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00218>

Dunne, W. M. (2002). Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 155–166. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.155-166.2002>

Eggleston, C. M., Vörös, J., Shi, L., Lower, B. H., Droubay, T. C., & Colberg, P. J. S. (2008). Binding and direct electrochemistry of OmcA, an outer-membrane cytochrome from an iron reducing bacterium, with oxide electrodes: A candidate biofuel cell system. *Inorganica Chimica Acta*, 361(3), 769–777. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2007.07.015>

Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., & Dempsey, J. L. (2018). A Practical Beginner's Guide to Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 95(2), 197–206. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>

ElMekawy, A., Hegab, H. M., Losic, D., Saint, C. P., & Pant, D. (2017). Applications of graphene in microbial fuel cells: The gap between promise and reality. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 72, 1389–1403. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.10.044>

Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>

Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>

Flemming, H.-C., van Hullebusch, E. D., Neu, T. R., Nielsen, P. H., Seviour, T., Stoodley, P., Wingender, J., & Wuertz, S. (2022). The biofilm matrix: Multitasking in a shared space. *Nature Reviews Microbiology*, 21(2), 70–86. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00791-0>

Fredrickson, J. K., Romine, M. F., Beliaev, A. S., Auchtung, J. M., Driscoll, M. E., Gardner, T. S., Nealson, K. H., Osterman, A. L., Pinchuk, G., Reed, J. L., Rodionov, D. A., Rodrigues, J. L. M., Saffarini, D. A., Serres, M. H., Spormann, A. M., Zhulin, I. B., & Tiedje, J. M. (2008). Towards environmental systems biology of *Shewanella*. *Nature Reviews Microbiology*, 6(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1947>

Gao, L., Lu, X., Liu, H., Li, J., Li, W., Song, R., Wang, R., Zhang, D., & Zhu, J. (2019). Mediation of Extracellular Polymeric Substances in Microbial Reduction of Hematite by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00575>

Guilbaud, M., Bruzaud, J., Bouffartigues, E., Orange, N., Guillot, A., Aubert-Frambourg, A., Monnet, V., Herry, J.-M., Chevalier, S., & Bellon-Fontaine, M.-N. (2017). Proteomic Response of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Adhering to Solid Surfaces. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01465>

Guo, L., Wang, J., Gou, Y., Tan, L., Liu, H., Pan, Y., & Zhao, Y. (2020). Comparative proteomics reveals stress responses of *Vibrio parahaemolyticus* biofilm on different surfaces: Internal adaptation and external adjustment. *Science of The Total Environment*, 731, 138386. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138386>

Guo, Z., Xie, C., Zhang, P., Zhang, J., Wang, G., He, X., Ma, Y., Zhao, B., & Zhang, Z. (2017). Toxicity and transformation of graphene oxide and reduced graphene oxide in bacteria biofilm. *The Science of the Total Environment*, 580, 1300–1308. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.093>

Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>

Harimawan, A., & Ting, Y.-P. (2016). Investigation of extracellular polymeric substances (EPS) properties of *P. aeruginosa* and *B. subtilis* and their role in bacterial adhesion. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 146, 459–467. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.06.039>

Harnisch, F., & Freguia, S. (2012). A Basic Tutorial on Cyclic Voltammetry for the Investigation of Electroactive Microbial Biofilms. *Chemistry – An Asian Journal*, 7(3), 466–475. <https://doi.org/10.1002/asia.201100740>

Hau, H. H., & Gralnick, J. A. (2007). Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annual Review of Microbiology*, 61, 237–258. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093257>

Hindatu, Y., Annuar, M. S. M., & Gumel, A. M. (2017). Mini-review: Anode modification for improved performance of microbial fuel cell. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 73(C), 236–248. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.138>

Huang, X., Yin, Z., Wu, S., Qi, X., He, Q., Zhang, Q., Yan, Q., Boey, F., & Zhang, H. (2011). Graphene-based materials: Synthesis, characterization, properties, and applications. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 7(14), 1876–1902. <https://doi.org/10.1002/sml.201002009>

Huang, Y.-X., Liu, X.-W., Xie, J.-F., Sheng, G.-P., Wang, G.-Y., Zhang, Y.-Y., Xu, A.-W., & Yu, H.-Q. (2011). Graphene oxide nanoribbons greatly enhance extracellular electron transfer in bio-electrochemical systems. *Chemical Communications*, 47(20), 5795–5797. <https://doi.org/10.1039/C1CC10159E>

Huang, X., Zeng, Z., Fan, Z., Liu, J., & Zhang, H. (2012). Graphene-Based Electrodes. *Advanced Materials*, 24(45), 5979–6004. <https://doi.org/10.1002/adma.201201587>

Ikeda, S., Takamatsu, Y., Tsuchiya, M., Suga, K., Tanaka, Y., Kouzuma, A., & Watanabe, K. (2021). *Shewanella oneidensis* MR-1 as a bacterial platform for electro-biotechnology. *Essays in Biochemistry*, 65(2), 355–364. <https://doi.org/10.1042/EBC20200178>

Jain, A., Zhang, X., Pastorella, G., Connolly, J. O., Barry, N., Woolley, R., Krishnamurthy, S., & Marsili, E. (2012). Electron transfer mechanism in

Shewanella loihica PV-4 biofilms formed at graphite electrode. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 87, 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2011.12.012>

Jaworski, S., Strojny-Cieślak, B., Wierzbicki, M., Kutwin, M., Sawosz, E., Kamaszewski, M., Matuszewski, A., Sosnowska, M., Szczepaniak, J., Daniluk, K., Lange, A., Pruchniewski, M., Zawadzka, K., Łojkowski, M., & Chwalibog, A. (2021). Comparison of the Toxicity of Pristine Graphene and Graphene Oxide, Using Four Biological Models. *Materials*, 14(15), Article 15. <https://doi.org/10.3390/ma14154250>

Jayathilake, C., Piyumika, G., Nazeer, Z., Wijayawardene, N., Rajakaruna, S., Kumla, J., & Fernando, E. (2024). Recent progress in the characterization and application of exo-electrogenic microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 117(1), 10. <https://doi.org/10.1007/s10482-023-01916-y>

Jiang, X., Hu, J., Fitzgerald, L. A., Biffinger, J. C., Xie, P., Ringeisen, B. R., & Lieber, C. M. (2010). Probing electron transfer mechanisms in *Shewanella oneidensis* MR-1 using a nanoelectrode platform and single-cell imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(39), 16806–16810. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011699107>

Jiang, Z., Yu, Q., Zhao, Z., Song, X., & Zhang, Y. (2023). Reason for the increased electroactivity of extracellular polymeric substances with electrical stimulation: Structural change of α -helix peptide of protein. *Water Research*, 238, 119995. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119995>

Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., & Thurnheer, T. (2020). Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends in Microbiology*, 28(8), 668–681. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016>

Kaplan, A., Yuan, Z., Benck, J. D., Rajan, A. G., Chu, X. S., Wang, Q. H., & Strano, M. S. (2017). Current and future directions in electron transfer chemistry of graphene. *Chemical Society Reviews*, 46(15), 4530–4571. <https://doi.org/10.1039/C7CS00181A>

Kitayama, M., Koga, R., Kasai, T., Kouzuma, A., & Watanabe, K. (2017). Structures, Compositions, and Activities of Live *Shewanella* Biofilms Formed on Graphite Electrodes in Electrochemical Flow Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(17). <https://doi.org/10.1128/AEM.00903-17>

Kotloski, N. J., & Gralnick, J. A. (2013). Flavin Electron Shuttles Dominate Extracellular Electron Transfer by *Shewanella oneidensis*. *mBio*, 4(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.00553-12>

Kracke, F., Vassilev, I., & Kramer, J. O. (2015a). Microbial Electron Transport and energy conservation - the foundation for optimizing bioelectrochemical systems. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00575>

Kreve, S., & Reis, A. C. D. (2021). Bacterial adhesion to biomaterials: What regulates this attachment? A review. *The Japanese Dental Science Review*, 57, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2021.05.003>

Kumar, A., Hsu, L. H.-H., Kavanagh, P., Barrière, F., Lens, P. N. L., Lapinsonnière, L., Lienhard V, J. H., Schröder, U., Jiang, X., & Leech, D. (2017). The ins and outs of microorganism–electrode electron transfer reactions. *Nature Reviews Chemistry*, 1(3), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0024>

Kumar, R., Singh, L., Zularisam, A. W., & Hai, F. I. (2018). Microbial fuel cell is emerging as a versatile technology: A review on its possible applications, challenges and strategies to improve the performances. *International Journal of Energy Research*, 42(2), 369–394. <https://doi.org/10.1002/er.3780>

Li, M., Zhou, M., Tian, X., Tan, C., McDaniel, C. T., Hassett, D. J., & Gu, T. (2018). Microbial fuel cell (MFC) power performance improvement through enhanced microbial electrogenicity. *Biotechnology Advances*, 36(4), 1316–1327. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.04.010>

Li, T., Li, C., Liang, H., Li, X., Yang, X., Li, H., & Song, H. (2024). Enhancement of stress resistance of electroactive biofilms against hypersaline shock via exogenous electron mediator addition. *Chemical Engineering Journal*, 499, 155905. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.155905>

Lin, X.-Q., Li, Z.-L., Liang, B., Nan, J., & Wang, A.-J. (2019). Identification of biofilm formation and exoelectrogenic population structure and function with graphene/polyaniline modified anode in microbial fuel cell. *Chemosphere*, 219, 358–364. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.212>

Liu, Y., & Tay, J.-H. (2002). The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research*, 36(7), 1653–1665. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00379-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00379-7)

Liu, T., Yu, Y.-Y., Deng, X.-P., Ng, C. K., Cao, B., Wang, J.-Y., Rice, S. A., Kjelleberg, S., & Song, H. (2015). Enhanced *Shewanella* biofilm promotes bioelectricity generation. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(10), 2051–2059. <https://doi.org/10.1002/bit.25624>

Logan, B. E. (2009). Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nature Reviews Microbiology*, 7(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2113>

Logan, B. E., Rossi, R., Ragab, A., & Saikaly, P. E. (2019). Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems. *Nature Reviews Microbiology*, 17(5), 307–319. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0173-x>

López Zavala, M. Á., González Peña, O. I., Cabral Ruelas, H., Delgado Mena, C., & Guizani, M. (2019). Use of Cyclic Voltammetry to Describe the Electrochemical Behavior of a Dual-Chamber Microbial Fuel Cell. *Energies*, 12(18), Article 18. <https://doi.org/10.3390/en12183532>

Lovley, D. R. (2008). The microbe electric: Conversion of organic matter to electricity. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(6), 564–571. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.10.005>

Lovley, D. R., & Holmes, D. E. (2021). Electromicrobiology: The ecophysiology of phylogenetically diverse electroactive microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 20(1), 5–19. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00597-6>

Lowry, Oliver H., Rosebrough, Nira J., Farr, A. L., & Randall, Rose J. (1951). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)

Madhav, S., Ahamad, A., Singh, A. K., Kushawaha, J., Chauhan, J. S., Sharma, S., & Singh, P. (2020). Water Pollutants: Sources and Impact on the Environment and Human Health. In D. Pooja, P. Kumar, P. Singh, & S. Patil

(Eds.), *Sensors in Water Pollutants Monitoring: Role of Material* (pp. 43–62). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0671-0_4

Mahto, K. U., Vandana, Priyadarshanee, M., Samantaray, D. P., & Das, S. (2022). Bacterial biofilm and extracellular polymeric substances in the treatment of environmental pollutants: Beyond the protective role in survivability. *Journal of Cleaner Production*, 379, 134759. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.134759>

Malvankar, N. S., Vargas, M., Nevin, K. P., Franks, A. E., Leang, C., Kim, B.-C., Inoue, K., Mester, T., Covalla, S. F., Johnson, J. P., Rotello, V. M., Tuominen, M. T., & Lovley, D. R. (2011). Tunable metallic-like conductivity in microbial nanowire networks. *Nature Nanotechnology*, 6(9), 573–579. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.119>

Marcus, A., Torres, C. I., & Rittmann, B. E. (2007). Conduction-based modeling of the biofilm anode of a microbial fuel cell. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(6), 1171–1182. <https://doi.org/10.1002/bit.21533>

Marsili, E., Baron, D. B., Shikhare, I. D., Coursolle, D., Gralnick, J. A., & Bond, D. R. (2008). *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10), 3968–3973. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710525105>

Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.-I., & Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, 339(1), 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>

McCormick, A. J., Bombelli, P., Bradley, R. W., Thorne, R., Wenzel, T., & Howe, C. J. (2015). Biophotovoltaics: Oxygenic photosynthetic organisms in

the world of bioelectrochemical systems. *Energy & Environmental Science*, 8(4), 1092–1109. <https://doi.org/10.1039/C4EE03875D>

Mier, A. A., Olvera-Vargas, H., Mejía-López, M., Longoria, A., Vereá, L., Sebastian, P. J., & Arias, D. M. (2021). A review of recent advances in electrode materials for emerging bioelectrochemical systems: From biofilm-bearing anodes to specialized cathodes. *Chemosphere*, 283, 131138. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131138>

Min, D., Cheng, L., Zhang, F., Huang, X.-N., Li, D.-B., Liu, D.-F., Lau, T.-C., Mu, Y., & Yu, H.-Q. (2017). Enhancing Extracellular Electron Transfer of *Shewanella oneidensis* MR-1 through Coupling Improved Flavin Synthesis and Metal-Reducing Conduit for Pollutant Degradation. *Environmental Science & Technology*, 51(9), 5082–5089. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04640>

Mokkapati, V. R. S. S., Pandit, S., Kim, J., Martensson, A., Lovmar, M., Westerlund, F., & Mijakovic, I. (2018). Bacterial response to graphene oxide and reduced graphene oxide integrated in agar plates. *Royal Society Open Science*, 5(11), 181083. <https://doi.org/10.1098/rsos.181083>

Muffler, K., Lakatos, M., Schlegel, C., Strieth, D., Kuhne, S., & Ulber, R. (2014). Application of biofilm bioreactors in white biotechnology. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 146, 123–161. https://doi.org/10.1007/10_2013_267

Naina Mohamed, S., Singaravelu, D. L., Brindhadevi, K., & Pugazhendhi, A. (2022). A review on graphene / graphene oxide supported electrodes for microbial fuel cell applications: Challenges and prospects. *Chemosphere*, 296, 133983. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133983>

Nanjundappa, Vs., Ramakrishnappa, T., Kempahanumakkagari, S., Prakash, HR., Praveen, BM. (2023). Efficient strategies to produce Graphene and functionalized graphene materials: A review. *Applied Surface Science Advances*, 14, 100386. <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2023.100386>

Nivedan. (2019). An Overview on Water Pollution. *International Journal of Emerging Technologies and Innovative Research* (www.jetir.org), ISSN:2349-5162, Vol.6, Issue 6, page no.238-242, June-2019, Available :<http://www.jetir.org/papers/JETIRFT06047.pdf>

Nouri, A., Rohani Shirvan, A., Li, Y., & Wen, C. (2023). Surface modification of additively manufactured metallic biomaterials with active antipathogenic properties. *Smart Materials in Manufacturing*, 1, 100001. <https://doi.org/10.1016/j.smmf.2022.100001>

Novoselov, K. S., Geim, A. K., Morozov, S. V., Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S. V., Grigorieva, I. V., & Firsov, A. A. (2004). Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science* (New York, N.Y.), 306(5696), 666–669. <https://doi.org/10.1126/science.1102896>

Oram, J., & Jeuken, L. J. C. (2016). A Re-evaluation of Electron-Transfer Mechanisms in Microbial Electrochemistry: *Shewanella* Releases Iron that Mediates Extracellular Electron Transfer. *ChemElectroChem*, 3(5), 829–835. <https://doi.org/10.1002/celc.201500505>

Pang, S., Hernandez, Y., Feng, X., & Müllen, K. (2011). Graphene as transparent electrode material for organic electronics. *Advanced Materials* (Deerfield Beach, Fla.), 23(25), 2779–2795. <https://doi.org/10.1002/adma.201100304>

Pant, D., Van Bogaert, G., Porto-Carrero, C., Diels, L., & Vanbroekhoven, K. (2011). Anode and cathode materials characterization for a microbial fuel cell in half cell configuration. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 63(10), 2457–2461. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.217>

Pareek, A., Shanthi Sravan, J., & Venkata Mohan, S. (2019). Exploring chemically reduced graphene oxide electrode for power generation in microbial fuel cell. *Materials Science for Energy Technologies*, 2(3), 600–606. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2019.06.006>

Peng, L., You, S.-J., & Wang, J.-Y. (2010). Carbon nanotubes as electrode modifier promoting direct electron transfer from *Shewanella oneidensis*. *Biosensors & Bioelectronics*, 25(5), 1248–1251. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.10.002>

Perchikov, R., Cheliukanov, M., Plekhanova, Y., Tarasov, S., Kharkova, A., Butusov, D., Arlyapov, V., Nakamura, H., & Reshetilov, A. (2024). Microbial Biofilms: Features of Formation and Potential for Use in Bioelectrochemical Devices. *Biosensors*, 14(6), 302. <https://doi.org/10.3390/bios14060302>

Petrova, O. E., Gupta, K., Liao, J., Goodwine, J. S., & Sauer, K. (2017). Divide and conquer: The *Pseudomonas aeruginosa* two-component hybrid SagS enables biofilm formation and recalcitrance of biofilm cells to antimicrobial agents via distinct regulatory circuits. *Environmental Microbiology*, 19(5), 2005–2024. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13719>

Pinto, R. M., Soares, F. A., Reis, S., Nunes, C., & Van Dijck, P. (2020). Innovative strategies toward the disassembly of the EPS matrix in bacterial biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00952>

Potter, M. C. (1911). 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.

Prathiba, S., Kumar, P. S., & Vo, D.-V. N. (2022). Recent advancements in microbial fuel cells: A review on its electron transfer mechanisms, microbial community, types of substrates and design for bio-electrochemical treatment. *Chemosphere*, 286, 131856. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131856>

PrévotEAU, A., & Rabaey, K. (2017). Electroactive Biofilms for Sensing: Reflections and Perspectives. *ACS Sensors*, 2(8), 1072–1085. <https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00418>

Qiu, T., S. Bozich, J., E. Lohse, S., M. Vartanian, A., M. Jacob, L., M. Meyer, B., L. Gunsolus, I., J. Niemuth, N., J. Murphy, C., L. Haynes, C., & D. Klaper, R. (2015). Gene expression as an indicator of the molecular response and toxicity in the bacterium *Shewanella oneidensis* and the water flea *Daphnia magna* exposed to functionalized gold nanoparticles. *Environmental Science: Nano*, 2(6), 615–629. <https://doi.org/10.1039/C5EN00037H>

Rahimnejad, M., Adhami, A., Darvari, S., Zirepour, A., & Oh, S.-E. (2015). Microbial fuel cell as new technology for bioelectricity generation: A review. *Alexandria Engineering Journal*, 54(3), 745–756. <https://doi.org/10.1016/j.aej.2015.03.031>

Rollefson, J. B., Stephen, C. S., Tien, M., & Bond, D. R. (2011). Identification of an extracellular polysaccharide network essential for cytochrome anchoring and biofilm formation in *Geobacter sulfurreducens*. *Journal of Bacteriology*, 193(5), 1023–1033. <https://doi.org/10.1128/jb.01092-10>

Roy, J. N., Garcia, K. E., Luckarift, H. R., Falase, A., Cornejo, J., Babanova, S., Schuler, A. J., Johnson, G. R., & Atanassov, P. B. (2013). Applied electrode potential leads to *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms engaged in direct electron transfer. *Journal of The Electrochemical Society*, 160(11). <https://doi.org/10.1149/2.001401jes>

Ruxton, G. D. (2006). The unequal variance *t*-test is an underused alternative to Student's *t*-test and the Mann–Whitney U test. *Behavioral Ecology*, 17(4), 688–690. <https://doi.org/10.1093/beheco/ark016>

Santoro, C., Arbizzani, C., Erable, B., & Ieropoulos, I. (2017). Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review. *Journal of Power Sources*, 356, 225–244. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.109>

Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*, 184(4), 1140–1154. <https://doi.org/10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002>

Sauer, K. (2003). The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology*, 4(6), 219. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-6-219>

Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: Expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews. Microbiology*, 20(10), 608–620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>

Schicklberger, M., Bücking, C., Schuetz, B., Heide, H., & Gescher, J. (2010). Involvement of the *Shewanella oneidensis* Decaheme Cytochrome MtrA in the Periplasmic Stability of the β -Barrel Protein MtrB. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1520. <https://doi.org/10.1128/AEM.01201-10>

Schilirò, T., Tommasi, T., Armato, C., Hidalgo, D., Traversi, D., Bocchini, S., Gilli, G., & Pirri, C. F. (2016). The study of electrochemically active planktonic microbes in microbial fuel cells in relation to different carbon-based anode materials. *Energy*, 106, 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2016.03.004>

Shemesh, M., Tam, A., Aharoni, R., & Steinberg, D. (2010). Genetic adaptation of *Streptococcus mutans* during biofilm formation on different types of surfaces. *BMC Microbiology*, 10, 51. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-51>

Siklitskaya, A., Gacka, E., Larowska, D., Mazurkiewicz-Pawlicka, M., Malolepszy, A., Stobiński, L., Marciniak, B., Lewandowska-Andrałójć, A., & Kubas, A. (2021). Lerf-Klinowski-type models of graphene oxide and reduced graphene oxide are robust in analyzing non-covalent functionalization with porphyrins. *Scientific Reports*, 11(1), 7977. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86880-1>

Slate, A. J., Whitehead, K. A., Brownson, D. A. C., & Banks, C. E. (2019). Microbial fuel cells: An overview of current technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 101, 60–81. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.09.044>

Sleutels, T. H. J. A., Ter Heijne, A., Buisman, C. J. N., & Hamelers, H. V. M. (2012). Bioelectrochemical Systems: An Outlook for Practical Applications. *ChemSusChem*, 5(6), 1012–1019. <https://doi.org/10.1002/cssc.201100732>

Sonawane, J. M., Yadav, A., Ghosh, P. C., & Adeloju, S. B. (2017). Recent advances in the development and utilization of modern anode materials for high performance microbial fuel cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 90, 558–576. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.10.014>

Srikanth, S., Marsili, E., Flickinger, M. C., & Bond, D. R. (2008). Electrochemical characterization of *Geobacter sulfurreducens* cells immobilized on graphite paper electrodes. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(5), 1065–1073. <https://doi.org/10.1002/bit.21671>

Starowicz, A., Zieliński, M., Rusanowska, P., & Dębowski, M. (2023). Microbial Fuel Cell Performance Boost through the Use of Graphene and Its Modifications—Review. *Energies*, 16(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/en16020576>

Sun, D., Chen, J., Huang, H., Liu, W., Ye, Y., & Cheng, S. (2016). The effect of biofilm thickness on electrochemical activity of *Geobacter Sulfurreducens*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(37), 16523–16528. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.04.163>

Tian, Y., Yu, Z., Cao, L., Zhang, X. L., Sun, C., & Wang, D.-W. (2021). Graphene oxide: An emerging electromaterial for energy storage and conversion. *Journal of Energy Chemistry*, 55, 323–344. <https://doi.org/10.1016/j.jechem.2020.07.006>

Torres, C. I., Marcus, A. K., Lee, H.-S., Parameswaran, P., Krajmalnik-Brown, R., & Rittmann, B. E. (2010). A kinetic perspective on extracellular electron transfer by anode-respiring bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(1), 3–17. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00191.x>

Tkachev, S. V., Buslaeva, E. Yu., Naumkin, A. V., Kotova, S. L., Laure, I. V., & Gubin, S. P. (2012). Reduced graphene oxide. *Inorganic Materials*, 48(8), 796–802. <https://doi.org/10.1134/S0020168512080158>

Ukaogo, P. O., Ewuzie, U., & Onwuka, C. V. (2020). 21 - Environmental pollution: Causes, effects, and the remedies. In P. Chowdhary, A. Raj, D.

Verma, & Y. Akhter (Eds.), *Microorganisms for Sustainable Environment and Health* (pp. 419–429). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819001-2.00021-8>

Utkan, G., Yumusak, G., Tunali, B. C., Ozturk, T., & Turk, M. (2023). Production of Reduced Graphene Oxide by Using Three Different Microorganisms and Investigation of Their Cell Interactions. *ACS Omega*, 8(34), 31188. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c03213>

Vishwakarma, V. (2020). Impact of environmental biofilms: Industrial components and its remediation. *Journal of Basic Microbiology*, 60(3), 198–206. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900569>

Wang, H., Park, J.-D., & Ren, Z. J. (2015). Practical Energy Harvesting for Microbial Fuel Cells: A Review. *Environmental Science & Technology*, 49(6), 3267–3277. <https://doi.org/10.1021/es5047765>

Wang, H.-W., Bringans, C., Hickey, A. J. R., Windsor, J. A., Kilmartin, P. A., & Phillips, A. R. J. (2021). Cyclic Voltammetry in Biological Samples: A Systematic Review of Methods and Techniques Applicable to Clinical Settings. *Signals*, 2(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/signals2010012>

Wang, Y., Akbarzadeh, A., Chong, L., Du, J., Tahir, N., & Awasthi, M. K. (2022). Catalytic pyrolysis of lignocellulosic biomass for bio-oil production: A review. *Chemosphere*, 297, 134181. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134181>

Wu, Y., Wang, L., Jin, M., Kong, F., Qi, H., & Nan, J. (2019). Reduced graphene oxide and biofilms as cathode catalysts to enhance energy and metal recovery in microbial fuel cell. *Bioresource Technology*, 283, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.080>

Yamada, H., Yoshii, K., Asahi, M., Chiku, M., & Kitazumi, Y. (2022). Cyclic Voltammetry Part 1: Fundamentals. *Electrochemistry*, 90(10), 102005–102005. <https://doi.org/10.5796/electrochemistry.22-66082>

Yaqoob, A. A., Mohamad Ibrahim, M. N., Rafatullah, M., Chua, Y. S., Ahmad, A., & Umar, K. (2020). Recent Advances in Anodes for Microbial Fuel Cells: An Overview. *Materials*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/ma13092078>

Yan, W., Guo, W., Wang, L., & Jing, C. (2021). Extracellular polymeric substances from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms mediate the transformation of Ferrihydrite. *The Science of the Total Environment*, 784, 147245. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147245>

Yasri, N., Roberts, E. P. L., & Gunasekaran, S. (2019). The electrochemical perspective of bioelectrocatalytic activities in microbial electrolysis and microbial fuel cells. *Energy Reports*, 5, 1116–1136. <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2019.08.007>

Yu, Y., Wu, Y., Cao, B., Gao, Y.-G., & Yan, X. (2015). Adjustable bidirectional extracellular electron transfer between *Comamonas testosteroni* biofilms and electrode via distinct electron mediators. *Electrochemistry Communications*, 59, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2015.07.007>

Zandalinas, S. I., Fritschi, F. B., & Mittler, R. (2021). Global Warming, Climate Change, and Environmental Pollution: Recipe for a Multifactorial Stress Combination Disaster. *Trends in Plant Science*, 26(6), 588–599. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.02.011>

Zang, L., Yang, X.-L., Xu, H., Xia, Y.-G., & Song, H.-L. (2024). A novel integrated microbial fuel cell-membrane bioreactor (MFC-MBR) for controlling the spread of antibiotic and antibiotic resistance genes while simultaneously alleviating membrane fouling. *Chemical Engineering Journal*, 487, 150578. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.150578>

Zhang, X., & Liu, Y. (2021). Circular economy-driven ammonium recovery from municipal wastewater: State of the art, challenges and solutions forward. *Bioresource Technology*, 334, 125231. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125231>

Zhang, G., Wang, X., Jiao, Y., Chen, Q., & Lee, D.-J. (2021). Enhanced performance of microbial fuel cells with enriched ferrous iron oxidation microflora at room temperatures. *Bioresource Technology*, 331, 125025. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125025>

Zhang, B., Shi, S., Tang, R., Qiao, C., Yang, M., You, Z., Shao, S., Wu, D., Yu, H., Zhang, J., Cao, Y., Li, F., & Song, H. (2023). Recent advances in enrichment, isolation, and bio-electrochemical activity evaluation of exoelectrogenic microorganisms. *Biotechnology Advances*, 66, 108175. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108175>

Zhang, J., Li, F., Liu, D., Liu, Q., & Song, H. (2024). Engineering extracellular electron transfer pathways of electroactive microorganisms by synthetic biology for Energy and chemicals production. *Chemical Society Reviews*, 53(3), 1375–1446. <https://doi.org/10.1039/d3cs00537b>

Zheng, T., Li, J., Ji, Y., Zhang, W., Fang, Y., Xin, F., Dong, W., Wei, P., Ma, J., & Jiang, M. (2020). Progress and Prospects of Bioelectrochemical Systems: Electron Transfer and Its Applications in the Microbial Metabolism. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00010>

Zhou, A., Bai, J., Hong, W., & Bai, H. (2022). Electrochemically reduced graphene oxide: Preparation, composites, and applications. *Carbon*, 191, 301–332. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2022.01.056>

Zhou, M., Chi, M., Luo, J., He, H., & Jin, T. (2011). An overview of electrode materials in microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*, 196(10), 4427–4435. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2011.01.012>

Zuo, X., He, S., Li, D., Peng, C., Huang, Q., Song, S., & Fan, C. (2010). Graphene Oxide-Facilitated Electron Transfer of Metalloproteins at Electrode Surfaces. *Langmuir*, 26(3), 1936–1939. <https://doi.org/10.1021/la902496u>

