

**EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN LA  
ADHERENCIA DE LA BACTERIA ACIDÓFILA  
*Leptospirillum* sp. CF-1 A MINERALES  
SULFURADOS.**

**Tesis**

**Entregada A La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De**

**Doctor en Ciencias, con mención en Microbiología**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Mauricio Ignacio Núñez Rodríguez**

**Octubre, 2023**

**Director de Tesis Dra: Gloria Levicán Jaque**

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

**Mauricio Ignacio Núñez Rodríguez**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias, con mención en Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día .....

Director de Tesis:  
Dra. Gloria Levicán

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Carlos Jerez

.....

Dr. Felipe Arenas

.....

Dr. Andrés Marcoleta

.....

## Tabla de Contenidos

INDICE DE TABLAS.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS .....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	ix
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Biopelículas: señalización y <i>quorum sensing</i>.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Producción de ROS en minerales sulfurados. ....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Respuesta antioxidante en bacterias acidófilas. ....</b>	<b>9</b>
<b>1.4 Relación entre la respuesta antioxidante en bacterias acidófilas y la adherencia.....</b>	<b>9</b>
<b>1.5 Participación de c-di-GMP y <i>quorum sensing</i> en la adherencia de bacterias acidófilas a minerales sulfurados. ....</b>	<b>12</b>
<b>1.6 Planteamiento del problema. ....</b>	<b>14</b>
<b>1.7 Hipótesis. ....</b>	<b>16</b>
<b>1.8 Objetivo general. ....</b>	<b>16</b>
<b>1.4 Objetivos específicos. ....</b>	<b>16</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Identificación bioinformática de genes participantes en la adherencia y formación de biopelículas en <i>Leptospirillum</i> sp. CF-1.....</b>	<b>17</b>
2.1.1 Análisis bioinformático. ....	17
<b>2.2 Determinación de la participación del peróxido de hidrógeno en la adherencia de <i>Leptospirillum</i> sp. CF-1 a minerales sulfurados.....</b>	<b>19</b>
2.2.1 Cepa bacteriana y condiciones de cultivo.....	19
2.2.2 Preparación de minerales sulfurados. ....	19
2.2.3 Medición del peróxido de hidrógeno en minerales sulfurados en suspensión .....	20
2.2.4 Estimación de la adherencia a superficies de minerales sulfurados. ....	21
2.2.5 Evaluación del efecto del peróxido de hidrógeno exógeno sobre la adherencia.....	22
2.2.6 Evaluación de la adherencia a través de microscopía de fluorescencia.....	22
2.2.7 Análisis estadístico. ....	23
<b>2.3 Evaluación del efecto del peróxido de hidrógeno sobre el proteoma de <i>Leptospirillum</i> sp. CF-1 en células planctónicas y adheridas a minerales sulfurados.....</b>	<b>24</b>
2.3.1 Condiciones de cultivo para la extracción de proteínas totales. ....	24
2.3.2 Extracción de proteínas totales de cultivos en estado planctónico y adheridos a pirita.....	25

2.3.3 Análisis proteómico.....	26
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Identificación bioinformática de genes de adherencia en bacterias acidófilas. ....</b>	<b>27</b>
3.1.1 Pili tipo IV (T4P).....	27
3.1.2 Sistema Tad.....	32
3.1.3 Flagelina.....	33
3.1.4 Señalización c-di-GMP y sistema de <i>quorum sensing</i> en <i>Leptospirillum</i> sp. CF-1.....	36
<b>3.2 Determinación de la participación del peróxido de hidrógeno en la adherencia de <i>Leptospirillum</i> sp. CF-1 a minerales sulfurados. ....</b>	<b>37</b>
3.2.1 Medición de la concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en minerales sulfurados en suspensión.....	37
3.2.2 Estimación de la adherencia de <i>Leptospirillum</i> sp. CF-1 a minerales sulfurados.....	45
3.2.3 Evaluación del efecto del peróxido de hidrógeno exógeno sobre la adherencia.....	47
3.2.4 Evaluación de la adherencia a través de microscopía de fluorescencia.....	49
<b>3.3 Evaluación del efecto del peróxido de hidrógeno sobre el proteoma de <i>Leptospirillum</i> sp. CF-1 en células planctónicas y adheridas a minerales sulfurados.....</b>	<b>52</b>
<b>4. DISCUSIÓN .....</b>	<b>64</b>
<b>4.1 Identificación bioinformática de genes de adherencia en bacterias acidófilas. ....</b>	<b>64</b>
<b>4.2 Determinación de la participación del peróxido de hidrógeno en la adherencia de <i>Leptospirillum</i> sp. CF-1 a minerales sulfurados.....</b>	<b>72</b>
<b>4.3 Evaluación del efecto del peróxido de hidrógeno sobre el proteoma de <i>Leptospirillum</i> sp. CF-1 en células planctónicas y adheridas a minerales sulfurados.....</b>	<b>75</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>78</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>79</b>
<b>7. ANEXO .....</b>	<b>89</b>

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de los microorganismos utilizados para la identificación bioinformática de los genes codificantes para elementos estructurales de adherencia. ....	18
Tabla 2. Genes codificantes para las proteínas del Sistema Tad en los diferentes genomas de las bacterias acidófilas (y algunas neutrófilas) estudiadas. ....	34
Tabla 3. Composición de las muestras de minerales sulfurados antes y después de su esterilización. ..	42
Tabla 4. Concentraciones de proteínas obtenidas en los cultivos de <i>Leptospirillum</i> sp. CF-1.....	58

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de la formación de una biopelícula. ....	4
Figura 2. Adherencia y formación de biopelícula sobre superficies de minerales sulfurados. ....	14
Figura 3. Diseño experimental de los cultivos usados para la extracción de proteínas totales. ....	25
Figura 4. Contexto genómico y esquema de la estructura del T4P en <i>P. aeruginosa</i> PAO1 y <i>Neisseria</i> spp.....	29
Figura 5. Contexto genómico y esquematización del T4P en el género <i>Leptospirillum</i> . ....	31
Figura 6. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de la pilina mayor PilA del género <i>Acidithiobacillus</i> .....	32
Figura 7. Organización y disposición específica de los genes del sistema Tad en <i>Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans</i> .....	33
Figura 8. Alineamiento de las diferentes secuencias aminoacídicas tanto para FlaA como para FlaB en los diferentes acidófilos estudiados. ....	35
Figura 9. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de FlaA y FlaB de los representantes del género <i>Leptospirillum</i> .....	36
Figura 10. Relaciones de similitud de la flagelina (FlaA y FlaB). ....	37
Figura 11. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de diguanilato ciclasas de <i>Leptospirillum</i> sp. CF-1. ....	39
Figura 12. Sistema de <i>quorum sensing</i> (DSF) de <i>Leptospirillum</i> sp. CF-1. ....	41
Figura 13. Curva de calibración para H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	43
Figura 14. Intensidad de fluorescencia emitida por la sonda APF para determinar la concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 1 h de incubación en una suspensión con diferentes minerales sulfurados. ....	44
Figura 15. Intensidad de fluorescencia emitida por la sonda APF para determinar la concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en el tiempo. ....	46
Figura 16. Intensidad de fluorescencia emitida por la sonda APF y la concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> respectiva a las 8 h de incubación.....	47
Figura 17. Análisis estadístico de cada mineral con respecto al control positivo utilizando ANOVA de dos vías.....	48

Figura 18. Análisis estadístico de cada mineral con respecto al cuarzo (control negativo) utilizando ANOVA de dos vías.....	49
Figura 19. Medición de la concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en el tiempo hasta 24 h en una suspensión con pirita. ....	50
Figura 20. Recuento de células de <i>Leptospirillum</i> sp. CF.1 planctónicas en el tiempo en cultivos líquidos con diferentes minerales sulfurados.....	51
Figura 21. Análisis estadístico de la adherencia de <i>Leptospirillum</i> sp. CF-1 a cada mineral con respecto a la pirita.....	52
Figura 22. Recuento de células planctónicas en el tiempo en presencia de pirita con y sin adición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	53
Figura 23. Recuento de células planctónicas en el tiempo en presencia de cuarzo y de cada mineral sulfurado con y sin la adición de 10 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de forma exógena. ....	54
Figura 24. Colonización de la pirita por <i>Leptospirillum</i> sp. CF-1 a 2, 4 y 6 h.....	55
Figura 25. Porcentaje de la superficie colonizada (µm <sup>2</sup> ) por <i>Leptospirillum</i> sp. CF-1 en gránulos de pirita. ....	56
Figura 26. Anotación funcional de las proteínas analizadas en los cultivos planctónicos de <i>Leptospirillum</i> sp. CF-1 con hierro (II) a 2 horas de incubación con y sin la adición de 10 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	60
Figura 27. Abundancia relativa de las proteínas de <i>Leptospirillum</i> sp. CF-1 con el valor promedio iBAQ más elevado en la muestra con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	61
Figura 28. Modelo de los sistemas de adherencia detectados en diferentes bacterias acidófilas.....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS

APF: 3'-(p-aminofenil) fluoresceína

cAMP: adenosín monofosfato cíclico

c-di-GMP: 3'-5'- diguanilato cíclico

DGC: Diguanilato ciclasa

DSF: factor de señal difusible

EPS: Sustancias poliméricas extracelulares

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno

L: Litro

LSM: Microscopía de barrido láser de fluorescencia

mg: Miligramos

min: Minutos

mL: Mililitros

mM: Milimolar

nm: Nanometros

PDE: Fosfodiesterasa

ROS: Especies reactivas de oxígeno

s: Segundos

T4P: Pili tipo IV

μg: Microgramos

μl: Microlitros

μM: Micromolar

V: Voltaje

## RESUMEN

Los microorganismos acidófilos en ambientes extremadamente ácidos forman biopelículas en la superficie de minerales sulfurados. Estas biopelículas comienzan con una unión inicial de células a dichas superficies, impulsada por mecanismos celulares que interactúan con señales ambientales. Entre las señales potenciales, destaca la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) que se generan de manera espontánea en las superficies de los minerales sulfurados. Estas ROS podrían actuar como un desencadenante en la adherencia y posterior formación de biopelículas en estas condiciones extremas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del  $H_2O_2$  en la adherencia de *Leptospirillum* sp. CF-1 a superficies de minerales sulfurados. Para esto se utilizaron herramientas bioinformáticas para determinar los genes asociados con la adherencia, la señalización de c-di-GMP y mecanismos de *quorum sensing*. Luego de forma experimental se realizó la medición a lo largo del tiempo del  $H_2O_2$  generado en una suspensión de gránulos de pirita, calcopirita y esfalerita. Posterior se evaluó la adherencia de *Leptospirillum* sp. CF-1 a cultivos que contenían cada mineral, con y sin la adición de diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  exógeno. La determinación de la adherencia se llevó a cabo mediante el recuento de células planctónicas y mediante el análisis de biopelículas por microscopía de barrido láser de fluorescencia (LSM). Finalmente se evaluó el efecto del  $H_2O_2$  sobre el proteoma de *Leptospirillum* sp. CF-1 utilizando un análisis proteómico de las proteínas de cultivos planctónicos con y sin la adición de  $H_2O_2$  exógeno.

Los resultados indicaron la presencia de múltiples genes que codifican diguanilatociclasas y fosfodiesterasas, junto con el sistema DSF, el cual estaría implicado en la comunicación entre células (*quorum sensing*). Para la adherencia, identificamos la flagelina



como el elemento estructural predominante. En la parte experimental se obtuvo que la pirita es el mineral que presenta una mayor producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una suspensión a lo largo del tiempo en comparación con otros minerales (1 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las 8 horas). La adherencia a los minerales fue más elevada en la pirita, donde el 94% de las células se habían adherido a las 8 horas, superando a la calcopirita (78%) y la esfalerita (74%) en el mismo intervalo. La adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno a los cultivos minerales aumentó aún más la adherencia, especialmente en la pirita, con un 99% de adherencia de las células a las 6 horas. Los experimentos de microscopía confirmaron esta tendencia, mostrando una mayor adherencia en la pirita en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De las proteínas obtenidas de la proteómica, se analizaron 347. De ellas, 41 correspondían a proteínas estructurales, 35 relacionadas a reacciones redox, 23 a la protección y respuesta al estrés, y 10 al mantenimiento y función de otras proteínas. Se destacó una alta abundancia de la chaperona GroES, una peroxirredoxina, una tiorredoxina y una rubreritina como participantes en la respuesta a estrés, y diversas proteínas de membrana, lipoproteínas y la flagelina como elementos estructurales que participarían en la adherencia.

Se puede concluir que *Leptospirillum* sp. CF-1 posee mecanismos importantes presentes en su genoma y proteoma relacionados a la adherencia, formación de biopelículas y respuesta al estrés oxidativo. Además, se proporciona evidencia de la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el tiempo en los distintos minerales sulfurados estudiados, de la adherencia diferenciada de *Leptospirillum* sp. CF-1 a cada uno de ellos y de como la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno estimula aún más la adherencia. Todo esto confirma la participación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como activador y su posible rol como molécula señalizadora en la adherencia de *Leptospirillum* sp. CF-1 a minerales sulfurados.

## ABSTRACT

Acidophilic microorganisms in extremely acidic environments form biofilms on the sulfide minerals surface. These biofilms initiate with an initial cell attachment, driven by cellular mechanisms interacting with environmental signals. Among the potential signals, the presence of reactive oxygen species (ROS) generated spontaneously on the surfaces of sulfide minerals stands out. These ROS could act as a trigger for adherence and subsequent biofilm formation under these extreme conditions.

The aim of this study was to assess the effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on *Leptospirillum* sp. CF-1 adherence to sulfide mineral surfaces. Bioinformatics tools were used to identify genes associated with adherence, c-di-GMP signaling, and *quorum sensing* mechanisms. Subsequently, experimental measurements of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated over time in suspensions of pyrite, chalcopyrite, and sphalerite granules were performed. Adherence of *Leptospirillum* sp. CF-1 to cultures containing each mineral was evaluated, with and without the addition of different concentrations of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Adherence determination involved planktonic cell counting and biofilm analysis using laser scanning fluorescence microscopy (LSM). Finally, the effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the proteome of *Leptospirillum* sp. CF-1 was evaluated using proteomic analysis of planktonic cultures with and without the addition of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

The results indicated the presence of multiple genes encoding diguanylate cyclases and phosphodiesterases, along with the DSF system, which would be involved in cell communication (*quorum sensing*). For adherence, flagellin was identified as the predominant structural element. Experimental data showed that pyrite had the highest H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production over time in suspension compared to other minerals (1 μM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 8 hours). Adherence to minerals was highest on pyrite, with 94% of cells adhered at 8 hours, surpassing chalcopyrite

(78%) and sphalerite (74%) in the same timeframe. The addition of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to mineral cultures further increased adherence, especially on pyrite, with 99% cell adherence at 6 hours. Microscopy experiments confirmed this trend, showing increased adherence on pyrite in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Of the proteins obtained from proteomics, 347 were analyzed. Among these, 41 corresponded to structural proteins, 35 were related to redox reactions, 23 to protection and stress response, and 10 to maintenance and function of other proteins. There was a high abundance of the chaperone GroES, a peroxiredoxin, a thioredoxin, and a rubrerythrin as participants in the stress response, as well as various membrane proteins, lipoproteins, and flagellin as structural elements involved in adherence.

In conclusion, *Leptospirillum* sp. CF-1 possesses important mechanisms in its genome and proteome related to adherence, biofilm formation, and oxidative stress response. Additionally, evidence is provided for the generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> over time on the different studied sulfide minerals, the differentiated adherence of *Leptospirillum* sp. CF-1 to each of them, and how the addition of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> further stimulates adherence. This confirms the involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as an activator and its possible role as a signaling molecule in the adherence of *Leptospirillum* sp. CF-1 to sulfide minerals.

# 1. INTRODUCCIÓN

Los ambientes ácidos extremos (pH menor a 3) como son los ambientes mineros y volcánicos, y ríos ácidos, entre otros, se caracterizan por poseer una alta concentración de metales disueltos (Wilmes et al., 2008; Johnson et al., 2013). En estos ambientes los microorganismos acidófilos pueden formar biopelículas sobre minerales sulfurados y llevar a cabo el proceso de biolixiviación, el cual consiste en la conversión de un metal insoluble a una forma soluble por la acción de estos microorganismos (Schippers et al., 2013; Shu y Huang, 2022; Vera et al., 2022). Este proceso se utiliza industrialmente para recuperar metales de importancia económica como el cobre, níquel, y zinc entre otros (Johnson et al., 2013; Vera et al., 2013). Entre las bacterias biolixiviantes más reconocidas se encuentran las oxidantes de hierro *Leptospirillum ferriphilum* y *Leptospirillum ferrooxidans*, las oxidantes de hierro y azufre *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* y las oxidantes de azufre *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Acidithiobacillus caldus* (Hallberg y Johnson, 2001; Zhang et al., 2016; Kaksonen et al., 2018; Shu y Huang, 2022).

En las acidófilas de los géneros *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum*, la adherencia a la superficie de los minerales sulfurados lleva a la formación de una biopelícula que consiste en monocapas celulares embebidas en sustancias poliméricas extracelulares (EPS) (Jiao et al., 2010; Vargas-Straube et al., 2020; Shen et al., 2022). Tanto la adherencia como la formación de la biopelícula estarían reguladas por mecanismos de señalización y de *quorum sensing*, estudiados en detalle en algunas acidófilas del género *Acidithiobacillus*, pero escasamente en *Leptospirillum* spp. (Belas, 2014; Bellenberg et

al., 2019; 2021). En este último género, este mecanismo es considerado importante en la formación de biopelículas, ya que favorecería la adherencia, la producción de EPS y la actividad lixivante de otras especies de bacterias acidófilas como *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (Li et al., 2015), *At. ferrooxidans* y *At. thiooxidans* (Bellenberg et al., 2019), y también de arqueas y organismos eucariotas (Wilmes et al., 2008). Por lo tanto, los microorganismos del género *Leptospirillum* podrían tener un papel importante como colonizadores primarios durante la formación de biopelículas naturales sobre los minerales. No obstante, en bacterias acidófilas las moléculas o factores ambientales que activarían los mecanismos de señalización para permitir el reconocimiento y la adherencia al mineral son aún desconocidas. En este trabajo de tesis se plantea que las ROS que se generan espontáneamente sobre la superficie mineral podrían constituir una señal medioambiental que activaría las vías de señalización y de *quorum sensing* para que los microorganismos se adhieran, y al mismo tiempo, estas ROS activarían los mecanismos de protección frente a un posible daño oxidativo durante el proceso de colonización. Los antecedentes que sustentan este planteamiento se describen a continuación.

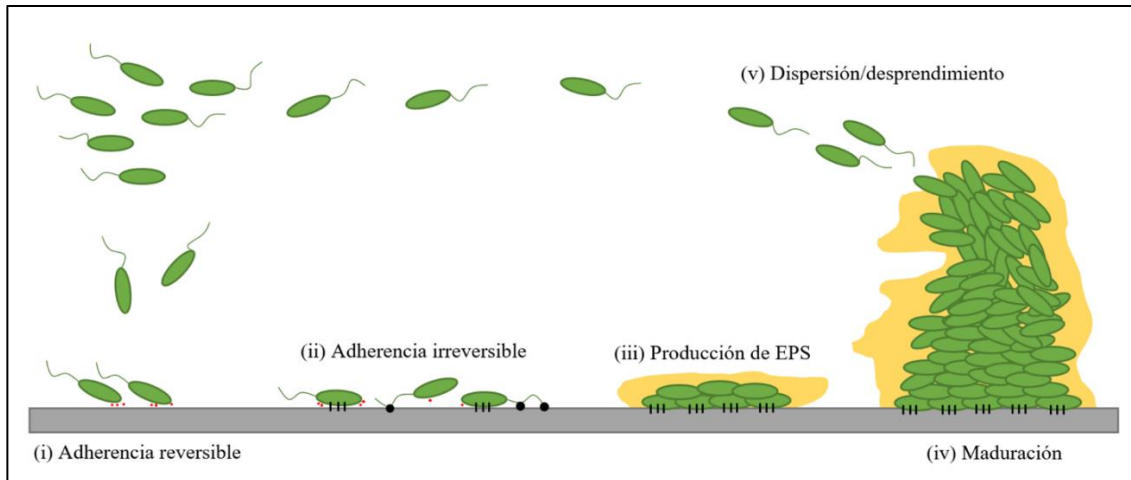
### **1.1 Biopelículas: señalización y *quorum sensing*.**

Las biopelículas se definen como agregados de microorganismos que están adheridos a una superficie a través de una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) (Costerton et al., 1995; Sutherland, 2001; Flemming et al., 2016). En las biopelículas las células que la componen están más cercanas entre sí que en su estado de vida libre, con un contacto directo entre ellas, favoreciendo distintos procesos propios de la biopelícula. Este fenómeno de contacto entre células puede suceder tanto en

biopelículas que están adheridas a una superficie, donde solo una capa celular establece contacto con el sustrato, como en flóculos, que son biopelículas móviles que se forman sin depender de ningún sustrato (Flemming et al., 2016; van Wolferen et al., 2018). Mediante interacciones intercelulares que engloban aspectos tanto sociales como físicos, y considerando las características de la matriz circundante, el estilo de vida en las biopelículas se distingue de manera significativa de aquel observado en las células bacterianas de vida libre (Arnaouteli et al., 2021; Meganathan et al 2022). De esta manera, las comunidades dentro de las biopelículas manifiestan propiedades emergentes, es decir, nuevas características que surgen en la biopelícula y que no se pueden predecir mediante el estudio de las células bacterianas en estado de vida libre (Völkel et al., 2018; Panitz et al., 2019).

Recientemente en una revisión llevada a cabo por Sauer y cols. (2022), se propone que la formación de una biopelícula se puede resumir en cinco etapas principales; **(i)** una primera etapa de reconocimiento y unión reversible de las células a una superficie a través de interacciones hidrofóbicas débiles no específicas **(ii)** una segunda etapa de unión irreversible donde participan diferentes sistemas de adherencia de la célula como adhesinas, fimbrias, el flagelo, el pili entre otros, **(iii)** en tercer lugar una etapa de producción y secreción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) por las células que se han adherido, **(iv)** en cuarto lugar una etapa que involucra una maduración de la biopelícula, donde las células liberan moléculas de señalización para comunicarse entre ellas formando microcolonias, aumentando la densidad celular por la replicación de las células y su diferenciación, **(v)** y finalmente una quinta etapa de dispersión o

desprendimiento, en la que células que forman parte de la biopelícula se desprenden de ella y vuelven a un estado planctónico (Figura 1).



**Figura 1. Etapas de la formación de una biopelícula.** (i) adherencia reversible por interacciones hidrofóbicas en la superficie, (ii) adherencia irreversible a través de mecanismos celulares, (iii) producción de EPS, (iv) maduración de la biopelícula y (v) desprendimiento de células retornando a un estado planctónico. Imagen original hecha en base a las etapas descritas en Sauer et al., 2022.

Para que ocurra la adherencia reversible o irreversible, las bacterias en estado planctónico deben iniciar un reconocimiento de la superficie que van a colonizar. Este reconocimiento está regulado por diferentes mecanismos de señalización intracelular (Belas, 2014), donde el mensajero secundario 3'-5'- diguanilato cíclico (c-di-GMP) tiene un papel central (Povolotsky y Hengge, 2012). Esta molécula es sintetizada en gran parte por bacterias Gram negativas a través de proteínas con actividad diguanilato ciclasa (DGC) y degradada por otras proteínas con dominio fosfodiesterasa (PDE) (Hengge, 2009). El c-di-GMP participa en varios procesos que implican la formación de la biopelícula y el estado sésil de las bacterias, como la expresión y localización de elementos estructurales de adherencia, la secreción de EPS y supresión de genes de

motilidad (Wolfe y Visick, 2008). Por ejemplo, se ha descrito que en *Pseudomonas aeruginosa* PA14 el pili tipo IV, sistema fundamental en la adherencia a superficies, participa como un sistema sensor en las primeras etapas del contacto con superficies junto con un aumento en la regulación de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) (Wolfgang et al., 2003). Esto desencadena una cascada de señales que activa la señalización de c-di-GMP y, por lo tanto, un aumento en la biosíntesis y concentración intracelular de este mensajero, lo que favorece la adherencia, el asentamiento y la formación de la biopelícula (Burrows, 2012). Por otra parte, una disminución de la concentración intracelular de c-di-GMP se correlaciona con un comportamiento planctónico, aumento de motilidad y una rápida propagación (Armbruster y Parsek, 2018; Homma y Kojima, 2022). Resultados similares a lo encontrado en *P. aeruginosa* PA14 se han descrito para *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Ruiz et al., 2007), *Stenotrophomonas maltophilia* (Huedo et al., 2018) y para bacterias del género *Vibrio* (Homma y Kojima, 2022).

Además de la vía c-di-GMP, existe un proceso ampliamente estudiado y distribuido entre bacterias, arqueas y hongos, en el que estos microorganismos supervisan la densidad de su población y ajustan la expresión genética por medio de sustancias químicas. Este mecanismo, conocido como "*quorum sensing*", regula la formación de las biopelículas por eventos de comunicación célula-célula y constituye la forma más investigada de comunicación bacteriana (Whitehead et al., 2001; Bassler, 2002; Mangwani et al., 2016). En algunas bacterias, la transición del estado planctónico a uno sésil representa un proceso altamente regulado por el *quorum sensing*, el cual dependiendo del tipo de bacteria puede funcionar a través de moléculas de señalización llamados autoinductores (AIs) (Henke y Bassler, 2004; Gera y Srivastava, 2006) o de



compuestos de la familia de factor señal difusible (DSF) (Li et al., 2019; He et al., 2022). La comunicación química del *quorum sensing* implica tanto la producción y secreción de las moléculas autoinducidas o señales como su posterior reconocimiento (Henke y Bassler, 2004; Liao y Li, 2013). Con el aumento de la densidad celular, existe una mayor concentración de estas moléculas en el medio, lo que implica una respuesta de las bacterias provocando cambios en la expresión de diferentes genes (Waters y Bassler, 2005; Waters et al., 2008) principalmente relacionados a la adherencia, secreción de moléculas, respuesta a condiciones ambientales entre otros (Miller y Bassler, 2001; Liao y Li, 2013; Mangwani et al., 2016).

La capacidad de las bacterias de formar una biopelícula está determinada por diversas señales ambientales que involucran señales metabólicas y nutricionales, como en el caso de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium que responde a la limitación de nutrientes (Gerstel y Römling, 2001); señales de naturaleza inorgánica como el fosfato, importante en *Pseudomonas fluorescens* (Monds et al., 2007); señales provenientes del hospedero, como por ejemplo los ácidos biliares en el caso de las biopelículas de *Vibrio cholerae* (Hung et al., 2006), entre otros casos. Sin embargo, en las bacterias acidófilas, las moléculas o condiciones que actúan como señal para activar las vías de señalización y de *quorum sensing* permanecen desconocidas. No obstante, se ha sugerido que las ROS que se generan sobre la superficie mineral podrían estar ejerciendo un papel relevante en el reconocimiento de los minerales (Bellenberg et al., 2015; Zapata et al., 2017), permitiendo finalmente el reconocimiento y la adherencia al mineral y, por lo tanto, la formación de la biopelícula.

## 1.2 Producción de ROS en minerales sulfurados.

La ganancia de electrones por el oxígeno ( $O_2$ ) genera especies reactivas de oxígeno (ROS) parcialmente reducidas como el superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ). Estas ROS pueden dañar las células y causar la muerte celular ya que son altamente oxidantes, pudiendo inducir daño a las biomoléculas, como, por ejemplo, un efecto directo en el material genético provocando la aparición de mutaciones (Sies y Menck 1992; Sies, 1993), oxidación, inactivación y daño a proteínas y lípidos esenciales, y por lo tanto una pérdida de funciones afectando la estructura y el metabolismo celular (Hong et al., 2019). En conjunto estos efectos generan una condición altamente perjudicial para la célula conocida como estrés oxidativo (Imlay, 2019; Seixas et al., 2022).

En bacterias que crecen en ambientes aeróbicos, las ROS pueden formarse endógenamente a través de la reacción entre el  $O_2$  y donantes univalentes de electrones, como centros metálicos, el cofactor  $FADH_2$  y quinonas (Ezraty et al., 2017; Imlay, 2019; Fasnacht and Polacek, 2021). En el caso de los microorganismos acidófilos, además de la producción endógena de ROS, también ocurre una producción exógena sobre la superficie de minerales sulfurados. Esta generación de ROS se produce a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss cuando los minerales son expuestos a condiciones oxigénicas y ácidas (Jones et al., 2013; Javadi y Hanumantha, 2014). Además, esta generación es dependiente de la naturaleza, tamaño y de la densidad de la partícula del mineral (Cohn et al 2006; Jones et al., 2013).

Cohn y cols. (2006) determinaron que en partículas del mineral sulfurado pirita ( $FeS_2$ ) en suspensión, existe una generación de ROS constante. Esto lo comprobaron

midiendo la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilizando un espectro de cristal violeta para su cuantificación. Ese año estos autores encontraron que a medida que aumentaban la cantidad de partículas de pirita en un medio líquido, la concentración del  $\text{H}_2\text{O}_2$  también aumentaba. Por ejemplo, en presencia de oxígeno molecular, la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue de  $2,19 \mu\text{M}$  cuando la concentración de pirita era de  $20 \text{ g/L}$ , mientras que al aumentar los gramos a  $40 \text{ g/L}$  y  $80 \text{ g/L}$ , la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  aumentaba a  $6,54 \mu\text{M}$  y  $11,7 \mu\text{M}$ , respectivamente. En años posteriores, Cohn y cols. (2008;2009) describieron un método más sensible para la detección y cuantificación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  empleando sondas fluorescentes como la 3'-(p-aminofenil) fluoresceína (APF). Sumado a estos estudios, otros autores en años posteriores determinaron que en condiciones ácidas (pH 2,5) el  $\text{H}_2\text{O}_2$  que se genera espontáneamente en las superficies de pirita alcanzaba concentraciones superiores a las detectadas en otros minerales sulfurados como la calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), esfalerita ( $\text{ZnS}$ ) y galena ( $\text{PbS}$ ) (Jones et al., 2011; 2013; Javadi y Hanumantha, 2014).

Sumado a lo anterior, se ha propuesto que la capacidad del mineral de ceder electrones podría también ser determinante en la cantidad de ROS que se genere sobre la superficie, siendo por lo tanto la formación de ROS una medida directa del potencial redox (Adler et al., 1999). Por ejemplo, el potencial redox de la pirita ( $0,63 \text{ V}$ ) es mayor que el de calcopirita ( $0,52 \text{ V}$ ) y esfalerita ( $-0,24 \text{ V}$ ) (Mehta y Murr, 1983; Holmes y Crundwell, 1995), siendo la diferencia de valores equivalentes a la concentración de ROS encontrados en suspensiones de cada uno de dichos minerales. Por lo tanto, todavía está pendiente la realización de estudios más exhaustivos y comparativos para determinar la generación de ROS en minerales y como este fenómeno podría ser diferente dependiendo

de la naturaleza del mineral, lo que podría influir en la capacidad y especificidad de la adherencia de las bacterias acidófilas a ellos.

### **1.3 Respuesta antioxidante en bacterias acidófilas.**

Las bacterias acidófilas que colonizan los minerales ricos en azufre encontrados en ambientes ácidos necesitan disponer de sistemas de reconocimiento y antioxidantes que les permitan detectar y contrarrestar la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas exógenamente en estos minerales. La presencia de estos mecanismos permitiría a estos microorganismos eliminar eficazmente las ROS, facilitando así su fijación y colonización de la superficie mineral. Dentro de las diversas estrategias que han desarrollado las bacterias acidófilas para destruir las ROS generadas tanto en el metabolismo aerobio como de forma exógena, se encuentran mecanismos enzimáticos mediados por enzimas como superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa (Zapata et al., 2017; Farías et al., 2021) y mecanismos no enzimáticos mediados por el glutatión (GSH) y otros tioles de bajo peso molecular (Cárdenas et al., 2012), el sistema tiorredoxina (Trx) (Norambuena et al., 2012; González et al., 2020) y algunas vitaminas (p.ej. vitamina B12; cobalamina) (Ferrer et al., 2016) entre otras moléculas.

### **1.4 Relación entre la respuesta antioxidante en bacterias acidófilas y la adherencia.**

En bacterias acidófilas diversos estudios multi-ómicos destacan la participación de mecanismos antioxidantes en la adherencia y formación de las biopelículas sobre sulfuros metálicos (Christel et al., 2017; Moreno-Paz et al., 2010; Bellenberg et al., 2019). En *L. ferriphilum* DSM 14647 cultivadas con calcopirita se identificaron varios genes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo, específicamente genes que codifican para

la subunidad C de la alquil-hidroperóxido reductasa (*ahpC*), peroxirredoxinas (*ccmG* y *dsbE*), una putativa peroxidasa dependiente de hierro (*efeB*), la tiorredoxina reductasa (*trxB*) y para proteínas involucradas en la síntesis de moléculas antioxidantes como espermidina, ectoína y cobalamina (Christel et al., 2017). En el proteoma de biopelículas de *At. ferrooxidans* DSM 14882 sobre pirita también se reportaron proteínas relacionadas al estrés oxidativo, como tiorredoxinas, peroxirredoxinas y oxidoreductasas (Bellenberg et al., 2019).

En conjunto, estos análisis podrían proporcionar una pista acerca de los procesos que están teniendo lugar en las bacterias acidófilas presentes en entornos ácidos. Esto sugiere una conexión significativa entre la capacidad de adherencia y la respuesta antioxidante de estas bacterias en relación a los minerales sulfurados. La relación entre la adherencia, la respuesta antioxidante y las ROS también se ha reportado en diversos estudios fisiológicos en bacterias acidófilas crecidas sobre minerales sulfurados. En *At. ferrooxidans* DSM 14882 se ha demostrado que existe un aumento en la adherencia a pirita cuando previamente fue expuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM (Bellenberg et al., 2014). En *Leptospirillum* sp. CF-1 se observó que la enzima citocromo *c* peroxidasa periplasmática (CcP) es importante para la respuesta al estrés oxidativo generado exógenamente (Zapata et al., 2017). Además, en ese mismo estudio los resultados sugieren que las células planctónicas de *Leptospirillum* sp. CF-1 enfrentadas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM aumentan su adherencia a minerales sulfurados, y que CcP es de vital importancia para la bacteria en la respuesta ante el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno. En consecuencia, es posible afirmar que las bacterias acidófilas tienen una respuesta antioxidante ante la presencia de las ROS generadas en los minerales sulfurados. Estas ROS, a su vez, parecen fomentar el proceso de adherencia,

desempeñando un rol crucial en la señalización que promueve la formación de biopelículas en dichas superficies.

Un posible papel de las ROS como molécula estimulante de la adherencia se correlaciona con una variedad de otras funciones que se han atribuido a estas moléculas (D'Autréaux y Toledano, 2007). Por ejemplo, en bacterias no acidófilas del clado *Roseobacter*, se ha descrito una regulación estricta del superóxido extracelular que es exportado desde el interior de la célula. Esta molécula cumpliría un papel en la regulación del crecimiento ya que al disminuir sus niveles extracelulares por la adición exógena de superóxido dismutasa, se observó una inhibición significativa del crecimiento. Este resultado indicaría que el superóxido actuaría como una señal que regula de forma positiva la densidad celular de estas bacterias (Hansel et al., 2019).

Por otra parte, en *Escherichia coli* se ha descrito que el regulador transcripcional OxyR media la respuesta a estrés oxidativo y que a su vez está involucrado en la adherencia a superficies y formación de las biopelículas a través de la activación de la expresión de la adhesina Ag43 (Čáp et al., 2012). También en *E. coli*, un análisis de la expresión génica durante la transición desde un estilo de vida planctónico a sésil, reveló la inducción de genes codificantes para proteínas de transporte, oxidorreductasas putativas y la enzima antioxidante superóxido dismutasa (Schembri et al., 2003).

Por ende, en su totalidad, esta información proporciona un indicio de que las ROS desempeñan una función significativa en las células, contribuyendo de manera directa al desarrollo bacteriano, al estímulo de la adherencia y a la formación de las biopelículas.

## **1.5 Participación de c-di-GMP y *quorum sensing* en la adherencia de bacterias acidófilas a minerales sulfurados.**

El c-di-GMP es una molécula señalizadora que cumple un papel importante en el desarrollo de las biopelículas y su aumento intracelular induce la adherencia en diversos microorganismos (Jenal et al., 2017). En la bacteria acidófila *At. ferrooxidans* ATCC 23270 se ha descrito un aumento de hasta 6 veces en los niveles c-di-GMP intracelular cuando está en un estado de biopelícula con respecto a un estado planctónico, por lo que se especula estaría ejerciendo un papel en la colonización de pirita (Ruiz et al., 2011; Díaz et al., 2018).

Sumado a lo anterior, en *At. ferrooxidans* LR se encontraron diferencias en la expresión génica entre células planctónicas y adheridas a calcopirita, detectándose un aumento en la expresión de genes relacionados al pili tipo IV, el cual está implicado directamente en la adherencia (Ossa Henao et al., 2013). Por lo tanto, al igual que en la bacteria modelo *P. aeruginosa* (Merritt et al., 2010), en *At. ferrooxidans* existe una relación directa entre el aumento intracelular de los niveles de c-di-GMP y el aumento de la expresión de genes relacionados a la adherencia.

En el caso del género *Leptospirillum*, hay evidencia genómica de la presencia de genes relacionados a la síntesis de c-di-GMP. Por ejemplo, en *L. ferriphilum* DSM 14647 se ha descrito un incremento en los niveles de transcritos de genes para diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas de c-di-GMP cuando es cultivada en presencia de calcopirita como fuente de energía con respecto a un cultivo con hierro soluble (Christel et al., 2017). Sin embargo, la relación directa entre el metabolismo de c-di-GMP y la adherencia a minerales sulfurados no ha sido abordada en detalle en este género bacteriano.

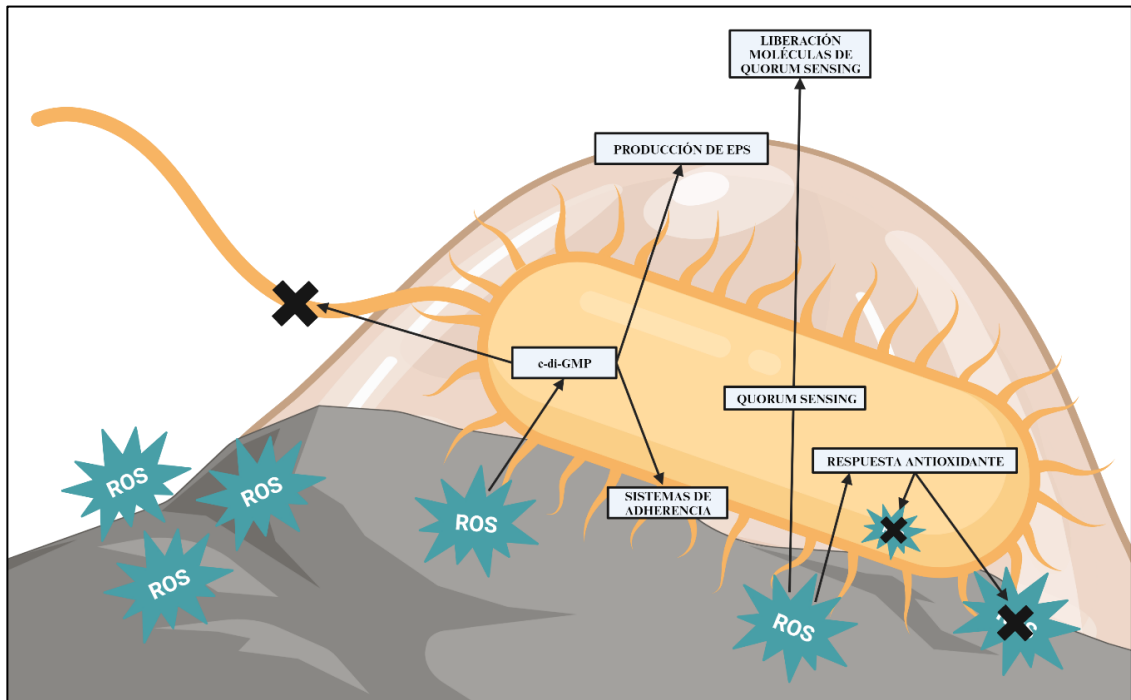
Por otra parte, como se ha indicado previamente, la adherencia y formación de las biopelículas sobre minerales sulfurados también podrían involucrar la participación del mecanismo de *quorum sensing*. La N-acil homoserina lactona (AHL) estaría influyendo en la colonización de pirita en varias bacterias acidófilas del género *Acidithiobacillus*, como *At. ferrooxidans* DSM 14882, *At. ferrivorans* DSM 17398, *At. thiooxidans* DSM 14887 (Bellenberg et al., 2014). Aunque hasta la fecha no existe evidencia genómica de la presencia de genes participantes en la síntesis de AHLs en el género *Leptospirillum*, existen reportes de la participación de otros tipos de moléculas relacionados a *quorum sensing*, como los compuestos de la familia de factor de señal difusible (DSF), los cuales podrían estar influyendo sobre la adherencia a minerales sulfurados en *Leptospirillum* spp. (Valenzuela et al., 2007).

En *L. ferriphilum* DSM 14647 se ha encontrado que posee un grupo de genes que contienen el sistema *rpf*, los cuales están encargados de la síntesis y reconocimiento de las moléculas de la familia DSF (Christel et al., 2017). Estos genes serían funcionales y responderían bajo condiciones de estrés en conjunto con enzimas involucradas en una respuesta antioxidante. Esto ha sido recientemente demostrado en un análisis realizado en nuestro laboratorio al estudiar el transcriptoma de *L. ferriphilum* DSM 14647 bajo condiciones de estrés salino. En este caso, se encontró un aumento en los transcritos para una DSF sintasa (10 veces) y una citocromo *c* peroxidasa (11 veces) (Rivera-Araya y Levicán, 2019). Estos antecedentes indicarían que en el género *Leptospirillum* el sistema de *quorum sensing* podría estar mediado por moléculas DSF y que este sistema podría estar formando parte de una respuesta coordinada frente a condiciones ambientales que involucran estrés salino y oxidativo.



## 1.6 Planteamiento del problema.

Los antecedentes presentados previamente indican que en las bacterias acidófilas las ROS generadas en la superficie de minerales sulfurados podrían desempeñar un papel como señal activadora de vías de señalización y *quorum sensing* para que los microorganismos reconozcan el mineral y, en consecuencia, se adhieran y formen la biopelícula. Asimismo, los sistemas antioxidantes que contribuyen a la eliminación de las ROS acumuladas en la superficie también podrían desempeñar un papel fundamental en el proceso de formación de la biopelícula (Figura 2).



**Figura 2. Modelo de adherencia y formación de biopelícula sobre superficies de minerales sulfurados.** La bacteria acidófila móvil en su estado planctónico reconoce a las ROS generadas espontáneamente en la superficie del mineral como señal para la colonización. Una vez ocurrido el reconocimiento de las ROS, la bacteria cambia su estado fisiológico y aumenta la concentración intracelular de c-di-GMP, ocurre la activación de genes de adherencia y de respuesta antioxidante y se estimula la producción de moléculas de *quorum sensing*. Una vez que las bacterias se adhieren a la superficie, en su conjunto secretan EPS lográndose finalmente la formación de la biopelícula.

Se ha descrito que las bacterias pertenecientes al género *Leptospirillum* desempeñan un papel crucial como colonizadores en minerales sulfurados y como actores clave en el proceso de biolixiviación. Los análisis ómicos realizados en ejemplares de este género, cultivados con minerales sulfurados, han revelado la presencia de genes y proteínas relacionados con la vía de c-di-GMP, *quorum sensing*, adherencia, producción de EPS, así como enzimas y moléculas antioxidantes. No obstante, persiste la necesidad de comprender cómo estos mecanismos interactúan para promover la adherencia y la formación de biopelículas de *Leptospirillum* spp. en minerales sulfurados. Esta tesis ha explorado en parte estos aspectos, poniendo un enfoque particular en el papel de las ROS generadas externamente en el mineral, y su influencia en las respuestas de adherencia en la bacteria modelo *Leptospirillum* sp. CF-1.

### **1.7 Hipótesis.**

La producción de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en la superficie y por lo tanto en el ambiente acuoso circundante de minerales sulfurados, como la pirita, calcopirita y esfalerita, tiene un papel estimulante de la adherencia de la bacteria acidófila *Leptospirillum* sp. CF-1 a estos minerales, existiendo una correlación entre la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cada mineral con la adherencia de *Leptospirillum* sp. CF-1 a cada uno de ellos

### **1.8 Objetivo general.**

Evaluar el efecto del peróxido de hidrógeno en la adherencia de *Leptospirillum* sp. CF-1 a superficies de minerales sulfurados.

### **1.9 Objetivos específicos.**

1. Identificar bioinformáticamente los genes participantes en la adherencia y formación de biopelículas en *Leptospirillum* sp. CF-1.
2. Determinar la participación del peróxido de hidrógeno en la adherencia de *Leptospirillum* sp. CF-1 a minerales sulfurados.
3. Evaluar el efecto del peróxido de hidrógeno sobre el proteoma de *Leptospirillum* sp. CF-1 tanto en células planctónicas y adheridas a minerales sulfurados.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Identificación bioinformática de genes participantes en la adherencia y formación de biopelículas en *Leptospirillum* sp. CF-1.

Para investigar los mecanismos de adherencia que utiliza *Leptospirillum* sp. CF-1. se realizó un análisis bioinformático del genoma que permitió predecir proteínas y sistemas posiblemente involucrados en la colonización de minerales. Se extendió este análisis a diferentes representantes de bacterias acidófilas, para permitir generar información sobre mecanismos generales y específicos de adherencia en los diferentes grupos.

#### 2.1.1 Análisis bioinformático.

En este análisis se incluyeron secuencias genómicas públicas y de aislados ambientales privados y se consideró incorporar la mayor cantidad de clases dentro de los filos bacterianos. Todos los microorganismos utilizados en este análisis se detallan en la Tabla 1. Para todos se realizó la búsqueda de genes de sistemas relacionados a la adherencia haciendo énfasis en el pili tipo IV, el sistema Tad y la flagelina. Además, en el caso particular de *Leptospirillum* sp. CF-1 se realizó una búsqueda específica de genes relacionados a señalización mediada por c-di-GMP (diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas), así como también genes relacionados al *quorum sensing*. Los genes codificantes para estas proteínas se identificaron en cada genoma utilizando la herramienta de bioinformática SnapGene (<https://www.snapgene.com/>) y la tecnología online RAST (<https://rast.nmpdr.org/>). Para deducir la homología, se emplearon criterios

BLASTp que consideraban una identidad del 30%, una cobertura del 80% y la presencia de dominios conservados en las secuencias de aminoácidos. Para los alineamientos y análisis filogenéticos se usó el software MEGA X (<https://www.megasoftware.net/>).

**Tabla 1:** Lista de los microorganismos utilizados para la identificación bioinformática de los genes codificantes para elementos estructurales de adherencia.

<i>Filo</i>	<i>Clase</i>	<i>Bacteria</i>
<b><i>Proteobacteria</i></b>	Acidithiobacilia	<i>Acidithiobacillus albertensis</i> DSM14366
		<i>Acidithiobacillus caldus</i> ATCC51756
		<i>Acidithiobacillus ferridurans</i> JCM18981
		<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> SS3
		<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC23270
		<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> ATCC19377
		<i>Acidithiobacillus sulfuriphilus</i> CJ-2
	Betaproteobacteria	<i>Ferrovum myxofaciens</i> P3G
		<i>Gallionella capsiferriformans</i> ES-2
		<i>Sideroxydans lithotrophicus</i> ES-1
	Gammaproteobacteria	<i>Acidiferrobacter thiooxydans</i> ZJ
		<i>Acidihalobacter ferrooxydans</i> V8
		<i>Acidihalobacter prosperus</i> DSM5130
	Epsilonproteobacteria	<i>Sulfurimonas autotrophica</i> DSM16294
		<i>Sulfurimonas denitrificans</i> DSM1251
Zetaproteobacteria	<i>Mariprofundus ferroxydans</i> O-1	
<b><i>Nitrospirota</i></b>	Nitrospiria	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i> C2-3
		<i>Leptospirillum ferriphilum</i> DSM14647
		<i>Leptospirillum</i> sp. CF-1
		<i>Leptospirillum rubarum</i>
<b><i>Bacillota</i></b>	Bacilli	<i>Acidibacillus sulfuroxidans</i> Y002
		<i>Acidibacillus ferroxidans</i> Huett2
		<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> TC4-1
		<i>Alicyclobacillus tengchongensis</i> CGMCC1504
	Sulfobacillia	<i>Sulfobacillus acidophilus</i> TPY
		<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> DSM9293
		<i>Sulfobacillus thermotolerans</i> Kr1

## **2.2 Determinación de la participación del peróxido de hidrógeno en la adherencia de *Leptospirillum* sp. CF-1 a minerales sulfurados.**

### **2.2.1 Cepa bacteriana y condiciones de cultivo.**

La bacteria acidófila *Leptospirillum* sp. CF-1 fue provista por el laboratorio de Microbiología Básica y Aplicada de la Universidad de Santiago de Chile. Para su crecimiento se utilizó el medio de cultivo 9K ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,132 g/L; KCL 0,0373 g/L; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O 0,027 g/L; MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 1,23 g/L) según lo descrito por Belnap y cols. (2010), con ciertas adaptaciones. Para la preparación del medio, en primer lugar, se ajustó a un pH de 1,75 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> antes de su esterilización en autoclave. Seguido de la esterilización y una vez enfriado a temperatura ambiente, se suplementó con sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O pH 1,2) estéril a una concentración final de 63 mM antes de su uso. Los inóculos bacterianos se agregaron al medio fresco a una concentración de 10% p/v (aproximadamente 10<sup>8</sup> cel/mL) y se incubó a 37°C por 48-72 h con agitación constante a 120 rpm. El almacenamiento de la cepa bacteriana se efectuó a temperatura ambiente en medio 9K pH 1,75 (sin sulfato ferroso) suplementado con gránulos de pirita de 50-100 µm de tamaño a una concentración de 5% p/v.

### **2.2.2 Preparación de minerales sulfurados.**

Los minerales utilizados en esta tesis fueron provistos por el Dr. Michael Schlömann (Institute of Biosciences, TU Bergakademie Freiberg, Alemania). Estos correspondían a pirita (FeS<sub>2</sub>), calcopirita (CuFeS<sub>2</sub>), esfalerita (ZnS) de 50-100 µm de tamaño. Antes de su uso, cada mineral se sumergió en HCl 6 M durante 30 min, seguido de un lavado con agua desionizada hasta obtener un pH neutro. Posteriormente y una vez

descartada el agua, los minerales se agitaron en acetona durante 30 min para eliminar compuestos solubles de azufre. Las muestras minerales se mantuvieron en una campana de extracción a temperatura ambiente durante 12 a 24 h para evaporar los residuos de acetona. Cada mineral se sometió a una atmósfera de nitrógeno, se esterilizó en seco durante 24 h a 120°C, y se almacenó en recipientes de vidrio herméticos y estériles. Finalmente, con el propósito de evaluar si la composición de los minerales se conservaba luego de los tratamientos, se llevó a cabo un análisis de difracción de rayos X en la Universidad Técnica de Freiberg (TU Bergakademie Freiberg, Alemania). En este análisis se utilizó mineral no tratado como control.

### **2.2.3 Medición del peróxido de hidrógeno en minerales sulfurados en suspensión.**

La cantidad de peróxido de hidrógeno generado en suspensiones de minerales sulfurados se midió en los minerales nombrados en el punto anterior incluyendo como control cuarzo ( $\text{SiO}_2$ ) (Sigma), el cual no es un mineral sulfurado y se ha demostrado que produce mínimas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en comparación a la pirita en condiciones neutras y ácidas (Jones et al., 2013). Para determinar las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se usó el kit con la sonda fluorescente 3'-(p-aminofenil) fluoresceína (APF) (Santa Cruz Biotechnology Inc). Este método se basa principalmente en la conversión de una sonda molecular no fluorescente en una molécula fluorescente tras la reacción con el radical hidroxilo o la combinación de peroxidasa de rábano (HPR) con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Cohn et al., 2009).

Como paso previo, se realizó una curva de calibración para establecer la relación cuantitativa entre la intensidad de fluorescencia y concentraciones conocidas del peróxido

de hidrógeno. Esto se hizo en placas de 96 pocillos a través de reacciones con 10  $\mu\text{M}$  de la sonda APF, 50 mM de tampón fosfato a pH 7,4, 0,2  $\mu\text{M}$  de peroxidasa HRP y concentraciones de 0-10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se determinó la fluorescencia para cada concentración usando un lector de fluorescencia con excitación a 490/520 nm (Jones et al., 2011; 2013).

Finalmente, para la cuantificación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , los diferentes minerales en forma de gránulos de 50-100  $\mu\text{m}$  se depositaron en matraces que contenían 50 mL de medio 9K sin hierro a una relación de 2% p/v. Cada matraz se incubó por 8 h y se determinó la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la suspensión cada 1 h, usando el mismo método de la sonda APF descrito anteriormente.

#### **2.2.4 Estimación de la adherencia a superficies de minerales sulfurados.**

Una vez realizada la cuantificación de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el tiempo en la suspensión de cada mineral, se procedió a determinar la adherencia de *Leptospirillum* sp. CF-1 a cada uno de ellos en el tiempo.

Para la estimación de la adherencia de *Leptospirillum* sp. CF-1 sobre cada mineral, se realizó un ensayo por triplicado en matraces con 50 mL de medio de cultivo 9K conteniendo los minerales correspondientes a 2% p/v de forma separada. Los matraces se inocularon con *Leptospirillum* sp. CF-1 de manera de obtener una densidad celular de  $10^8$  cel/mL y se incubaron durante 8 h. La adherencia se cuantificó cada 2 h; para esto se retiró una alícuota de 1 mL, se centrifugó a 1.000 x g (para retirar las partículas de mineral) por 1 min y se realizó el recuento microscópico de las células planctónicas en el sobrenadante mediante cámara Neubauer Improved. Al resultado de la cuantificación, expresado en cel/mL, se le restó al valor de densidad celular inicial del cultivo; la



diferencia obtenida representó el número estimado de células adheridas a cada mineral en cada tiempo (Harneit et al., 2006).

### **2.2.5 Evaluación del efecto del peróxido de hidrógeno exógeno sobre la adherencia.**

Determinadas tanto la cuantificación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la suspensión de cada mineral como la adherencia de *Leptospirillum* sp. CF-1 a cada uno ellos, a continuación, se evaluó si la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno tendría un estímulo positivo en la adherencia a la superficie del mineral. Además, al mismo tiempo se determinaron aquellas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que tienen el mejor efecto estimulante.

Para esto se utilizó la misma metodología que en el punto anterior (2.2.4 de los materiales y métodos), determinándose la adherencia cada 2 h mediante el recuento bacteriano utilizando la cámara Neubauer Improved, pero en este caso se añadió a cada matraz de forma exógena e independiente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en concentraciones de 0; 0,1; 1 y 10 μM. Además, para comprobar que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno no tuvo un efecto tóxico para la célula, se determinó la densidad de células planctónicas en cultivos sin minerales suplementados con hierro, y con y sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **2.2.6 Evaluación de la adherencia a través de microscopía de fluorescencia.**

Para tener un registro visual y poder estimar el grado de colonización del mineral, en paralelo se realizó la observación microscópica de gránulos de pirita colonizados con *Leptospirillum* sp. CF-1 junto con el análisis respectivo de las imágenes utilizando microscopía de fluorescencia. Los gránulos utilizados tenían un tamaño de 50-100 μm y provenían de los cultivos con y sin adición de 10 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (experimentos de las secciones 2.2.4 y 2.2.5 de los materiales y métodos).

Los gránulos de pirita fueron removidos del medio y lavados 2 veces con agua ácida estéril ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  10 mM, pH 1,7) para retirar las células en estado planctónico. Luego, se realizó una fijación de las células que se encontraban adheridas usando 2,5% de glutaraldehído e incubando a temperatura ambiente por 15 min. Posterior a la fijación, los gránulos se lavaron 2 veces con agua ácida estéril y se resuspendieron en agua ultra pura ajustada a pH 1,7. De esta mezcla se tomaron 50  $\mu\text{L}$  y se realizó la tinción de las células adheridas a pirita utilizando una solución de 6  $\mu\text{M}$  de Syto® 9 (Invitrogen©) durante 15 min. Los gránulos de pirita se montaron en portaobjetos de vidrio usando Citifluor® AF2. Se utilizó un módulo de escaneo láser (LSM 510 Carl Zeiss® Jena) acoplado a un microscopio invertido Axiovert100MBP (Zeiss®). Para la detección específica de la fluorescencia de Syto® 9, se utilizó un láser de argón a 488 nm y un filtro de paso de banda de 505-550 nm a una energía láser de excitación constante y configuraciones de detector constantes. El microscopio fue operado con el software LSM 510 Release 3.2 (Zeiss®) (Bellenberg et al. 2019). Para el cálculo del área colonizada ( $\mu\text{m}^2$ ) de cada gránulo de pirita por *Leptospirillum* sp. CF-1 en las imágenes obtenidas, se utilizó el software Zen Blue (Zeiss®).

### **2.2.7 Análisis estadístico.**

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos en todo el apartado 2.2 de los materiales y métodos se utilizó ANOVA de una vía para comparaciones con respecto a una de las condiciones y ANOVA de dos vías para múltiples comparaciones a través del uso del software GraphPad Prism (Versión 9) disponible en

<https://www.graphpad.com/>. Además, se realizaron pruebas post hoc, incluyendo el test de Tukey y el test de Dunnett, para análisis detallados de las diferencias entre condiciones.

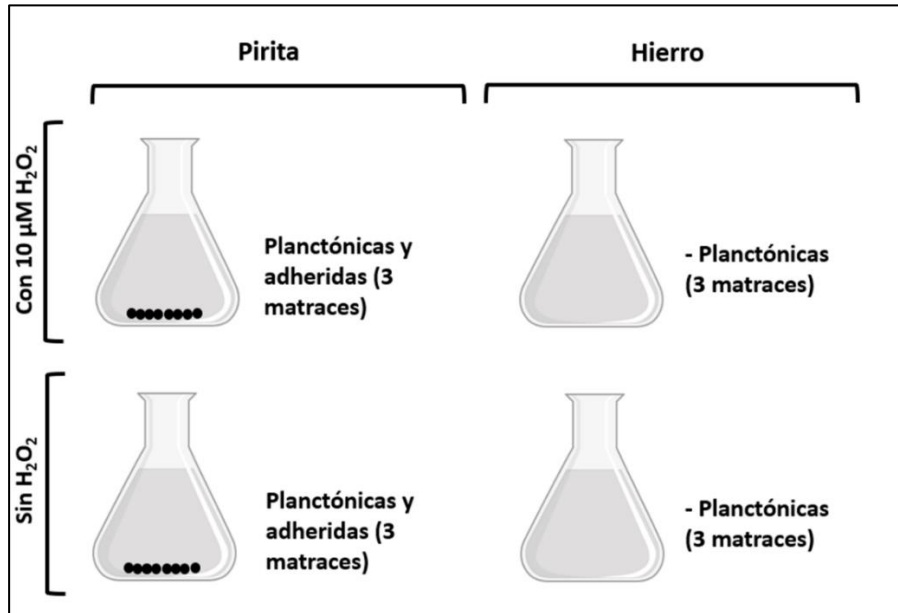
### **2.3 Evaluación del efecto del peróxido de hidrógeno sobre el proteoma de *Leptospirillum* sp. CF-1 en células planctónicas y adheridas a minerales sulfurados.**

Este punto tuvo como propósito evaluar el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre células planctónicas y adheridas a pirita a través de la caracterización del proteoma con énfasis en proteínas relacionadas a la adherencia, formación de biopelículas y con función antioxidante durante el proceso de colonización de minerales sulfurados.

#### **2.3.1 Condiciones de cultivo para la extracción de proteínas totales.**

Por triplicado, en 12 matraces de 2 litros de volumen se añadieron 500 mL de medio de cultivo 9K fresco sin hierro y se inocularon con *Leptospirillum* sp. CF-1 de manera de obtener una densidad final de 10<sup>8</sup> cel/mL. A 6 de los matraces se le añadió pirita a 2% p/v, y a 3 de ellos además se les complementó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para obtener una concentración final de 10 µM. A los otros 6 cultivos se les suplementó el hierro y al igual que la condición anterior, a 3 de ellos además se les añadió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 3). Todos los matraces se incubaron durante 2 h a 37°C a 150 rpm. Tal como se muestra en la Figura 3, posterior a la incubación se procedió con la extracción de proteínas totales de las siguientes condiciones: células adheridas a pirita en presencia (3 extracciones) y ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 extracciones), células planctónicas de los cultivos con pirita en presencia (3 extracciones) y ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 extracciones), células planctónicas de cultivos con

hierro en presencia (3 extracciones) y ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 extracciones). Todo lo anterior sumó en total 18 condiciones distintas para la extracción de proteínas totales.



**Figura 3. Diseño experimental de los cultivos usados para la extracción de proteínas totales.** Se utilizó pirita al 2% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 μM. El experimento se realizó por triplicado.

### 2.3.2 Extracción de proteínas totales de cultivos en estado planctónico y adheridos a pirita.

Posterior a las 2 h de incubación de los cultivos del paso 2.3.1, los cultivos con pirita se dejaron inmóviles durante 2 min para permitir la decantación del mineral. Luego se separaron los gránulos de pirita de las células planctónicas en tubos de centrifuga de 50 mL. Los cultivos con hierro también se transfirieron a tubos de centrifuga de 50 mL. Las células planctónicas de estos cultivos se colectaron por centrifugación a 10.000 x g a 4°C por 15 min, se descartó el sobrenadante y los pellets fueron resuspendidos en 2 mL de agua ácida fría.

A cada tubo, tanto con gránulos de mineral como con pellets de células planctónicas se les añadió 8 mL de tampón de extracción (2% SDS en 10X de tampón Tris-EDTA a pH 8.0) y se incubó a 67°C por 10 min aplicando vórtex cada 1 min. Se agregó 8 mL de fenol a cada tubo y se incubó nuevamente a 67°C por 10 min aplicando vórtex cada 2 min. A continuación, se centrifugó a 12.000 x g por 7 min, se recuperó la fase acuosa y se agregó 1 volumen de agua ultra pura seguido de la aplicación de vórtex. Luego, se calentó a 67°C por 10 min y se volvió a aplicar vórtex cada 2 min seguido de una incubación en hielo durante 10 min para continuar con una centrifugación a 7.000 x g por 10 min a 4°C. A continuación, se descartó la fase acuosa y se agregó 1,5 volumen de acetona fría, dejando precipitar las proteínas toda la noche a -20°C. Finalmente, se centrifugó a 7.000 x g por 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante, el pellet se dejó secar a temperatura ambiente, y se guardó a -20°C hasta su uso para el análisis proteómico.

### **2.3.3 Análisis proteómico.**

Previo al envío para la secuenciación de los proteomas, se realizó la cuantificación de la concentración de proteínas totales mediante el kit BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). Posterior a la cuantificación, las muestras fueron enviadas a la empresa Tianjin Novogene Bioinformatic Technology Co., Ltd, la cual realiza la secuenciación a través del análisis de LC-ESI-MS/MS en un UHPLC nanoAcquity acoplado al sistema LTQ-XL Orbitrap. La adquisición de datos se realizó mediante software especializado. Los datos del análisis proteómico, y búsqueda se procesaron utilizando el software Andrómeda. Como referencia, se utilizó el proteoma de *Leptospirillum* sp. CF-1 compilado a partir de la base de datos Uniprot.

### 3. RESULTADOS

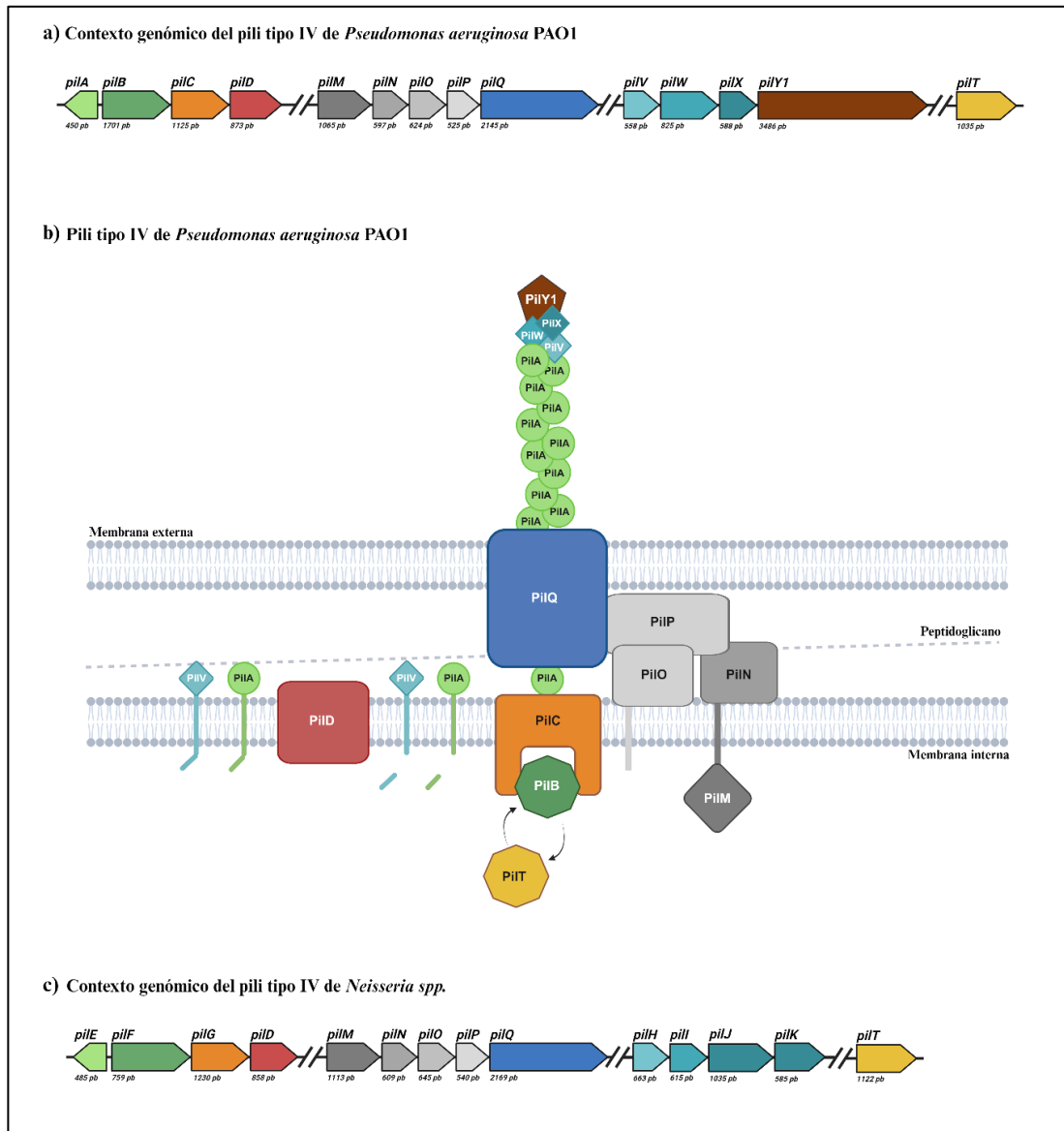
#### 3.1 Identificación bioinformática de genes participantes en la adherencia inicial a superficies minerales en *Leptospirillum* sp. CF-1 y otras bacterias acidófilas.

Ante la escasez de datos sustanciales sobre los mecanismos de adherencia en microorganismos acidófilos y su distribución prevalente dentro de estos ambientes, se llevó a cabo un análisis bioinformático. El objetivo fue identificar y comparar los mecanismos involucrados en la adherencia de diversas bacterias acidófilas, centrándose en genes asociados con elementos estructurales de adherencia, como los pili tipo IV, el sistema Tad y la flagelina. Adicionalmente, se realizó una indagación específica para *Leptospirillum* sp. CF-1, con el propósito de buscar genes que participan indirectamente en la adherencia, con un enfoque particular en aquellos relacionados con la señalización c-di-GMP y el sistema de *quorum sensing*.

##### 3.1.1 Elementos estructurales de adherencia en bacterias acidófilas.

**Pili tipo IV (T4P).** El T4P es un sistema compuesto por diversas proteínas que permiten que un conjunto de pilinas; mayores y menores, puedan elongarse o retraerse para formar un filamento que queda anclado a la membrana y expuesto al medio extracelular, y que tiene por función la adherencia a distintas superficies (Burrows, 2012). En *P. aeruginosa* PAO1, bacteria en donde el sistema ha sido ampliamente descrito, el gen que codifica para la pilina principal o mayor, identificado como *pilA*, se encuentra en la misma región genómica que *pilB*, *pilC* y *pilD*, los cuales codifican para una ATPasa de elongación, una proteína de plataforma de la membrana interna y una prepilina peptidasa

respectivamente. En otra parte del genoma se encuentran los genes codificantes para las proteínas de ensamblaje (*pilM*, *pilN*, *pilO* y *pilP*) y para la secretina (*pilQ*). Los genes de las pilinas menores (*pilV*, *pilW* y *pilX*) se encuentran en un mismo clúster con el gen de la adhesina PilY1 (*pilY1*), mientras que el último componente del sistema, el gen codificante para la ATPasa de retracción *pilT*, se encuentra separado y distante en el genoma. En *Neisseria*, otro género bacteriano en donde se ha descrito el T4P, se mantiene mayoritariamente el orden y distribución de los genes, aunque algunos tienen diferente nombre (Winter-Larsen et al., 2005). En la Figura 4 se puede observar el contexto genómico de los genes del T4P para estas 2 bacterias modelo junto con una representación del ensamblaje de las proteínas codificadas en la membrana celular para dar origen al T4P.



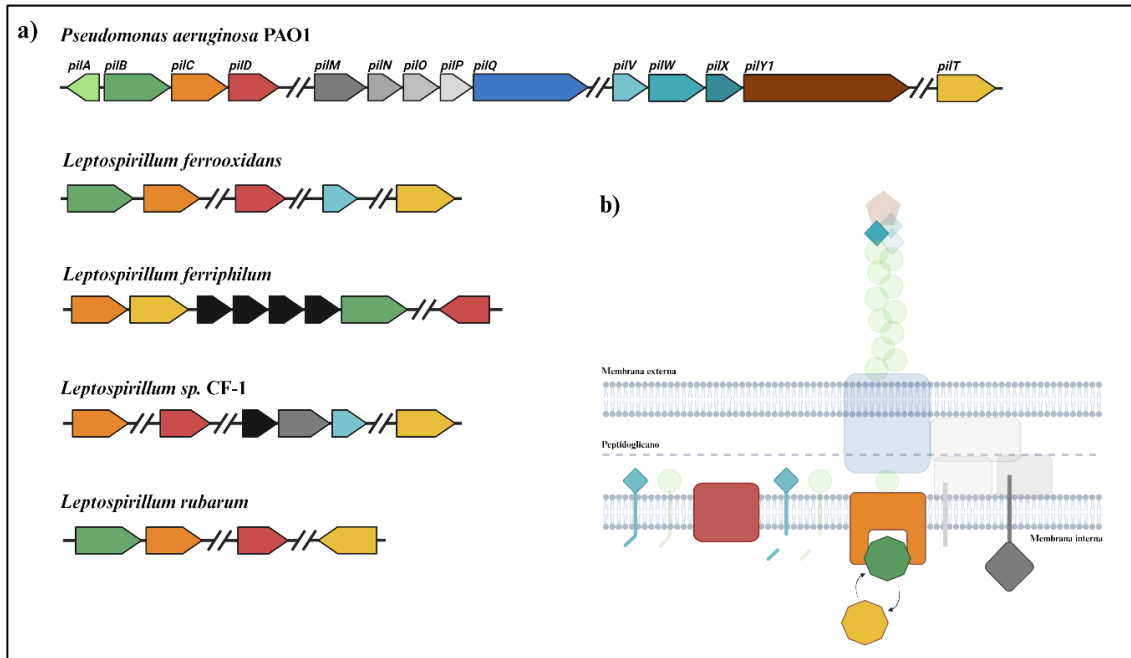
**Figura 4. Contexto genómico y esquema de la estructura del T4P en *P. aeruginosa* PAO1 y *Neisseria* spp.** a) Contexto genómico de *P. aeruginosa* PAO1. b) Representación esquemática del T4P de *P. aeruginosa* PAO1 c) Contexto genómico de los genes *pil* en *Neisseria* spp.



Según los resultados obtenidos en la clase Nitrospiria, que incluye a las bacterias acidófilas del género *Leptospirillum*, se observó una detección limitada de genes asociados a los componentes del T4P. En general, entre los genes identificados se encuentran PilB, PilC, PilD y PilT (Figura 5), que corresponden a una ATPasa de elongación, la proteína de la plataforma de membrana interna, la prepilina peptidasa y la ATPasa de retracción, respectivamente. No se lograron identificar las pilinas mayores ni menores, excepto en los genomas de *L. ferrooxidans* y *Leptospirillum* sp. CF-1, donde se identificó la pilina menor PilV.

En el genoma de *Leptospirillum* sp. CF-1, los genes relacionados con el T4P se encontraron distribuidos en cuatro clústeres distintos: uno que contiene *pilC*, un segundo clúster con *pilD*, un tercero conformado por una proteína hipotética ubicada antes de *pilM* y *pilV*, y finalmente un cuarto clúster que alberga *pilT*. En *L. ferrooxidans*, se hallaron los genes en cuatro clústeres diferentes: uno con *pilB* y *pilC*, otro con *pilD*, un tercero con *pilV*, y un cuarto con *pilT*. En *L. ferriphilum*, los genes relacionados al T4P se distribuyeron en dos clústeres: uno con *pilC*, *pilT*, cuatro proteínas hipotéticas de tamaño similar, y *pilB*; y un segundo clúster con el gen de la prepilina peptidasa PilD. Finalmente, en *L. rubarum*, los genes se encontraron en tres clústeres, con una disposición similar a *L. ferrooxidans*, excepto por la ausencia de un clúster que contenga el gen de la pilina menor PilV. Al analizar en detalle las secuencias aminoacídicas de la ATPasa de retracción PilT, se obtuvo como resultado que en los cuatro genomas de los representantes del género *Leptospirillum* estudiados existe una conservación del 100% en la posición de 42 aminoácidos lo que corresponde aproximadamente al 13% de la proteína. En el caso de PilB, la ATPasa de elongación, se encontró que a pesar de que el tamaño de la proteína

es variable (855 aa para *L. ferriphilum*, 581 aa para *L. ferrooxidans* y 580 aa para *L. rubarum*) existen 138 aminoácidos conservados en un 100% dentro de la secuencia aminoacídica.

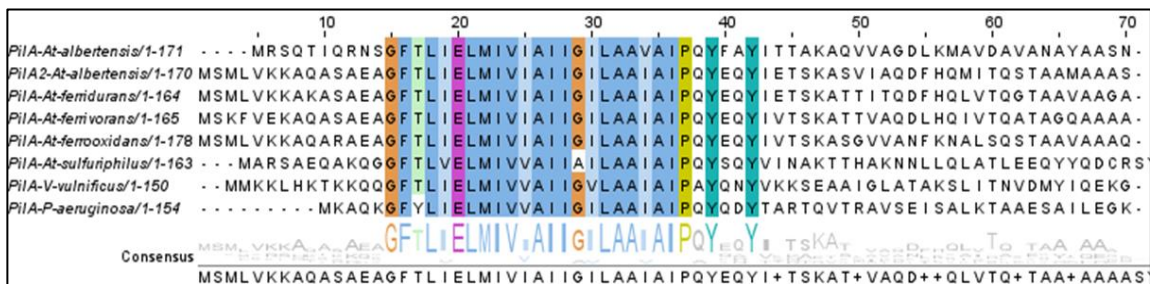


**Figura 5. Contexto genómico y esquematización del T4P en el género *Leptospirillum*.**  
a) Contexto genómico de los genes presentes en diferentes representantes del género *Leptospirillum*. b) Proteínas que componen el T4P en el género *Leptospirillum*.

Al extender el análisis a otros grupos de acidófilas se encontraron notorias diferencias en la cantidad de genes encontrados para el T4P. Se pudo evidenciar que las bacterias del género *Acidithiobacillus* poseen en sus genomas casi la totalidad de genes que codifican para las distintas proteínas que forman parte del T4P. La región genómica donde se encuentran las proteínas de ensamblaje PilM, PilN, PilP y la secretina PilQ se conserva en todo el género, solo destacando una copia extra de PilM en *At. ferrooxidans*. La pilina mayor PilA fue encontrada en varios representantes del género *Acidithiobacillus*

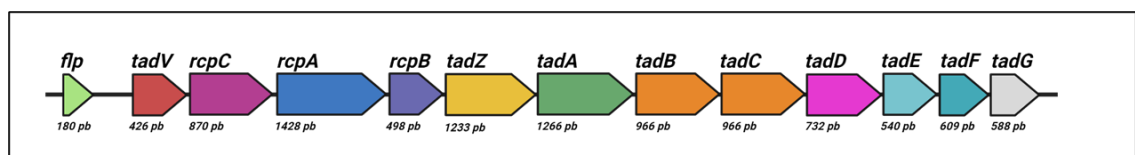
(*At. albertensis*, *At. ferridurans*, *At. ferrivorans* y *At. thiooxidans*). En un análisis más profundo de la pilina principal PilA de *Acidithiobacillus* se encontró que existe una región conservada en el extremo N-terminal de la proteína. Cuando se compararon las secuencias aminoacídicas de PilA del género *Acidithiobacillus*, se obtuvo que el porcentaje de identidad de estas proteínas es del 10,7% con 23 aminoácidos en una posición idéntica, mientras que cuando se compararon estas mismas con la PilA de *P. aeruginosa*, este porcentaje bajó a un 8,8% de identidad con 21 aminoácidos en una posición idéntica y 12 aminoácidos en una posición similar pero variable. A pesar de esta baja en la identidad, la región conservada en el extremo N-terminal se sigue manteniendo (Figura 6).

En el caso de las Gammaproteobacteria, éstas también contienen los genes codificantes para los componentes principales del T4P. Una excepción a esto fueron *Acidiferrobacter thiooxidans* y *Acidihalobacter ferrooxydans*, en las cuales no fue posible encontrar un gen para la pilina principal (PilA/PilE). En esta clase de bacterias el clúster de genes de las proteínas de ensamblaje y la secretina también se mantienen en una organización y distribución específica en una región genómica.



**Figura 6. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la región N-terminal de la pilina mayor PilA del género *Acidithiobacillus*. Se incluyeron también las proteínas PilA de *Vibrio vulnificus* y *P. aeruginosa*.**

**Sistema Tad.** Al igual que el T4P, el sistema Tad está compuesto por diversas proteínas que se encargan de elongar el filamento de las pilinas mayores hacia el exterior de la célula (Figura 7). La pilina mayor de este sistema es Flp y se encuentra ubicada normalmente lejos de los otros genes de este sistema, los cuales a diferencia de T4P se ha descrito que se encuentran todos ordenados en un clúster dentro del genoma. En ninguno de los genomas de las clases  $\gamma$ -proteobacteria y Nitrospiria fue posible encontrar alguno de los genes que componen este sistema. En los genomas de *At. ferridurans*, *At. ferrooxidans*, *Ferrovum myxofaciens* y en los géneros *Acidibacillus* y *Sulfobacillus* se detectó genes para la pilina Flp. Los otros componentes del sistema Tad que pudieron ser encontrados fueron la ATPasa de elongación TadA, y las proteínas de membrana interna TadB y TadC. Estos tres componentes son los que se encuentran más conservados cuando el genoma estudiado presenta el sistema Tad. Por último, la secretina RcpA solo fue identificada en el género *Acidithiobacillus* y *Ferrovum*, no pudiendo ser identificada en ninguna de las otras acidófilas Gram positivas donde se encontró el gen de la pilina Flp o los genes *tad* (Tabla 2).



**Figura 7. Organización y disposición específica de los genes del sistema Tad en *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*** (adaptado de Kachlany et al., 2000).

**Tabla 2:** Genes codificantes para las proteínas del Sistema Tad en los diferentes genomas de las bacterias acidófilas estudiadas.

	Genes codificantes para las proteínas del Sistema Tad												
	Pilina mayor	Pilinas menores			Secretina	Proteína de ensamble	Plataforma membrana interna		ATPasa de elongación	ATPasa de retracción	Prepilin Peptidasa	Ensamble membrana externa	Otras funciones
Bacteria	<i>flp</i>	<i>tadE</i>	<i>tadF</i>	<i>rcpA</i>	<i>tadG</i>	<i>tadB</i>	<i>tadC</i>	<i>tadA</i>	<i>tadZ</i>	<i>tadV</i>	<i>rcpB</i>	<i>rcpC</i>	<i>tadD</i>
<i>Acidithiobacillus caldus</i>	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
<i>Acidithiobacillus ferridurans</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Acidithiobacillus sulfuriphilus</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Ferrofumus myxofaciens</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>Sulfurimonas autotrophica</i> *	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Acidibacillus sulfuroxidans</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Acidibacillus ferroxidans</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>Allicyclobacillus acidocaldarius</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Sulfobacillus acidophilus</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Sulfobacillus thermotolerans</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-

\*: *Sulfurimonas autotrophica* corresponde a una bacteria neutrófila oxidante de azufre.

**Flagelina.** La flagelina es una proteína que participa en la adherencia de diferentes bacterias a una superficie, y ha sido especialmente estudiada en patógenos. Es una proteína estructural codificada por el gen *flaA/flaB* que forma parte de los filamentos flagelares y que contiene un dominio conservado que está muy extendido en las especies bacterianas. Dentro de los genomas estudiados, los del género *Leptospirillum* se destacaron por poseer más de una copia de este gen en sus genomas descritos como *flaA* y *flaB*. En la Figura 8 se observa el alineamiento de las secuencias aminoacídicas tanto para las flagelinas FlaA como para FlaB encontradas en los diferentes genomas estudiados. Se destaca la presencia de regiones conservadas en la región N-terminal (encerradas en cuadro rojo). Este grado de conservación se acentúa cuando se compara solo las proteínas encontradas en el género *Leptospirillum* (Figura 9).

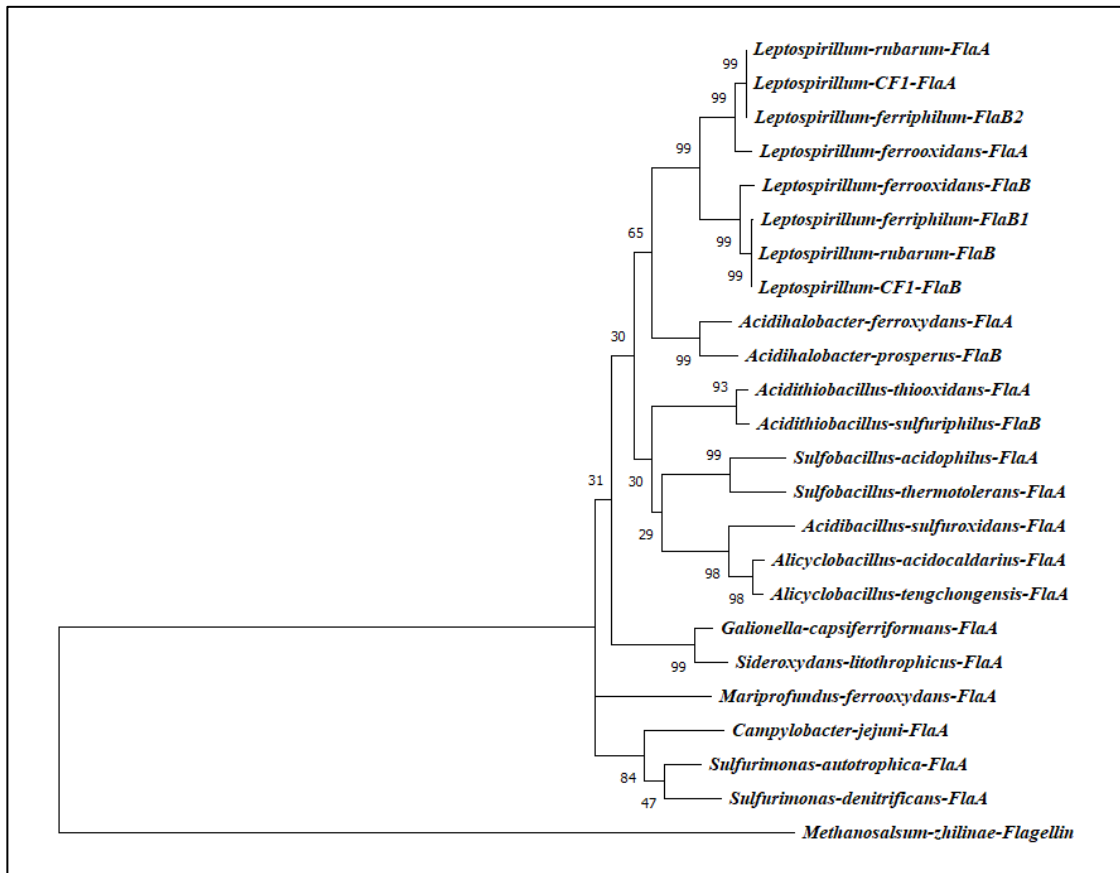
Acidibacillus-sulfuroxidans-FlaA	1	MSSFFVYNNHAKQCIILQNLNVONNINSEY	FALESSENSAARDNPAEYSEH	QMTSQVNLNQATQNNQNGISMIQTATGAMNQ
Acidihalobacter-ferroxydans-FlaA	1	--MSLPIYHTTASLAAQNNLSKTSQLDNAL	QLSSGLRNSPADNPAEYALH	QMTSQIINGFNQIRNANDGISFAQVANGALNT
Alicyclobacillus-acidocaldarius-FlaA	1	MSLNFRVYNNHAKSALILSNLQYVNEINTSY	QLESNGRNSAARDPAEYALH	QMTAQVNALNQIRNANDGISMLQTAGAMNQ
Alicyclobacillus-tengchongensis-FlaA	1	MALDFSGNNHAKSALILSNLSAVNNALINTSY	QLESNGRNSAARDPAEYALH	QMTAQVNALNQIRNANDGISMLQTAGAMNQ
Acidithiobacillus-thiooxidans-FlaA	1	MAISGIIYNTTSLTLNLNLNGTQGSINTYV	QLESNGRNSAARDPAEYALH	RFOTQINGMNRISNGNDGVSIVQTATGAIQN
Gallionella-capsiferiformans-FlaA	1	--MACVINTVSSLLTSQLNKSINLGLQTAM	QLSSGLRNSAKDDPAEYALH	RFYDQIRGNSQIRNANDGISLQTAGYRAQ
Leptospirillum-ferrooxydans-FlaA	1	--MSGVINTVTSALQAQVNLNATQDRLNRSI	FRSSGYRVNSPADNPAEYALH	QVWNSYVKSQQIRNANDGISLQTAGYRAQ
Leptospirillum-rubrum-FlaA	1	--MSGVINTVTSALQAQVNLNATQDRLNRSI	FRSSGYRVNSPADNPAEYALH	QVWNSYVKSQQIRNANDGISLQTAGYRAQ
Leptospirillum-CF1-FlaA	1	--MSGVINTVTSALQAQVNLNATQDRLNRSI	FRSSGYRVNSPADNPAEYALH	QVWNSYVKSQQIRNANDGISLQTAGYRAQ
Mariprofundus-ferrooxydans-FlaA	1	---MISVQYNNAMTALKNLNATQDRLNRSI	FRSSGYRVNSPADNPAEYALH	QVWNSYVKSQQIRNANDGISLQTAGYRAQ
Sulfurimonas-autotrophica-FlaA	1	--MSPRINTVTSALQAQVNLNATQDRLNRSI	FRSSGYRVNSPADNPAEYALH	QVWNSYVKSQQIRNANDGISLQTAGYRAQ
Sulfurimonas-denitrificans-FlaA	1	--MSPRINTVTSALQAQVNLNATQDRLNRSI	FRSSGYRVNSPADNPAEYALH	QVWNSYVKSQQIRNANDGISLQTAGYRAQ
Sideroxydans-lithotrophicus-FlaA	1	--MACVINTVTSALQAQVNLNATQDRLNRSI	FRSSGYRVNSPADNPAEYALH	QVWNSYVKSQQIRNANDGISLQTAGYRAQ
Sulfobacillus-acidophilus-FlaA	1	---MISVQYNNAMTALKNLNATQDRLNRSI	FRSSGYRVNSPADNPAEYALH	QVWNSYVKSQQIRNANDGISLQTAGYRAQ
Sulfobacillus-thermotolerans-FlaA	1	---MISVQYNNAMTALKNLNATQDRLNRSI	FRSSGYRVNSPADNPAEYALH	QVWNSYVKSQQIRNANDGISLQTAGYRAQ
Acidihalobacter-prosperus-FlaB	1	MALSGIYNTTSLTLNLNLSTQGNLNTYV	QLESNGRNSAARDPAEYALH	RFOTQINGMNRISNGNDGVSIVQTATGAIQN
Acidithiobacillus-sulfuriphilus-FlaB	1	MALSGIYNTTSLTLNLNLSTQGNLNTYV	QLESNGRNSAARDPAEYALH	RFOTQINGMNRISNGNDGVSIVQTATGAIQN
Leptospirillum-ferrophilum-FlaB1	1	--MSGVINTVTSALQAQVNLNATQDRLNRSI	FRSSGYRVNSPADNPAEYALH	QVWNSYVKSQQIRNANDGISLQTAGYRAQ
Leptospirillum-ferrophilum-FlaB2	1	--MSGVINTVTSALQAQVNLNATQDRLNRSI	FRSSGYRVNSPADNPAEYALH	QVWNSYVKSQQIRNANDGISLQTAGYRAQ
Leptospirillum-ferrooxydans-FlaB	1	--MSGVINTVTSALQAQVNLNATQDRLNRSI	FRSSGYRVNSPADNPAEYALH	QVWNSYVKSQQIRNANDGISLQTAGYRAQ
Leptospirillum-rubrum-FlaB	1	--MSGVINTVTSALQAQVNLNATQDRLNRSI	FRSSGYRVNSPADNPAEYALH	QVWNSYVKSQQIRNANDGISLQTAGYRAQ
Leptospirillum-CF1-FlaB	1	--MSGVINTVTSALQAQVNLNATQDRLNRSI	FRSSGYRVNSPADNPAEYALH	QVWNSYVKSQQIRNANDGISLQTAGYRAQ
Helicobacter-pylori-Flagellin	1	--MSFRINTVTSALQAQVNLNATQDRLNRSI	FRSSGYRVNSPADNPAEYALH	QVWNSYVKSQQIRNANDGISLQTAGYRAQ
Campylobacter-jejuni-FlaA	1	---MSFRINTVTSALQAQVNLNATQDRLNRSI	FRSSGYRVNSPADNPAEYALH	QVWNSYVKSQQIRNANDGISLQTAGYRAQ

**Figura 8. Alineamiento de las diferentes secuencias aminoacídicas tanto para FlaA como para FlaB en los diferentes acidófilos estudiados.** Como referencia se utilizaron las flagelinas de *Helicobacter pylori* y *Campylobacter jejuni*. En el cuadro rojo se resalta las regiones conservadas en el extremo N-terminal.

En un análisis filogenético para el resultado encontrado en las flagelinas de los diferentes acidófilos estudiados (Figura 10) se puede observar la similitud que existe entre las secuencias aminoacídicas, agrupándose en diferentes clústeres. Se destaca la agrupación que existe entre las flagelinas FlaA y FlaB del género *Leptospirillum*, todas agrupadas en el mismo clúster dentro el árbol, mientras que las neutrófilas están más lejanas y se agrupan junto a la flagelina de *Helicobacter pylori* (utilizada como referencia y grupo externo). Se puede observar además que la flagelina encontrada en dos especies del género *Acidithiobacillus* se encuentran mucho más cercanas a la FlaA de las bacterias Gram positivas del género *Sulfobacillus*, mientras que las FlaA del género *Alicyclobacillus* se encuentran cercanas a las flagelinas de bacterias neutrófilas.

Leptospirillum-ferrooxidans-FlaA	1	MSGVINTNTASLGAQYFLNLTQDRLNRSINRLSSGYRVNT PADDPAGYATGCVMTSYTK	60
Leptospirillum-rubarum-FlaA	1	MSGVINTNTASLGAQYFLNLTQDRLNRSINRLSSGYRVNT PADDPAGYATGCVMTSYVK	60
Leptospirillum-CF1-FlaA	1	MSGVINTNTASLGAQYFLNLTQDRLNRSINRLSSGYRVNT PADDPAGYATGCVMTSYVK	60
Leptospirillum-ferriphilum-FlaB1	1	MSGLIINDNTASMNQAQYLNLTQALNKHGRSLSSGYRVNS PADDPAGYATISQRMGAQMM	60
Leptospirillum-ferriphilum-FlaB2	1	MSGVINTNTASLGAQYFLNLTQDRLNRSINRLSSGYRVNT PADDPAGYATGCVMTSYVK	60
Leptospirillum-ferrooxidans-FlaB	1	MSGVINTNTASMNQAQYLNLTQALNKHGRSLSSGYRVNS PADDPAGYATISQRMGAQVL	60
Leptospirillum-rubarum-FlaB	1	MSGLIINDNTASMNQAQYLNLTQALNKHGRSLSSGYRVNS PADDPAGYATISQRMGAQMM	60
Leptospirillum-CF1-FlaB	1	MSGLIINDNTASMNQAQYLNLTQALNKHGRSLSSGYRVNS PADDPAGYATISQRMGAQMM	60
****:* : * * : * : * : * * : * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *			
Leptospirillum-ferrooxidans-FlaA	61	SVQQRIRNAHDGAGLTIQTINGALLTDNDILVKMRQLAIQAANSTYAPEDDESVLQNEYQHL	120
Leptospirillum-rubarum-FlaA	61	SVQQRIRNAHDGAGLTIQTINGALLTDNDILVKMRQLAIQAANSTYAPEDDESVLQNEYQHL	120
Leptospirillum-CF1-FlaA	61	SVQQRIRNAHDGAGLTIQTINGALLTDNDILVKMRQLAIQAANSTYAPEDDESVLQNEYQHL	120
Leptospirillum-ferriphilum-FlaB1	61	SYNAIRIRNAHDGAGLTIQTINGALLTDNTILLKMRQLAIQAANSTYSEKDDLKVLNCEYQHL	120
Leptospirillum-ferriphilum-FlaB2	61	SVQQRIRNAHDGAGLTIQTINGALLTDNDILVKMRQLAIQAANSTYAPEDDESVLQNEYQHL	120
Leptospirillum-ferrooxidans-FlaB	61	SYNAIRIRNAHDGHTLLOAGSALLTDNTILLKMRQLAIQAANSTYSEKDDLKVLNCEYQHL	120
Leptospirillum-rubarum-FlaB	61	SYNAIRIRNAHDGAGLTIQTINGALLTDNTILLKMRQLAIQAANSTYSEKDDLKVLNCEYQHL	120
Leptospirillum-CF1-FlaB	61	SYNAIRIRNAHDGAGLTIQTINGALLTDNTILLKMRQLAIQAANSTYSEKDDLKVLNCEYQHL	120
* : *			
Leptospirillum-ferrooxidans-FlaA	121	MSEINRVAVTDFNGRKVLDDGSMNGLVFQIDAGTDDTNRIIVKIPSPSTDMGIYQNST	180
Leptospirillum-rubarum-FlaA	121	MSEINRIALVTFNGRKVLDDGSMNGLVFQIDSGTDDTNRIIVVSPSPSTDVLIYQNSV	180
Leptospirillum-CF1-FlaA	121	MSEINRIALVTFNGRKVLDDGSMNGLVFQIDSGTDDTNRIIVVSPSPSTDVLIYQNSV	180
Leptospirillum-ferriphilum-FlaB1	121	NSEVIRIAKVTDFNGMRLDDSGHGT-EKEHVGITYTSVNDRLAVNIGKMDSSITGL-----	173
Leptospirillum-ferriphilum-FlaB2	121	MSEINRIALVTFNGRKVLDDGSMNGLVFQIDSGTDDTNRIIVVSPSPSTDVLIYQNSV	180
Leptospirillum-ferrooxidans-FlaB	121	NSEISRIARVDFNGMRLDDGSHSE-EKEHVGITYTSIDDRISVAKMGLDASITGL-----	173
Leptospirillum-rubarum-FlaB	121	NSEVIRIAKVTDFNGMRLDDSGHGT-EKEHVGITYTSINDRITVNIIGKMDSSITGL-----	173
Leptospirillum-CF1-FlaB	121	NSEVIRIAKVTDFNGMRLDDSGHGT-EKEHVGITYTSINDRITVNIIGKMDSSITGL-----	173
* : *			
Leptospirillum-ferrooxidans-FlaA	181	LVMSEGATSLMSYMMRMSAISALTEGALAEIINTTGGILGAFQERMWTIRNINTELVNQAI	240
Leptospirillum-rubarum-FlaA	181	LVMSEGATSLMNSMAISALTEGALAEIINTTGGILGAFQERMWTIRNINTELVNQAI	240
Leptospirillum-CF1-FlaA	181	LVMSEGATSLMNSMAISALTEGALAEIINTTGGILGAFQERMWTIRNINTELVNQAI	240
Leptospirillum-ferriphilum-FlaB1	174	----IRSTNILNRQNAKNAVDKLVVLDNRNATGGGIGAIQNRMEWTIRNINTELVNQAI	229
Leptospirillum-ferriphilum-FlaB2	181	LVMSEGATSLMNSMAISALTEGALAEIINTTGGILGAFQERMWTIRNINTELVNQAI	240
Leptospirillum-ferrooxidans-FlaB	174	----IGSTKILDRSDAKNADRLSALKEKTIQVGSIGAIQNRMEWTIRNINTELVNQAI	229
Leptospirillum-rubarum-FlaB	174	----IRSTNILNRQNAKNAVDKLVVLDNRNATGGGIGAIQNRMEWTIRNINTELVNQAI	229
Leptospirillum-CF1-FlaB	174	----IRSTNILNRQNAKNAVDKLVVLDNRNATGGGIGAIQNRMEWTIRNINTELVNQAI	229
* : *			
Leptospirillum-ferrooxidans-FlaA	241	SKSQIKDVNFASETAFTKRQILSQS GAAVLAQANLVPQAAIKLLE	286
Leptospirillum-rubarum-FlaA	241	SKSQIKDVNFASETAFTKRQILSQS STAVLSQANQIPQAAVKLLE	286
Leptospirillum-CF1-FlaA	241	SKSQIKDVNFASETAFTKRQILSQS STAVLSQANQIPQAAVKLLE	286
Leptospirillum-ferriphilum-FlaB1	230	SRAGIKDVNFASETAFTKRQILSQS GAAVLAQANLVPQAAIKLLE	275
Leptospirillum-ferriphilum-FlaB2	241	SKSQIKDVNFASETAFTKRQILSQS STAVLSQANQIPQAAVKLLE	286
Leptospirillum-ferrooxidans-FlaB	230	SRAGIKDVNFASETAFTKRQILSQS GAAVLAQANLVPQAAIKLLE	275
Leptospirillum-rubarum-FlaB	230	SRAGIKDVNFASETAFTKRQILSQS GAAVLAQANLVPQAAIKLLE	275
Leptospirillum-CF1-FlaB	230	SRAGIKDVNFASETAFTKRQILSQS GAAVLAQANLVPQAAIKLLE	275
* : *			

**Figura 9. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de FlaA y FlaB de los representantes del género *Leptospirillum*. En gris se destaca la conservación de aminoácidos de ambas flagelinas.**

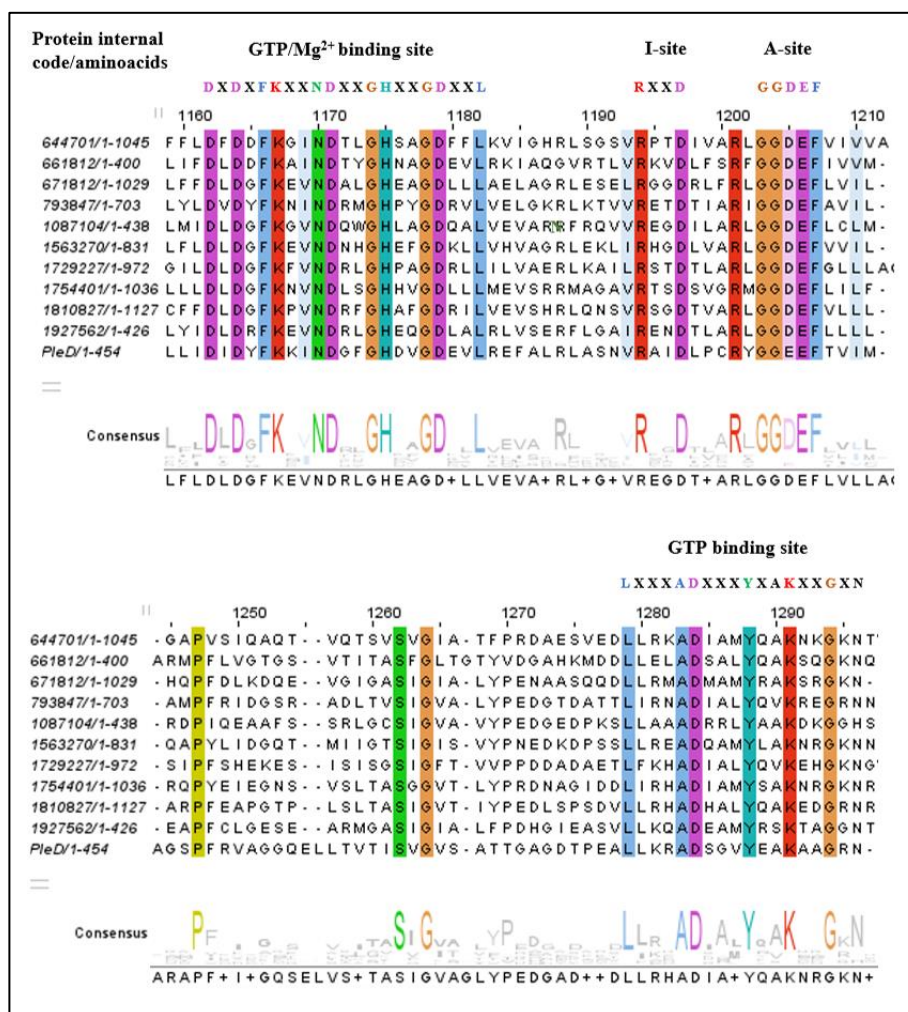


**Figura 10. Relaciones de similitud de la flagelina (FlaA y FlaB).** Se infirió utilizando el método de Máxima Verosimilitud y un modelo basado en la matriz JTT. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo en MEGA X empleando 1000 réplicas de Bootstrap para evaluar la robustez de las agrupaciones. Los valores de bootstrap se indican en las ramas del árbol filogenético como porcentajes, los cuales determinan el nivel de respaldo para cada agrupación. Los valores sobre 70 se consideran indicativos de un alto soporte en el árbol filogenético.



### **3.1.2 Mecanismos de señalización c-di-GMP y de *quorum sensing* en *Leptospirillum* sp. CF-1**

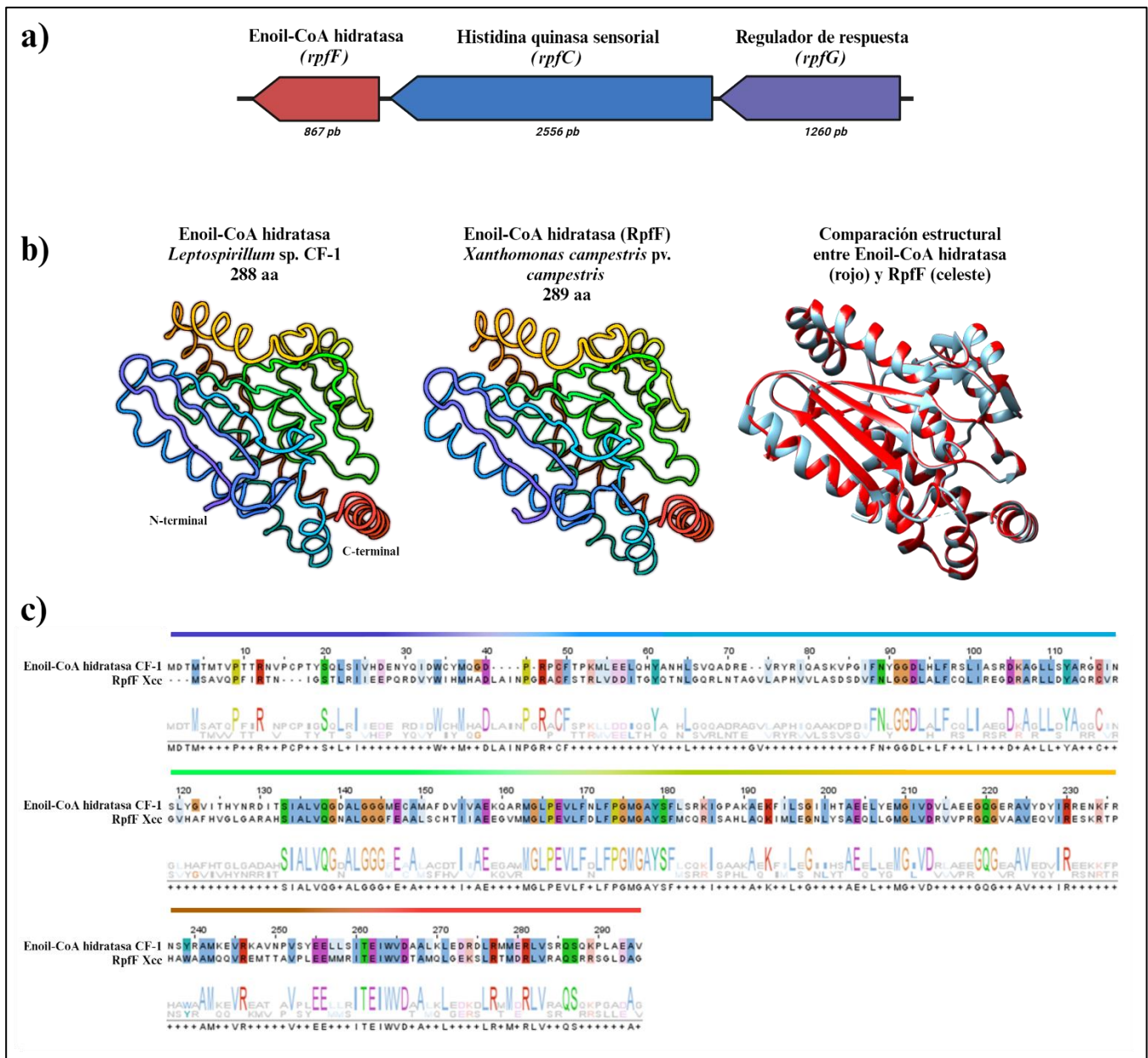
El c-di-GMP es una molécula que participa en procesos que implican la formación de la biopelícula y el estado sésil de las bacterias, como la expresión y localización de elementos estructurales de adherencia y supresión de genes de motilidad. Su síntesis está encargada por enzimas llamadas diguanilato ciclasas, mientras que su degradación esta llevada a cabo por diversas fosfodiesterasas. En el genoma de *Leptospirillum* sp. CF-1 fue posible encontrar 10 genes para diguanilato ciclasa. Todas las proteínas identificadas con esta función presentaron regiones aminoacídicas características y determinantes para la síntesis de c-di-GMP (Figura 11). Estas regiones comprenden un primer sitio de unión a GTP con los 11 aminoácidos característicos, el sitio I donde se lleva a cabo la reacción para la síntesis de c-di-GMP y el sitio A, región reguladora que tiene la capacidad de impactar la actividad enzimática de las diguanilato ciclasas, y finalmente una segunda región de unión a GTP con los 7 aminoácidos característicos. También se detectaron 6 genes codificantes para fosfodiesterasas; en este caso todas las proteínas predichas poseían el sitio EAL el cual es esencial para la actividad catalítica sobre el c-di-GMP y llevar a cabo la hidrólisis de esta molécula.



**Figura 11. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de diguanilato ciclasas de *Leptospirillum* sp. CF-1.** Se incluyó como referencia a la diguanilato ciclasa PleD de *Caulobacter crescentus*. Se destacan las regiones características de este tipo de enzimas; dos de unión a GTP, el sitio I y el sitio A.

El sistema de *quorum sensing* encontrado corresponde al de moléculas señales difusibles, DSF. Este sistema fue encontrado completo, ordenado en un clúster el cual comprende el gen que codifica para la proteína que realiza la síntesis de estas moléculas (Enoil-CoA hidratasa) de 867 bp, seguido del gen para la proteína sensora (histidina quinasa sensorial) de 2556 bp y finalmente el gen para una proteína reguladora de

respuesta de 1260 bp (Figura 12a). Con respecto a la Enoil-CoA hidratasa, la secuencia aminoacídica comprende un tamaño de 288 aminoácidos y comparte un 42,5% de identidad (136 aminoácidos) y un 59,7% de similitud con RpfF de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, enzima descrita como la responsable de la síntesis de los compuestos difusibles (DSF) que median el *quorum sensing* de esta bacteria (Figura 12b y 12c).



**Figura 12. Sistema de *quorum sensing* (DSF) de *Leptospirillum* sp. CF-1.** a) Esquema del conjunto de genes que comprenden este sistema. b) Modelamiento comparativo entre la proteína principal Enoil-CoA hidratasa responsable de la síntesis de moléculas difusibles, y la proteína homóloga RpfF de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. c) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la Enoil-CoA hidratasa de *Leptospirillum* sp. CF-1 utilizando la secuencia de RpfF como referencia.

### 3.2 Determinación de la participación del peróxido de hidrógeno en la adherencia de *Leptospirillum* sp. CF-1 a minerales sulfurados.

#### 3.2.1 Medición de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en minerales sulfurados en suspensión.

Inicialmente, para comprobar que el proceso de esterilización de los minerales no tuvo un efecto negativo en las propiedades y composición química de cada mineral, se realizó un análisis de difracción de rayos X, antes y después de la esterilización. Los resultados de este ensayo (Tabla 3) indican que no existió en ningún caso una pérdida en los porcentajes de pureza de los minerales analizados. Al contrario, posterior a la esterilización hubo un incremento en la pureza el caso de la pirita y esfalerita (12% y 8% respectivamente). Con respecto a la calcopirita, la pureza de este mineral se mantuvo después del proceso de esterilización.

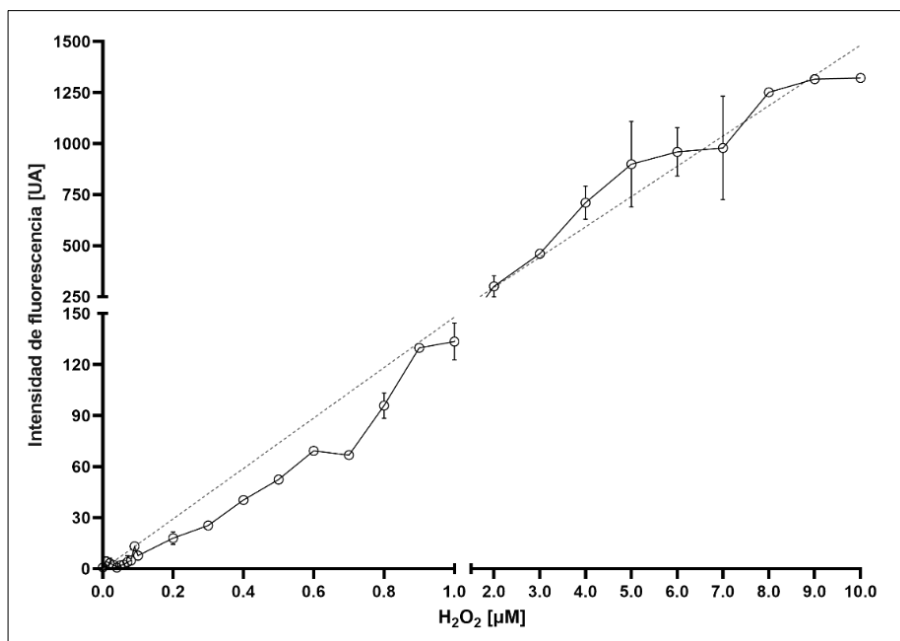
**Tabla 3:** Composición de las muestras de minerales sulfurados antes y después de su esterilización.

Muestra	% Calcopirita	% Espinela	% Esfalerita	% Cuarzo	% Pirita	% Otros*
<i>Calcopirita</i>	84 ± 5	5 ± 1	4 ± 1	4 ± 1		3 ± 1
<i>Calcopirita esterilizada</i>	84 ± 5	6 ± 1	2 ± 1	6 ± 1		2 ± 1
<i>Pirita</i>				2 ± 1	82 ± 5	16 ± 2
<i>Pirita esterilizada</i>				4 ± 1	94 ± 5	2 ± 1
<i>Esfalerita</i>	4 ± 1	~ 1	69 ± 4	10 ± 2	~ 1	14 ± 2
<i>Esfalerita esterilizada</i>	2 ± 1	~ 1	77 ± 4	16 ± 2	~ 1	~ 1

\* En otros se incluyen diferentes porcentajes menores de szomolnokita, cronstedtita, amaranita, cristobalita y hematita.

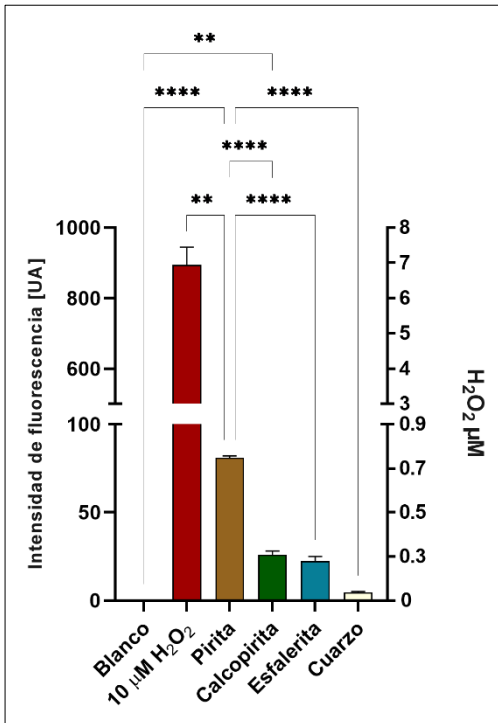
La sonda 3'-(p-aminofenil) fluoresceína (APF) es oxidada por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de la peroxidasa HRP transformándose así en su forma fluorescente. En la Figura 13 se puede observar la curva de calibración obtenida donde se representan los

valores de intensidad de fluorescencia emitida por la sonda APF en el eje vertical y las concentraciones conocidas de peróxido de hidrógeno en el eje horizontal. Al realizar las mediciones y trazar la curva, se observa que a medida que aumenta la concentración de peróxido de hidrógeno, la intensidad de fluorescencia también aumenta. Por ejemplo, a concentraciones de 0,1  $\mu\text{M}$ , 1.0  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  los valores de intensidad de fluorescencia correspondieron aproximadamente a 12, 120 y 1200 UA (unidades arbitrarias). Estos valores se encuentran dentro de los rangos descritos al utilizar esta sonda para la determinación de diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Cohn et al., 2009).



**Figura 13. Curva de calibración para  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** Las reacciones contenían 10  $\mu\text{M}$  de la sonda APF, 50 mM de tampón fosfato a pH 7,4, 0,2  $\mu\text{M}$  de peroxidasa HRP y concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La intensidad de fluorescencia está expresada en unidades arbitrarias (UA).

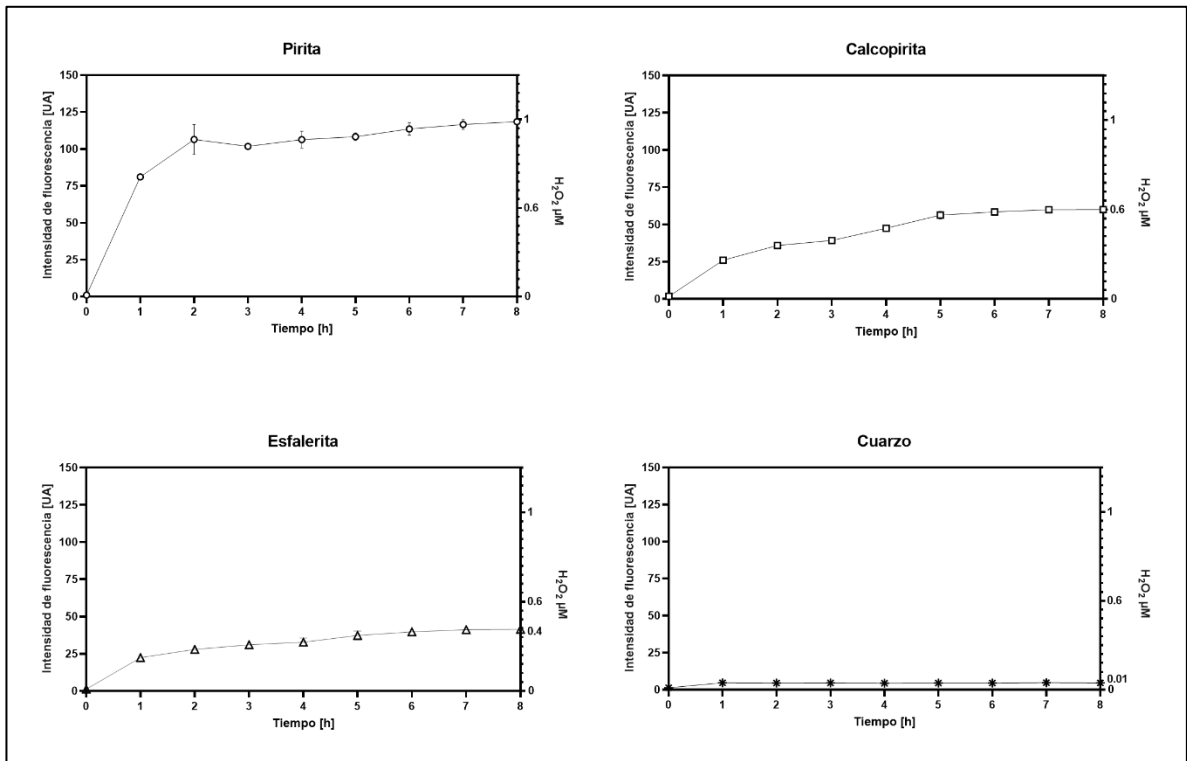
Posterior a la realización de la curva de calibración que determinó los valores de intensidad de fluorescencia para cada concentración de  $H_2O_2$ , se realizó la medición de la concentración de esta molécula en suspensiones con cada mineral sulfurado a 1 h de incubación. El resultado de este experimento reveló que, la suspensión con pirita mostró la concentración más alta de  $H_2O_2$  en comparación con las suspensiones que contenían calcopirita, esfalerita y el control (cuarzo). Al realizar el análisis estadístico respectivo (ANOVA de una vía), se encontraron diferencias significativas con respecto al ensayo con pirita (Figura 14).



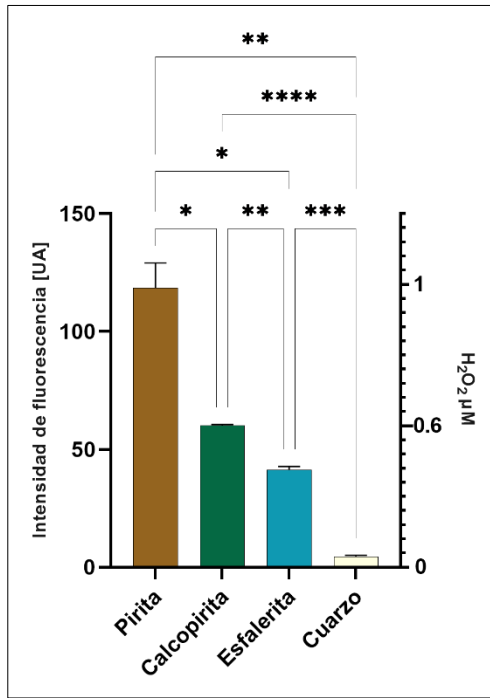
**Figura 14. Intensidad de fluorescencia emitida por la sonda APF para determinar la concentración de  $H_2O_2$  a 1 h de incubación en una suspensión con diferentes minerales sulfurados (pirita, calcopirita y esfalerita). Se usaron como control el cuarzo (mineral no sulfurado), una suspensión sin la sonda (blanco) y como control positivo una suspensión sin mineral, con una concentración de 10  $\mu M$  de  $H_2O_2$ . Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron mediante el test de Tukey, y los resultados se indican como \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0001$ .**

También se determinó la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en función del tiempo en un periodo de 8 horas (Figura 15). Los resultados de este experimento evidenciaron la misma tendencia, es decir, la suspensión con pirita como la condición con la más elevada concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Específicamente desde las 6 h y hasta las 8 h, la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la suspensión de pirita fue cercana a  $1,0 \mu\text{M}$  (120 UA), mientras que en el mismo intervalo de tiempo la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  obtenida en las suspensiones de calcopirita y esfalerita fueron de alrededor de  $0,6 \mu\text{M}$  (60 UA) y  $0,4 \mu\text{M}$  (40 UA) respectivamente. En el caso de la suspensión con cuarzo en todos los tiempos no hubo una detección de fluorescencia de forma significativa (4 UA), lo que indica que no existe una formación importante de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en este mineral como en los sulfuros de hierro (Figura 16). El análisis estadístico indicó que existen diferencias significativas tanto con respecto al control positivo ( $10 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ) como con respecto al control negativo (cuarzo) para todos los tiempos determinados (Figuras 17 y 18), indicando una detección exitosa de las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en cada mineral sulfurado.

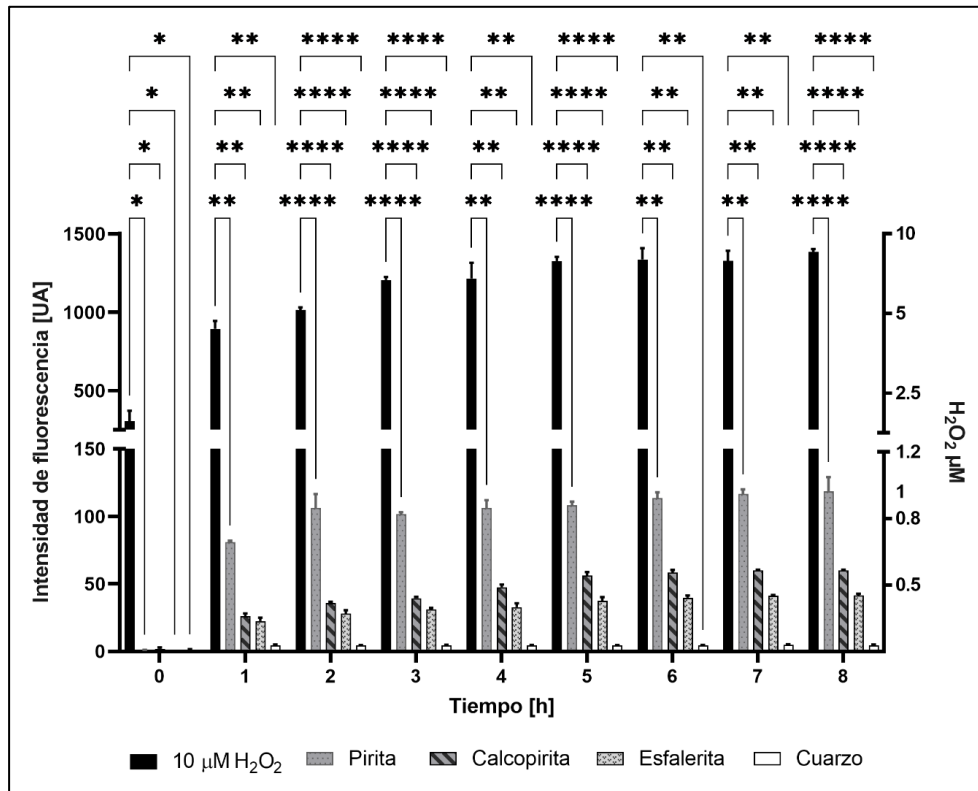




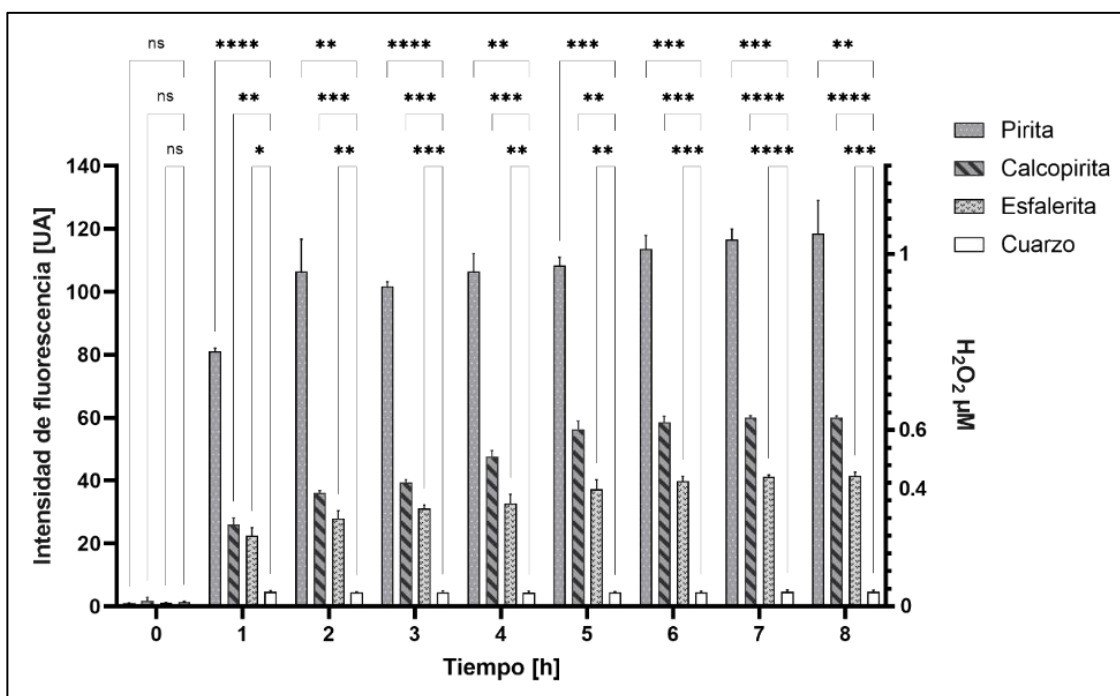
**Figura 15. Intensidad de fluorescencia emitida por la sonda APF para determinar la concentración de  $H_2O_2$  en el tiempo (hasta 8 h). Se realizó en una suspensión con diferentes minerales sulfurados (pirita, calcopirita y esfalerita) utilizando como control el cuarzo.**



**Figura 16. Intensidad de fluorescencia emitida por la sonda APF y la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectiva a las 8 h de incubación.** Se realizó en una suspensión con diferentes minerales sulfurados (pirita, calcopirita y esfalerita) usando como control negativo el cuarzo. El análisis estadístico usado fue ANOVA de una vía, las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron mediante el test de Tukey, y los resultados se indican como \*; p<0,05, \*\*; p<0,005, \*\*\*; p<0,0005, \*\*\*\*; p<0,0001.

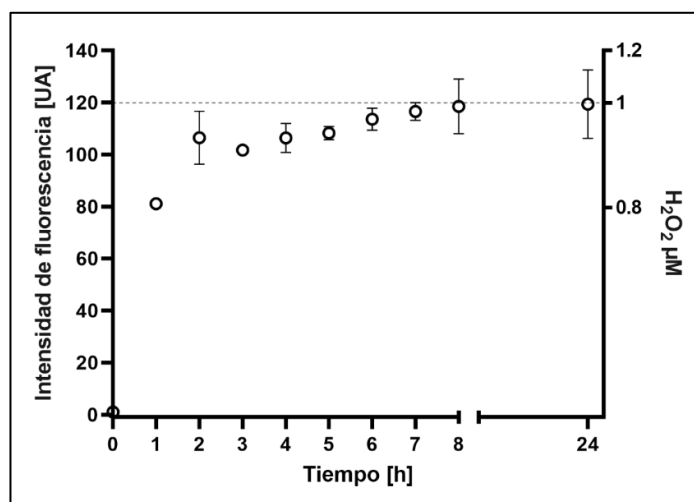


**Figura 17. Análisis estadístico de cada mineral con respecto al control positivo utilizando ANOVA de dos vías.** El gráfico de barras representa la comparación de la pirita, calcopirita, esfalerita y el cuarzo con el control positivo (10 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de dos vías, permitiendo evaluar simultáneamente la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> encontrada en la suspensión de cada mineral (representada en intensidad de fluorescencia) en el tiempo (0-8 h). Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron mediante el test de Dunnett, y los resultados se indican como \*: p<0,05, \*\*: p<0,005, \*\*\*: p<0,0005, \*\*\*\*: p<0,0001, ns; no significativo.



**Figura 18. Análisis estadístico de cada mineral con respecto al cuarzo (control negativo) utilizando ANOVA de dos vías.** El gráfico de barras representa la comparación de la pirita, calcopirita y esfalerita contra el cuarzo. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de dos vías, permitiendo evaluar simultáneamente la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> encontrada en la suspensión de cada mineral (representada en intensidad de fluorescencia) en el tiempo (0-8 h). Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron mediante el test de Dunnett, y los resultados se indican como \*; p<0,05, \*\*; p<0,005, \*\*\*; p<0,0005, \*\*\*\*; p<0,0001, ns; no significativo.

Para corroborar si la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se mantenía en el tiempo, se realizó una evaluación solo en pirita hasta las 24 h. Se obtuvo como resultado que la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las 24 h se mantuvo con valores similares a los obtenidos a las 8 h, es decir, sin diferencias significativas entre estos dos tiempos, determinándose que en ambos casos una intensidad de fluorescencia de 120 UA equivalentes a 1 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 19). Estos resultados nos indican que existe un grado de estabilidad en la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las suspensiones con minerales sulfurados en el tiempo manteniéndose al menos hasta las 24 h.

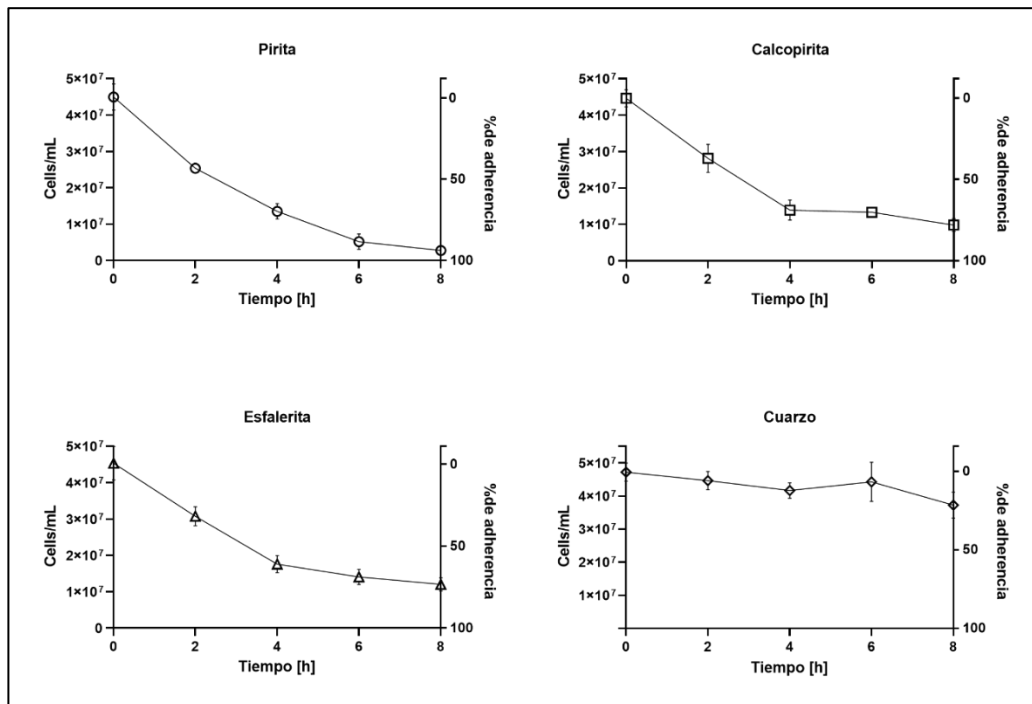


**Figura 19. Medición de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el tiempo hasta 24 h en una suspensión con pirita.**

### 3.2.2 Estimación de la adherencia de *Leptospirillum* sp. CF-1 a minerales sulfurados.

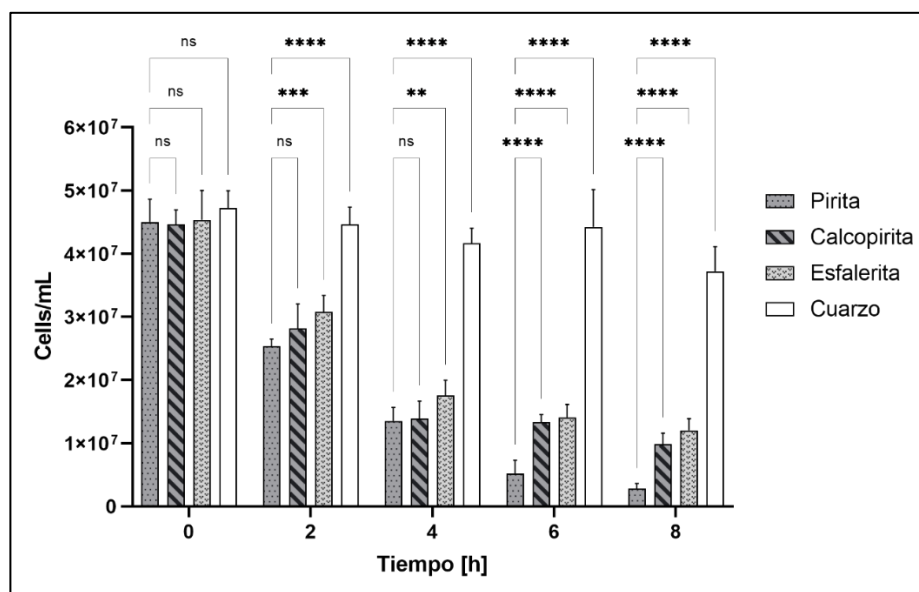
Una vez determinadas las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las suspensiones de pirita, calcopirita, esfalerita y cuarzo, se procedió a estimar la adherencia de *Leptospirillum* sp. CF-1 sobre estos mismos minerales en el tiempo.

Tal como se puede apreciar en la Figura 20, desde las 2 h existe un aumento en el porcentaje de adherencia (disminución del número de células planctónicas con respecto al inóculo inicial) tanto en pirita (43,6%) como en calcopirita (36,9%) y esfalerita (32,2%). Este aumento en la adherencia llegó a su máximo detectable a las 8 h en los 3 casos, obteniéndose porcentajes de adherencia de 93,8% para pirita, 78,0% para calcopirita y 73,5% para esfalerita. Todas estas disminuciones presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Por el contrario, en el caso del cuarzo, desde las 2 h la disminución observada del 5,5 % no presentó diferencias significativas tanto con el inóculo inicial como con los otros tiempos (11,5% a las 4 h, 6,3% a las 6 h y 21,2% a las 8 h).



**Figura 20. Recuento de células de *Leptospirillum* sp. CF.1 planctónicas en el tiempo en cultivos líquidos con diferentes minerales sulfurados.** El porcentaje de adherencia se calculó a través del recuento de células por mL del inóculo final versus las contadas en el inóculo inicial.

Durante la comparación de cada mineral con la pirita en todos los tiempos estudiados, el análisis estadístico reveló diferencias altamente significativas con un valor de  $p < 0,0001$  a las 6 y 8 h. Sin embargo, antes de este intervalo, no se observó diferencias notables entre la pirita y la calcopirita. En el caso de la pirita y la esfalerita, se observó diferencias ligeramente notables antes de las 6 h. No obstante, al contrastar la pirita con el cuarzo, se encontró diferencias altamente significativas desde las 2 h y en todos los momentos posteriores (Figura 21).



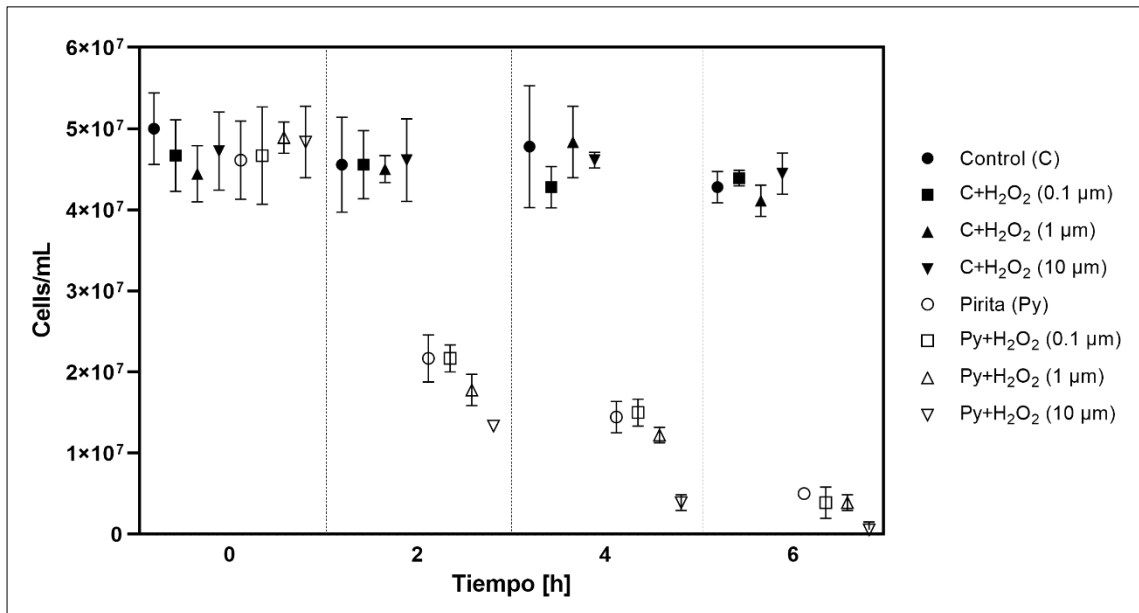
**Figura 21. Análisis estadístico de la adherencia de *Leptospirillum* sp. CF-1 a cada mineral con respecto a la pirita.** El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de dos vías, permitiendo evaluar simultáneamente el número de células planctónicas encontradas en la suspensión de cada mineral (representada en células por mL) en el tiempo (0-8 h). Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron mediante el test de Dunnett, y los resultados se indican como \*;  $p < 0,05$ , \*\*;  $p < 0,005$ , \*\*\*;  $p < 0,0005$ , \*\*\*\*;  $p < 0,0001$ , ns; no significativo.

### 3.2.3 Evaluación del efecto del peróxido de hidrógeno exógeno sobre la adherencia.

Luego de determinar tanto la concentración de  $H_2O_2$  que se encontraba en las suspensiones de los distintos minerales como la adherencia de *Leptospirillum* sp. CF-1 a estos, es que se determinó si al añadir  $H_2O_2$  de forma exógena existiría un efecto en la adherencia.

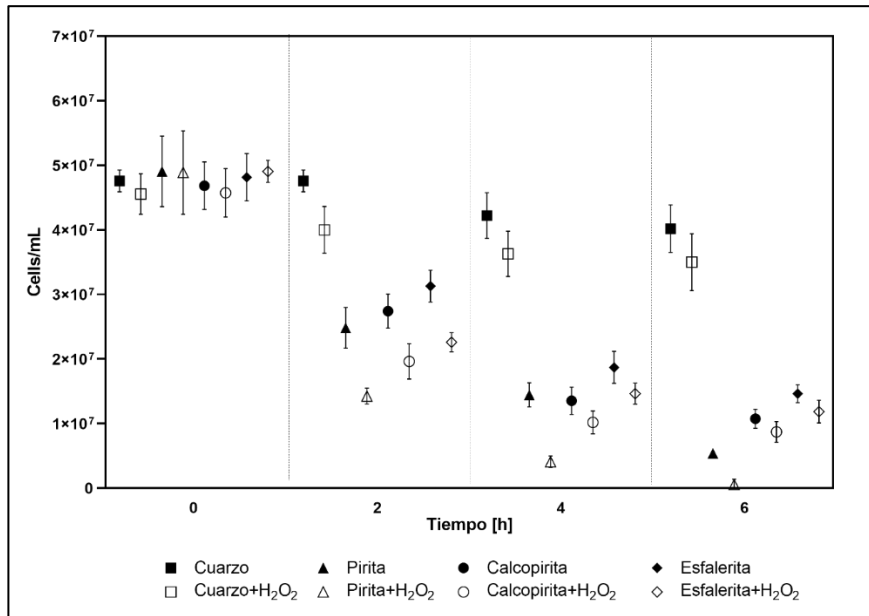
En primer lugar, se determinó en pirita el efecto de distintas concentraciones no nocivas de  $H_2O_2$ . Tal como se indica en la Figura 22, se pudo observar que existe un incremento en la cantidad de células adheridas en todas las concentraciones usadas, siendo la concentración de  $10 \mu M$  la que obtuvo un mayor incremento. Una vez obtenido este resultado, se procedió a evaluar con esta última concentración la adherencia en los

otros minerales. Según se puede observar en la Figura 23, en el caso de la esfalerita, a las 4 h existe un porcentaje de adherencia del 70,2% y a las 6 h de 75,9% en los cultivos con 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  añadido. Al comparar estos datos con los mismos tiempos del cultivo con esfalerita, pero sin  $\text{H}_2\text{O}_2$ , los valores de porcentaje de adherencia fueron de 61,2% y 70%. Esta tendencia de aumento en el porcentaje de adherencia se evidenció también en la calcopirita, en donde se alcanzó un 77,7% y 81% de adherencia a las 4 y 6 h, respectivamente. En el caso de la pirita se observó que a las 4 h existe un incremento del porcentaje de adherencia (91,7%) cuando se añadió  $\text{H}_2\text{O}_2$  comparado con el mismo tiempo sin la adición de esta molécula (70.6%). Esta predisposición al alza se repite a las 6 h, en donde los porcentajes de adherencia con y sin  $\text{H}_2\text{O}_2$  fueron de 98,9% y 89,1% respectivamente.



**Figura 22. Recuento de células planctónicas en el tiempo en presencia de pirita con y sin adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** Se usó como control de viabilidad un cultivo sin pirita suplementado con hierro. Las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  usadas fueron de 0,1, 1 y 10  $\mu\text{M}$ .



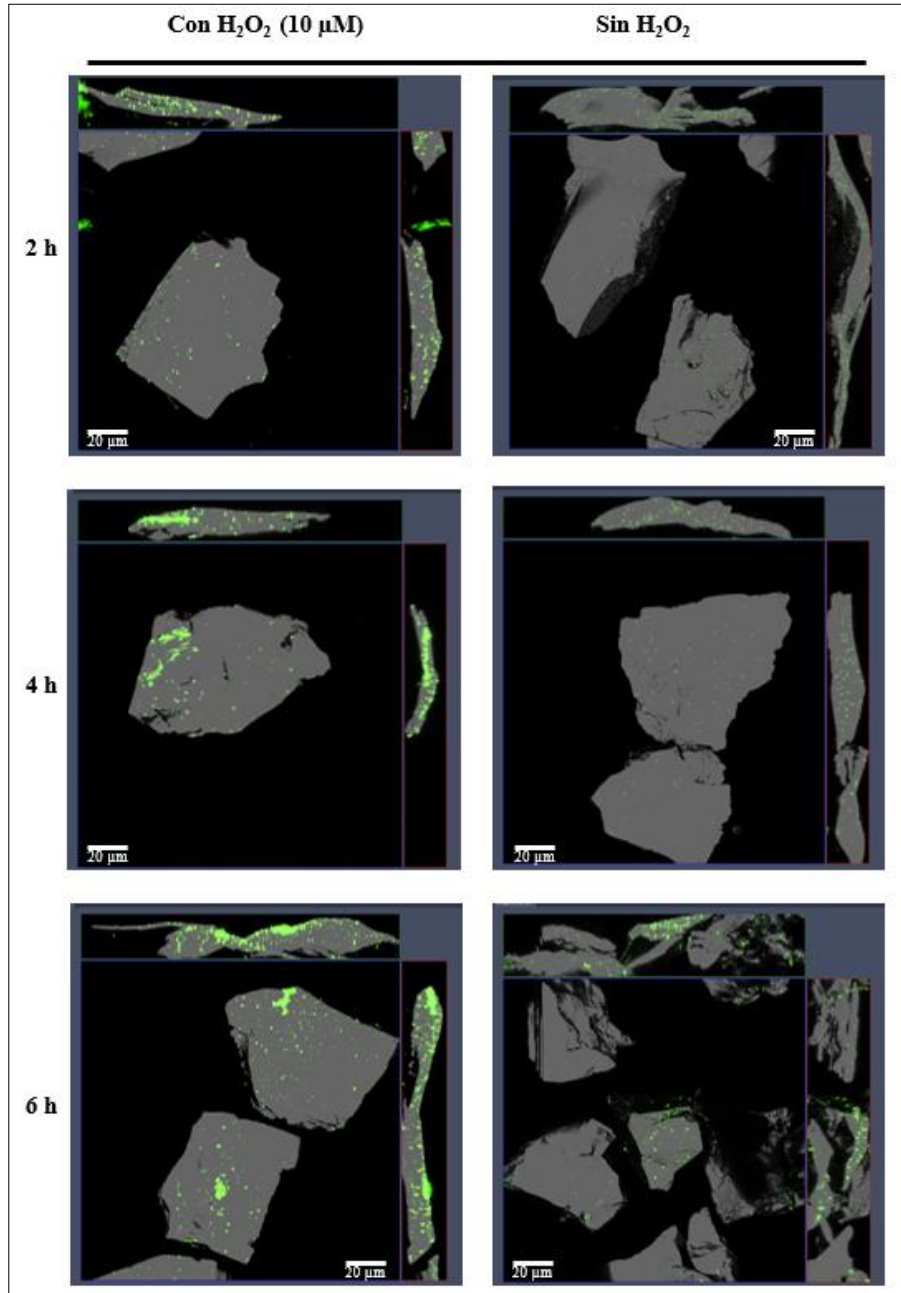


**Figura 23. Recuento de células planctónicas en el tiempo en presencia de cuarzo y de cada mineral sulfurado con y sin la adición de 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de forma exógena.**

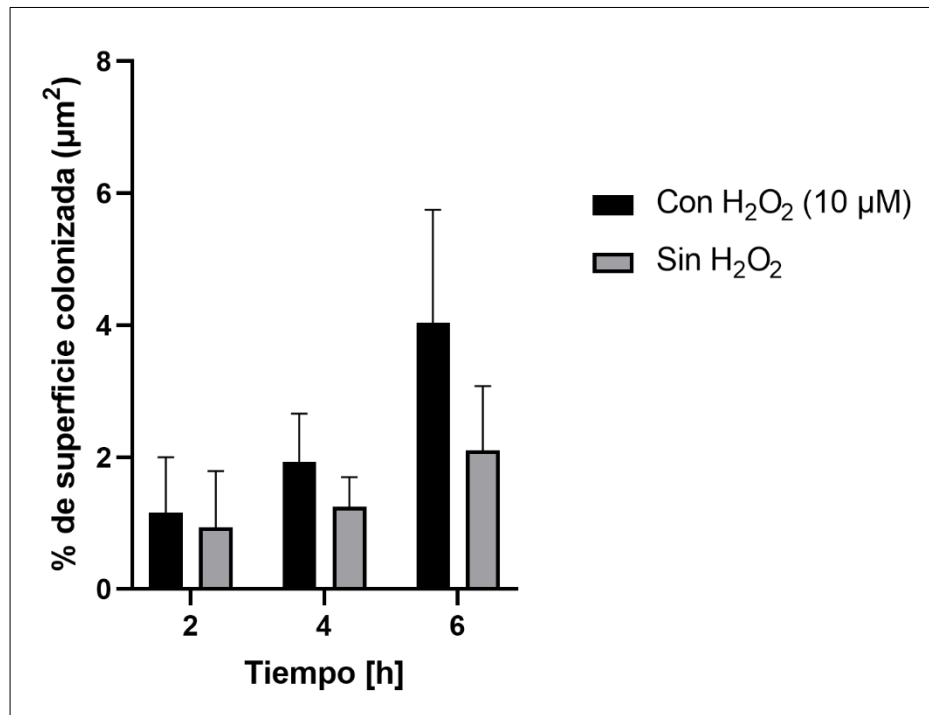
### 3.2.4 Evaluación de la adherencia a través de microscopía de fluorescencia.

Para complementar los datos obtenidos anteriormente y tener un registro visual, directo y cuantitativo de la adherencia, es que se hizo microscopía de fluorescencia a gránulos de pirita. Se escogió este mineral para este experimento ya que es el que presentó mejores resultados tanto en la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en su suspensión como en el % de adherencia con y sin peróxido añadido. En la Figura 24 se puede observar la colonización por parte de *Leptospirillum* sp. CF-1 en gránulos de pirita a 2, 4 y 6 h con y sin peróxido de hidrógeno añadido. Un total de 82 gránulos de pirita fueron analizados en las imágenes obtenidas. A las 6 horas es donde más se puede observar la diferencia entre ambas condiciones, destacándose el aumento de los puntos de fluorescencia (lo que indican las células que están colonizando) cuando fue expuesto a los 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En la Figura

25 se muestra la gráfica del promedio del área colonizada en los gránulos de pirita. Se puede observar el aumento que existe de la colonización en el tiempo y las diferencias entre ambas condiciones.



**Figura 24.** Colonización de la pirita por *Leptospirillum* sp. CF-1 a 2, 4 y 6 h. Las imágenes de la izquierda corresponden a la condición con la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 μM, y a la derecha el control.



**Figura 25. Porcentaje de la superficie colonizada ( $\mu\text{m}^2$ ) por *Leptospirillum* sp. CF-1 en gránulos de pirita.** El valor fue calculado usando como parámetros el área con señal de fluorescencia emitida por SYTO-9 (área fluorescente y que corresponde a las bacterias adheridas) con respecto al área total de cada gránulo observado en las imágenes.

### **3.3 Evaluación del efecto del peróxido de hidrógeno sobre el proteoma de *Leptospirillum* sp. CF-1 en células planctónicas y adheridas a minerales sulfurados.**

El propósito de estos resultados es investigar el impacto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células planctónicas y adheridas a pirita, centrándonos en la caracterización del proteoma. Específicamente, nos enfocaremos en las proteínas relacionadas con la adherencia, la formación de biopelículas y las funciones antioxidantes durante el proceso de colonización de minerales sulfurados. Las condiciones para la extracción fueron células adheridas a pirita en presencia y ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno, células planctónicas de los cultivos con pirita en presencia y ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno y, células planctónicas de cultivos con hierro en presencia y ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno. En la Tabla 4 se muestran los resultados de las concentraciones de proteínas obtenidas según la cuantificación realizada mediante el kit BCA. El análisis proteómico se llevó a cabo en la empresa Tianjin Novogene Bioinformatic Technology Co., Ltd.

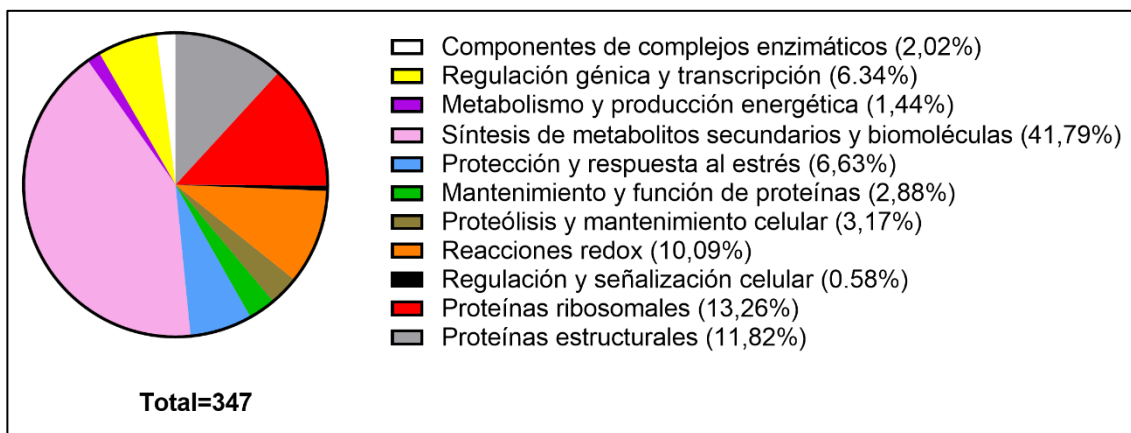
**Tabla 4.** Concentraciones de proteínas obtenidas en los cultivos de *Leptospirillum* sp. CF-1. Los cultivos correspondían a células en estado planctónico y adheridas a pirita con y sin la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno a una concentración de 10 µM después de 2 h de incubación. Cada condición se realizó por triplicado.

Muestra	Especificación	Concentración de proteínas (µg/ml)	Proteínas totales en el pellet seco (µg)
P1	Células adheridas a pirita	10	0,75
P2	Células adheridas a pirita	25	1,875
P3	Células adheridas a pirita	15	1,125
P4	Células adheridas a pirita + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	25	1,875
P5	Células adheridas a pirita + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	150	11,25
P6	Células adheridas a pirita + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	25	1,875
PP7	Células planctónicas de un cultivo con pirita	500	37,5
PP8	Células planctónicas de un cultivo con pirita	300	22,5
PP9	Células planctónicas de un cultivo con pirita	50	3,75
PH10	Células planctónicas de un cultivo con pirita + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	300	22,5
PH11	Células planctónicas de un cultivo con pirita + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	500	37,5
PH12	Células planctónicas de un cultivo con pirita + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200	15
C1	Células planctónicas de un cultivo sin pirita (con hierro)	500	37,5
C2	Células planctónicas de un cultivo sin pirita (con hierro)	250	18,75
C3	Células planctónicas de un cultivo sin pirita (con hierro)	125	9,375
CH1	Células planctónicas de un cultivo sin pirita (con hierro) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	3,75
CH2	Células planctónicas de un cultivo sin pirita (con hierro) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20	1,5
CH3	Células planctónicas de un cultivo sin pirita (con hierro) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	250	18,75

De los resultados derivados del MS/MS se obtuvieron 49.634 péptidos los que permitieron identificar 1.330 proteínas a través de la plataforma UniProt usando como referencia las proteínas identificadas para *Leptospirillum* sp. CF-1 (Taxon ID: 1660083 <https://www.uniprot.org/taxonomy/1660083>). Para todas las proteínas se calcularon los valores brutos y logarítmicos (log<sub>2</sub>) de iBAQ y LFQ. El primero mide la intensidad de las señales de los péptidos de una proteína y estima su abundancia relativa en la muestra, y el segundo compara las señales de péptidos detectados en diferentes muestras, lo que permite establecer la abundancia relativa de proteínas entre muestras.

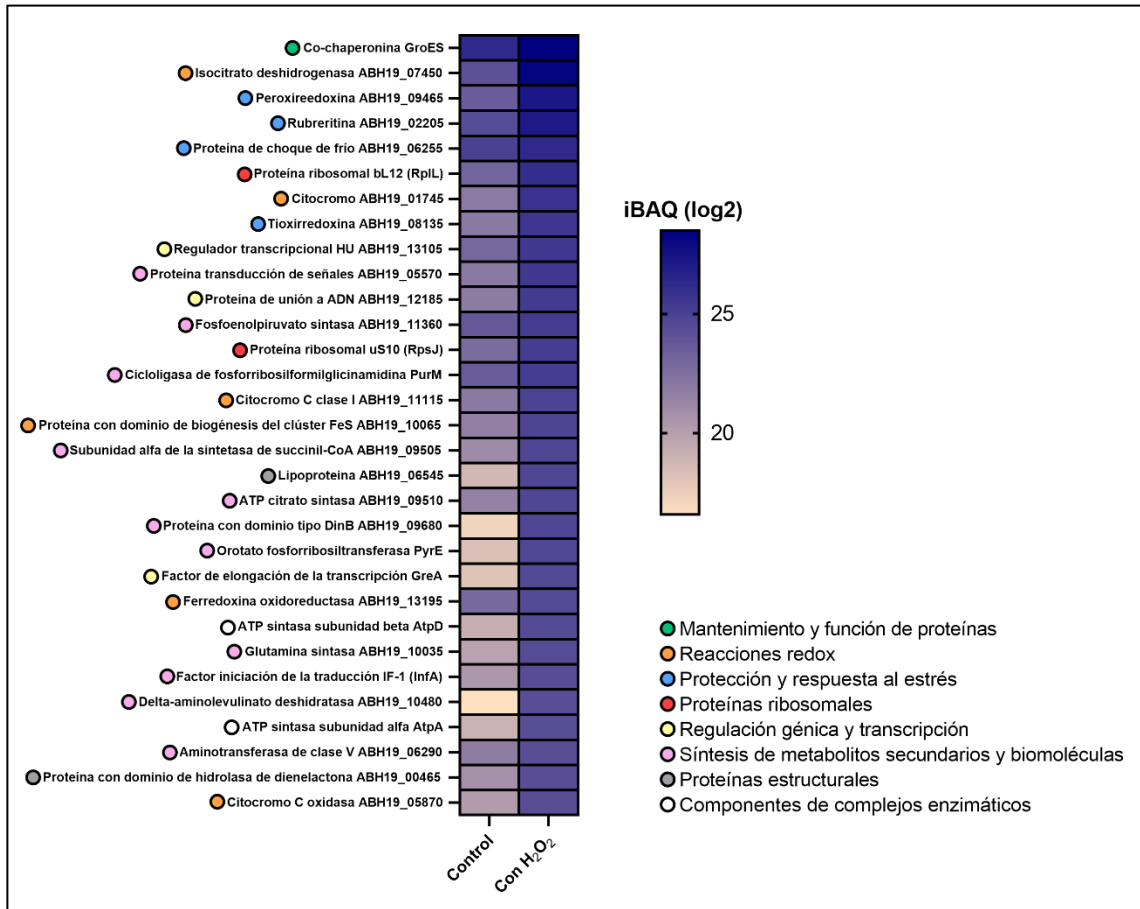
Del total de proteínas, se analizaron un total de 347. El criterio de selección se basó en la representatividad de las muestras y sus datos en las réplicas: únicamente se consideraron aquellas muestras donde al menos dos de las tres réplicas estuvieran disponibles para un análisis semicuantitativo. Como resultado, no se consideraron las muestras provenientes de los cultivos de pirita debido a la baja calidad en la obtención de proteínas y la falta de datos contundentes para realizar una comparación. Por lo tanto, se enfocó el análisis en los valores iBAQ de las muestras del cultivo planctónico (iBAQC) y del cultivo planctónico con 10  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (iBAQCH) (Tabla A1 del anexo).

Una vez agrupadas las proteínas de acuerdo a su función biológica, se calculó el porcentaje de representación de cada función con respecto al total de proteínas analizadas (Figura 26). Del total, se identificaron 145 proteínas involucradas en la síntesis de metabolitos secundarios y biomoléculas, lo que representa el 41,79% del total. Además, se encontraron 46 proteínas asociadas a funciones ribosomales (13,26%), 41 como proteínas estructurales (11,82%), 35 implicadas en reacciones redox (10,09%), 23 asociadas con la protección y respuesta al estrés (6,63%), 22 vinculadas a la regulación génica y transcripción (6,34%), 11 relacionadas con la degradación proteica y el mantenimiento celular (3,17%), 10 contribuyendo al mantenimiento y función de otras proteínas (2,88%), 7 como componentes de complejos enzimáticos (2,02%), 5 implicadas en el metabolismo y la producción energética (1,44%), y 2 asociadas a la regulación y señalización celular (0,58%).



**Figura 26. Anotación funcional de las proteínas analizadas en los cultivos planctónicos de *Leptospirillum* sp. CF-1 con hierro (II) a 2 horas de incubación con y sin la adición de 10  $\mu$ M de  $H_2O_2$ .** 145 proteínas fueron relacionadas con la función de síntesis de metabolitos secundarios y biomoléculas (41,79%), 46 a proteínas ribosomales (13,26%), 41 a proteínas estructurales (11,82%), 35 relacionadas a reacciones redox (10,09%), 23 a la protección y respuesta al estrés (6,63%), 22 a regulación génica y transcripción (6,34%), 11 a proteólisis y mantenimiento celular (3,17%), 10 al mantenimiento y función de otras proteínas (2,88%), 7 componentes de complejos enzimáticos (2,02%), 5 relacionadas a metabolismo y producción energética (1,44%), y 2 a regulación y señalización celular (0,58%).

Se hizo una comparación de las 30 proteínas con el valor log<sub>2</sub> más alto de iBAQ, es decir fuertemente aumentadas en la muestra con adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comparado con la muestra control (Figura 27).



**Figura 27: Abundancia relativa de las proteínas de *Leptospirillum* sp. CF-1 con el valor promedio iBAQ más elevado en la muestra con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Se observan los nombres de cada proteína junto con los valores de iBAQ representados en un mapa de calor. Se proporciona información sobre la función biológica de cada proteína analizada.

Como se puede observar, en la muestra de células planctónicas con la adición de 10 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el valor más alto de la abundancia relativa dentro de la misma muestra corresponde a la co-chaperonina GroES. Proteínas principalmente involucradas a reacciones redox también estaban fuertemente presentes, como la isocitrato



deshidrogenasa dependiente de NADP (ABH19\_07450), un citocromo C de clase I (ABH19\_11115), la citocromo C oxidasa (ABH19\_05870), la ferredoxina oxidoreductasa (ABH19\_13195) y una proteína que contiene el dominio de biogénesis del cúster FeS (ABH19\_10065). Dentro de las 10 proteínas con valor iBAQ más alto, se encontraron proteínas relacionadas a la protección y respuesta al estrés; una peroxirredoxina (ABH19\_09465), una rubreritrina (ABH19\_02205), una proteína de choque de frío (ABH19\_06255), y una tiorredoxina (ABH19\_08135). En este listado de proteínas más abundantes, también se evidenciaron otras con diversas funciones, como el regulador transcripcional HU (ABH19\_13105) y el factor de elongación de transcripción GreA, una proteína de señalización celular (ABH19\_05570), proteínas encargadas de la síntesis de metabolitos secundarios y otras biomoléculas, como, por ejemplo, una aminotransferasa (ABH19\_06290), una ATP citrato sintasa (ABH19\_09510), un fosfoenolpiruvato sintasa (ABH19\_11360), entre otras. Además, se encontraron componentes de complejos enzimáticos como las subunidades alfa (AtpA) y beta de la ATP sintasa (AtpD), y componentes de la membrana celular como una lipoproteína (ABH19\_06545).

Dentro de las otras 317 analizadas, se destacan otras proteínas que podrían estar expresándose activamente en el cultivo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para realizar diferentes funciones, muchas de ellas de protección al estrés. Estas son las chaperonas GroEL, ClpB, GrpE y DnaK, las alquil hidroperóxido reductasas LysA y AtpF, y una tiorredoxina reductasa (ABH19\_12975). También se observa una abundancia alta en proteínas estructurales que podrían estar involucradas en la adherencia inicial a superficies, como la flagelina (ABH19\_12570), una proteína con dominio FlgO (ABH19\_02055) y diversas

lipoproteínas (ABH19\_10145, ABH19\_02660 y ABH19\_10555) y proteínas de membrana (ABH19\_07425, ABH19\_00715 y ABH19\_06770). Se encontraron también proteínas participantes de reacciones redox, como ferredoxinas oxidoreductasas (ABH19\_13170, ABH19\_13200, ABH19\_13180), proteína protectora de centros Fe-S (ABH19\_12075), oxidoreductasa (ABH19\_07400) y citocromos (ABH19\_12265, ABH19\_09790, ABH19\_10195, ABH19\_10205).

Los resultados de la abundancia relativa iBAQ para cada una de las 347 proteínas se muestran en la Tabla A1 del anexo.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Identificación bioinformática de genes de adherencia en bacterias acidófilas.

El análisis bioinformático realizado entregó como resultados que las bacterias acidófilas poseen el pili tipo IV (T4P), el sistema Tad y la flagelina como elementos estructurales de adherencia, y que la presencia de los genes codificantes para esos sistemas dependería de la clase y/o especie de bacteria acidófila (Figura 24). El T4P se ha descrito como un elemento importante en la adherencia en el paso inicial de la colonización de diversos tipos de superficies (Ellison et al., 2017). La presencia de la gran parte de los genes codificantes para las proteínas que forman parte de la estructura del T4P en el género *Acidithiobacillus*, podrían indicar la importancia de este mecanismo como estrategia de adherencia de esta bacteria acidófila a las superficies que va a colonizar para su posterior asentamiento y formación de biopelículas. Otros autores y también a través de estudios genómicos, confirman la existencia de este grupo de genes en este género de acidófilos (Alfaro-Saldaña et al., 2019; Zhao et al., 2021).

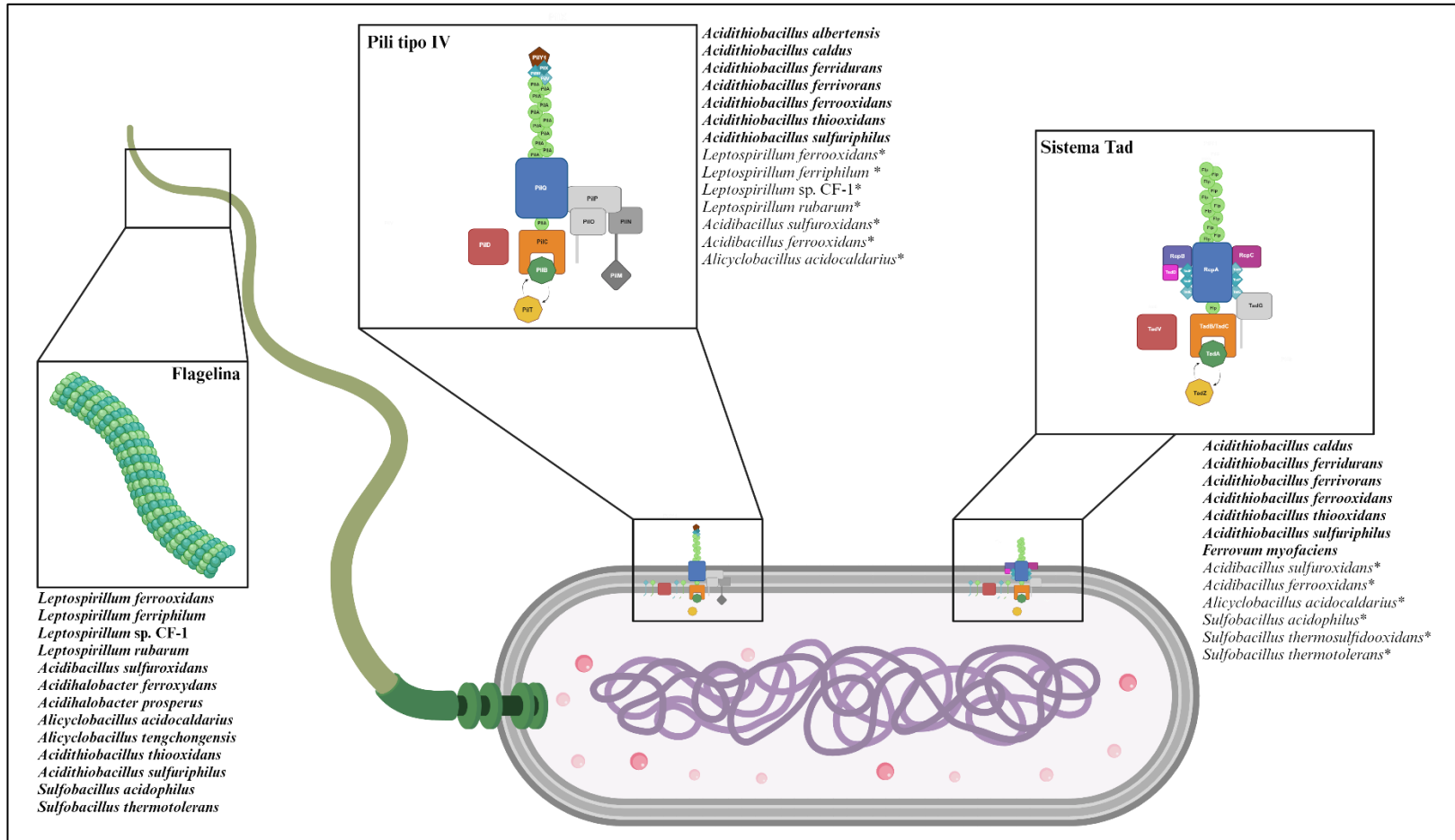
En esta tesis se analizó en detalle la secuencia aminoacídica de la pilina mayor PilA. Al realizar los alineamientos para determinar posibles regiones conservadas, encontramos un alto porcentaje de conservación en el extremo N-terminal de PilA de *At. albertensis* DSM14366, *At. ferridurans* JCM18981, *At. ferrivorans* SS3, *At. ferrooxidans* ATCC23270 y *At. sulfuriphilus* CJ-2. Se ha descrito que esta región es la que se encuentra inmersa en la membrana antes de ser catalizada por la prepilin peptidasa PILD (Graupner et al., 2000), y por lo tanto el grado de conservación en esta región estaría determinada por sus características de unión a la membrana.

En el caso del género *Leptospirillum*, se pudo determinar que posee las estructuras troncales del T4P ubicadas en la membrana interna. Específicamente, se pudo encontrar el gen codificante para la proteína de la plataforma de la membrana interna *pilC*, los codificantes para las ATPasa de elongación y retracción; *pilB* y *pilT*, y el gen para la prepilina peptidasa *pilD*. No fue posible encontrar en ninguno de los genomas de este género la pilina mayor PilA, aun cuando se usaron como parámetros de búsqueda los aminoácidos conservados de esta proteína, como también la evaluación del contexto génico. En el caso de las pilinas menores, solo fue posible ubicar en el genoma de *Leptospirillum* sp. CF-1 el gen *pilV*.

Diversos autores han tratado de explicar el fenómeno anterior en otras bacterias a través del estudio comparativo del T4P con el sistema de secreción tipo II (Peabody et al., 2003; Yamagata et al., 2012). El T4P junto con el sistema de secreción tipo II están compuestos por proteínas que comparten un origen evolutivo en común y con funciones similares (Yamagata et al., 2012). En la búsqueda que se realizó en el genoma de *Leptospirillum* sp. CF-1 se pudieron encontrar genes codificantes para el sistema de secreción tipo II (datos no mostrados). En otros representantes de este género también ha sido posible encontrar genes codificantes para este sistema, como en el caso de *L. ferriphilum* ML-04 (Mi et al., 2011), *L. rubarum* y *L. ferrodiazotrophum* (Aliaga Goltsman et al., 2009). Por lo tanto, en este género bacteriano se podría estar dando un fenómeno de compensación de las estructuras faltantes del T4P a través de las proteínas con función similar provenientes del sistema de secreción tipo II.

En el caso de lo encontrado en Gram positivas, específicamente en *Acidibacillus sulfuroxidans* Y002, *Acidibacillus ferrooxidans* Huett2, *Alicyclobacillus acidocaldarius*

TC4-1 y *Alicyclobacillus tengchongensis* CGMCC1504, también se repitió lo encontrado en el género *Leptospirillum*, es decir, solo se pudo encontrar e identificar en sus genomas a *pilC*, *pilB*, *pilT* y *pilD*, aunque en ambas especies de *Alicyclobacillus* también se encontraron los genes codificantes para las proteínas de ensamblaje PilM y PilN. Aunque hasta la fecha no se ha podido determinar con exactitud la presencia del sistema de secreción tipo II en *Acidibacillus*, si ha podido ser encontrada en *Alicyclobacillus* (Carvalho Leonardo et al., 2022). Este hallazgo apoya la idea de la complementación de ambos sistemas para poder cumplir sus funciones.



**Figura 28. Modelo de los sistemas de adherencia detectados en diferentes bacterias acidófilas. (\*)** indica a los microorganismos donde fue posible determinar mediante la búsqueda bioinformática realizada la presencia de genes codificantes para proteínas del sistema de adherencia respectivo, pero que no estaban los clústeres completos (<50% de los genes necesarios).

Al igual que el T4P, el sistema Tad está compuesto por diversas proteínas que se encargan de elongar el filamento de las pilinas mayores hacia el exterior de la célula. Los genes para este sistema se encuentran normalmente en un clúster determinado, en donde solo el gen codificante para la pilina Flp está en una posición diferente fuera de este clúster. En los resultados encontramos que los géneros *Acidithiobacillus*, *Ferroplasma*, *Acidibacillus*, *Alicyclobacillus* y las tres especies estudiadas de *Sulfobacillus* abarcan la gran parte de los genes responsables de la formación de este sistema. Existen estudios previos en *Sulfobacillus thermotolerans* que destacan la presencia de los genes de este sistema en plásmidos crípticos (Deane y Rawlings, 2011). Este tipo de plásmidos se han descrito como plásmidos que no estarían confiriendo un beneficio claro a la bacteria. Sin embargo, muchos de ellos poseen genes que confieren una ventaja respecto a otros microorganismos, como lo es la presencia de genes de virulencia y de adherencia (Voth et al., 2011). La adherencia de *Sulfobacillus* a minerales sulfurados ha sido ampliamente reportada (Li et al., 2015; 2016; Huynh et al., 2020). Se ha demostrado que esta bacteria es capaz de formar biopelículas en pirita y otros minerales sulfurados, pero no está del todo claro cuál sistema estaría usando para la adherencia inicial. El hallazgo de este trabajo propone que el sistema Tad podría ser uno de los sistemas responsables en la adherencia de esta bacteria a la superficie que va a colonizar.

La flagelina es una proteína estructural que compone el filamento del flagelo. Varias unidades de flagelina se ensamblan en un patrón helicoidal para formar este filamento, proporcionando su estructura, permitiendo el movimiento de la célula y también la adherencia a superficies (Kurniyati et al., 2022). La estructura y secuencia de la flagelina pueden ser muy variables, pero comparten importantes similitudes entre

especies (Beatson et al., 2006). Esta proteína se compone de siete dominios; dos dominios D0, D1 y D2 en los extremos C y N- terminales, y un dominio D3 hipervariable en el centro (Beatson et al., 2006). Cuando ocurre el ensamblaje del filamento, los dominios D2 y D3 quedan hacia afuera, mientras que los otros dominios que miran hacia dentro son los que interactúan entre sí y están más conservados. Esta conservación queda demostrada en los resultados obtenidos (Figura 8). El alineamiento y la comparación realizada muestra que los dominios D0 y D1 de la región N- terminal de todos los acidófilos estudiados que poseen flagelina, tienen algunos aminoácidos característicos que componen estos dominios, existiendo una pronunciada variabilidad en el resto de la secuencia (correspondientes a regiones D2 y D3).

Cuando el análisis se acotó a sólo el género *Leptospirillum*, el grado de conservación fue mayor considerablemente a lo largo de toda la secuencia aminoacídica, incluso en algunos casos toda la secuencia se encuentra conservada, como por ejemplo las flagelinas FlaB de *Leptospirillum* sp. CF-1 y *Leptospirillum rubarum*, y FlaB de *Leptospirillum ferriphilum* con FlaA de *Leptospirillum* sp. CF-1. Esta observación coincide en algunos casos con lo reportado en la literatura. Durante bastante tiempo, se ha establecido que a medida que los organismos comparados se acercan filogenéticamente, el grado de conservación de la flagelina es mayor. Por ejemplo, análisis de la región N-terminal de *Borrelia burgdorferi* (Gabmann et al., 1989) mostró que existe una alta conservación de aminoácidos, incluso comparando con otras especies. Lo mismo sucede con las flagelinas de *Pseudomonas aeruginosa*, en donde en este caso sucede algo similar que en *Leptospirillum*, es decir, existe un alto porcentaje de conservación tanto en el extremo N-terminal como en el C-terminal



(Totten y Lory, 1990). Incluso estudios moleculares comparativos más recientes, siguen apoyando esta idea cuando se compara un mismo grupo (Kurniyati et al., 2022). Sin embargo, otros estudios no refuerzan esta idea. En *Salmonella enterica*, existen importantes variaciones entre distintos serotipos dentro de la misma especie (Beatson et al., 2006), lo que indica que en algunos microorganismos incluso dentro de la misma especie no es común tan alta conservación. Esto puede estar explicado por el tipo de ambiente que habitan los microorganismos acidófilos. Al estar sometidos a condiciones de pH extremo, la conservación de estructuras expuestas al medio externo podría verse favorecida, y esto significaría una estrategia o adaptación importante al medio ácido, tal como ocurre con en el pili y la flagelina de la arquea *Sulfolobus islandicus* (Wang et al., 2019).

El c-di-GMP es un importante segundo mensajero que regula una amplia variedad de procesos celulares, incluyendo la motilidad, la formación de biofilms, la virulencia, la adhesión a superficies, la respuesta a estrés, entre otros (Povolotsky y Hengge, 2012; Belas, 2014). Con respecto al metabolismo del c-di-GMP se encontraron en el genoma de *Leptospirillum* sp. CF-1 genes codificantes para 10 diguanilato ciclasas y 6 fosfodiesterasas. Estas enzimas son las encargadas de la biosíntesis y degradación del mensajero c-di-GMP respectivamente. En general las bacterias poseen varias copias de diguanilato ciclasas en sus genomas debido a la importancia de este tipo de enzimas en la regulación de la producción de c-di-GMP. Tienen dominios altamente conservados que otorgan la función de catalizar de esta reacción y, por ende, controlar los niveles de c-di-GMP en la célula (Burrows, 2012). La variabilidad en la secuencia y estructura de estas enzimas puede estar relacionada

con su función específica en diferentes contextos y condiciones ambientales (Merritt et al., 2010; Cruz et al., 2012).

En *Leptospirillum* sp. CF-1, la presencia de múltiples copias de genes que codifican diguanilato ciclasas podría conferir una mayor flexibilidad y capacidad de respuesta ante diferentes señales y estímulos ambientales. Cada copia de la enzima puede estar involucrada en la regulación de c-di-GMP en distintos procesos celulares o en respuesta a diferentes señales, lo que brinda a la bacteria un mecanismo sofisticado de adaptación y regulación en su entorno cambiante. Se encontraron genes para diversas diguanilato ciclasas río abajo de grupos de genes involucrados en la biosíntesis de diversos carbohidratos, probablemente relacionados a la formación de EPS, y en particular uno de ellos también se encontró próximo al clúster de genes codificantes para un sistema de *quorum sensing*. La relación estrecha entre ambos sistemas se ha descrito recientemente para el comportamiento planctónico y de biofilm en *Vibrio fischeri* (Dial et al., 2021), lo que indicaría que en *Leptospirillum* sp. CF-1 se podría dar el mismo comportamiento, es decir, un involucramiento por parte de las diguanilato ciclasas en la producción de EPS y síntesis de moléculas de *quorum sensing* que permitan el paso de vida libre a uno sésil y por lo tanto la formación de biopelículas. Con respecto al mecanismo de *quorum sensing* presente en *Leptospirillum* sp. CF-1, se pudo determinar que el sistema mediado por moléculas señales difusibles (DSF) sería el que usaría esta bacteria para la comunicación entre células. Esto se apoya en lo encontrado en la literatura, donde este sistema ha sido descrito anteriormente en este género, y donde, además, controla la colonización y biolixiviación en *Leptospirillum ferriphilum* y *Leptospirillum ferrooxidans* en presencia de pirita (Bellenberg et al.,

2021). Se encontró una alta similitud entre RpfF (proteína encargada de la síntesis de moléculas difusibles encargadas del *quorum sensing* de *Xanthomonas campestris* pv *campestris*) y la Enoil-CoA hidratasa de *Leptospirillum* sp. CF-1. Esto apoya aún más la hipótesis de que el sistema que usaría esta acidófila para la comunicación entre células y, por lo tanto, la formación de biopelículas, sería el sistema DSF.

#### **4.2 Determinación de la participación del peróxido de hidrógeno en la adherencia de *Leptospirillum* sp. CF-1 a minerales sulfurados.**

Los resultados revelaron que, dentro de los minerales sulfurados estudiados, la suspensión con pirita mostró la concentración más alta de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en comparación con las suspensiones con calcopirita y esfalerita. Se encontró que las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en medio 9K con 2% de pirita eran cercanas a 1 μM desde las 2 h, estabilizándose esta concentración en el tiempo hasta las 8 h. Los reportes en la literatura indican que al usar 20% de pirita en un medio acuoso (con agua y EDTA) las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alcanzan valores cercanos a 2 μM (Cohn et al., 2006). Sin embargo, dicho estudio involucraba el uso de un método colorimétrico basado en cristal violeta siendo menos preciso que el uso de la sonda APF usada en esta tesis.

Con respecto a la mayor cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detectada en la suspensión de pirita en el medio 9K usado para el crecimiento de *Leptospirillum* sp. CF-1 en comparación a los otros dos minerales, este resultado se apoya a lo encontrado en literatura (Jones et al., 2011; 2013). Sin embargo, se debe destacar que en los experimentos de dichos trabajos las condiciones eran diferentes ya que no eran medidas las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un medio de cultivo para bacterias acidófilas, sino más bien, medios acuosos sin uso microbiológico.

Además de lo mencionado anteriormente, se ha sugerido que la capacidad del mineral para liberar electrones también puede influir en la cantidad de  $H_2O_2$  generada en su superficie. En este sentido, la formación de  $H_2O_2$  puede considerarse como una indicación directa del potencial redox (Adler et al., 1999). El potencial redox para la pirita es más alto que el registrado para la calcopirita y la esfalerita (0,63, 0,52 y -0,24 V, respectivamente) (Mehta y Murr, 1983; Holmes y Crundwell, 1995), y esta diferencia de valores está correlacionada con la concentración de  $H_2O_2$  encontrada en suspensiones de cada uno de estos minerales en este estudio.

Además de ser la pirita el mineral que en suspensión generó una mayor concentración de  $H_2O_2$ , también fue el que más se destacó al momento de evaluar la adherencia de *Leptospirillum* sp. CF-1 a su superficie. Este interesante resultado nos podría estar indicando la estrecha relación que existe entre las especies reactivas del oxígeno y la respuesta de adherencia de las bacterias acidófilas ante ellas. Está documentado que el estrés influye en el metabolismo de las bacterias y puede ser un desencadenante de la formación de las biopelículas, sin embargo, en bacterias acidófilas no existen reportes que indiquen cuáles son las señales ambientales que influyen directamente en este proceso. A pesar de que en nuestro laboratorio se han realizado estudios en donde los agentes oxidantes como el sulfato cúprico tienen un efecto negativo, es decir, interfieren en la formación de las biopelículas, la respuesta ante otras moléculas como el  $H_2O_2$  parece tener el efecto contrario (Ferrer et al., 2016). Esta tesis apoya este último punto, en donde encontramos que cuándo estudiamos tres minerales sulfurados que son capaces de ser colonizados por *Leptospirillum* sp. CF-1, y determinamos en cada uno de ellos la concentración de  $H_2O_2$  que se genera, la

adherencia de esta bacteria es mayor para la pirita, el mineral en donde se obtuvo la concentración más elevada.

Para continuar con la idea anterior es que se procedió con la estrategia de añadir  $H_2O_2$  de forma exógena y evaluar si esta condición estimulaba aún más la adherencia de esta bacteria a los minerales. Se encontró que efectivamente a medida que se usaban concentraciones crecientes (no nocivas) de  $H_2O_2$  la adherencia fue mayor, y el aumento fue significativo para los tres minerales estudiados. En el caso de la pirita, la adherencia de casi la totalidad de las células planctónicas fue documentada a las 6 h usando  $10 \mu M$  de  $H_2O_2$ , en comparación al control sin la adición de  $H_2O_2$ , en donde el número de células adheridas a las 8 h todavía no llega a los valores alcanzados cuando se usó  $H_2O_2$ . Este interesante resultado es opuesto a la idea de que algunos agentes estresantes ralentizan o impiden la formación de las biopelículas (como el caso del sulfato cúprico) sino más bien apoya la idea de que a pesar de que las concentraciones elevadas aún tienen un efecto nocivo, concentraciones más bajas pueden desencadenar una respuesta en la bacteria que estimule positivamente su adherencia a los minerales sulfurados tal cual lo hacen otras moléculas como el cloruro de sodio en *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (Huynh et al., 2020).

Todo el punto anterior está apoyado además en el análisis por microscopía de fluorescencia que se efectuó. En las imágenes analizadas se puede observar claramente la capacidad que tiene *Leptospirillum* sp. CF-1 para colonizar la pirita, mineral que comúnmente también es colonizado por otros acidófilos (Bellenberg et al., 2014; Huynh et al., 2020). A pesar de que las imágenes muestran sólo una cara de los gránulos del mineral, se puede observar claramente la tendencia existente en el aumento de la

adherencia cuando se añade H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además, usar este método directo para el análisis de las células adheridas y tener el registro visual de ello, incrementa la fiabilidad de los resultados encontrados en el recuento de células planctónicas y se relacionan directamente.

### **4.3 Evaluación del efecto del peróxido de hidrógeno sobre el proteoma de *Leptospirillum* sp. CF-1 en células planctónicas y adheridas a minerales sulfurados.**

Finalmente, se debe destacar que esta tesis no consideró el estudio de la etapa intermedia y final de una biopelícula como se ha realizado en biopelículas de otras acidófilas sometidas a estrés oxidativo, como lo es el caso de *At. ferrooxidans* (Bellenberg et al., 2019), sino más bien se ha comprendido una etapa muy poco estudiada: la adherencia inicial. Los resultados obtenidos en esta tesis sustentan la hipótesis de que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estimula la adherencia de *Leptospirillum* sp. CF-1 a pirita. Además, esta bacteria posee genes que codifican para elementos estructurales de adherencia, señalización de c-di-GMP y *quorum sensing*; por esto se puede prever que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es una molécula señalizadora que tiene un efecto específico sobre la fisiología y la activación de los mecanismos de adherencia.

En los resultados de la proteómica se pudieron encontrar diversas proteínas relacionadas a la protección y respuesta al estrés, a reacciones redox, de mantenimiento y función de otras proteínas, metabolismo en general, y proteínas estructurales. Por ejemplo, en la condición con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno, se encontró una abundancia relativa alta en las chaperonas GroES, GroEL, GrpE, ClpB y DnaK. Las chaperonas GroES y GroEL forman un complejo y juegan un papel fundamental durante el estrés celular

(Susin et al., 2006). En condiciones de estrés, como la exposición a sustancias que resultan tóxicas como las ROS, las células pueden experimentar desnaturalización o despliegue incorrecto de proteínas. Es aquí donde las chaperonas GroES/GroEL jugarían un papel importante en *Leptospirillum* sp. CF-1 en un ambiente con presencia de estas moléculas estresantes, como lo sería al momento de colonizar minerales sulfurados. Cuando hay estrés celular la actividad de estas chaperonas, junto con las otras encontradas, pueden intensificarse para ayudar a refoldar las proteínas que están siendo dañadas y mal plegadas y así prevenir la acumulación de agregados de proteínas, lo que contribuye finalmente en mantener el equilibrio dentro de la célula y su protección ante el daño por un agente estresor (Fourie y Wilson, 2020). Además de las chaperonas, los sistemas clásicos de respuesta a estrés en bacterias también estarían participando en esta condición de forma importante en *Leptospirillum* sp. CF-1, y por lo tanto serían sistemas activos en el momento de colonizar minerales sulfurados. La elevada abundancia de proteínas como peroxirredoxinas, tiorredoxinas y rubreritina bajo una condición con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suministrado de forma exógena, se condice con la literatura tanto para el género *Leptospirillum* (Ferrer et al., 2016) como para otras acidófilas (Bellenberg et al., 2019). Por lo tanto, la participación de estas proteínas para enfrentar las concentraciones generadas en minerales como la pirita sería uno de los mecanismos utilizados de forma previa y también durante la colonización de minerales sulfurados por *Leptospirillum* sp. CF-1. A pesar de no obtener demasiada información con respecto a elementos estructurales que podrían participar en la adherencia de esta bacteria a la pirita, se encontró que la flagelina estaba mucho más abundante en la condición con la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de forma exógena. Este resultado sustenta la hipótesis

propuesta en este trabajo, de que existe una alta probabilidad de que sea esta proteína la que desempeña el papel de adherente a las superficies para la formación de las biopelículas. Diversas proteínas estructurales se encontraron de forma abundante en la condición con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, entre ellas muchas proteínas de membrana sin una función descrita y varias lipoproteínas. Este tipo de proteínas pueden tener una labor importante en la capacidad de las bacterias para unirse a superficies. Su ubicación en la membrana externa favorecería la interacción con una variedad de superficies, lo que a su vez puede inducir la capacidad de las bacterias para adherirse y establecerse en su ambiente (Hooda et al., 2017).



## 5. CONCLUSIONES

En el genoma de las bacterias acidófilas estudiadas en esta tesis, se encontraron mecanismos específicos que estarían involucrados en la adherencia a los minerales sulfurados, destacándose la flagelina para *Leptospirillum sp.* CF-1. Además, esta bacteria posee los genes esenciales que codifican para las enzimas encargadas de la biosíntesis y degradación de c-di-GMP y para el sistema DSF como mecanismo de *quorum sensing*.

En medios acuosos con minerales sulfurados existe una constante generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el tiempo, siendo la suspensión con pirita la que generó una mayor concentración, comparado con la calcopirita y esfalerita. Bajo estas mismas condiciones *Leptospirillum sp.*CF-1 logró una adherencia diferenciada en el tiempo que dependía del mineral sulfurado utilizado.

La adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno estimuló la adherencia de *Leptospirillum sp.* CF-1 a los distintos minerales sulfurados, lo que indicaría que esta molécula posee efectivamente un efecto activador de la adherencia (y de los mecanismos asociados a esta) en esta bacteria acidófila.

En el proteoma de un cultivo de *Leptospirillum sp.* CF-1 sometida a una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> similar a la producida en pirita, se encontró una alta abundancia de proteínas relacionadas a la protección y respuesta al estrés, de mantenimiento y función de otras proteínas, proteínas de membrana, lipoproteínas y la flagelina. Esto indicaría la participación de proteínas antioxidantes y chaperonas para combatir el estrés causado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los posibles elementos participantes en la adherencia.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Adler, V., Yin, Z., Tew, K.D., Ronai, Z. 1999. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* 18: 6104-6111.
- Alfaro-Saldaña, E., Hernández-Sánchez, A., Patrón-Soberano, A., Astello-García, M., Méndez-Cabañas, J.A., García-Meza, J.V. 2019. Sequence analysis and confirmation of the type IV pili-associated proteins PilY1, PilW and PilV in *Acidithiobacillus thiooxidans*. *PLoS ONE* 14(1): e0199854.
- Aliaga Goltsman, D.S., Deneff, V.J., Singer, S.W., VerBerkmoes, N.C., Lefsrud, M., Mueller, R.S., Dick, G.J., Sun, C.L., Wheeler, K.E., Zemla, A., Baker, B.J., Hauser, L., Land, M., Shah, M.B., Thelen, M.P., Hettich, R.L., Banfield, J.F. 2009. Community genomic and proteomic analyses of chemoautotrophic iron-oxidizing *Leptospirillum rubrum* (Group II) and *Leptospirillum ferrodiazotrophum* (Group III) bacteria in acid mine drainage biofilms. *App. Environ. Microbiol.* 75(13): 4599-4615.
- Armbruster, C.R., Parsek, M.R. 2018. New insight into the early stages of biofilm formation. *PNAS*. 115: 4317-4319.
- Arnaouteli, S., Bamford, N., Stanley-Wall, N.R., Kovács, AT. 2021. *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 19: 600-614.
- Bassler, B.L. 2002. Small talk: cell to cell communication in bacteria. *Cell*. 109: 421-424.
- Beatson, S.A., Tohru, M., Pallen, M.J. 2006. Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure. *Trends Microbiol.* 14(4): 151-155.
- Belas, R. 2014. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends Microbiol.* 22:517–527.
- Bellenberg, S., Díaz, M., Noël, N., Sand, W., Poetsch, A., Guiliani, N., Vera, M. 2014. Biofilm formation, communication and interactions of leaching bacteria during colonization of pyrite and sulfur surfaces. *Res. Microbiol.* 165: 773-781.
- Bellenberg, S., Huynh, D., Poetsch, A., Sand, W., Vera, M. 2019. Proteomics reveal enhanced oxidative stress responses and metabolic adaptation in *Acidithiobacillus ferrooxidans* biofilm cells on pyrite. *Front. Microbiol.* 10: 592.

- Bellenberg, S., Ngoc, D.H., Castro, L., Boretska, M., Sand, W., Vera, M. 2015. Reactive oxygen species influence biofilm formation of acidophilic mineral-oxidizing bacteria on pyrite. *Adv. Mater. Res.* 1130: 118-122.
- Bellenberg, S., Salas, B., Ganji, S., Jorquera-Román, C., Valenzuela, M.L., Buetti-Dinh, A., Unelius, C.R., Dopson, M., Vera, M. 2021. Diffusible signal factor signaling controls bioleaching activity and niche protection in the acidophilic, mineral-oxidizing leptospirilli. *Sci. Rep.* 11: 16275.
- Belnap, C.P., Pan, C., VerBerkmoes, N.C., Power, M.E., Samatova, N.F., Carver, R.L., Hettich, R.L., Banfield, J.F. 2010. Cultivation and quantitative proteomic analyses of acidophilic microbial communities. *ISME J.* 4: 520–530.
- Burrows, L.L. 2012. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annu. Rev. Microbiol.* 66: 493-520.
- Čáp, M., Váchová, L., Palková, Z.. 2012. Reactive oxygen species in the signaling and adaptation of multicellular microbial communities. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 201: 1-13.
- Cárdenas, J.P, Moya, F., Covarrubias, P., Shmaryahu, A., Levicán, G., Holmes, D.S., Quatrini, R. 2012. Comparative genomics of the oxidative stress response in bioleaching microorganisms. *Hydrometallurgy.* 127-128: 162-167.
- Carvalho Leonardo I, Barreto Crespo MT, Bustos Gaspar F. 2022. Unveiling the complete genome sequence of *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922<sup>T</sup>, a taint-producing strain. *G3 (Bethesda).* 12(12): jkac225.
- Christel, S., Herold, M., Bellenberg, S., Hajjami, M., Buetti-Dinh, A., Pivkin, I., Sand, W., Wilmes, P., Poetsch, A., Dopson, M. 2017. Multi-omics reveals the lifestyle of the acidophilic, mineral-oxidizing model species *Leptospirillum ferriphilum*. *App. Environ. Microbiol.* 84: 2091-2117.
- Cohn, C.A., Mueller, S., Wimmer, E., Leifer, N., Greenbaum, S., Strongin, D.R., Schoonen, M.A.A. 2006. Pyrite-induced hydroxyl radical formation and its effect on nucleic acids. *Geochem. Trans.* 7:3.
- Cohn, C.A., Pedigo, C.E., Hylton, S.N., Simon, S.R., Schoonen, M.A.A. 2009. Evaluating the use of 3'-(p-Aminophenyl) fluorescein for determining the formation of highly reactive oxygen species in particle suspensions. *Geochem. Trans.* 10:8.
- Cohn, C.A., Simon, S.R., Schoonen, M.A.A. 2008. Comparison of fluorescence-based techniques for the quantification of particle-induced hydroxyl radicals. *Part. Fibre Toxicol.* 5:2.

- Cruz, D.P., Huertas, M.G., Lozano, M., Zárata, L., Mercedes Zambrano, M. 2012. Comparative analysis of diguanylate cyclase and phosphodiesterase genes in *Klebsiella pneumoniae*. BMC Microbiol. 12: 139.
- Costerston, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M. 1995. Microbial biofilms. Annu. Rev. Microbiol. 49: 711-745.
- D'Autréaux, B., Toledano, M.B. 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. Nat. Rev. 8: 813-824.
- Deane, S.M., Rawlings, D.E. 2011. Two large, related, cryptic plasmids from geographically distinct isolates of *Sulfobacillus thermotolerans*. App. Environ. Microbiol. 77(22): 8175-8180.
- Dial, C.N., Eichinger, S.J., Foxall, R., Corcoran, C.J., Tischler, A.H., Bolz, R.M., Whistler, C.A., Visick, K.L. 2021. Quorum sensing and cyclic di-GMP exert control over motility of *Vibrio fischeri* KB2B1. Front. Microbiol. 12: e103389.
- Díaz, M., Castro, M., Copaja, S., Guiliani, N. 2018. Biofilm formation by the acidophile bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans* involves c-di-GMP pathway and Pel exopolysaccharide. Genes. 9: 113.
- Ellison, C.K., Kan, J., Dillard, R.S., Kysela, D.T., Dueret, A., Berne, C., Hampton, C.M., Ke, Z., Wright, E.R., Biais, N., Dalia, A.B., Brun, Y.V. 2017. Obstruction of pilus retraction stimulates bacterial surface sensing. Science. 358: 535-538.
- Ezraty, B., Gennaris, A., Barras, F., Collet, J.F. 2017. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 15: 385-396.
- Farías, R., Norambuena, J., Ferrer, A., Camejo, P., Zapata, C., Chávez, R., Orellana, O., Levicán, G. 2021. Redox stress response and UV tolerance in the acidophilic iron-oxidizing bacteria *Leptospirillum ferriphilum* and *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Res. Microbiol. 172; 103833.
- Fasnacht, M., Polacek, N. 2021. Oxidative stress in bacteria and central dogma of molecular biology. Front. Mol. Biosci. 8: 671037.
- Ferrer, A., Rivera, J., Zapata, C., Norambuena, J., Sandoval, A., Chávez, R., Orellana, O., Levicán, G. 2016. Cobalamin protection against oxidative stress in the acidophilic iron-oxidizing bacterium *Leptospirillum* group II CF-1. Front. Microbiol. 7:748.
- Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., Kjelleberg, S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nat. Rev. Microbiol. 14: 563-575.

- Fourie, K.R., Wilson, H.L. 2020. Understanding GroEL and DnaK stress response proteins as antigens for bacterial diseases. *Vaccines*. 8; 773.
- Gabmann, G.S, Deutzmann, R., Vogt, A., Göbel, U.B. 1989. N-terminal amino acid sequence of the *Borrelia burgdorferi* flagellin. *FEMS Microbiol. Lett.* 60: 101-106.
- Gera, C., Srivastava, S. 2006. Quorum-sensing, The phenomenon of microbial communication. *Curr. Sci.* 90: 566-677.
- Gerstel, U., Römling, U. 2001. Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Microbiol.* 3: 638-648.
- González, D., Álamos, P., Rivero, M., Orellana, O., Norambuena, J., Chávez, R., Levicán, G. 2020. Deciphering the role of multiple thioredoxin fold proteins of *Leptospirillum* sp. In oxidative stress tolerance. *Int. J. Mol. Sci.* 21:1880.
- Graupner, S., Frey, V., Hashemi, R., Lorenz, M.G., Brandes, G., Wackernagel, W. 2000. Type IV pilus genes *pilA* and *pilC* of *Pseudomonas stutzeri* are required for natural genetic transformation, and *pilA* can be replaced by corresponding genes from nontransformable species. *J. Bacteriol.* 182(8): 2184-2190.
- Hallberg, K., Johnson, B. 2001. Biodiversity of acidophilic prokaryotes. *Adv. App. Microbiol.* 49: 37-84.
- Hansel, C.M., Diaz, J.M., Plummer, S. 2019. Tight regulation of extracellular superoxide points to its vital role in the physiology of the globally relevant *Roseobacter* clade. *mBio.* 10: e02668–e02618.
- Harneit, K., Göksel, A., Kock, D., Klock, J.H., Gehrke, T., Sand, W. 2006. Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy.* 83: 245-254.
- He, Y.W., Deng, Y., Miao, Y., Chatterjee, S., Tran, T.M., Tian, J., Lindow, S. 2022. DSF-family quorum sensing signal-mediated intraspecies, interspecies, and inter-kingdom communication. *Trends Microbiol.* 31(1): 36-50.
- Henke, J.M., Bassler, B.L. 2004. Bacterial social engagements. *Trends Cell Biol.* 14: 648-656.
- Hengge, R. 2009. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 263–273.

- Holmes, P.R., Crundwell, F.K. 1995. Kinetic aspects of galvanic interactions between minerals during dissolution. *Hydrometallurgy*. 39: 353-375.
- Homma, M., Kojima, S. 2022. Roles of the second messenger c-di-GMP in bacteria: Focusing on the topics of flagellar regulation and *Vibrio* spp. *Genes Cells*. 27:157-172.
- Hong, Y., Zeng, J., Wang, X., Drlica, K., Zhao, X. 2019. Post-stress bacterial cell death mediated by reactive oxygen species. *PNAS*. 116(20); 10064-10071.
- Hooda, Y., Lai, C.C.L., Moraes, T.F. 2017. Identification of a large family of slam-dependent surface lipoproteins in Gram-negative bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 7:217.
- Huedo, P., Coves, X., Daura, X., Gibert, I., Yero, D. 2018. Quorum sensing signaling and quenching in the multidrug resistant pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 8:122.
- Huynh, D., Norambuena, J., Boldt, C., Kaschabek, S., Levicán, G., Schlömann, M. 2020. Effect of sodium chloride on pyrite bioleaching and initial attachment by *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. *Front. Microbiol*. 11: 2102.
- Hung, D.T., Jun-Zhu, H., Sturtevant, D., Mekalanos, J. 2006. Bile acids stimulate biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiology*. 59: 193-201.
- Imlay, J.A. 2019. Where in the world do bacteria experience oxidative stress? *Environ. Microbiol*. 21(2): 521-530.
- Javadi, A., Hanumantha, K. 2014. Formation of hydrogen peroxide by sulphide minerals. *Hydrometallurgy*. 141: 82-88.
- Jenal, U., Reinders, A., Lori, C. 2017. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat. Rev. Microbiol*. 15: 271-284.
- Jiao, Y., Cody, G.D., Harding, A.K., Wilmes, P., Schrenk, M., Wheeler, K.E., Banfield, J.F., Thelen, M.P. 2010. Characterization of extracellular polymeric substances from acidophilic microbial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol*. 76(9): 2916-2922.
- Johnson, D.B., Grail, B.M., Hallberg, K.B. 2013. A new direction for biomining: extraction of metals by reductive dissolution of oxidized ores. *Minerals*. 3: 49–58.

- Jones, G.C., Corin, K.C., van Hille, R.P., Harrison, S.T.L. 2011. The generation of toxic reactive oxygen species (ROS) from mechanically activated sulphide concentrates and its effect on thermophilic bioleaching. *Miner. Eng.* 24: 1198-1208.
- Jones, G.C., van Hille, R.P., Harrison, S.T.L. 2013. Reactive oxygen species generated in the presence of fine pyrite particles and its implication in thermophilic mineral bioleaching. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:2735-2742.
- Kachlany, S.C., Planet, P.J., Bhattacharjee, M.K., Kollia, E., De Salle, R., Fine, D.H., Figurski, D.H. 2000. Nonspecific adherence by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* requires genes widespread in *Bacteria* and *Archaea*. *J. Bacteriol.* 182(21): 6169-6176.
- Kaksonen, A.H., Boxall, N.J., Gumulya, Y., Nahreen, H., Morris, C., Bohu, T., Cheng, K., Usher, K., Lakaniemi, A.M. 2018. Recent progress in biohydrometallurgy and microbial characterization. *Hydrometallurgy.* 180: 7-25.
- Kurniyati, K., Chang, Y., Liu, J., Li, C. 2022. Transcriptional and functional characterizations of multiple flagellin genes in spirochetes. *Mol. Microbiol.* 118: 175-190.
- Li, L., Li, J., Zhang, Y., Wang, N. 2019. Diffusible signal factor (DSF)-mediated quorum sensing modulates expression of diverse traits in *Xanthomonas citri* and responses of citrus plants to promote disease. *BMC Genomics.* 20: 55.
- Li, Q., Sand, W., Zhang, R. 2016. Enhancement of biofilm formation on pyrite by *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. *Minerals* 6: 71.
- Li, Q., Zhang, R., Krok, B.A., Vera, M., Sand, W. 2015. Biofilm formation of *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* on pyrite in the presence of *Leptospirillum ferriphilum*. *Adv. Mater. Res.* 1130: 141-144.
- Liao, N., Li, H. 2013. Conceivable bioremediation techniques based on quorum sensing. *Appl. Mech. Mater.* 295: 39-44.
- Mangwani, N., Kumari, S., Das, S. 2016. Bacterial biofilms and quorum sensing: Fidelity in bioremediation technology. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 32: 43-73.
- Meganathan, Y., Vishwakarma, A., Ramya, M. 2022. Biofilm formation and social interaction of *Leptospira* in natural and artificial environments. *Res. Microbiol.* 173(8): 103981.

- Mehta, A.P., Murr, L.E. 1983. Fundamental studies of the contribution of galvanic interaction to acid-bacterial leaching of mixed metal sulfides. *Hydrometallurgy*. 9: 235.
- Merritt, J., Ha, D.G., Cowles, K.N., Lu, W., Morales, D., Rabinowitz, J., Gitai, Z., O'Toole, G.A. 2010. Specific control of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated behaviors by two c-di-GMP diguanylate cyclases. *mBio*. 1: e00183-10.
- Mi, S., Song, J., Lin, J., Che, Y., Zheng, H., Lin, J. 2011. Complete genome of *Leptospirillum ferriphilum* ML-04 provides insight into its physiology and environmental adaptation. *J. Microbiol.* 49: 890-901.
- Miller, M.B., Bassler, B.L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 165-199.
- Monds, R.D., Newell, P.D., Gross, R.H., O'Toole, G.A. 2007. Phosphate dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA. *Mol. Microbiology*. 63: 656-679.
- Moreno-Paz, M., Gómez, M.J., Arcas, A., Parro, V. 2010. Environmental transcriptome analysis reveals physiological differences between biofilm and planktonic modes of life of the iron oxidizing bacteria *Leptospirillum* spp. In their natural microbial community. *BMC Genomics*. 11: 404.
- Norambuena, J., Flores, R., Cardenas, J.P., Quatrini, R., Chavez, R., Levicán, G. 2012. Thiol/disulfide system plays a crucial role in redox protection in the acidophilic iron-oxidizing bacterium *Leptospirillum ferriphilum*. *PLoS ONE*. 7: e44576.
- Ossa Henao, M.D., Vicentini, R., Drumond, V., Bevilaqua, D., Mariscal Ottoboni, L.M. 2013. Differential gene expression in *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR planktonic and attached cells in the presence of chalcopyrite. *J. Basic Microbiol.* 54: 1-8.
- Panitz, C., Frösler, J., Wingender, J., Flemming, H.C., Rettberg, P. 2019. Tolerances of *Deinococcus geothermalis* biofilms and planktonic cells exposed to space and simulated Martian conditions in low Earth orbit for almost two years. *Astrobiology*. 19(8): 979-994.
- Peabody, C.R., Chung, Y.J., Yen, MR., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A.P., Saier, M.H. 2003. Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology*. 149: 3051-3072.
- Povolotsky, T.L., Hengge, R. 2012. Life-style control networks in *Escherichia coli*: signaling by the second Messenger c-di-GMP. *J. Biotechnol.* 160: 10-16.



- Rivera-Araya, J., Levicán, G. 2019. Characterization of NaCl tolerance mechanism and its relation with the antioxidant mechanisms in the acidophilic bacterium *Leptospirillum ferriphilum* DSM 14647. Tesis Doctorado en Microbiología, Universidad de Chile, Chile.
- Ruiz, L.M., Sand, W., Jerez, C.A., Guiliani, N. 2007. C-di-GMP pathway in *Acidithiobacillus ferrooxidans*: analysis of putative diguanylate cyclases (DGCs) and phosphodiesterases (PDEs) bifunctional proteins. *Adv. Mater. Res.* 20-21: 551-555.
- Ruiz, L.M., Castro, M., Barriga, A., Jerez, C.A., Guiliani, N. 2011. The extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* possesses a c-di-GMP signaling pathway that could play a significant role during bioleaching of minerals. *Lett. Appl. Microbiol.* 54: 133- 139.
- Sauer, K., Stoodley, P., Goerges, D.M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P.S., Bjarnsholt, T. 2022. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat. Rev. Microbiol.* 20(10): 608-620.
- Schembri, M.A., Kjaergaard, K., Klemm, P. 2003. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiology.* 48: 253-267.
- Schippers, A., Hedrich, S., Vasters, J., Drobe, M., Sand, W., Willscher, S. 2013. Biomining: Metal recovery from ores with microorganisms. *Advances in Biochemistry Engineering/Biotechnology* 1:1-47.
- Seixas, A.F., Quendera, A.P., Sousa, J.P., Silva, A.F.Q., Arraino, C.M., Andrade, J.M. 2022. Bacterial response to oxidative stress and RNA oxidation. *Front. Genet.* 12: 821535.
- Shen, L., Cheng, J., Wang, J., Cui, L., Zhang, Y., Liao, W., Liu, Z., Zhou, H., Wu, X., Li, J., Zeng, W. 2022. Comparison of extraction methods for extracellular polymeric substances (EPS) and dynamic characterization of EPS from sessile microorganisms during pyrite bioleaching. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 10(3): 107922.
- Shu, W.S., Huang, L.N. 2022. Microbial diversity in extreme environments. *Nat. Rev. Microbiol.* 20, 219–235.
- Sies, H., Menck, S.F. 1992. Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat. Res.* 275(3-6); 367-75.
- Sies, H. 1993. Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutat. Res.* 299(3-4); 183-91.

- Susin, M.F., Baldini, R.L., Gueiros-Filho, F., Gomes, S.L. 2006. GroES/GroEL and DnaK/DnaJ have distinct roles in stress responses and during cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 188(23): 8044-8053.
- Sutherland, I.W. 2001. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* 9:222-227.
- Totten, P.A., Lory, S. 1990. Characterization of the type a flagellin gene from *Pseudomonas aeruginosa* PAK. *J. Bacteriol.* 172(12): 7188-7199.
- Valenzuela, S., Banderas, A., Jerez, C.A, Guiliani, N. 2007. Cell-cell communication in bacteria. A promising new approach to improve bioleaching efficiency? En Donati, E.R., Sand, W. (Eds.), 805 *Microbial processing of metal sulfides*. Springer. pp. 253- 264. Dordrecht, Netherlands.
- van Wolferen, M., Orell, A., Albers, S.V. 2018. Archaeal biofilm formation. *Nat. Rev. Microbiol.* 16: 699-713.
- Vargas-Straube, M.J., Beard, S., Norambuena, R., Paradela, A., Vera, M., Jerez, C.A. 2020. High copper concentration reduces biofilm formation in *Acidithiobacillus ferrooxidans* by decreasing production of extracellular polymeric substances and its adherence to elemental sulfur. *J. Proteomics.* 225: 103874.
- Vera, M., Schippers, A., Sand, W. 2013. Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation - part A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17: 7529-7541.
- Vera, M., Schippers, A., Hedrich, S., Sand, W. 2022. Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation - part A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 106: 6933-6952.
- Völkel, S., Fröls, S., Pfeifer, F. 2018. Heavy metal ion stress on *Halobacterium salinarum* R1 planktonic cells and biofilms. *Front. Microbiol.* 9: 3157.
- Voth, D.E., Beare, P.A., Howe, D., Sharma, U.M., Samoilis, G., Cockrell, D.C., Omsland, A., Heinzen, R.A. 2011. The *Coxiella burnetii* cryptic plasmid is enriched in genes encoding type IV secretion systems substrates. *J. Bacteriol.* 193(7): 1493-503.
- Wang, F., Cvirkaite-Krupovic, V., Kreutzberger, M.A., Su, Z., de Oliveira, G., Osinki, T., Sherman, N., DiMaio, F., Wall, J.S., Prangishvili, D., Krupovic, M., Egelman, E.H. 2019. An extensively glycosylated archaeal pilus survives extreme conditions. *Nat. Microbiol.* 4: 1401-1410.

- Waters, C.M., Bassler, B.L. 2005. Quorum sensing cell to cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21: 319-346.
- Waters, C.M., Lu, W., Rabinowitz, J.D., Bassler, B.L. 2008. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic di- GMP levels and repression of *vpsT*. *J. Bacteriol.* 190: 2527-2536.
- Whitehead, N.A., Barnard, A., Slater, H., Simpson, N., Salmond, G. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 365-404.
- Winter-Larsen, H.C., Wolfgang, M., Dunham, S., van Putten, J.P..M, Dorward, D., Løvold, C., Aas, F.E., Koomey, M. 2005. A conserved set of pilin-like molecules controls type IV pilus dynamics and organelle-associated functions in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiology.* 56(4): 903-917.
- Wilmes, P., Remis, J.P., Hwang, M., Auer, M., Thelen, M.P., Banfield, J.F. 2008. Natural acidophilic biofilm communities reflect distinct organismal and functional organization. *ISME J.* 3: 266-270.
- Wolfe, A.J., Visick, K.L. 2008. Get the message out: cyclic-di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *J. Biotechnol.* 190: 463-475.
- Wolfgang, M.C., Lee, V.T., Gilmore, M.E., Lory, S. 2003. Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. *Dev. Cell.* 4: 253–263.
- Yamagata, A., Milgotina, E., Scanlon, K., Craig, L., Tainer, J.A., Donnenberg, M.S. 2012. Structure of an essential type IV pilus biogenesis protein provides insights into pilus and type II secretion systems. *J. Mol. Biol.* 419: 110-124.
- Zapata, C., Paillavil, B., Chávez, R., Álamos, P., Levicán, G. 2017. Cytochrome *c* peroxidase (CcP) is a molecular determinant of the oxidative stress response in the extreme acidophilic *Leptospirillum* sp. CF-1, *FEMS Microbiol. Ecol.* 93(3) fix001.
- Zhang, R., Bellenberg, S., Neu, T.R., Sand, W., Vera, M. 2016. The biofilm lifestyle of acidophilic metal/sulfur-oxidizing microorganisms. En *Biotechnology of Extremophiles Advances and Challenges*; Rampelotto, P., Ed.; Springer. 1: 177–213.
- Zhao, D., Yang, J., Liu, T., Lu, D., Zhang, S., Yan, L., Ni, Y. 2021. Complete genoma sequence análisis of *Acidithiobacillus ferrivorans* XJFY6S-08 reveals environmental adaptation to alpine acid mine drainage. *Curr. Microbiol.* 78: 1488-1498.

## 7. ANEXO

**Tabla A1:** Tabla de proteínas analizadas mediante proteómica. Las columnas contienen, de izquierda a derecha: el gen asociado, el código de UniProt, el nombre de la proteína, su función biológica, y los promedios de las abundancias relativas para la muestra control (iBAQC) y el tratamiento con 10  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (iBAQCH). Los valores de las abundancias relativas se presentan en escala logarítmica (log<sub>2</sub>)

Gene	Uniprot Code	Protein Name	Biological Function	Average iBAQC (Control)	Average iBAQCH (Treatment)
<i>ABH19_04035</i>	A0A0K0WLD5	Antitoxin Xre/MbcA/ParS-like toxin-binding domain-containing protein	Components of Enzyme Complexes	18,16987801	19,10336971
<i>ABH19_10900</i>	A0A0K0WPC5	AsmA domain-containing protein	Components of Enzyme Complexes	19,02691174	19,33704424
<i>thiG</i>	A0A0K0WJQ0	ATP synthase epsilon chain	Components of Enzyme Complexes	20,4397316	23,44539452
<i>atpG</i>	A0A0K0WJF6	ATP synthase gamma chain	Components of Enzyme Complexes	18,44262791	21,92003536
<i>atpA</i>	A0A0K0WQM9	ATP synthase subunit alpha	Components of Enzyme Complexes	18,98989073	24,34792709
<i>ABH19_10220</i>	A0A0K0WJG7	ATP synthase subunit b	Components of Enzyme Complexes	19,77318827	23,42126846
<i>atpD</i>	A0A0K0WJH9	ATP synthase subunit beta	Components of Enzyme Complexes	19,20104599	24,56018066
<i>topA</i>	A0A0K0WQE1	DNA topoisomerase 1	Gene Regulation and Transcription	12,93061066	20,4661274
<i>ABH19_00110</i>	A0A0K0WJC4	CRISPR-associated protein Cse2	Gene Regulation and Transcription	18,65521622	19,66175365
<i>ABH19_00115</i>	A0A0K0WJB7	CRISPR-associated protein Cse4	Gene Regulation and Transcription	17,07632065	21,14568901
<i>ABH19_06140</i>	A0A0K0WLY0	Crp/Fnr family transcriptional regulator	Gene Regulation and Transcription	16,60818195	20,60568333
<i>ABH19_12185</i>	A0A0K0WR64	DNA-binding protein	Gene Regulation and Transcription	21,94826889	25,33349991
<i>rpoA</i>	A0A0K0WQY1	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	Gene Regulation and Transcription	19,39233971	22,79854965
<i>rpoB</i>	A0A0K0WLH5	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	Gene Regulation and Transcription	14,490249	19,29771169
<i>rpoC</i>	A0A0K0WLJ1	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	Gene Regulation and Transcription	14,87561655	21,92446041
<i>rpoZ</i>	A0A0K0WLN8	DNA-directed RNA polymerase subunit omega	Gene Regulation and Transcription	18,936553	19,62541866
<i>ABH19_07970</i>	A0A0K0WQX0	DNA-directed RNA polymerase subunit sigma-24	Gene Regulation and Transcription	14,57227182	21,98790932
<i>ABH19_09645</i>	A0A0K0WR04	Fis family transcriptional regulator	Gene Regulation and Transcription	16,26487255	21,0953474
<i>ABH19_06570</i>	A0A0K0WM62	Helix-turn-helix domain-containing protein	Gene Regulation and Transcription	16,94577503	19,37273089
<i>ABH19_01960</i>	A0A0K0WK43	HMA domain-containing protein	Gene Regulation and Transcription	16,89417585	22,92375755

<i>ABH19_08690</i>	A0A0K0WNB4	HMA domain-containing protein	Gene Regulation and Transcription	17,34568596	18,76698637
<i>ABH19_07010</i>	A0A0K0WMB6	Integration host factor subunit alpha	Gene Regulation and Transcription	19,98929532	22,4223299
<i>ABH19_08200</i>	A0A0K0WN81	Integration host factor, beta-subunit	Gene Regulation and Transcription	19,39281464	22,15534401
<i>sigA</i>	A0A0K0WVP5	RNA polymerase sigma factor SigA	Gene Regulation and Transcription	18,03175735	20,08677483
<i>ABH19_05010</i>	A0A0K0WR07	Single-stranded DNA-binding protein	Gene Regulation and Transcription	19,79018688	21,87565422
<i>greA</i>	A0A0K0WP03	Transcription elongation factor GreA	Gene Regulation and Transcription	18,10899448	24,59216881
<i>rho</i>	A0A0K0WPP4	Transcription termination factor Rho	Gene Regulation and Transcription	18,72545624	19,58175341
<i>nusA</i>	A0A0K0WN74	Transcription termination/antitermination protein NusA	Gene Regulation and Transcription	19,33652592	22,22268677
<i>ABH19_13105</i>	A0A0K0WQE2	Transcriptional regulator HU subunit alpha	Gene Regulation and Transcription	22,98446719	25,50530624
<i>ABH19_10190</i>	A0A0K0WNP0	ABC transporter ATP-binding protein	Structural Proteins	18,91379674	19,44757318
<i>ABH19_08150</i>	A0A0K0WR95	Carboxy-terminal processing protease	Structural Proteins	17,99268055	20,99776077
<i>ABH19_10125</i>	A0A0K0WNM9	CBS domain containing membrane protein	Structural Proteins	19,2401619	23,42201042
<i>ABH19_09355</i>	A0A0K0WNA5	Cell division protein DivIVA	Structural Proteins	17,9797821	20,688344
<i>ABH19_13420</i>	A0A0K0WQ55	Cell shape determination protein CcmA	Structural Proteins	18,20343304	20,16699743
<i>mreB</i>	A0A0K0WPX6	Cell shape-determining protein MreB	Structural Proteins	16,86923885	21,63713455
<i>mdh</i>	A0A0K0WPT2	Diaminopimelate decarboxylase	Structural Proteins	19,23204136	22,52899933
<i>ABH19_13160</i>	A0A0K0WJX5	Diaminopimelate epimerase	Structural Proteins	18,88803768	22,73637772
<i>ABH19_00465</i>	A0A0K0WQB1	Dienelactone hydrolase domain-containing protein	Structural Proteins	20,81859684	24,32325745
<i>ABH19_05455</i>	A0A0K0WM12	Disulfide bond formation regulator	Structural Proteins	19,24657059	21,95283985
<i>ABH19_12570</i>	A0A0K0WPR3	Flagellin	Structural Proteins	17,60006618	20,39772797
<i>ABH19_02055</i>	A0A0K0WK58	FlgO domain-containing protein	Structural Proteins	18,06432724	24,04726791
<i>ABH19_04610</i>	A0A0K0WLC8	Lipid/polyisoprenoid-binding YceI-like domain-containing protein	Structural Proteins	18,34992154	22,43118763
<i>ABH19_10555</i>	A0A0K0WNV1	Lipoprotein	Structural Proteins	20,15993118	21,97204781
<i>ABH19_02660</i>	A0A0K0WKP3	Lipoprotein	Structural Proteins	19,83968353	21,43842793
<i>ABH19_10145</i>	A0A0K0WP12	Lipoprotein	Structural Proteins	18,91804981	20,74055767
<i>ABH19_06545</i>	A0A0K0WMD9	Lipoprotein	Structural Proteins	18,6809721	24,7882061
<i>ABH19_12395</i>	A0A0K0WPQ1	Lipoprotein SmpA/OmlA domain-containing protein	Structural Proteins	16,34095701	21,85395622
<i>lon</i>	A0A0K0WQC8	Lon protease	Structural Proteins	18,31713359	18,99038633

<i>ABH19_02060</i>	A0A0K0WQN3	Membrane protease	Structural Proteins	19,56754208	20,50204277
<i>ABH19_00715</i>	A0A0K0WJK1	Membrane protein	Structural Proteins	21,47425524	23,67770195
<i>ABH19_07425</i>	A0A0K0WQT9	Membrane protein	Structural Proteins	21,24809011	23,82544994
<i>rplW</i>	A0A0K0WPK5	Membrane protein	Structural Proteins	21,32777087	22,63492012
<i>ABH19_06770</i>	A0A0K0WMI0	Membrane protein	Structural Proteins	20,34902891	22,75187206
<i>ABH19_08450</i>	A0A0K0WR68	Membrane protein	Structural Proteins	17,64365578	20,97938538
<i>ABH19_02190</i>	A0A0K0WQG5	Penicillin-binding protein activator LpoB	Structural Proteins	18,70817502	20,45275402
<i>ABH19_12340</i>	A0A0K0WPP1	Porin	Structural Proteins	16,42340469	21,50484371
<i>ABH19_12690</i>	A0A0K0WPT3	Potassium channel protein	Structural Proteins	15,10113716	18,91184044
<i>ABH19_07625</i>	A0A0K0WMX2	Preprotein translocase subunit YajC	Structural Proteins	20,73986816	21,96154881
<i>secE</i>	A0A0K0WLH1	Protein translocase subunit SecE	Structural Proteins	18,95923805	22,19162369
<i>secY</i>	A0A0K0WQN6	Protein translocase subunit SecY	Structural Proteins	15,92708015	20,399683
<i>rplS</i>	A0A0K0WQA9	Probable cytosol aminopeptidase	Structural Proteins	19,0890131	22,95519733
<i>dabA</i>	A0A0K0WNE6	Probable inorganic carbon transporter subunit DabA	Structural Proteins	19,43288676	21,91891925
<i>ABH19_00965</i>	A0A0K0WJN7	Secretion protein HlyD	Structural Proteins	18,11855984	22,41052914
<i>ABH19_08000</i>	A0A0K0WN44	Secretion protein HlyD	Structural Proteins	16,58193731	20,18251324
<i>ABH19_00960</i>	A0A0K0WJP8	Transporter	Structural Proteins	18,13058043	22,03292751
<i>ABH19_00730</i>	A0A0K0WMS1	Transposase	Structural Proteins	16,59090837	22,11400604
<i>ABH19_10940</i>	A0A0K0WPD2	UvrD-like helicase C-terminal domain-containing protein	Structural Proteins	17,01948357	16,01423216
<i>ABH19_02840</i>	A0A0K0WQS2	YbhB and YbcL	Structural Proteins	17,82948875	19,28914833
<i>ABH19_05745</i>	A0A0K0WR32	YCII-related domain-containing protein	Structural Proteins	17,90998077	21,61744499
<i>ABH19_12155</i>	A0A0K0WR83	Zn-ribbon protein, putative nucleic acid-binding protein	Structural Proteins	18,29842567	21,24501991
<i>gpmA</i>	A0A0K0WPI1	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	Metabolism and Energy Production	18,18422508	20,33306885
<i>ABH19_04045</i>	A0A0K0WQK9	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase	Metabolism and Energy Production	16,75720835	19,59146929
<i>ABH19_11410</i>	A0A0K0WP88	6-phosphogluconate dehydrogenase	Metabolism and Energy Production	17,53015327	20,71338081
<i>ABH19_03230</i>	A0A0K0WL20	6-phosphogluconate dehydrogenase	Metabolism and Energy Production	14,79736853	22,72640038
<i>ABH19_08430</i>	A0A0K0WN79	Polyphosphate kinase	Metabolism and Energy Production	17,73304939	19,18320465
<i>dxs</i>	A0A0K0WNK0	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	14,90879536	20,74098206

<i>ABH19_05840</i>	A0A0K0WLT3	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	20,13597775	23,44803715
<i>ABH19_09895</i>	A0A0K0WRF0	3-deoxy-D-mannoctulosonate cytidyltransferase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,35525513	19,35095501
<i>fabZ</i>	A0A0K0WR76	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase FabZ	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,60083771	23,89309883
<i>leuD</i>	A0A0K0WKQ9	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	19,71586514	22,40410328
<i>leuB</i>	A0A0K0WQK7	3-isopropylmalate dehydrogenase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,945117	22,14792347
<i>ispE</i>	A0A0K0WLF7	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,09813023	19,30818558
<i>ispG</i>	A0A0K0WPK4	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase (flavodoxin)	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,54431534	21,72309017
<i>dapA</i>	A0A0K0WPS8	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,77328873	21,53334522
<i>ABH19_09140</i>	A0A0K0WN72	4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,79325676	22,19829178
<i>ABH19_05575</i>	A0A0K0WQZ1	7-keto-8-aminopelargonate synthetase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	15,19789076	18,80735826
<i>ABH19_13660</i>	A0A0K0WQA4	Acetolactate synthase small subunit	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,02386347	20,78742599
<i>ABH19_09500</i>	A0A0K0WNC5	Aconitate hydratase A	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	20,40000057	23,96896744
<i>acpP</i>	A0A0K0WPA3	Acyl carrier protein	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	24,09365336	21,93863964
<i>ahcY</i>	A0A0K0WN94	Adenosylhomocysteinase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,4918108	21,74536133
<i>adk</i>	A0A0K0WLL1	Adenylate kinase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	19,9920826	23,61444187
<i>ABH19_06945</i>	A0A0K0WMA6	Adenylosuccinate lyase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	14,56664944	22,47174454
<i>ABH19_02950</i>	A0A0K0WKT8	Adenylylsulfate reductase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,85819721	22,47152138
<i>ABH19_09900</i>	A0A0K0WR09	ADP-heptose synthase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	16,27431202	20,0078187
<i>ABH19_05325</i>	A0A0K0WLL0	ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,28346825	20,82896233
<i>alaS</i>	A0A0K0WN26	Alanine--tRNA ligase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	14,28685284	20,04101276
<i>glgE</i>	A0A0K0WKT1	Alpha-1,4-glucan:maltose-1-phosphate maltosyltransferase	Metabolism of Metabolites and	15,26074076	19,34000969

Biomolecules					
<i>trpD</i>	A0A0K0WP22	Anthranilate phosphoribosyltransferase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,86771488	19,08094311
<i>argG</i>	A0A0K0WQ33	Argininosuccinate synthase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,60970783	19,71637472
<i>panD</i>	A0A0K0WP54	Aspartate 1-decarboxylase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,84153175	22,25332928
<i>asd</i>	A0A0K0WRK4	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,22101593	21,40608883
<i>ABH19_09510</i>	A0A0K0WNE9	ATP citrate synthase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	21,57769394	24,7627964
<i>fabH</i>	A0A0K0WR49	Beta-ketoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	16,56253147	19,99148178
<i>ABH19_05845</i>	A0A0K0WLV0	Bifunctional chorismate mutase/prephenate dehydratase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	14,92798901	20,35409832
<i>folD</i>	A0A0K0WLS4	Bifunctional protein FolD	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,90915108	21,45130634
<i>purH</i>	A0A0K0WMM5	Bifunctional purine biosynthesis protein PurH	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,28669834	22,00338459
<i>ilvE</i>	A0A0K0WJL6	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,56907336	22,49766445
<i>dnaA</i>	A0A0K0WJA8	Chromosomal replication initiator protein DnaA	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	21,56479136	21,26484934
<i>ABH19_09495</i>	A0A0K0WQZ9	Citrate synthase (unknown stereospecificity)	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,10113335	21,89018822
<i>ABH19_06290</i>	A0A0K0WMA3	Class V aminotransferase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	21,82832718	24,32573128
<i>ABH19_13510</i>	A0A0K0WQ84	Cobalamin biosynthesis protein CbiG	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	15,88927126	18,82172298
<i>cbiF</i>	A0A0K0WLQ1	Cobalt-precorrin-4 C(11)-methyltransferase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,85842482	20,4070762
<i>ABH19_09270</i>	A0A0K0WNN3	Coproporphyrinogen-III oxidase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	16,10687351	20,16836834
<i>iscS</i>	A0A0K0WKK9	Cysteine desulfurase IscS	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	20,11707115	23,59714031
<i>ABH19_06285</i>	A0A0K0WQR8	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	20,41947651	24,22523403
<i>ABH19_05450</i>	A0A0K0WLX6	DegT/DnrJ/EryC1/StrS aminotransferase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	16,57042313	19,57444191
<i>ABH19_10480</i>	A0A0K0WP59	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	16,59154034	24,36472893



<i>ABH19_06860</i>	A0A0K0WM96	Dihydrolipoamide dehydrogenase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	15,49379635	23,43478966
<i>ilvD</i>	A0A0K0WQP3	Dihydroxy-acid dehydratase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	16,77921057	20,61077595
<i>ABH19_09680</i>	A0A0K0WNF0	DinB-like domain-containing protein	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,21238136	24,7204628
<i>ABH19_13070</i>	A0A0K0WQ98	Dioxygenase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	21,43646622	24,18438339
<i>ABH19_11175</i>	A0A0K0WPJ3	Dipeptidylpeptidase IV N-terminal domain-containing protein	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,39059448	22,48553848
<i>ABH19_04265</i>	A0A0K0WL47	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	19,01840782	20,18197155
<i>lepA</i>	A0A0K0WNK8	Elongation factor 4	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	16,66806126	18,39523824
<i>fusA</i>	A0A0K0WQP0	Elongation factor G	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,04659081	23,24801254
<i>efp</i>	A0A0K0WLY6	Elongation factor P	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	19,83808041	22,08608246
<i>tsf</i>	A0A0K0WRI1	Elongation factor Ts	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	20,95855141	22,36468379
<i>tuf</i>	A0A0K0WLI0	Elongation factor Tu	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	23,45586681	22,72588444
<i>rpsO</i>	A0A0K0WP48	Enolase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,87596321	22,31988144
<i>ABH19_08315</i>	A0A0K0WMX5	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	16,18832397	19,65020847
<i>ABH19_07130</i>	A0A0K0WR66	FmdB family regulatory protein	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	20,29061794	22,33840561
<i>ABH19_09480</i>	A0A0K0WNE3	Fumarate reductase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	15,54852724	19,78173399
<i>ABH19_02865</i>	A0A0K0WKS3	Gamma-butyrobetaine hydroxylase-like N-terminal domain-containing protein	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,93915494	23,6076107
<i>ABH19_04905</i>	A0A0K0WQW9	Glucokinase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	15,72530222	18,70663261
<i>ABH19_10035</i>	A0A0K0WNM8	Glutamine synthetase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	19,80890942	24,46649647
<i>ABH19_11180</i>	A0A0K0WP55	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing]	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	14,72299671	22,36091677
<i>ABH19_12175</i>	A0A0K0WRG2	Glutamyl-tRNA amidotransferase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	19,03435008	21,78977203
<i>ABH19_00330</i>	A0A0K0WJE6	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Metabolism of Metabolites and	18,9904747	22,86163139

Biomolecules					
<i>ABH19_01890</i>	A0A0K0WQF7	Glycosyl hydrolase family protein	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	20,70206928	23,36820412
<i>ABH19_07170</i>	A0A0K0WMQ3	Glycosyl transferase family 39	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	21,42132759	21,39059734
<i>ABH19_09640</i>	A0A0K0WNE5	Histidine kinase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	16,22224617	20,89415455
<i>thrB</i>	A0A0K0WNT1	Homoserine kinase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,67770004	18,99203539
<i>ABH19_05975</i>	A0A0K0WLU9	Hydrogenase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	15,93642426	21,84402084
<i>ilvC</i>	A0A0K0WQ90	Ketol-acid reductoisomerase (NADP(+))	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	19,60722446	23,0496645
<i>pnp</i>	A0A0K0WMS8	Malate dehydrogenase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	20,0283947	23,21002483
<i>ABH19_08640</i>	A0A0K0WN00	Metallo-beta-lactamase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,26064396	22,43822098
<i>ABH19_00420</i>	A0A0K0WJS6	Metallo-beta-lactamase domain-containing protein	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	15,54973316	19,63364697
<i>metG</i>	A0A0K0WHP86	Methionine--tRNA ligase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	15,90923786	20,28711605
<i>mtnB</i>	A0A0K0WHP63	Methylthioribulose-1-phosphate dehydratase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	16,28858121	20,78596306
<i>ABH19_13075</i>	A0A0K0WQD6	Methyltransferase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	19,94029713	23,38171291
<i>ABH19_09220</i>	A0A0K0WN89	Molybdenum cofactor biosynthesis protein Moad	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	19,86670176	21,64086437
<i>purE</i>	A0A0K0WLY5	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide mutase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,37046941	23,74847603
<i>ABH19_03265</i>	A0A0K0WKQ2	NAD-dependent dehydratase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,89355087	21,01132298
<i>ABH19_06855</i>	A0A0K0WML8	NAD-dependent epimerase/dehydratase domain-containing protein	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,64442158	21,07764053
<i>ABH19_09005</i>	A0A0K0WN70	NADH dehydrogenase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,87679195	21,31609535
<i>ABH19_08995</i>	A0A0K0WRC4	NADH dehydrogenase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	15,77340269	19,85627031
<i>ABH19_09000</i>	A0A0K0WN56	NADH dehydrogenase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	15,26188707	20,60426998
<i>ABH19_11015</i>	A0A0K0WHP30	NADH dehydrogenase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	23,4110616	24,18761349

<i>nuoB</i>	A0A0K0WNJ6	NADH-quinone oxidoreductase subunit B	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	19,40441799	18,90712611
<i>nuoC</i>	A0A0K0WNG2	NADH-quinone oxidoreductase subunit C	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,26946068	21,57705975
<i>nuoI</i>	A0A0K0WNJ1	NADH-quinone oxidoreductase subunit I	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,54553986	20,33792686
<i>ABH19_11055</i>	A0A0K0WPC9	N-ethylmaleimide reductase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	19,24774742	21,95161819
<i>ABH19_11670</i>	A0A0K0WPS0	NHL repeat containing protein	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	14,61527348	19,62873697
<i>ABH19_12465</i>	A0A0K0WRL1	Nif-specific regulatory protein	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	14,55620337	19,2644906
<i>ABH19_06115</i>	A0A0K0WLX5	Nitrite reductase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,46346569	19,10342407
<i>ABH19_00900</i>	A0A0K0WJM7	Nucleoid-associated protein ABH19_00900	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	19,14313412	20,06184769
<i>ndk</i>	A0A0K0WLX9	Nucleoside diphosphate kinase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,81163629	24,00346279
<i>pyrE</i>	A0A0K0WQA0	Orotate phosphoribosyltransferase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,2634325	24,6686058
<i>ABH19_13255</i>	A0A0K0WQ29	Parvulin peptidyl-prolyl isomerase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,55101267	21,08422947
<i>ABH19_00545</i>	A0A0K0WJR3	Phenylalanine--tRNA ligase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	15,66610861	18,2372427
<i>ABH19_12325</i>	A0A0K0WPM3	Phosphate-binding protein	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	19,78117561	21,4151907
<i>ABH19_02800</i>	A0A0K0WKH9	Phosphatidylglycerol lysyltransferase C-terminal domain-containing protein	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,65882619	22,38350487
<i>ABH19_11360</i>	A0A0K0WP95	Phosphoenolpyruvate synthase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	23,76596451	25,25554911
<i>pgk</i>	A0A0K0WJG9	Phosphoglycerate kinase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,62118816	21,89737797
<i>gmhA</i>	A0A0K0WQ42	Phosphoheptose isomerase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,60378075	22,79641914
<i>thiC</i>	A0A0K0WMY2	Phosphomethylpyrimidine synthase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,46630096	22,11933422
<i>purD</i>	A0A0K0WMF2	Phosphoribosylamine--glycine ligase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	16,41661644	21,23373413
<i>purM</i>	A0A0K0WP99	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	23,61055056	25,24339612
<i>purS</i>	A0A0K0WR18	Phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurS	Metabolism of Metabolites and	19,96271896	23,76324272

Biomolecules					
<i>ABH19_13505</i>	A0A0K0WQ70	Precorrin-6B methyltransferase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,95972919	21,34509945
<i>ABH19_02790</i>	A0A0K0WKR3	Peptidase M16	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,93952052	21,99744511
<i>ABH19_02785</i>	A0A0K0WKI9	Peptidase M16	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,99532795	20,58838463
<i>ABH19_11620</i>	A0A0K0WPL9	Peptidase U62	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,5152235	20,90675449
<i>prfC</i>	A0A0K0WJY9	Peptide chain release factor 3	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	14,15905714	23,05974579
<i>ABH19_12240</i>	A0A0K0WRG6	Peptide chain release factor N(5)-glutamine methyltransferase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,74232578	20,97063637
<i>def</i>	A0A0K0WQ71	Peptide deformylase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,19570827	21,06670189
<i>ABH19_08510</i>	A0A0K0WQW4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	20,9651591	23,91283321
<i>ABH19_06205</i>	A0A0K0WQQ6	Phytase-like domain-containing protein	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	21,49490484	23,42361895
<i>proC</i>	A0A0K0WNB6	Pyrroline-5-carboxylate reductase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	15,6697607	20,05358696
<i>nadA</i>	A0A0K0WRC8	Quinolate synthase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,32211431	19,4212656
<i>ribBA</i>	A0A0K0WQT3	Riboflavin biosynthesis protein RibBA	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	16,48759985	19,99206352
<i>ABH19_12750</i>	A0A0K0WPU7	Ribose 5-phosphate isomerase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	19,01490402	21,38777161
<i>prs</i>	A0A0K0WLH6	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,54966672	20,68389606
<i>metK</i>	A0A0K0WNA7	S-adenosylmethionine synthase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,32110214	21,05428505
<i>glyA</i>	A0A0K0WPW1	Serine hydroxymethyltransferase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,88529682	22,8678484
<i>ffh</i>	A0A0K0WN45	Signal recognition particle protein	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	16,2676328	19,76783276
<i>ABH19_05570</i>	A0A0K0WLN9	Signal transduction protein	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	22,02533595	25,50352383
<i>mtnP</i>	A0A0K0WN27	S-methyl-5-thioadenosine phosphorylase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,78603363	21,19553566
<i>rplA</i>	A0A0K0WNC0	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,66291682	22,94478512

<i>sucC</i>	A0A0K0WND1	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	19,14811802	23,40112686
<i>ABH19_09505</i>	A0A0K0WND6	Succinyl-CoA synthetase subunit alpha	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	21,10618401	24,79345608
<i>ABH19_01040</i>	A0A0K0WK10	Sulfurtransferase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	19,5663166	22,17003918
<i>ABH19_06155</i>	A0A0K0WR06	Tetratricopeptide repeat-like domain-containing protein	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,33991178	21,62487539
<i>clpB</i>	A0A0K0WJJ0	Thiazole synthase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,7688446	22,62971401
<i>ABH19_09225</i>	A0A0K0WNA0	Threonine synthase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	17,95814419	20,7780447
<i>ABH19_09605</i>	A0A0K0WNT0	Threonylcarbamoyl-AMP synthase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	15,39898539	20,48363209
<i>tmk</i>	A0A0K0WQ43	Thymidylate kinase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	15,04376316	19,80055857
<i>tal</i>	A0A0K0WLF0	Transaldolase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	16,79024553	21,73908901
<i>ABH19_09100</i>	A0A0K0WN67	Transglycosylase SLT domain-containing protein	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,39204852	19,44075871
<i>ABH19_04915</i>	A0A0K0WLS5	Transketolase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	18,33158588	22,46306896
<i>ABH19_03900</i>	A0A0K0WL02	Transketolase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	16,98412704	21,29632473
<i>infA</i>	A0A0K0WLY2	Translation initiation factor IF-1	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	20,45248667	24,41956902
<i>infC</i>	A0A0K0WJI2	Translation initiation factor IF-3	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	15,99342108	18,66561699
<i>tyrS</i>	A0A0K0WR37	Tyrosine--tRNA ligase	Metabolism of Metabolites and Biomolecules	15,5108428	23,54710197
<i>surE</i>	A0A0K0WR61	5-nucleotidase SurE	Protection and Response to Stress	19,81779099	18,70237684
<i>lysA</i>	A0A0K0WK79	Alkyl hydroperoxide reductase	Protection and Response to Stress	19,95587476	23,79303646
<i>atpF</i>	A0A0K0WRI2	Alkyl hydroperoxide reductase	Protection and Response to Stress	18,53720442	23,10275364
<i>ABH19_06255</i>	A0A0K0WM99	Cold-shock protein	Protection and Response to Stress	25,01543681	26,31120968
<i>ABH19_12130</i>	A0A0K0WPU9	Heat-shock protein Hsp20	Protection and Response to Stress	19,97899628	22,37736511
<i>ABH19_09960</i>	A0A0K0WNY2	Heat-shock protein Hsp20	Protection and Response to Stress	19,73964024	20,67066002
<i>ABH19_12190</i>	A0A0K0WPZ7	HIT family hydrolase	Protection and Response to Stress	18,72535324	19,58905172

<i>ABH19_02900</i>	A0A0K0WKW4	HscA chaperone	Protection and Response to Stress	17,96484184	21,42468548
<i>ABH19_00450</i>	A0A0K0WJQ5	Periplasmic heavy metal sensor	Protection and Response to Stress	18,08604431	23,43972111
<i>ABH19_09975</i>	A0A0K0WNL8	Periplasmic heavy metal sensor	Protection and Response to Stress	19,32726351	21,47884655
<i>ABH19_01495</i>	A0A0K0WKA3	Periplasmic heavy metal sensor	Protection and Response to Stress	19,47377459	21,09959316
<i>ABH19_09465</i>	A0A0K0WNR1	Peroxiredoxin	Protection and Response to Stress	23,58509254	27,25664902
<i>ABH19_00825</i>	A0A0K0WQJ5	Peroxiredoxin	Protection and Response to Stress	20,06432915	22,91925526
<i>ABH19_03235</i>	A0A0K0WQI2	Peroxiredoxin	Protection and Response to Stress	17,81060282	20,13483238
<i>ABH19_11705</i>	A0A0K0WPS5	Phage shock protein	Protection and Response to Stress	18,65079784	22,64244938
<i>pepA</i>	A0A0K0WNP2	Rieske iron-sulfur family protein	Protection and Response to Stress	20,17898877	23,24235058
<i>ABH19_02205</i>	A0A0K0WKA0	Rubryerythrin	Protection and Response to Stress	24,3953832	27,12486553
<i>ABH19_05555</i>	A0A0K0WLZ1	Stress-induced protein	Protection and Response to Stress	15,84094143	17,95459414
<i>ABH19_08135</i>	A0A0K0WN71	Thioredoxin	Protection and Response to Stress	22,01694107	25,63214207
<i>ABH19_01985</i>	A0A0K0WK50	Thioredoxin	Protection and Response to Stress	18,99245644	21,53258514
<i>ABH19_12975</i>	A0A0K0WPY6	Thioredoxin reductase	Protection and Response to Stress	17,81862259	21,75443935
<i>ABH19_08425</i>	A0A0K0WMY9	Thioredoxin-like fold domain-containing protein	Protection and Response to Stress	18,25226879	20,35140133
<i>grpE</i>	A0A0K0WMT4	Protein GrpE	Protection and Response to Stress	20,96904373	22,89431286
<i>argB</i>	A0A0K0WJX1	Cetylglutamate kinase	Protein Maintenance and Function	15,05160093	17,97708225
<i>rplI</i>	A0A0K0WQ08	Chaperone protein ClpB	Protein Maintenance and Function	18,45996761	22,83903122
<i>dnaJ</i>	A0A0K0WMJ5	Chaperone protein DnaJ	Protein Maintenance and Function	15,26789904	20,31587696
<i>dnaK</i>	A0A0K0WMK6	Chaperone protein DnaK	Protein Maintenance and Function	22,04046726	21,5542682
<i>groEL</i>	A0A0K0WMT7	Chaperonin GroEL	Protein Maintenance and Function	21,7384065	23,85697683
<i>ABH19_07655</i>	A0A0K0WMX7	Clp protease ClpX	Protein Maintenance and Function	14,43274721	21,21687126
<i>groES</i>	A0A0K0WMU0	Co-chaperonin GroES	Protein Maintenance and Function	26,29715856	28,49263954
<i>ABH19_06780</i>	A0A0K0WR52	Coiled coil domain-containing protein	Protein Maintenance and Function	19,61901983	21,62648964
<i>ABH19_06185</i>	A0A0K0WM05	DSBA-like thioredoxin domain-containing protein	Protein Maintenance and Function	17,86455154	21,35307503
<i>ABH19_07835</i>	A0A0K0WMR0	PEGA domain-containing protein	Protein Maintenance and Function	17,29888821	19,12007189
<i>ABH19_02075</i>	A0A0K0WKJ1	ATPase AAA	Proteolysis and Cell Maintenance	15,83063173	21,13304996
<i>clpX</i>	A0A0K0WLF3	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	Proteolysis and Cell Maintenance	16,50314093	20,60485363

<i>clpP</i>	A0A0K0WLF4	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	Proteolysis and Cell Maintenance	20,2719059	22,4032917
<i>ftsH</i>	A0A0K0WNV2	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	Proteolysis and Cell Maintenance	17,88780022	23,11394882
<i>sucD</i>	A0A0K0WMW7	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	Proteolysis and Cell Maintenance	19,08579254	22,87234211
<i>tldD</i>	A0A0K0WPR5	Protease TldD	Proteolysis and Cell Maintenance	16,78527117	19,63194799
<i>ABH19_02090</i>	A0A0K0WK62	Proteasome subunit beta	Proteolysis and Cell Maintenance	17,14778852	20,28149462
<i>ABH19_12920</i>	A0A0K0WPX9	RDD domain-containing protein	Proteolysis and Cell Maintenance	16,77650452	20,06753349
<i>ABH19_01850</i>	A0A0K0WKB9	Trypsin	Proteolysis and Cell Maintenance	18,90181605	23,25564098
<i>ABH19_09190</i>	A0A0K0WNI7	UDP-glucose 4-epimerase	Proteolysis and Cell Maintenance	16,61132288	19,32571459
<i>ABH19_02200</i>	A0A0K0WQN8	Vitamin B12-dependent ribonucleotide reductase	Proteolysis and Cell Maintenance	14,50793839	22,72486115
<i>ABH19_10870</i>	A0A0K0WNZ6	Addiction module protein	Reaction and Catalysis Enzymes	19,49277433	21,24638176
<i>ABH19_07480</i>	A0A0K0WQV0	Aldo/keto reductase	Reaction and Catalysis Enzymes	16,94254875	21,0440073
<i>ABH19_06865</i>	A0A0K0WQR4	Aldolase	Reaction and Catalysis Enzymes	17,66342545	20,86527157
<i>ABH19_13040</i>	A0A0K0WRI4	Aldolase	Reaction and Catalysis Enzymes	18,137146	21,45808697
<i>ABH19_01990</i>	A0A0K0WK47	Aminopeptidase	Reaction and Catalysis Enzymes	15,88659128	18,85950708
<i>ABH19_01345</i>	A0A0K0WQC5	Aminotransferase	Reaction and Catalysis Enzymes	19,46450901	23,06511211
<i>ABH19_13610</i>	A0A0K0WQ85	Carbon monoxide dehydrogenase	Redox Reactions	20,58826256	22,81769276
<i>ABH19_07010</i>	A0A0K0WQF1	Carbon monoxide dehydrogenase	Redox Reactions	19,182477	22,4971199
<i>ABH19_00220</i>	A0A0K0WJM5	Carbonic anhydrase	Redox Reactions	17,60956478	20,20674658
<i>ABH19_01745</i>	A0A0K0WQE4	Cytochrome	Redox Reactions	21,97090149	25,81837559
<i>ABH19_10205</i>	A0A0K0WR19	Cytochrome b/b6 c-terminal	Redox Reactions	17,96863461	20,99883556
<i>ABH19_12265</i>	A0A0K0WPL3	Cytochrome C class I	Redox Reactions	25,81876246	24,159633
<i>ABH19_11115</i>	A0A0K0WPD8	Cytochrome C class I	Redox Reactions	22,01839066	24,98003292
<i>ABH19_07065</i>	A0A0K0WMC6	Cytochrome C domain-containing protein	Redox Reactions	17,65285206	18,95964289
<i>ABH19_05870</i>	A0A0K0WP11	Cytochrome C oxidase	Redox Reactions	20,17016284	24,29907417
<i>ABH19_09790</i>	A0A0K0WNV8	Cytochrome C oxidase	Redox Reactions	18,46131516	22,16800785
<i>ABH19_10195</i>	A0A0K0WNQ3	Cytochrome C class I	Redox Reactions	19,34595108	22,16036129
<i>ABH19_10385</i>	A0A0K0WNS0	Ferredoxin	Redox Reactions	18,74202474	22,04586792
<i>ABH19_13195</i>	A0A0K0WQF6	Ferredoxin oxidoreductase	Redox Reactions	22,90863514	24,56088161

<i>ABH19_13205</i>	A0A0K0WRB3	Ferredoxin oxidoreductase	Redox Reactions	19,20906703	21,26705233
<i>ABH19_13175</i>	A0A0K0WQ19	Ferredoxin oxidoreductase	Redox Reactions	21,30008602	23,18159389
<i>ABH19_13180</i>	A0A0K0WR86	Ferredoxin oxidoreductase	Redox Reactions	20,65725613	23,41765976
<i>ABH19_13170</i>	A0A0K0WR89	Ferredoxin oxidoreductase	Redox Reactions	19,0347379	23,81328869
<i>ABH19_13200</i>	A0A0K0WQ20	Ferredoxin oxidoreductase	Redox Reactions	20,47424507	23,48363304
<i>ABH19_02890</i>	A0A0K0WKK4	FeS assembly protein IscX	Redox Reactions	20,06031704	19,97509718
<i>ABH19_10065</i>	A0A0K0WNN2	FeS cluster biogenesis domain-containing protein	Redox Reactions	21,65409946	24,85000324
<i>ABH19_12075</i>	A0A0K0WNI1	Fe-S cluster protector protein	Redox Reactions	21,77897199	23,18214607
<i>ABH19_07605</i>	A0A0K0WQU3	GTP pyrophosphokinase	Redox Reactions	18,04302533	18,38115247
<i>ABH19_03490</i>	A0A0K0WL18	Hydroxyacid dehydrogenase	Redox Reactions	19,87562847	22,82006836
<i>ABH19_10495</i>	A0A0K0WNU1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	Redox Reactions	18,378932	20,73399925
<i>ppa</i>	A0A0K0WPQ2	Inorganic pyrophosphatase	Redox Reactions	20,18450928	24,00127792
<i>guaB</i>	A0A0K0WNZ2	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase	Redox Reactions	16,59636688	21,608284
<i>ABH19_02910</i>	A0A0K0WKJ5	Iron-sulfur cluster assembly protein IscA	Redox Reactions	19,21476555	21,8187933
<i>ABH19_02915</i>	A0A0K0WKI7	Iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU	Redox Reactions	20,11625036	22,69470692
<i>ABH19_02880</i>	A0A0K0WKJ0	Iron-sulfur cluster carrier protein	Redox Reactions	20,32965088	22,65795326
<i>ABH19_07455</i>	A0A0K0WMH7	Isocitrate dehydrogenase	Redox Reactions	21,21553548	23,98507818
<i>ABH19_07450</i>	A0A0K0WMU7	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	Redox Reactions	24,19657453	28,27324772
<i>ABH19_07400</i>	A0A0K0WMR2	Oxidoreductase	Redox Reactions	16,96068764	20,09403706
<i>rpsF</i>	A0A0K0WNP5	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	Redox Reactions	18,92617893	22,58767319
<i>ABH19_05055</i>	A0A0K0WLI3	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	Redox Reactions	18,41004467	22,5906496
<i>ABH19_03115</i>	A0A0K0WKW2	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	Redox Reactions	15,66751146	18,23924446
<i>ABH19_01855</i>	A0A0K0WQE3	Two-component response regulator	Regulation and Cellular Signalling	17,58344889	21,41725826
<i>ABH19_02825</i>	A0A0K0WKV3	Response regulatory domain-containing protein	Regulation and Cellular Signalling	17,99083614	18,14061117
<i>ABH19_08210</i>	A0A0K0WQV3	30S ribosomal protein S1	Ribosomal Protein	20,35676479	20,94929441
<i>rplL</i>	A0A0K0WLH7	Large ribosomal subunit protein bL12	Ribosomal Protein	23,15159289	26,06575108
<i>rplQ</i>	A0A0K0WLJ8	Large ribosomal subunit protein bL17	Ribosomal Protein	20,61606026	22,6970911
<i>atpC</i>	A0A0K0WN42	Large ribosomal subunit protein bL19	Ribosomal Protein	19,31291866	22,2443285



<i>rplU</i>	A0A0K0WJJ3	Large ribosomal subunit protein bL21	Ribosomal Protein	21,41125234	24,06173897
<i>rplY</i>	A0A0K0WLQ8	Large ribosomal subunit protein bL25	Ribosomal Protein	20,66799545	23,26644897
<i>rpmA</i>	A0A0K0WJI1	Large ribosomal subunit protein bL27	Ribosomal Protein	22,38678106	22,89715767
<i>rpmE</i>	A0A0K0WPM5	Large ribosomal subunit protein bL31	Ribosomal Protein	18,78102112	21,79188442
<i>ABH19_08925</i>	A0A0K0WQF5	Large ribosomal subunit protein bL9	Ribosomal Protein	19,07991505	23,07782173
<i>ABH19_10215</i>	A0A0K0WLS2	Large ribosomal subunit protein uL1	Ribosomal Protein	20,35042477	23,04395103
<i>rplJ</i>	A0A0K0WLV7	Large ribosomal subunit protein uL10	Ribosomal Protein	19,88508415	22,62117481
<i>rplK</i>	A0A0K0WLI7	Large ribosomal subunit protein uL11	Ribosomal Protein	19,96574275	23,13415813
<i>rplN</i>	A0A0K0WLI8	Large ribosomal subunit protein uL14	Ribosomal Protein	21,07719294	22,49197292
<i>rplO</i>	A0A0K0WLJ3	Large ribosomal subunit protein uL15	Ribosomal Protein	19,37339338	23,31188202
<i>rplP</i>	A0A0K0WLT7	Large ribosomal subunit protein uL16	Ribosomal Protein	21,27722836	23,12470627
<i>rplR</i>	A0A0K0WLX7	Large ribosomal subunit protein uL18	Ribosomal Protein	19,75448513	19,40553617
<i>rplV</i>	A0A0K0WLI4	Large ribosomal subunit protein uL22	Ribosomal Protein	21,35598691	22,70486355
<i>ABH19_11260</i>	A0A0K0WLT2	Large ribosomal subunit protein uL23	Ribosomal Protein	20,42610359	23,07024956
<i>rpmC</i>	A0A0K0WLX2	Large ribosomal subunit protein uL29	Ribosomal Protein	22,65764999	24,26007843
<i>rplC</i>	A0A0K0WQX6	Large ribosomal subunit protein uL3	Ribosomal Protein	19,67576345	22,59264183
<i>rplD</i>	A0A0K0WLJ6	Large ribosomal subunit protein uL4	Ribosomal Protein	19,10780144	22,43179321
<i>rplE</i>	A0A0K0WR12	Large ribosomal subunit protein uL5	Ribosomal Protein	20,34818077	22,67844105
<i>rplF</i>	A0A0K0WLU1	Large ribosomal subunit protein uL6	Ribosomal Protein	19,26806895	22,18067074
<i>rpsP</i>	A0A0K0WMW0	Small ribosomal subunit protein bS16	Ribosomal Protein	23,03048134	23,28477669
<i>rpsR</i>	A0A0K0WLH9	Small ribosomal subunit protein bS18	Ribosomal Protein	20,55308342	22,19740105
<i>rpsT</i>	A0A0K0WKG1	Small ribosomal subunit protein bS20	Ribosomal Protein	20,4789362	21,04655838
<i>eno</i>	A0A0K0WLG1	Small ribosomal subunit protein bS6	Ribosomal Protein	19,81557941	22,96204472
<i>rpsJ</i>	A0A0K0WLI1	Small ribosomal subunit protein uS10	Ribosomal Protein	22,73001353	25,24895573
<i>rpsK</i>	A0A0K0WQP5	Small ribosomal subunit protein uS11	Ribosomal Protein	18,96103605	21,26232815
<i>rpsL</i>	A0A0K0WLS7	Small ribosomal subunit protein uS12	Ribosomal Protein	20,40629005	21,27730274
<i>rpsM</i>	A0A0K0WLJ9	Small ribosomal subunit protein uS13	Ribosomal Protein	19,91822688	22,47747707
<i>dapF</i>	A0A0K0WMW9	Small ribosomal subunit protein uS15	Ribosomal Protein	21,25798353	22,97212315

<i>rpsQ</i>	A0A0K0WLJ0	Small ribosomal subunit protein uS17	Ribosomal Protein	20,03245481	22,8871603
<i>rpsS</i>	A0A0K0WLI5	Small ribosomal subunit protein uS19	Ribosomal Protein	19,24273014	22,80293655
<i>rpsB</i>	A0A0K0WPW3	Small ribosomal subunit protein uS2	Ribosomal Protein	19,44345093	22,8446188
<i>rpsC</i>	A0A0K0WLK1	Small ribosomal subunit protein uS3	Ribosomal Protein	18,60125923	21,54210758
<i>rpsE</i>	A0A0K0WQN0	Small ribosomal subunit protein uS5	Ribosomal Protein	20,25735664	22,60975075
<i>rpsG</i>	A0A0K0WLW2	Small ribosomal subunit protein uS7	Ribosomal Protein	19,70596759	20,74761772
<i>rpsH</i>	A0A0K0WLK6	Small ribosomal subunit protein uS8	Ribosomal Protein	19,43475151	21,83161736
<i>rpsI</i>	A0A0K0WQA2	Small ribosomal subunit protein uS9	Ribosomal Protein	22,54159355	24,07548141
<i>rph</i>	A0A0K0WR59	Ribonuclease PH	Ribosomal Protein	17,28055716	19,27840678
<i>hpf</i>	A0A0K0WN07	Ribosome hibernation promoting factor	Ribosomal Protein	20,44782829	23,28777122
<i>frr</i>	A0A0K0WQ97	Ribosome-recycling factor	Ribosomal Protein	19,29471525	22,28952026
<i>ABH19_13575</i>	A0A0K0WQ80	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase large subunit	Ribosomal Protein	17,45867395	21,55682373
<i>rpe</i>	A0A0K0WPZ1	Ribulose-phosphate 3-epimerase	Ribosomal Protein	17,29197025	18,36058474
<i>ABH19_04940</i>	A0A0K0WLT0	Trigger factor ribosome-binding bacterial domain-containing protein	Ribosomal Protein	17,29017496	22,38033962