

Abschlussbericht zum Forschungsstipendium

„Präparation und Trennung von Membranfraktionen in Vorbereitung auf die Charakterisierung von Redoxproteinen im eisenoxidierenden Bakterium „*Ferrovum*“ sp. PN-J47“

Bearbeitungszeitraum: 01.07.2018 bis 30.06.2019

*Dr. Sophie Ullrich, Institut für Biowissenschaften, TU Bergakademie Freiberg,
Freiberg*

1 Hintergrund des Projektes

1.1 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Innerhalb der *Bacteria* und *Archaea* stellt die Eisenoxidation einen verbreiteten Mechanismus dar, um Eisen(II)-Ionen als Elektronendonator für zelluläre Prozesse zu nutzen [1,2]. Eine besondere biotechnologische Bedeutung haben acidophile (säureliebende) Eisenoxidierer. Die Aktivität acidophiler Eisenoxidierer erlaubt die Gewinnung verschiedener Wertmetalle wie Kupfer, Kobalt und Nickel mittels Biolaugung [3] sowie von Gold und Silber mittels Biooxidation im Industriemaßstab [4]. Daneben spielen acidophile Eisenoxidierer in der bergbaulichen Wasserwirtschaft als Verursacher von sauren Grubenwässern eine zentrale Rolle. Sie können jedoch auch Bestandteil biologischer Wiederaufbereitungsstrategien dieser Wässer sein [5].

Vertreter der weltweit an Bergbaustandorten verbreiteten Bakteriengattung „*Ferrovum*“ wurden in verschiedenen vorherigen Studien auf Genom- und Transkriptomebene beschrieben [6-8]. Auf Grundlage der Genom- und Transkriptomanalysen wurde ein Modell zur Eisenoxidation vorhergesagt, das sowohl Proteine in der äußeren und inneren Membran als auch im periplasmatischen Raum einschließt (Abb. 1). Dieser Stoffwechselprozess dient Eisenoxidierern zur Energiegewinnung und stellt die Grundlage ihrer biotechnologischen Bedeutung dar. Die Redoxproteine, die bei diesem Prozess eine Rolle spielen, scheinen innerhalb der verschiedenen Gattungen von Eisenoxidierern sehr divers zu sein. Studien zur experimentellen Charakterisierung der Redoxproteine der Eisenoxidation beschränken sich allerdings fast ausschließlich auf den acidophilen Modellorganismus *Acidithiobacillus ferrooxidans* [9–12].

Das Forschungsstipendium sollte zur Ausarbeitung einer experimentellen Strategie dienen, mit der Redoxproteine von „*Ferrovum*“ sp. PN-J47 u.a. aus den Membransystemen präpariert werden können, ohne ihre natürliche Proteinfaltung, die essentiell für ihre biochemische Funktion ist, zu zerstören. Diese Strategien sollten als methodische Vorarbeit für ein geplantes DFG-gefördertes Projekt dienen, in dem diese Redoxproteine näher charakterisiert werden sollen und mit denen anderer Eisenoxidierer verglichen werden sollen.

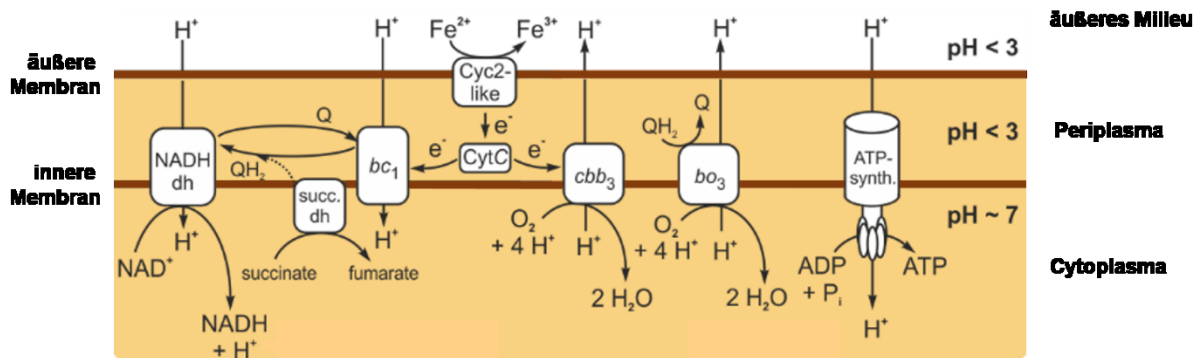


Abb. 1: Modell der Eisenoxidation in „*Ferroplasma*“ spp. Verändert nach [16]

1.2 Im Antrag vorgeschlagener Arbeitsplan

In Vorbereitung auf die spätere Charakterisierung der Redoxproteine, die an der Eisenoxidation in „*Ferroplasma*“ spp. beteiligt sind, soll eine Strategie entwickelt werden, um Proteine der äußeren und inneren Membran sowie des periplasmatischen Raumes getrennt von cytoplasmatischen Proteinen zu isolieren, ohne dabei ihre natürliche Proteinfaltung zu beeinträchtigen. Im Rahmen des Forschungsstipendiums sollten dazu folgende Arbeitsschwerpunkte bearbeitet werden:

- „*Ferroplasma*“ sp. PN-J47 sollte wiederholt im 3,5l-Batch-Ansatz kultiviert, um Biomasse für die Präparation der Redoxproteine zu gewinnen.
- Zur Präparation der Redoxproteine der äußeren sowie der inneren Membran und des periplasmatischen Raumes sollten verschiedene Zellaufschlussverfahren auf ihre Eignung für Zellen von „*Ferroplasma*“ sp. PN-J47 geprüft. Membranbestandteile sollten anschließend durch Zentrifugation von löslichen Zellbestandteilen getrennt.
- Um die so gewonnenen Membranbestandteile zu solubilisieren, d.h. wieder in Lösung zu bringen, sollten verschiedene Detergenzien auf ihre Eignung geprüft werden.
- Die verschiedenen Proteine und Proteinkomplexe der solubilisierten Membranfraktionen sollten über Dichtegradientenzentrifugation in verschiedenen Fraktionen angereichert werden.
- Zur Überprüfung des Präparations- und Reinigungserfolgs sollte die native Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese verwendet werden. Anhand von spezifischen Färbungen im Polyacrylamid-Gel wird der Erhalt der Enzymaktivität beispielhaft an Häm-haltigen Proteinen (Cytochrome) nach der Präparation, Reinigung und Trennung untersucht.

2 Ergebnisse

Während der Abarbeitung der vorgeschlagenen Arbeitspakete wurden Anpassungen am experimentellen Plan auf Grundlage von Vorversuchen vorgenommen.

Insbesondere die Kultivierung von „*Ferrovum*“ sp. PN-J47 zur Gewinnung ausreichender Mengen an Biomasse stellte eine experimentelle Herausforderung dar. Selbst im 3,5 l-Maßstab war die gewonnene Menge an Biomasse zu gering zur Gewinnung von Redoxproteinen der Eisenoxidation. Zusätzlich erschwerten Eisen(iii)-Hydroxid-Präzipitate, die sich durch die Oxidation der Eisen(ii)-Ionen um die Zellen herum bilden, die geplante Aufarbeitungsstrategie der Redoxproteine. Aus diesem Grund wurden alle geplanten Versuche mit einem anderen acidophilen Modellorganismus „*Acidiphilium*“ sp. JA12-A1 durchgeführt. Dieser Organismus stammt aus demselben Bergbaustandort wie „*Ferrovum*“ sp. PN-J47. Als heterotropher Organismus bildet „*Acidiphilium*“ sp. JA12-A1 jedoch deutlich dichtere Zellkulturen im Labormaßstab, sodass mehr Biomasse gewonnen werden kann. Obwohl „*Acidiphilium*“ sp. JA12-A1 nicht zu den Eisenoxidierern zählt, besitzt auch er Redoxproteine, die an der Energiegewinnung beteiligt sind. Daher sollte sich eine experimentelle Strategie zur Anreicherung von Redoxproteinen aus „*Acidiphilium*“ sp. JA12-A1 später auch wieder für Eisenoxidierer wie „*Ferrovum*“ sp. PN-J47 anpassen lassen.

2.1 Vorversuche zur Proteinanalytik und Membransolubilisierung

2.1.1 Analytik der Proteinfractionen

Die **Bestimmung des Proteingehaltes** stellt die wichtigste Grundlage für die Einschätzung des Anreicherungs Erfolges für Proteine sowie für weitere analytische Verfahren dar. Der BCA-Assay zeichnet sich durch seine Robustheit gegenüber Detergenzien aus, die häufig beim Zellaufschluss verwendet werden und seine große dynamische Reichweite. Auch für die aktuelle Forschungsarbeit erwies sich der BCA-Assay (Pierce BCA Protein Assay Kit) als geeignet, um zügig und akkurat sowohl Gehalte von löslichen Proteinen als auch von solubilisierten Membranproteinen und Proteinen in den Fraktionen der Saccharose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation zu bestimmen.

Ein Verfahren zur Identifizierung von Häm-Gruppen in Membranproteinen der Eisenoxidation ist die Aufnahme von **Absorptionsspektren**. Sofern die Häm-Gruppen nach der Anreicherungsprozedur intakt bleiben, zeichnen sie sich durch Absorptionsmaxima bei spezifischen Wellenlängen im UV/VIS-Bereich aus. Mithilfe eines Mikrotiter-Platten-Lesegerätes wurden die Spektren von multiplen Proben parallel bestimmt. Der verwendete Puffer, Solubilisierungsreagenzien und Saccharose in den Membranfraktionen nach Dichte-Gradienten-Zentrifugation beeinflussten dabei die Aufnahme der Spektren nicht. Die Aufnahme der Absorptionsspektren von allen Fraktionen vor der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese bildete zudem eine Kontrolle für die spätere Häm-Aktivitätsfärbung im Polyacrylamid-Gel nach der Elektrophorese.

Proteine und Proteinkomplexe können in Proteingemischen auch anhand ihrer ungefähren

Größe identifiziert werden. Zur Abschätzung der Größe von Proteinen und Proteinkomplexen in den verschiedenen Fraktionen wurde ein natives **Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese-System** entwickelt. Dafür wurde ein 4 bis 12 %iges Polyacrylamid-Gel (Novex Tris-Glycin Mini-Gel, Invitrogen) mit nativen Laufpuffern (Tris-Glycin Native Running Buffer, Invitrogen), denen die Solubilisierungsreagenzien Dodecylmaltosid (DDM) und Desoxycholat (DOC) zugesetzt wurden, kombiniert. Der native Laufpuffer sollte dabei möglichst geringen Einfluss auf die natürliche Raumstruktur der zu trennenden Proteine haben, sodass ihre natürliche katalytische Aktivität erhalten bleibt. Dies stellt eine Grundlage für die Häm-Aktivitätsfärbung (TMB-1-Step-Blotting Solution, ThermoFisher) dar. Der Zusatz von DDM und DOC sollte die Trennung von Membranproteinen während der Elektrophorese verbessern. Durch ihren hydrophoberen Charakter lassen sie sich meist schlechter gelelektrophoretisch trennen als lösliche Proteine. Das verwendete Gel-Elektrophorese-System erlaubte eine sehr saubere Trennung der Proteine sowohl in löslichen als auch in Membranfraktionen über einen sehr großen Größenbereich von unter 20 kDa bis 1500 kDa. Nach der Trennung wurden die Proteine mit Coomassie (SimplyBlue Safe Stain, Thermo Fisher) bzw. mithilfe einer Silberfärbung sichtbar gemacht. Für die Coomassie-Färbung waren Proteinmengen von etwa 30 µg je Bahn ausreichend. Für die Silberfärbung genügte bereits 1 µg je Bahn. Beide Färbemethoden waren für den Umfang der durchgeführten Versuche ausreichend sensitiv für den Proteinnachweis nach der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.

2.1.2 *Solubilisierung von Membranproteinen*

Für die Solubilisierung der angereicherten Membranproteine wurden zwei verschiedenen Verfahren mit einander verglichen.

Für das erste Verfahren wurden pelletierte Membranproteine mit 0,1 % DDM im Solubilisierungspuffer zunächst in Lösung gebracht und anschließend in einem Saccharose-Dichte-Gradienten per Ultrazentrifugation fraktioniert. Dabei erwies sich der Zusatz von 0,1 % DDM zum Saccharose-Dichte-Gradienten als zentral für den Solubilisierungserfolg. Die so erhaltenen Membranproteinfractionen wurden anschließend gelelektrophoretisch getrennt.

Für das zweite Verfahren wurden pelletierte Membranproteine mit 5 % Digitonin im Solubilisierungspuffer in Lösung gebracht. Durch die hohen finanziellen Kosten für das Solubilisierungsreagenz Digitonin musste auf Saccharose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation verzichtet werden, sodass die solubilisierten Proteine direkt gelelektrophoretisch getrennt wurden.

Das DDM-basierte Solubilisierungsverfahren mit anschließender Saccharose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation erwies sich als arbeitsintensiver, jedoch war die Auflösung der Trennung in der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese sehr hoch (Abb. 2A). Im Gegensatz dazu war die Auflösung der Proteintrennung nach Solubilisierung mit Digitonin sehr viel geringer (Abb. 2B).

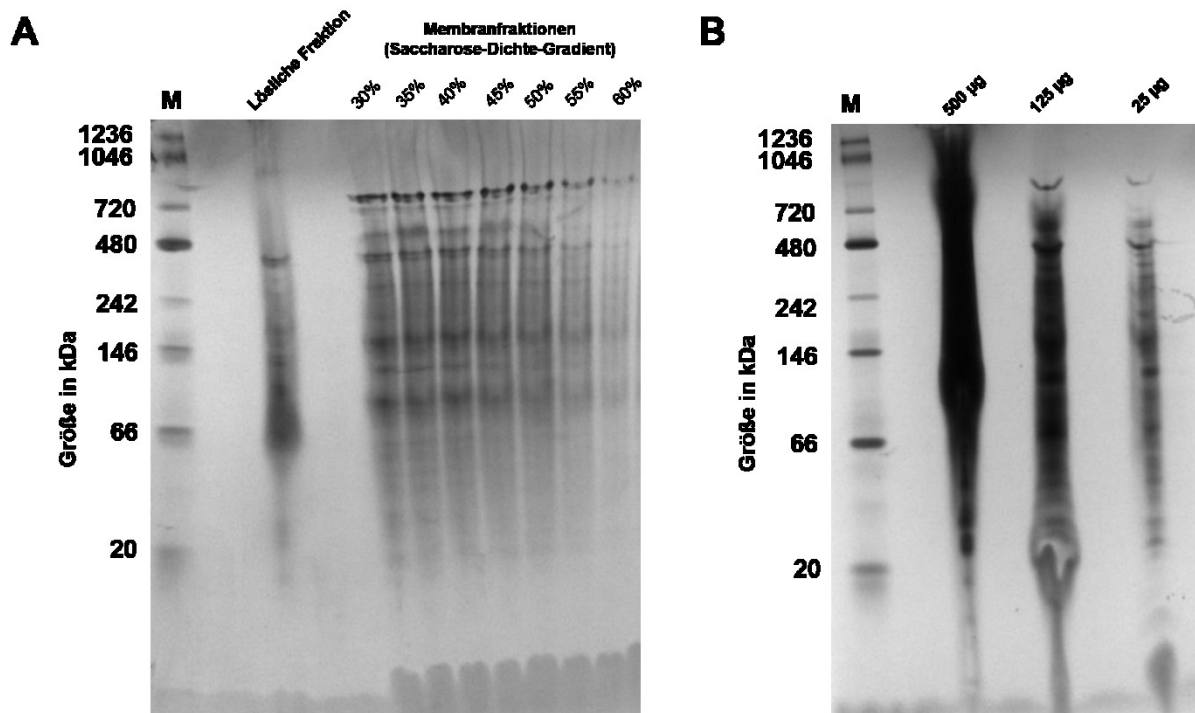


Abb. 2: Vergleich der Solubilisierungsdetergenzien Dodecylmaltosid (A) und Digitonin (B). Dargestellt sind Polyacrylamid-Gele nach Elektrophorese und Färbung mit Coomassie **A:** Je Fraktion wurden 30 µg Gesamtprotein für gelelektrophoretische Trennung aufgetragen. Nach Solubilisierung der Membranproteine mit Dodecylmaltosid (DDM) wurden diese mittels Saccharose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation fraktioniert. **B:** Nach Solubilisierung mit Digitonin wurden verschiedene Proteinmengen vergleichend gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.2 Vergleich verschiedener Zellaufschlussmethoden

Nach der Entwicklung einer entsprechenden Analytik zur Beurteilung des Anreicherungserfolges und des nativen Faltungszustandes von Membranproteinen, sollte eine geeignete Zellaufschlussmethode gefunden werden, um Membranproteine effizient und intakt anzureichern. Die Vorversuche zeigten die bessere Eignung von DDM als Detergenz zur Solubilisierung der pelletierten Membranproteine gegenüber Digitonin, sodass im Folgenden nur die Ergebnisse für die Solubilisierung mit DDM und anschließender Fraktionierung mittels Saccharose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation gezeigt werden.

Im Rahmen des vorliegenden Forschungsprojektes wurden gefrorene Zellen von *Acidiphilium* sp. JA12-A1 mithilfe einer Ultraschallsonde, einer Schwingmühle bzw. mittels French Press aufgeschlossen. Daneben wurden die Methode der Spheroblastenformation auf frisch geerntete Zellen angewendet. Eine Gegenüberstellung des Anreicherungserfolges aller Methoden ist in Abb. 3 dargestellt.

2.2.1 *Aufschluss gefrorener Zellen mittels Ultraschallsonde*

Sowohl die Fraktion der löslichen Proteine als auch die Membranfraktionen (30 % Saccharose bis 60 % Saccharose) wiesen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 420 nm auf. In der löslichen Fraktion war zudem ein weiteres Absorptionsmaximum bei 540 nm zu sehen. Beide Maxima sind typisch für Häm-Gruppen des b-Typs und deuten dabei auf das Vorhandensein von Redoxproteinen wie des bc₁-Komplexes der Atmungskette (Abb. 1) hin.

Die lösliche Fraktion und die Membranfraktionen unterschieden sich deutlich hinsichtlich des Musters der Proteinbanden nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Abb. 3A). Während in der Bahn der löslichen Fraktion keine deutlichen Banden zu erkennen waren, wiesen die Membranfraktionen eine Vielfalt an Proteinbanden auf mit einer maximalen Größe von bis zu 800 kDa. Die Abwesenheit von Proteinen in der löslichen Fraktion deutet auf einen ineffizienten Zellaufschluss hin. Nach Häm-Färbung waren keine Banden im Polyacrylamid-Gel zu sehen, was darauf hindeutete, dass die Häm-haltigen Redoxproteine möglicherweise ihren Häm-Cofaktor während der gelelektrophoretischen Trennung verloren hatten.

2.2.2 *Aufschluss gefrorener Zellen mittels Schwingmühle*

Die Analyse der löslichen Proteinfraction und der Membranfraktionen nach Aufschluss mithilfe der Schwingmühle ergab analoge Ergebnisse zum Aufschluss mittels Ultraschallsonde. In allen Fraktionen war das Häm-b-typische Absorptionsmaximum bei 420 nm zu sehen, während nur in der löslichen Fraktion auch ein zweites Absorptionsmaximum bei 540 nm zu sehen war. Die Gelelektrophorese deutete wiederum auf einen ineffizienten Zellaufschluss hin (Abb. 3B). Die Häm-Färbung zeigte auch bei dieser Zellaufschlussmethode keine Häm-Aktivität mehr nach gelelektrophoretischer Trennung an.

2.2.3 *Aufschluss gefrorener Zellen mittels French Press*

Nach Zellaufschluss mittels French Press wiesen sowohl die lösliche Proteinfraction als auch die Membranfraktionen von 30 % bis 40 % Saccharose beide Häm-b-typischen Absorptionsmaxima bei 420 nm und 540 nm auf, während die anderen Membranfraktionen nur das Absorptionsmaximum bei 420 nm aufwies.

Sowohl in der löslichen Fraktion als auch in den Membranfraktionen waren vielfältige Bandenmuster zu erkennen (Abb. 3C). Während in der löslichen Fraktion die maximale Größe der Proteine bzw. Proteinkomplexe ca. 450 kDa betrug, beinhalteten die Membranfraktionen Proteinkomplexe bis 800 kDa. Die Häm-Färbung zeigte wiederum keine Häm-Aktivität mehr nach gelelektrophoretischer Trennung an.

2.2.4 *Spheroblastenformation frisch geernteter Zellen*

Ziel der Spheroblastenformation war die unabhängige Anreicherung der Proteine der äußeren und inneren Membran sowie der löslichen Proteine des Periplasmas und des Cytoplasmas.

Die cytoplasmatische Fraktion und die 30 %-Saccharose-Fraktion der inneren Membran wiesen beide Häm-b-typischen Absorptionsmaxima auf, während das Absorptionsspektrum des Periplasmas keine definierten Maxima aufwies. Von den Spektren der äußeren Membran-

Fraktionen wies nur das Spektrum der 30 %-Saccharose-Fraktion das Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 420 nm auf.

Die Bandenmuster äußeren Membranfraktionen (Abb. 3E) zeigten nach gelelektrophoretischer Trennung eine geringere Bandenvielfalt als die Fraktionen der inneren Membran (Abb. 3D). Die maximale Größe der vorhandenen Proteine waren in den Fraktionen beider Membransysteme mit ca. 800 kDa vergleichbar. Während in der periplasmatischen Fraktion keine definierten Proteinbanden auftraten (Abb. 3E), zeigte die cytoplasmatische Fraktion ein ausgeprägtes Bandenmuster (Abb. 3D). Die maximale Proteingröße war jedoch mit ca. 600 kDa kleiner als in den Fraktionen der beiden Membransysteme.

Obwohl die Häm-Färbung auch nach dieser Methode des Zellaufschluss keine Aktivität anzeigte, deuten die Ergebnisse auf recht erfolgreiche getrennte Anreicherung von Proteinen der beiden Membransysteme hin. Die Anreicherung von periplasmatischen Proteinen bedarf jedoch weiterer Optimierung, da auch in dieser Fraktion Proteine zu erwarten sind, die in Eisenoxidierern an der Eisenoxidation beteiligt sind.

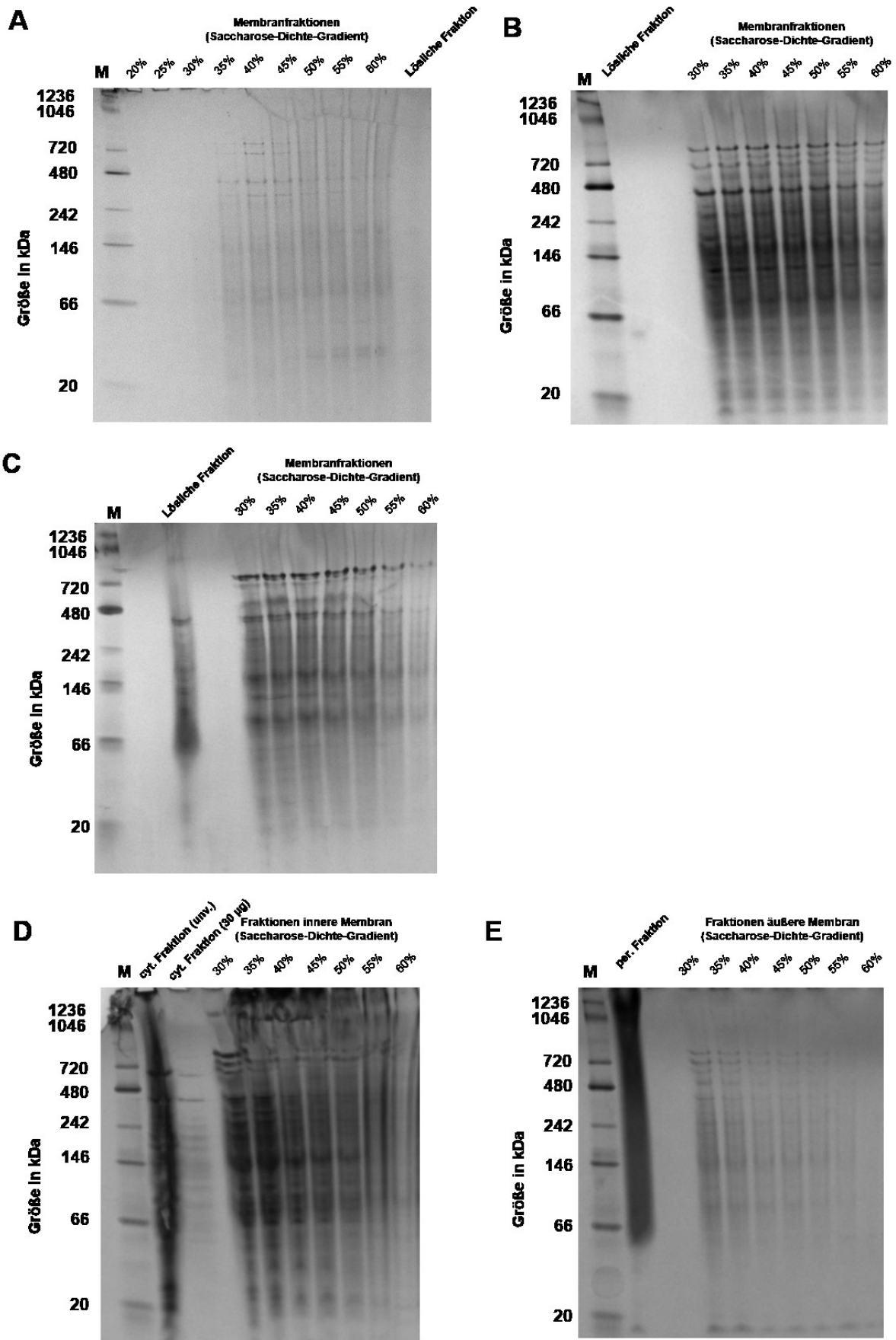


Abb. 3: Vergleich der Zellaufschlussmethoden. Polyacrylamid-Gele nach elektrophoretischer Trennung und Coomassie-Färbung. **A:** Ultraschall, **B:** Schwingmühle, **C:** French Press, **D/E:** Spheroblastenformation

3 Fazit

Im Rahmen des bearbeiteten Projektes erwies sich der Zellaufschluss mittels French Press am geeignetsten, um Zellen effizient aufzuschließen und aus diesen Extrakten Membranproteine und lösliche Proteine anzureichern. Für die Solubilisierung der Proteine in pelletierten Membranen nach Ultrazentrifugation erwies sich das Detergenz Dodecylmaltosid als vielversprechend. Kombiniert mit einer anschließenden Fraktionierung der solubilisierten Membranen in einer Saccharose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation waren die Proteine sehr gut mithilfe einer nativen Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese trennbar und darstellbar.

Obwohl die Aufnahme von Absorptionsspektren das Vorhandensein von Häm-b in den Proteinfractionen zeigte, war es im Rahmen des Projektes noch nicht möglich diese auch in ihrer aktiven Form anzureichern. Die Anreicherung dieser Häm-haltigen Proteine und anderer Redoxproteine stellt jedoch die Voraussetzung für ihre Charakterisierung dar.

Für aufbauende Arbeiten bedarf es daher zum einen weiterer Optimierung hinsichtlich der Aufrechterhaltung der aktiven Form dieser Proteine. Zum anderen sollte eine alternative Strategie erarbeitet werden, die möglichst unabhängig von der Gewinnung dieser Proteine aus ihrem Ursprungsorganismus ist, denn die vorliegende Forschungsarbeit zeigte, dass für den Aufschluss mithilfe der French Press eine große Menge Biomasse notwendig ist, die von Eisenoxidierern wie „*Ferrovum*“ sp. PN-J47 nur in sehr großen Kulturmaßstab zu gewinnen ist.

4 Verwertungsstrategie der Ergebnisse

Während der Bearbeitungszeit des Forschungsstipendiums wurde ein inhaltlich aufbauendes dreijähriges DFG-gefördertes Forschungsprojekt beantragt. Aufgrund von Mutterschutzfristen und Elternzeit wird dieses Projekt im Frühjahr 2020 beginnen. In dieses Projekt können nun **kurzfristig** die Ergebnisse aus dem Forschungsstipendium einfließen, insbesondere hinsichtlich Analytik (Elektrophoresesystem und Färbetechniken), Zellaufschlussmethode, Solubilisierung von Membranfraktionen. Daneben ist für das DFG-Projekt ein Plan für eine alternative Strategie zur Anreicherung von Membranproteinen der Eisenoxidation aus ihrem Ursprungsorganismus „*Ferrovum*“ spp. entwickelt worden. Die heterologe Produktion von Proteinkandidaten der Eisenoxidation in einem gut kultivierbaren Wirtsbakterium stellt eine vielversprechende Alternative dar, um ausreichende Mengen von Proteinen für ihre bio- und elektrochemische Charakterisierung zu gewinnen.

Mittelfristig sollen so erzielte Ergebnisse in geeigneten Fachzeitschriften publiziert und auf Fachtagungen vorgestellt und diskutiert werden.

Längerfristig sollen die erarbeiteten Protokolle auch auf andere Eisenoxidierer aus der Stammsammlung der AG Umweltmikrobiologie angewendet werden, um so den Pool von potentiell biotechnologisch-relevanten Proteinen zu erweitern.

5 Nutzen für die Chemische Technik, Verfahrenstechnik und Biotechnologie

Eine erfolgreiche Präparations- und Reinigungsstrategie von periplasmatischen Proteinen und Proteinen, die mit der äußeren Membran assoziiert sind, eröffnet den Zugang zu einem Pool potentiell biotechnologisch interessanter Enzyme und Redoxproteine. Im Unterschied zu cytoplasmatischen Proteinen sind Proteine des periplasmatischen Raumes und der äußeren Membran in acidophilen Organismen Bedingungen ausgesetzt, die dem äußeren, sauren Milieu entsprechen. Auf Proteinsequenzebene zeigen viele dieser Proteine Veränderungen gegenüber homologen Proteinen aus Organismen, die in einem neutralen Milieu leben. Die Anpassungen dieser Proteine an pH-Werte von 3 und niedriger könnten auch mit einer erhöhten Stabilität einhergehen, die für biotechnologische Anwendungen relevant sein kann.

Darüber hinaus kann der Vergleich der bio- und elektrochemischen Eigenschaften von Redoxproteinen von acidophilen Eisenoxidierern möglicherweise Hinweise darauf geben, warum diese Organismen so unterschiedliche Anwendungspotentiale für die Biolaugung aufweisen.

6 Literatur

1. Bird LJ, Bonnefoy V, Newman DK (2011) Bioenergetic challenges of microbial iron metabolisms. *Trends Microbiol* 19 (7): 330–340.
2. Ilbert M, Bonnefoy V (2013) Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. *Biochim Biophys Acta* 1827 (2): 161–175.
3. Vera M, Schippers A, Sand W (2013) Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation-part A. *Appl Microbiol Biotechnol* 19 (7): 7529–7541.
4. Brierley CL, Brierley JA (2013) Progress in bioleaching: part B: applications of microbial processes by the minerals industries. *Appl Microbiol Biotechnol* 97 (17): 7543–7552.
5. Johnson DB (2013) Development and application of biotechnologies in the metal mining industry. *Environ Sci Pollut Res Int* 20 (11): 7768–7776.
6. Ullrich SR, Poehlein A, Tischler JS, González C, Ossandon FJ et al. (2016) Genome analysis of the biotechnologically relevant acidophilic iron oxidising strain JA12 indicates phylogenetic and metabolic diversity within the novel genus “*Ferrovum*”. *PLoS ONE* 11 (1): e0146832.
7. Ullrich SR, González C, Poehlein A, Tischler JS, Daniel R et al. (2016) Gene loss and horizontal gene transfer contributed to the genome evolution of the extreme acidophile “*Ferrovum*”. *Front Microbiol* 7 (390): e78237.
8. Ullrich SR (2016) Genomic and transcriptomic characterization of novel iron oxidizing bacteria of the genus “*Ferrovum*”. Dissertation. TU Bergakademie Freiberg: <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bsz:105-qucosa-205981>
9. Cavazza C, Giudici-Ortoni MT, Nitschke W, Appia C, Bonnefoy V et al. (1996) Characterisation of a soluble cytochrome c_4 isolated from *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEBS* 242 (2): 308–314.
10. Elbehti A, Lemesle-Meunier D (1996) Identification of membrane-bound c-type cytochromes in an acidophilic ferrous ion oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol Lett* 136 (1): 51–56.
11. Malarte G, Leroy G, Lojou E, Abergel C, Bruschi M et al. (2005) Insight into molecular stability and physiological properties of the diheme cytochrome CYC_{41} from the acidophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biochemistry* 44 (17): 6471–6481.
12. Castelle C, Guiral M, Malarte G, Ledgham F, Leroy G et al. (2008) A new iron-oxidizing/ O_2 -reducing supercomplex spanning both inner and outer membranes, isolated from the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J Biol Chem* 283 (38): 25803–25811.