

Análisis *In Silico* de la molécula OmcZ presente en los Nanocables Proteicos Conductores de Electricidad en *Geobacter sulfurreducens*

In Silico Analysis of the OmcZ molecule present in Electrically Conducting Protein Nanowires in Geobacter sulfurreducens

Laura Andrea Acero Páez*, **Duverney Gaviria Arias****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n1.112409

RESUMEN

Geobacter sulfurreducens es una bacteria anaerobia y mesófila que utiliza ácidos grasos, alcoholes y compuestos monoaromáticos como sustratos oxidativos, y óxidos de hierro como aceptor de electrones. Se ha demostrado que esta bacteria es eficiente en la generación de electricidad y desempeña un papel importante en el ciclo del carbono y la biorremediación. Se descubrió que este microorganismo produce y transfiere electrones a través de nanocables proteínicos altamente conductores llamados pili; estos pili actúan como conductores metálicos, permitiendo que los microorganismos intercambien electrones con el medio extracelular.

El artículo se centra en el análisis del gen y producto génico de una proteína llamada OmcZ, que desempeña un papel crucial en la transferencia de electrones entre *G. sulfurreducens* a los electrodos.

En este estudio, se llevaron a cabo varios pasos para investigar las secuencias de la proteína OmcZ en el género *Geobacter*. Primero, se realizó una búsqueda en UniProt para obtener la secuencia del OmcZ de *G. sulfurreducens*. Luego, se efectuaron alineamientos de secuencias con el programa BLASTp para identificar microorganismos ortólogos en el NCBI. Se obtuvieron secuencias de 14 especies de *Geobacter*, las cuales se alinearon múltiples con el software MEGA11. Se construyó un árbol filogenético utilizando MEGA11 y se realizó una prueba de reloj molecular de Tajima. Además, se llevaron a cabo alineamientos y caracterizaciones de la secuencia OmcZ en *G. sulfurreducens*, incluyendo el análisis de su genoma y la caracterización fisicoquímica de la proteína. Se usó el software RasMol para realizar predicciones y modelamientos de la proteína.

El estudio se centró en el alineamiento de las secuencias de la proteína OmcZ en diferentes especies de *Geobacter* spp, ya que descubrió que los filamentos conductores de electricidad están compuestos principalmente por OmcZ. Se encontró un nivel bajo de mutaciones y algunas delecciones en las secuencias analizadas. Se identificaron posibles dominios conservados y se encontraron aminoácidos altamente conservados en la mayoría de las secuencias. El análisis filogenético reveló dos clados principales y mostró la relación entre las especies de *Geobacter*. El reloj molecular indicó que la secuencia de la proteína OmcZ no se comporta estrictamente como un reloj molecular. Se caracterizó el genoma de *G. sulfurreducens* y se identificó la región específica que codifica la proteína OmcZ. Se realizó una caracterización fisicoquímica de la proteína y se encontró que era estable y contenía grupos hemo. En general, este estudio pro-

* Microbióloga. Universidad Libre de Colombia. Calle 134 # 59A – 81, Bogotá, Colombia. lauritaandreaaceropaez@gmail.com

** Biólogo. Mas. Biología molecular y Biotecnología. Universidad Libre de Colombia Seccional Pereira. Belmonte Avenida Las Américas Carrera 28 No. 96-102, Pereira, Colombia. duverney.gaviria@unilibre.edu.co

porciona una comprensión de los nanocables proteínicos y su importancia en el metabolismo de *Geobacter* spp., con implicaciones en tecnologías electroquímicas y biorremediación.

Palabras claves: bioinformática, Citocromo C, *Geobacter*, Electricidad, Nanocables.

ABSTRACT

Geobacter sulfurreducens is an anaerobic, mesophilic bacterium that uses fatty acids, alcohols and monoaromatic compounds as oxidative substrates, and iron oxides as electron acceptors. This bacterium has been shown to be efficient in electricity generation and plays an important role in carbon cycling and bioremediation. It was found that this microorganism produces and transfers electrons through highly conductive protein nanowires called pili; these pili act as metallic conductors, allowing the microorganisms to exchange electrons with the extracellular medium.

The article focuses on the analysis of the gene and gene product of a protein called OmcZ, which plays a crucial role in electron transfer between *G. sulfurreducens* to the pili.

In this study, several steps were carried out to investigate the OmcZ protein sequences in the genus *Geobacter*. First, a UniProt search was performed to obtain the OmcZ sequence of *G. sulfurreducens*. Then, sequence alignments were performed with the BLASTp program to identify orthologous microorganisms in NCBI. Sequences of 14 *Geobacter* species were obtained and multiple alignments were performed with MEGA11 software. A phylogenetic tree was constructed using MEGA11 and a Tajima molecular clock test was performed. In addition, OmcZ sequence alignments and characterizations were performed on *G. sulfurreducens*, including genome analysis and physicochemical characterization of the protein. RasMol software was used to perform protein predictions and modeling.

The study focused on the alignment of OmcZ protein sequences in different species of *Geobacter* spp, as it found that the electrically conductive filaments are mainly composed of OmcZ. A low level of mutations and some deletions were found in the analyzed sequences. Possible conserved domains were identified and highly conserved amino acids were found in most of the sequences. Phylogenetic analysis revealed two major clades and showed the relationship between *Geobacter* species. The molecular clock indicated that the OmcZ protein sequence does not behave strictly as a molecular clock. The genome of *G. sulfurreducens* was characterized and the specific region encoding the OmcZ protein was identified. A physicochemical characterization of the protein was performed and found to be stable and contain heme groups. Overall, this study provides insight into protein nanowires and their importance in the metabolism of *Geobacter* spp. with implications for electrochemical technologies and bioremediation.

Keywords: bioinformatics, Cytochrome C, *Geobacter*, Electricity, Nanowires,

Recibido: enero 17 de 2024 **Aprobado:** marzo 10 de 2025

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el modelo bacteriano de un microorganismo electrogénico corresponde a la bacteria Gram negativa, mesófila y anaerobia *Geobacter sulfurreducens* (NCBI, 1995). Este es el primer microorganismo del que se tiene constancia que produce grandes cantidades de electricidad, reconociéndose como el más eficaz en la generación de tal reacción; ya que este es capaz de utilizar como sustrato oxidativo, ácidos grasos, alcoholes y compuestos monoaromáticos y usa óxidos de hierro como aceptor de electrones; adicionalmente, se ha identificado que esta reacción es de gran importancia en el ciclo del carbono y ha sido utilizada para procesos de biorremediación (Andrés et al., 2017).

G. sulfurreducens es una de las bacterias productoras de electricidad más importantes, y es la especie exoelectrogénica más comúnmente identificadas en los modelos de las Pilas de Combustible Microbiana (PCM) las cuales son inoculadas con muestras microbianas diversas y concentradas. En este tipo de estructuras se utilizan medios con un pH casi neutro, agua dulce ligeramente salina y temperaturas moderadas. Cuando el inóculo procede de sedimentos o de aguas residuales y el reactor se alimenta con acetato en un medio tamponado con bicarbonato o con fosfato en las condiciones mencionadas, suele predominar *G. sulfurreducens*, en el modelo. Este microorganismo se distingue por su capacidad para reducir oxidantes insolubles incluidos minerales, sin depender aparentemente de mediadores solubles de trans-

ferencia extracelular de electrones (TEE) (Holmes *et al.*, 2004; Logan *et al.*, 2019).

Se descubrió que este microorganismo produce y transfiere electrones a través de nanocables proteicos altamente conductores llamados pili. Estos pili actúan como conductores metálicos, permitiendo que los microorganismos intercambien con el medio extracelular (Gu, Y. *et al.*, 2023). *Geobacter* spp. produce y transfiere electrones a través de pili altamente conductores, permitiendo una transferencia eficiente de electrones al ánodo. La mayoría de los otros microorganismos exoelectrogénicos deben hacer contacto directo con el ánodo o producir y liberar lanzaderas de electrones que normalmente no alcanzan concentraciones suficientes de electrones en el ánodo (Redondo, 2018). Basándose en la evidencia científica recopilada, se ha concluido que la conductividad de las biopelículas se debe a la presencia de una red altamente concentrada de pili que presenta conductividad casi metálica. Estos pili son esencialmente nanocables, es decir, apéndices o filamentos que existen fuera de las células microbianas y que son capaces de conducir la electricidad de manera similar a cómo lo hacen los conductores metálicos. En consecuencia, los microorganismos pueden intercambiar electrones con el medio extracelular a través de estos pili (Malvankar & Lovley, 2014; Fu *et al.*, 2020).

Distinguir a *G. sulfurreducens* de otras especies no siempre es posible basándose solamente en las secuencias del gen del ARNr 16S, por ejemplo, los marcadores 16S ARNr de *G. anodireducens* y *G. sulfurreducens* son idénticos al 100%, sin embargo, se ha podido determinar que la primera puede predominar en las PCM alimentadas con acetato debido a su mayor tolerancia a salinidades cercanas a las del agua de mar; adicionalmente, se ha identificado que *G. anodireducens* no puede utilizar fumáto como acceptor de electrones (Richter *et al.*, 2008).

Actualmente, la transferencia extracelular de electrones (TEE) tiene lugar a través de dos mecanismos distintos: la transferencia directa de electrones (TDE) y la transferencia indirecta de electrones (TIE). La TDE involucra a microorganismos que establecen contacto directo con los aceptores de electrones insolubles, como electrodos u otros sustratos. Esto se hace a través de las proteínas que decoran la superficie celular, así como apéndices celulares como los pili o nanocables. Algunos de estos apéndices también están cubiertos de proteínas como los citocromos C. Por el contrario, en la TIE esta se basa en la capacidad de los microorganismos para emplear compuestos activos redox solubles como transportadores de electrones (Costa *et al.*, 2018). Estos transportadores median la transferencia de electrones entre las pro-

teínas conductoras expuestas en la superficie celular y los aceptores de electrones insolubles como los electrodos, todos estos elementos a su vez hacen parte de las tecnologías electroquímicas microbianas (Richardson *et al.*, 2012; Pirbadian *et al.*, 2014; Santoro *et al.*, 2017).

G. sulfurreducens ha sido objeto de amplios estudios, estos cuentan con la asombrosa cantidad de 111 genes que codifican los citocromos C, muchos de los cuales portan múltiples grupos hemo que actúan como transportadores de electrones (Santoro *et al.*, 2017). Los pili conductores de electricidad (E-pili) están formados por la proteína PilA truncada, que se considera que ha evolucionado a partir de la pilina completa por fusión génica bajo selección evolutiva positiva (Liu *et al.*, 2020). El flujo de electrones comienza desde la proteína de la membrana interna MacA, continúa hacia la proteína periplásmica PpcA antes de transferirse finalmente a los citocromos de la membrana externa en la superficie celular (Omc) (Lovley, 2022); los más notables entre estos son: OmcS, OmcB y OmcZ. De estos, OmcZ se destaca por ser responsable de la transferencia de electrones entre la biopelícula de *G. sulfurreducens* al electrodo presente en la PCM, lo que finalmente genera altos niveles de corriente, donde el último intercambio de electrones, entre la célula y el electrodo, lo producen las proteínas de membrana del citocromo C (Methé *et al.*, 2003; Sunil A. Patil, Cecilia Hägerhäll, 2014; Santos *et al.*, 2015; Lovley, 2017).

La célula de *G. sulfurreducens* expresa 2 citocromos C multihemo, OmcS y OmcZ, los cuales se ensamblan en filamentos conductores, se ha identificado mediante microscopía de fuerza atómica que casi todos los nanocables que emanan de las células de *G. sulfurreducens* son e-pili, incluso en células que producían pequeñas cantidades de OmcS y OmcZ. Además, estas proteínas homólogas son raras en el mundo microbiano, y muchos de los microorganismos que producen nanocables carecen de citocromos en la superficie externa, lo que sugiere que los filamentos basados en citocromos son de alta importancia (Lovley, 2022). Los apéndices extracelulares conductores de la cepa *G. sulfurreducens* son principalmente filamentos OmcZ, estos son filamentos polimerizados con características estructurales únicas que también proporcionan una base molecular para comprender el transporte electrónico de largo alcance en las proteínas (Wang *et al.*, 2019).

Las biopelículas generadas por *G. sulfurreducens* contienen una red conductora de mediadores de TEE unidos en la que OmcZ (citocromo C de tipo Z de membrana externa) participa en la TEE homogénea (a través de la masa del biofilm) mientras que OmcB media en la TEE

heterogénea (a través de la interacción biopelícula/electrodo). En el caso de los pili de tipo IV son importantes ambas reacciones tanto la mediada por los OmcZ como la facilitada por OmcB. Los OmcS desempeñan un papel secundario en la TEE homogénea, sin embargo, desempeñan un papel valioso en la transferencia extracelular de electrones, ya que puede transferir electrones a óxidos de Fe_{3+} insolubles, así como a otros aceptores de electrones extracelulares, incluidos el óxido de Mn_{4+} y las sustancias húmidas (Wang et al., 2019). En el caso de OmcE, se ha determinado que este es fundamental en la reducción del óxido de Fe (III), y que no interviene en ninguna de las reacciones previamente descritas (Richter et al., 2009; Gu, Y., Srikanth, V., Malvankar, N.S.; Lovley & Walker, 2019; Samatey, 2021).

Se ha identificado que para este tipo de microorganismos la superficie celular tiene 2 estructuras para los citocromos de membrana externa las cuales presentan las características descritas en la Tabla 1, sobre la estructura, simetría, estequiométrica, peso, número de átomos y residuos de los citocromos 8D9M y 7LQ5. Estos datos son importantes para comprender la organización y las características de estas proteínas en el contexto de su función biológica (RCSB PDB, 2021, 2022; Lovley, 2022; Wang et al., 2022).

Se ha determinado que el género de proteobacterias está compuesto por 13 especies y al realizar la comparación entre cada una de estas, en términos de producción de electricidad se identificó que las más representativas son *G. sulfurreducens* y *G. metallireducens*. Estas observaciones orientan a que existe diversidad en la estructura genómica del citocromo OmcZ y que debido a ello el resto de las especies no producen una generación de electricidad tan alta.

Por estas razones el objetivo de este artículo es efectuar una comparación in silico entre las secuencias de los genes que codifican OmcZ en las diferentes especies de *Geobacter* y caracterizar este citocromo en el microorganismo electrogénico *G. sulfurreducens*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Búsqueda de las secuencias de OmcZ en el género *Geobacter*

Se efectuó una búsqueda en la plataforma UniProt (<https://www.uniprot.org/>) para identificar la secuencia de la proteína del OmcZ teniendo como organismo modelo el genoma de la bacteria *G. sulfurreducens*, esta secuencia se recuperó en formato FASTA.

Alineamiento por pares y múltiple de las secuencias de *Geobacter spp.*

Se ejecutó un alineamiento de la secuencia previamente obtenida con ayuda del Software Standard Protein BLAST (BLASTp) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) para detectar los microorganismos ortólogos disponibles en el NCBI que presentan una homología con la secuencia de la proteína OmcZ, de allí se extrajeron las secuencias de 14 especies correspondientes al género *Geobacter* y a partir de estos se realizó un alineamiento múltiple con el programa bioinformático Molecular Evolutionary Genetics Analysis 11 (MEGA 11) (Koichiro Tamura, Glen Stecher, 2021) con los valores predeterminados de la alineación de proteína por codones seleccionados mediante el algoritmo Clustal W presente en MEGA 11.

Análisis filogenético

Para ver la estructura de los genes ortólogos y la orientación de los organismos seleccionados se usaron las secuencias de los ortólogos del alineamiento previamente obtenido y se construyó el árbol filogenético utilizando el programa MEGA 11. La sesión de alineamiento se guardó y se utilizó para construir el árbol filogenético de máxima verosimilitud con 100 replicaciones del método de Bootstrap y utilizando la matriz de sustituciones de aminoácidos basada en el método Jones-Taylor-Thornton (JTT). Se realizó una tabla de distancia o de estimaciones de la divergencia evolutiva entre las 14 secuencias de *Geobacter spp.* con ayuda del programa MEGA 11, utilizando la opción para la estimación de distancia "Computer overwall mean distance" el cual presentaba las siguientes características: con alcance pares de taxones, sin ningún método de estimación de la varianza, modelo de sustitución tipo aminoácidos con distancia P, tasas entre centros uniformes, patrón entre linajes homólogo y el tratamiento de los espacios de los datos que faltan fue por detección por pares.

Prueba de reloj molecular de Tajima

Se elaboró la prueba del reloj molecular de Tajima con ayuda del programa MEGA 11; ya que las 14 secuencias recuperadas representan microorganismos con secuencias ortólogas con la secuencia inicial del OmcZ, a partir de una búsqueda del alineamiento más divergente a los anteriores obtenidos con la secuencia previamente obtenida de OmcZ; estas secuencias fueron analizadas con la aplicación de Standard Protein en la plataforma BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) en la cual se modificaron los parámetros de búsqueda con el fin de obtener una palabra con un tamaño de 2 y el parámetro "Expect threshold" en 0,01, detectando nuevos microorganismos que presentaban homología con la secuencia de la proteína

OmcZ. La secuencia “MAG: IPT/TIG domain-containing protein [Methanosarcinales archaeon]”, la cual presentaba una puntuación de 199, el valor E 8 E-55 y un porcentaje de identidad de 35,17%; se adicionó a las secuencias de las 14 especies correspondientes al género *Geobacter* y se realizó un alineamiento múltiple en MEGA 11 con los valores predeterminados del programa.

A partir del alineamiento se creó el árbol filogenético con el método estadístico de máxima verosimilitud, 100 réplica de Bootstrap para la prueba filogenética, usando todos los sitios para agregar espacios y el método de sustitución Jons-Taylor-Thornton (JTT); con el árbol filogenético obtenido se desarrolló el MI Clock Test en el cual se usaron los siguientes parámetros: Modelo de sustitución de aminoácidos bajo el método de sustitución JTT, utilizando todos los sitios para agregar espacios, con el método estadístico máxima verosimilitud y con relojes moleculares globales; de allí se separaron 2 clados uno de los taxones en Outgroup donde se encontraba la secuencia de *Methanosarcinales archaeon* y en el otro las 14 secuencias de *Geobacter* spp. en un grupo denominado taxones no agrupados.

Alineamiento múltiple de las secuencias de la proteína OmcZ en *G. sulfurreducens*

Se seleccionaron las 3 secuencias de *G. sulfurreducens* de las subespecies KN400 y PCA; estas proteínas se alinearon con los valores predeterminados utilizando el algoritmo ClustalW en MEGA 11.

Caracterización del gen donde se encuentra el OmcZ en *G. sulfurreducens*

Se exploró el genoma completo de *G. sulfurreducens* en el NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con el código GenBank AP017912.1, buscando en la sección de características: localización y calificación, rastreando el producto “Citocromo OmcZ multihemo de tipo C” identificado con el código GenBank BBA70571.1, el cual tiene el registro del gen completo, el locus, la región de codificación con su codón de inicio, tabla de traducción y el número de identificación de la proteína.

Caracterización fisicoquímica y estructural de la proteína OmcZ en *G. sulfurreducens*

El servidor ProtParam de Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>) se usó para predecir el peso molecular, punto isoeléctrico (pl), índice de inestabilidad, índice alifático, media de hidropatía (GRAVY) y la composición de aminoácidos de la proteína OmcZ de *G. sulfurreducens*.

De igual manera, se realizó un análisis estructural de la molécula con la ayuda de programa bioinformático Ras-

Mol para representar, explorar las estructuras, características de la proteína y los aminoácidos que interactúan con el grupo hemo, los tetrapirroles y los átomos de hierro que los componen.

RESULTADOS

Secuencia de OmcZ en *Geobacter* spp

La secuencia proteica de la OmcZ pertenecientes a *G. sulfurreducens* se recuperaron de UniProt donde de estas secuencias se seleccionó en función de los parámetros generales de calidad de la herramienta UniProt y la secuencia recuperada fue la siguiente:

```
>tr|Q74BG5|Q74BG5_GEOSL_Cytochrome_C_OS=Geobacter_sulfurreducens (strain ATCC 51573 / DSM 12127 / PCA)
OX=243231 GN=OmcZ PE=1 SV=1
MKKKVLIGASLAAVLTGAAVMGAAVPPPPVNNQFLGIYDTKPNLTKADCLECHIVSDTVLVAQHHIALNTVPP
ASCNTSGVPTPLATGCHVMVPGSGGFTQDFRNCFCNCHTQTPTHSPAVALDKCKYCHGNFIDNPDLGHYIP
TYSASSVTPMPGRSVTAITDGNVVIVQQCEACIQAAPNAIDPKINTVTPIFSNQDITHHTGTTDCNLCHNTSSNV
PIRQCEVCHGVNSLHNIQKDPSNAANLGTVKPGLEDIWGWHIGHNNWDCQGCHWSWFGNSPYTNATVPAINGQ
SSYTVTAGKEAVLTVGGSFVNVPGDGVTTYQITIVALVSGSTSLLTLPESVTESEIKVSVPALVEGVYELRITKAN
KVSNLAKLTIVAPARIASATLATGKTLITGTFGPAPSEYDAGIGVYAGTQANVISWSDTKVVAATSPDFATNG
YVTVKTINGPLSGKILAAPKKVKR
```

Alineamiento por pares y múltiple de las secuencias de *Geobacter* spp

El alineamiento de secuencias de la proteína OmcZ de los 14 microorganismos reportados en la base de datos pertenecientes al género; presentando una similitud entre las secuencias, brindando los siguientes datos: puntuación más alta de 964 y la más baja de 321, valor E entre 0 y 6 E-120, porcentaje de identidad entre 45% y 100% para la proteína en OmcZ de *Geobacter* spp. Este análisis reveló que hubo un nivel relativamente bajo de mutaciones, principalmente puntuales en la especie de *G. sulfurreducens* y en algunos microorganismos se presentaron inserciones y delecciones, que generaron un número de espacios varió entre 0% y 8% entre las 14 secuencias de especies analizadas.

En las 14 secuencias alineadas del género *Geobacter* se detectaron posibles dominios conservados, con puntajes de alineamiento mayores o iguales a 200, la secuencia denominada “Cadena A, Citocromo C [*Geobacter sulfurreducens* PCA]” es la que presentó mayor número de índoles desde 270 a más de 450, posiblemente los dominios no están presentes en la misma secuencia, pero sí en la posición aunque no sean similares a la serie pueden tener composiciones similares de la naturaleza, pero no en la función final que se desarrolla en el ORF.

Las secuencias de: IPT/TIG domain-containing protein [*Geobacter sulfurreducens*], IPT/TIG domain-containing protein [*Geobacter*] y IPT/TIG domain-containing protein [*Geobacter pickeringii*] presentan un número de espacios desde 1 hasta alrededor de 30, estos dominios se encuen-

tran en receptores de la superficie celular como Met y Ron, así como en factores de transcripción intracelulares donde participa en la unión al ADN, puede que por ello presentan una diferenciación antes las otras secuencias.

En el alineamiento brindado por ClustalW en MEGA 11 se realizó la búsqueda de homología y el alineamiento de secuencias múltiples de estas 14 secuencias de OmcZ y se reveló un pequeño tramo de región conservada entre cada uno de los alineamientos. También se observaron unos pocos aminoácidos altamente conservados en la mayoría de las secuencias el cual presentó que el 25,44 % de los residuos son 100 % idénticos entre las 14 secuencias analizadas. En la región alineada se encontraron 129 posiciones conservadas al 100% que comprende aminoácidos no polares como: alanina, leucina, glicina, prolina y valina; aminoácidos polares: asparagina y serina; aminoácidos ácidos como el glutámico y aspártico; aminoácidos básicos: arginina e histidina y aminoácidos aromáticos como la tirosina.

Análisis filogenético

Se construyó un árbol filogenético utilizando las 14 secuencias de proteínas OmcZ en *Geobacter* spp. mediante el software MEGA 11. Las secuencias de las proteínas OmcZ empleadas para la construcción del árbol filogenético se obtuvieron a partir de los resultados de BLASTp, que procedían de especies de *Geobacter* spp. Las ramas horizontales representaban linajes evolutivos que cambiaban con el tiempo.

Los análisis revelaron que las secuencias de aminoácidos crearon un árbol filogenético coherente y se distribuyeron en dos clados principales para las 14 especies evaluadas. El clado dominante (A) estaba formado por secuencias de aminoácidos en el que de la secuencia de *Geobacter* spp. es la inicial y de allí se derivan la cepa de *G. chapellei*, *G. benzoatilyticus*, *G. sulfurreducens* en conjunto con otras subespecies y se unificaron *G. soli* con *G. anodireducens*, lo que reveló la similitud a nivel de secuencia. En el clado B se unificaron a partir de la secuencia de *Geobacter* spp. AOG1 de allí se derivaron *G. pickeringii*, *G. hydrogenophilus*, *G. grbiciae* y se unificaron las subespecies de *G. metallireducens* GS-15 y RCH13.

En el árbol filogenético nueve de las ramas presentaron un alto soporte Bootstrap entre el 70% y el 100% considerándose más robustas y confiables para el análisis. Además, se observa que en el clado A la secuencia de *G. Sulfurreducens PCA* y *G. Sulfurreducens KN400* formaban parientes hermanos (100% de apoyo para máxima parsimonia). Luego, la secuencia de *G. Sulfurreducens* cerró a estos grupos hermanos con un 100%; indicando que eran los parientes más cercanos entre todas

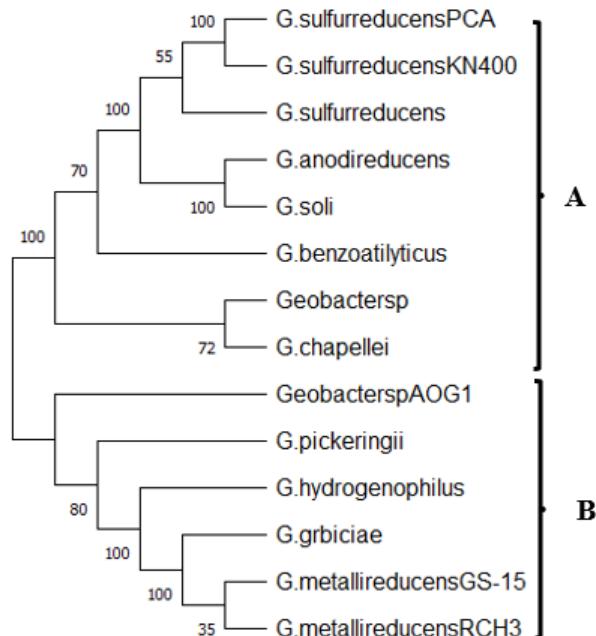


Figura 1. Árbol filogenético del alineamiento de las 14 secuencias de *Geobacter* spp. Fuente: MEGA11.

las 14 especies utilizadas para la reconstrucción filogenética (Figura 1).

El análisis evolutivo que se realizó en MEGA 11 para analizar la distancia demostró el número de diferencias de aminoácidos por sitio entre secuencias, este análisis incluyó 14 secuencias de aminoácidos, donde se eliminaron todas las posiciones ambiguas de cada par de secuencias, encontrando finalmente que en el conjunto de datos final había un total de 507 posiciones.

Prueba de reloj molecular de Tajima

Para realizar esta prueba se realizó un alineamiento de las 14 secuencias iniciales de la proteína OmcZ en *Geobacter* spp. junto con una secuencia denominada "MAG: IPT/TIG domain-containing protein [Methanoscincus archaeon]" y a partir de estas secuencias se creó un árbol filogenético, en este se crearon 3 clados donde las dos iniciales pertenecían a las secuencias de *Geobacter* spp. y el último a *Methanoscincus archaeon*, presentando una distancia filogenética amplia (Figura 2).

Los análisis evolutivos que se realizaron en MEGA 11 para la prueba del reloj molecular la hipótesis nula de igual ritmo evolutivo en todo el árbol se rechazó con un nivel de significación del 5% ($P=7,579 \times 10^{-185}$); este análisis incluyó 15 secuencias de aminoácidos, donde el conjunto de datos final había un total de 507 posiciones; en donde el valor lnL con reloj fue de -10000.360 con 14 parámetros, mientras que la prueba sin reloj presentaba un valor de lnL -9546.263 con 27 parámetros, con estos resulta-

Tabla 1. Características estructurales de los citocromos identificados en RCSB – PDB con los códigos 8D9M y 7LQ5 (Koichiro Tamura, Glen Stecher, 2021; Wang et al., 2022).

Estructura de los citocromos	Proteína 8D9M	Proteína 7LQ5
Cadena	Única	Única
Simetría	Global helicoidal	Helicoidal - H
Estequiometría global	Homo 7-mer-A7	Homo 3-mer-A3
Peso total (kDa)	54,37	97,9
Número de átomos	2.281	6.843
Número de residuos modelados	258	774
Número de residuos depositados	473	774

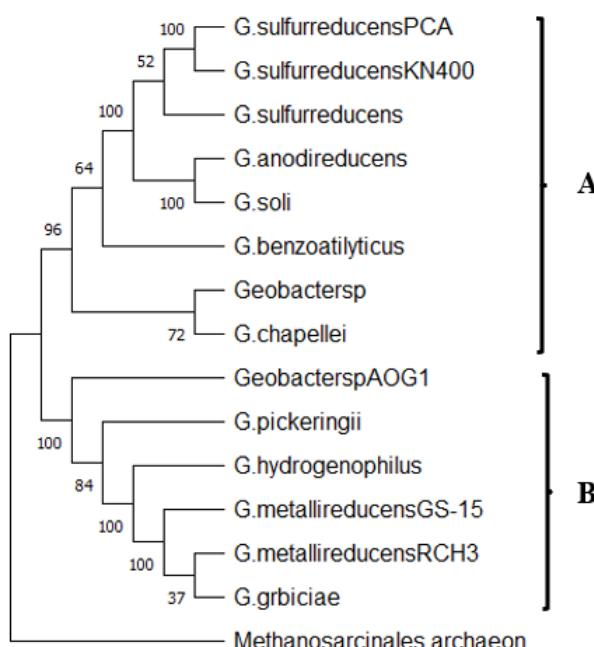


Figura 2. Árbol filogenético del alineamiento de las 14 secuencias de *Geobacter* spp. más la secuencia de *Methanoscincus archaeon*. Fuente: MEGA11.

dos se pudo inferir que la sección del gen que contiene la proteína de OmcZ en *Geobacter* spp. no se comporta como reloj molecular, pero sí de manera similar a uno.

Análisis de las secuencias de *Geobacter sulfurreducens*
 El alineamiento de las 3 secuencias de la proteína OmcZ en *G. sulfurreducens* contó con un total de 473 posiciones con similitud de secuencia (puntuación mínima de 953 – 964, valor E de 0, porcentaje de identidad entre 99,58 % y 100 %). Se reveló que las secuencias estaban muy conservadas a lo largo de la evolución, en donde el 91,3% de los residuos son 100% idénticos entre las 3 secuencias, adicionalmente hubo un nivel relativamente bajo de mutaciones entre estos.

Caracterización del gen donde se encuentra el OmcZ en *G. sulfurreducens*

En el NCBI se identificó que el ADN de *G. sulfurreducens* está integrado por 3.726.411 pb, con un contenido de G+C del 60,7% y no se encontraron plásmidos. El cromosoma contiene 2 operones de ARNr, 49 genes de ARNr y 3.327 secuencias codificadoras de proteínas (CDS) (Inoue et al., 2018). La región que codifica la proteína OmcZ en este microorganismo se encuentra en la región entre 2.240.813 y 2.242.234 en el locus "YM18_2051", al traducir esta con el uso de la herramienta ORFider (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Utils/wprintgc.cgi?mode=c#SG11>) y el uso del código genético 11 de los plásmidos de bacterias, arqueas y plantas; esta proteína generada se identifica en el NCBI como BBA70571.1 la cual consta de 473 aminoácidos (NCBI, 2018; NCBI, 2019).

Caracterización fisicoquímica y estructural de la proteína OmcZ en *G. sulfurreducens*

Para la caracterización fisicoquímica se evaluaron todas estas propiedades fisicoquímicas de la proteína OmcZ de *G. sulfurreducens* utilizando el servidor Expasy ProtParam; identificando que esta proteína presenta un peso molecular de 49.378,83 Da, contiene un total de átomos de 6.884 y siendo la fórmula química la siguiente: C₂₁₇₂H₃₄₁₇N₅₉₉O₆₇₆S₂₀.

La proteína consta de 473 residuos de aminoácidos; el punto isoelectrónico teórico (pl) de esta proteína fue de 7,22, lo que sugiere que la proteína es neutra, esto debido a la presencia de igual número de residuos de aminoácidos cargados negativamente (ácido aspártico y glutámico) y de aminoácidos básicos (arginina, lisina) que fueron 29 para ambos. El índice de inestabilidad se calculó en más de 34,17, lo que clasificó a la OmcZ como una proteína estable. El índice alifático fue de 79,96, lo que puede considerarse un factor positivo para aumentar la termo

Tabla 2. Composición de aminoácidos de la proteína OmcZ de *G. sulfurreducens*. Fuente: RasMol.

Aminoácido	Cantidad de átomos	Porcentaje (%)	Aminoácido	Cantidad de átomos	Porcentaje (%)
Ala (A)	240	4,1	Lys (K)	189	3,2
Arg (R)	132	2,2	Met (M)	48	0,8
Asn (N)	528	9,0	Phe (F)	297	5,1
Asp (D)	360	6,1	Pro (P)	462	7,9
Cys (C)	288	4,9	Pyl (O)	0	0
Gln (Q)	297	5,1	Sec (U)	0	0
Glu (E)	108	1,8	Ser (S)	288	4,9
Gly (G)	252	4,3	Thr (T)	504	8,6
His (H)	510	8,7	Trp (W)	168	2,8
Ile (I)	288	4,9	Tyr (Y)	144	2,4
Leu (L)	288	4,9	Val (V)	420	7,2

estabilidad de la proteína. Además, el valor Grand Average of Hydropathy (GRAVY) resultó negativo (-0,028), lo que indica que esta proteína es apolar.

Los aminoácidos más abundantes en la proteína OmcZ de *G. sulfurreducens* son: asparagina (9,0%), histidina (8,7%), treonina (8,6%), prolina (7,9%), valina (7,2%) y serina (4,9%); representando una proporción significativa de la composición total de la proteína. La histidina es el segundo aminoácido que se encuentra en mayor proporción en la proteína 8,7%, ya que es importante en la formación de enlaces coordinados con iones metálicos. Por otra parte, esta proteína no contiene los aminoácidos pirrolisina ni selenocisteína (Tabla 2).

La base de datos “Protein Data Bank (PDB)” caracterizó la proteína identificada con el código “8D9M” denominada “Cryo-EM de los nanocables OmcZ de *G. sulfurreducens*”, e identificó las siguientes características en la cadena A la cual cuenta con 16 puntos donde hay una coordi-

nación metálica y se encuentran entre las posiciones 54 a las 276 y están directamente relacionadas con las histidinas pertenecientes a la secuencia, esta estructura presenta 7 enlaces covalentes entre las cisteínas y contiene un péptido cis entre la treonina y la prolina.

Según el programa RasMol la estructura de la proteína fue generada mediante cryo-EM de nanocables OmcZ de *G. sulfurreducens* y identificó que está compuesta por 6 cadenas, 774 grupos funcionales con 21 hélices y 12 hebras; con un total de 6.843 átomos de los cuales 5.811 pertenecen a la proteína, 1.032 son átomos designados al grupo hemo, con 54 átomos de azufre y 24 átomos de hierro (Figura 3).

La molécula cuenta con 24 grupos hemo los cuales están compuestos por tetrapirroles enlazados los unos con los otros con un átomo de hierro coordinado a cada hemo. El grupo hemo es un tetrapirrol, también conocido como anillo porfirínico, que consiste en cuatro ani-

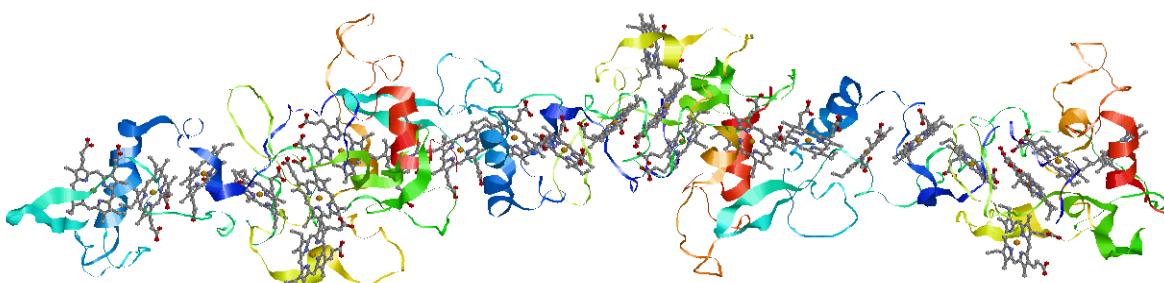


Figura 3. Visualización inicial de la proteína de la estructura cryo-EM de nanocables OmcZ de *G. sulfurreducens*.
Fuente: RasMol.

Ilos pirrólicos unidos por enlaces covalentes. En el centro del grupo hemo se encuentra un átomo del tetrapirrol actúa como un cofactor esencial para la función de la proteína, la presencia del átomo de hierro en el centro del grupo hemo permite que el citocromo C juegue un papel clave en las reacciones de transferencia de electrones en las células. El átomo de hierro puede alternar entre diferentes estados de oxidación (Fe_{2+} y Fe_{3+}) y facilitar la transferencia de electrones entre proteínas y complejos en la cadena respiratoria.

La histidina es un aminoácido que se encuentra en las proteínas y tiene la capacidad de interactuar con tetrapirroles y átomos de hierro en ciertas proteínas, como las hemoproteínas. La histidina, específicamente la histidina 18, es un residuo de aminoácido que interactúa con el átomo de hierro en el centro del grupo hemo, a través de uno de los átomos de nitrógeno de su grupo imidazol, forma un enlace coordinado con el átomo de hierro y estabiliza la unión del átomo de hierro en el grupo hemo. La interacción entre la histidina, el tetrapirrol y el átomo de hierro es crucial en muchas proteínas que contienen grupos hemo, como la hemoglobina y la mioglobina, ya que estas proteínas están involucradas en el transporte y almacenamiento de oxígeno en los tejidos.

En esta proteína se ha identificado que el hemo C se caracteriza por la presencia de dos enlaces tioéter covalentes formados entre las cadenas laterales cisteína y los grupos vinilo del hemo en las posiciones 2 y 4.

Las hélices de la proteína exhiben una característica de polaridad, lo que significa que están compuestas por una cara que contiene la mayoría de los aminoácidos polares con un 57,6% y la otra compuesta por un 42,38% de aminoácidos hidrofóbicos. La polaridad de las hélices puede estar relacionada con su función en la proteína. Las regiones polares pueden estar involucradas en interacciones con otras moléculas polares, como proteínas o ácidos nucleicos, mientras que las regiones hidrofóbicas pueden estar involucradas en interacciones con lípidos o en el núcleo hidrofóbico de la proteína y la interacción con el grupo hemo.

DISCUSIÓN

Análisis de la secuencia

Los resultados del análisis de las secuencias de OmcZ en *Geobacter* spp. indican que esta proteína está altamente conservada entre las diferentes especies del género. El alineamiento de las secuencias de OmcZ de *Geobacter* spp. reveló que el 25,44% de los residuos son 100% idénticos entre las 14 secuencias analizadas. Además, el alineamiento de las 3 secuencias de OmcZ

de *G. sulfurreducens* reveló que el 91,3% de los residuos son 100% idénticos.

Estos resultados sugieren que OmcZ es una proteína esencial para la función electrogénica de *Geobacter* spp. la cual ha sido sometida a una fuerte presión selectiva para conservar su estructura y función a lo largo de la evolución. Las mutaciones que se han producido en OmcZ entre las diferentes especies de *Geobacter* spp. son principalmente puntuales, y se han concentrado en regiones no esenciales de la proteína OmcZ, sugiriendo que estas mutaciones no han tenido un impacto significativo en su función. El análisis del gen que codifica OmcZ en *G. sulfurreducens* revela que este se encuentra en el locus "YM18_2051", este locus también contiene genes que codifican otras proteínas involucradas en la transferencia de electrones desde compuestos orgánicos a electrodos, lo que sugiere que OmcZ está involucrada en este proceso.

Análisis filogenético

Los resultados del análisis filogenético de las secuencias de OmcZ en *Geobacter* spp. indican que estas proteínas están agrupadas en dos clados principales: el clado A, formado por secuencias de *G. soli*, *G. anodireducens*, *G. benzoatilyticus*, *G. sulfurreducens* y *G. chapellei*; y el clado B, formado por secuencias de *G. pickeringii*, *G. hydrogenophilus*, *G. grbiciae*, *G. metallireducens* GS-15, *Geobacter* spp. AOG1 y *G. metallireducens* RCH13. El hecho de que las secuencias de OmcZ de *G. sulfurreducens* se encuentren en los dos clados principales sugiere que esta especie es basal al género *Geobacter*. Esto es consistente con los resultados de estudios filogenéticos anteriores, que han encontrado que *G. sulfurreducens* es la especie más divergente del género (Mora Collazos & Bravo Montaño, 2017).

La prueba de reloj molecular de Tajima indicó que la sección del gen que contiene la proteína de OmcZ en *Geobacter* spp. no se comporta como un reloj molecular, pero sí de manera similar a uno. Estos resultados sugieren que la evolución de esta proteína ha estado sujeta a una tasa mutacional relativamente constante a lo largo del tiempo.

Los resultados del análisis de la divergencia evolutiva muestran que las bacterias del género *Geobacter* son un grupo diverso, con una amplia gama de diferencias genéticas. Las diferencias más significativas se observan entre las especies *G. sulfurreducens* y *G. metallireducens*, que tienen un 37,71% de diferencias de aminoácidos. Las especies *G. soli* y *G. benzoatilyticus* son las más cercanas a *G. sulfurreducens*, con un 7,62% y 37,71% de diferencias entre los aminoácidos, respectivamente. Es-

tas especies comparten algunas características, como la capacidad de reducir sulfatos y la presencia de una estructura de pili en forma de hélice. Las especies *Geobacter* spp., *G. chapellei*, *Geobacter* spp. AOG1, *G. metallireducens* GS-15 y *G. metallireducens* RCH3 son más distantes de *G. sulfurreducens*, con diferencias de aminoácidos que van del 40,62% al 52,49%.

Estas diferencias probablemente reflejan las adaptaciones de estas especies a diferentes ambientes y condiciones. El clado A está formado por secuencias de especies que habitan ambientes sedimentarios, mientras que el clado B está formado por secuencias de especies que habitan ambientes acuáticos. Sugiriendo que las diferencias en la distribución ecológica de las especies de *Geobacter* pueden estar relacionadas con las diferencias en la estructura de la proteína OmcZ. Por ejemplo, *G. sulfurreducens* es una especie anaeróbica que puede reducir sulfatos, mientras que *G. metallireducens* es una especie facultativa que puede reducir sulfatos o metales.

Caracterización fisicoquímica y estructural de la proteína OmcZ en *G. sulfurreducens*

Se establece que esta proteína es una hemoproteína, es decir, contiene 24 grupos formado por cuatro anillos pirrólicos unidos por enlaces covalentes a los átomos de hierro, el cual se encuentra en el centro de la estructura, siendo así una proteína estable e hidrofóbica. Está compuesta por 473 residuos de aminoácidos, en donde la histidina es el segundo aminoácido más abundante en la proteína, siendo algunas de ellas importantes en la formación de enlaces coordinados con el ion hierro. Estructuralmente se identifica que esta proteína contiene hélices anfipáticas, la polaridad de las hélices está relacionada con su función en la proteína y la disposición de los grupos hemo que facilita el que estos pili se comporten en procesos de transferencia de electrones de manera casi metálica. Los grupos prostéticos del hemo desempeñan un papel crucial al interactuar con el entorno proteico, influyendo en su reactividad, los factores determinantes incluyen el número y tipo de ligandos axiales donados por la proteína al hierro, la profundidad de inserción del hemo en la proteína, la accesibilidad a ligandos exógenos, la distribución de grupos polares y cargados alrededor del hemo, y otras propiedades del sitio de unión al hemo y de la proteína. Por ejemplo, en el caso del hemo c, el cual se caracteriza por enlaces tioéter covalentes, establece enlaces con cadenas laterales de cisteína en las posiciones 2 y 4 de los grupos vinilo.

Las proteínas que contienen hemo c, conocidas como citocromos C, cumplen principalmente el papel de transportadores de electrones. Su sitio de unión al hemo suele estar definido por un pentapéptido CXXCH, donde la histidina actúa como ligando axial, las cisteínas forman

enlaces tioéter con la porfirina y hay unión con los residuos variables, desempeñando un rol esencial en la función biológica. Es así como esta proteína se puede clasificar como un citocromo C de clase 4 donde hay una alta proporción de hemo en relación con el polipéptido; en estos citocromos, el ligamento axial puede ser Histidina-Metionina o Metionina-Histidina, aportando versatilidad a su función biológica.

CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación han arrojado importantes revelaciones a nivel proteómico sobre la estructura y la evolución de los nanocables proteínicos, conocidos como E-pili, que desempeñan un papel crucial en la transferencia de electrones en este microorganismo.

El análisis detallado de las secuencias de OmcZ en *Geobacter* spp. ha demostrado la conservación evolutiva de esta proteína, así como la existencia de posibles dominios conservados que sugieren una diferenciación funcional. Asimismo, se han identificado aminoácidos altamente conservados en la mayoría de las secuencias, lo que indica su importancia en la función y estructura de la proteína. El análisis filogenético ha permitido identificar las relaciones y la divergencia evolutiva entre las secuencias de OmcZ en *Geobacter* spp., proporcionando una visión más clara de la evolución de esta proteína a lo largo del tiempo. Además, el estudio reveló información relevante sobre la ubicación y características del gen que codifica la proteína OmcZ en el genoma de *G. sulfurreducens*.

La caracterización fisicoquímica de la proteína OmcZ ha destacado su composición específica, la presencia de grupos hemo y la importancia de ciertos aminoácidos como la histidina y la cisteína en su estructura y función. En general, estos hallazgos proporcionan una mejor comprensión de la función y la importancia de la proteína OmcZ en el metabolismo de *G. sulfurreducens* al igual que en el proceso de transferencia extracelular de electrones en *Geobacter* spp.

Este estudio *In Silico* ha contribuido al conocimiento de la estructura proteica de OmcZ que se encuentra en los nanocables conductores de electricidad en *Geobacter* spp. y abre nuevas perspectivas para futuras investigaciones y aplicaciones en campos como la biotecnología y la bioenergía, en donde el entendimiento profundo de estos mecanismos puede conducir a innovaciones tecnológicas y soluciones sostenibles basadas en la actividad metabólica de microorganismos electrogénicos como *G. sulfurreducens*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrés, G., Gómez, H., Alejandro, M., & Olvera, S. (2017). La plurifuncionalidad de las bacterias electrogénicas. *Universitarios Potosinos*, 211, 4-10.
- Costa, N. L., Clarke, T. A., Philipp, L.-A., Gescher, J., Louro, R. O., & Paquete, C. M. (2018). Electron transfer process in microbial electrochemical technologies: The role of cell-surface exposed conductive proteins. *Bioresource Technology*, 255, 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.133>
- Fu, T., Liu, X., Gao, H., Ward, J. E., Liu, X., Yin, B., Wang, Z., Zhuo, Y., Walker, D. J. F., Joshua Yang, J., Chen, J., Lovley, D. R., & Yao, J. (2020). Bioinspired bio-voltage memristors. *Nature Communications*, 11(1), 1861. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15759-y>
- Gu, Y., Srikanth, V., Malvankar, N.S., Samatey, F. A. (2021). Cryo-EM structure of OmcZ nanowire from Geobacter sulfurreducens. DOI: 10.2210/Pdb7LQ5/ Pdb. <https://www.rcsb.org/structure/7LQ5>
- Gu, Y., Guberman-Pfeffer, M. J., Srikanth, V., Shen, C., Giska, F., Gupta, K., ... & Malvankar, N. S. (2023). Structure of Geobacter cytochrome OmcZ identifies mechanism of nanowire assembly and conductivity. *Nature microbiology*, 8(2), 284-298. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01315-5>
- Holmes, D. E., Bond, D. R., O'Neil, R. A., Reimers, C. E., Tender, L. R., & Lovley, D. R. (2004). Microbial Communities Associated with Electrodes Harvesting Electricity from a Variety of Aquatic Sediments. *Microbial Ecology*, 48(2), 178–190. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-0004-4>
- Inoue, K., Ogura, Y., Kawano, Y., & Hayashi, T. (2018). Complete Genome Sequence of Geobacter sulfurreducens Strain YM18, Isolated from River Sediment in Japan. *Genome Announcements*, 6(19). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00352-18>
- Koichiro Tamura, Glen Stecher, and S. K. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022-3027.
- Liu, X., Ye, Y., Xiao, K., Rensing, C., & Zhou, S. (2020). Molecular evidence for the adaptive evolution of Geobacter sulfurreducens to perform dissimilatory iron reduction in natural environments. *Molecular Microbiology*, 113(4), 783–793. <https://doi.org/10.1111/mmi.14443>
- Logan, B. E., Rossi, R., Ragab, A., & Saikaly, P. E. (2019). Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems. *Nature Reviews Microbiology*, 17(5), 307–319. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0173-x>
- Lovley, D. R. (2017). Electrically conductive pili: Biological function and potential applications in electronics. *Current Opinion in Electrochemistry*, 4(1), 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.08.015>
- Lovley, D. R. (2022a). Microbial nanowires. *Current Biology*, 32(3), R110-R112. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.12.019>
- Lovley, D. R. (2022b). Untangling Geobacter sulfurreducens Nanowires. *MBio*, 13(3). <https://doi.org/10.1128/mbio.00850-22>
- Lovley, D. R., & Walker, D. J. F. (2019). Geobacter Protein Nanowires. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02078>
- Malvankar, N. S., & Lovley, D. R. (2014). Microbial nanowires for bioenergy applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.12.003>
- Methé, B. A., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Paulsen, I. T., Nelson, W., Heidelberg, J. F., Wu, D., Wu, M., Ward, N., Beanan, M. J., Dodson, R. J., Madupu, R., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., DeBoy, R. T., Durkin, A. S., Gwinn, M., Kolonay, J. F., Sullivan, S. A., ... Fraser, C. M. (2003). Genome of Geobacter sulfurreducens: Metal Reduction in Subsurface Environments. *Science*, 302(5652), 1967–1969. <https://doi.org/10.1126/science.1088727>
- Mora Collazos, A., & Bravo Montaño, E. (2017). Isolation of electrogenic microorganisms with potential to reduce hexavalent chromium. *Acta Biológica Colombiana*, 22(1), 27–36.
- NCBI. (1995). Geobacter sulfurreducens. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=35554&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- NCBI. (2018). Geobacter sulfurreducens DNA, complete genome. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AP017912.1/>
- NCBI. (2019). The Genetic Codes. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Utils/wprintgc.cgi?mode=c#SG11>
- Pirbadian, S., Barchinger, S. E., Leung, K. M., Byun, H. S., Jangir, Y., Bouhenni, R. A., Reed, S. B., Romine, M. F., Saffarini, D. A., Shi, L., Gorby, Y. A., Golbeck, J. H., & El-Naggar, M. Y. (2014). Shewanella oneidensis MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(35), 12883–12888. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410551111>
- RCSB PDB. (2021). 7LQ5 Cryo-EM structure of OmcZ nanowire from Geobacter sulfurreducens. <https://www.rcsb.org/structure/7LQ5>
- RCSB PDB. (2022). 8D9M Cryo-EM of the OmcZ nanowires from Geobacter sulfurreducens. <https://www.rcsb.org/structure/8D9M>
- Redondo, J. (2018). Microorganismos electrogénicos: células de combustible microbianas. In 26/27: Vol. I.

- h t t p s : / / e b u a h . u a h . e s / d s p a c e / handle/10017/37227https://ebuah.uah.es/dspace/handle/10017/37227
- Richardson, D. J., Butt, J. N., Fredrickson, J. K., Zachara, J. M., Shi, L., Edwards, M. J., White, G., Baiden, N., Gates, A. J., Marritt, S. J., & Clarke, T. A. (2012). The 'porin-cytochrome' model for microbe-to-mineral electron transfer. *Molecular Microbiology*, 85(2), 201 - 212. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08088.x>
- Richter, H., McCarthy, K., Nevin, K. P., Johnson, J. P., Rotello, V. M., & Lovley, D. R. (2008). Electricity Generation by Geobacter sulfurreducens Attached to Gold Electrodes. *Langmuir*, 24(8), 4376–4379. <https://doi.org/10.1021/la703469y>
- Richter, H., Nevin, K. P., Jia, H., Lowy, D. A., Lovley, D. R., & Tender, L. M. (2009). Cyclic voltammetry of biofilms of wild type and mutant Geobacter sulfurreducens on fuel cell anodes indicates possible roles of OmcB, OmcZ, type IV pili, and protons in extracellular electron transfer. *Energy & Environmental Science*, 2(5), 506. <https://doi.org/10.1039/b816647a>
- Santoro, C., Arbizzani, C., Erable, B., & Ieropoulos, I. (2017). Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review. *Journal of Power Sources*, 356, 225–244. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.109>
- Santos, T. C., Silva, M. A., Morgado, L., Dantas, J. M., & Salgueiro, C. A. (2015). Diving into the redox properties of *Geobacter sulfurreducens* cytochromes: a model for extracellular electron transfer. *Dalton Transactions*, 44(20), 9335–9344. <https://doi.org/10.1039/C5DT00556F>
- Sunil A. Patil, Cecilia Hägerhäll, L. G. (2014). Electron transfer mechanisms between microorganisms and electrodes in bioelectrochemical systems. In *Advances in Chemical Bioanalysis*.
- Wang, F., Chan, C. H., Suciu, V., Mustafa, K., Ammend, M., Si, D., Hochbaum, A. I., Egelman, E. H., & Bond, D. R. (2022). Structure of Geobacter OmcZ filaments suggests extracellular cytochrome polymers evolved independently multiple times. *eLife*, 11. <https://doi.org/10.7554/eLife.81551>
- Wang, F., Gu, Y., O'Brien, J. P., Yi, S. M., Yalcin, S. E., Srikanth, V., Shen, C., Vu, D., Ing, N. L., Hochbaum, A. I., Egelman, E. H., & Malvankar, N. S. (2019). Structure of Microbial Nanowires Reveals Stacked Hemes that Transport Electrons over Micrometers. *Cell*, 177 (2), 361-369.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.029>