



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**TIPIFICACIÓN POR MÉTODOS MOLECULARES DE  
MICROORGANISMOS ACIDÓFILOS PRESENTES EN LOS  
TERREROS DE LIXIVIACIÓN DE MEXICANA DE CANANEA**

**Tesis que presenta**

**Elida Yazmín Gómez Rodríguez**

**Para obtener el grado de**

**Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular**

**Co-directores de la Tesis:**

**Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís**

**Dr. Marcos Gustavo Monroy Fernández**

San Luis Potosí, S.L.P., Enero 2007

---



IPICYT

### Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Tipificación por métodos moleculares de microorganismos acidófilos presentes en los terreros de lixiviación de Mexicana de Cananea**” presentada para obtener el Grado de de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Elida Yazmín Gómez Rodríguez** y aprobada el **07 de diciembre del 2006** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís  
(Co-director de la tesis)

Dr. Marcos Gustavo Monroy Fernández  
(Co-director de la tesis)

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz  
(Asesor de la tesis)



### **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., y en el Laboratorio de Geoquímica y Geomicrobiología Ambiental del Instituto de Metalurgia de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la co-dirección del **Dr. Angel Gabriel Alpuche Solís**, del **Dr. Marcos Gustavo Monroy Fernández**

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 193931 y apoyo del proyecto financiado por la empresa Mexicana de Cananea, a través del proyecto del Fondo ECONOMÍA - CONACYT 2003-C01-12607



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 028 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 5 días del mes de enero del año 2007, se reunió a las 09:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Lina Raquel Riego Ruiz</b>	<b>Presidenta</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Marcos Gustavo Monroy Fernández</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>UASLP</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Elida Yazmín Gómez Rodríguez**

sobre la Tesis intitulada:

*Tipificación por Métodos Moleculares de Microorganismos Acidófilos Presentes en los Terreros de Lixiviación de Mexicana de Cananea*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís**  
**Dr. Marcos Gustavo Monroy Fernández (UASLP)**

El Jurado, después de deliberar, determinó

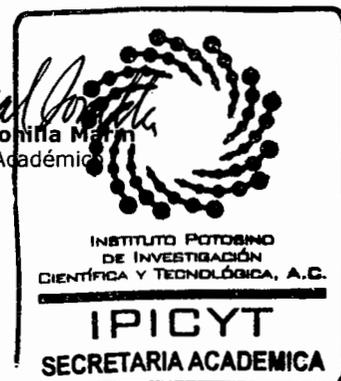
**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 11:10 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 5 días del mes enero de 2007.

  
**Dr. Marcial Bonilla Márquez**  
Secretario Académico

  
**L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez**  
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



---

## Dedicatorias

A mi esposo **Fabrizio Arteaga Larios** por su amor, confianza y apoyo incondicional. Por sus palabras de aliento en los momentos difíciles, por compartir conmigo una sonrisa en los momentos de alegría, por escuchar mis preocupaciones y darme consejos, por toda su comprensión. Por ser mi conciencia y reflexiones. Por estar conmigo y ser mi compañero. Muchas gracias. Te amo.

A mis papás **Rebeca Rodríguez Acosta y Felipe Alfredo Gómez Acosta** por su amor y apoyo en todos los momentos y etapas de mi vida, por siempre tener las palabras indicadas. Por su paciencia y ser mi ejemplo a seguir, enseñándome el camino correcto; por todo sus esfuerzos y sacrificios para darnos lo mejor. Muchas gracias. Los quiero mucho.

A mi hermana **Zaida Olivia Gómez Rodríguez** por su amor, apoyo, por siempre creer en mí. A mi sobrina **Zaida Rebeca Moreno Gómez** por todo su cariño, simpatía y ocurrencias, por hacernos cada momento más feliz. Muchas gracias. Las quiero mucho.

---

## Agradecimientos

Gracias a **Dios** por todo lo que me ha dado en la vida, la salud, las personas a mi alrededor, las oportunidades, las experiencias, la felicidad y la tranquilidad. Al **Dr. Marcos Gustavo Monroy Fernández** por su confianza y apoyo que me dio desde que trabaje en el Laboratorio de Geoquímica y Geomicrobiología Ambiental, en el Instituto de Metalurgia y durante el desarrollo del proyecto de investigación; por su paciencia y por siempre tener tiempo para escucharme, por impulsarme a seguir con mi crecimiento profesional así como personal. Muchas gracias por ser una gran persona, ser humano y un gran amigo. Al **Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís** por su apoyo y asesoría en la realización de mi proyecto, por admitirme en su equipo de investigación, por su confianza en mi trabajo. A la **Dra. Lina Raquel Riego Ruiz** por sus consejos y apoyo, por brindarme siempre un momento para escucharme y asesorarme. Al **Dr. Sergio Casas Flores** por su asesoría técnica en el trabajo de laboratorio, por haber resuelto mis dudas y por darme sus consejos. A la **Dra. Martha Leticia Santos Martínez** por habernos facilitado el protocolo de extracción de DNA adaptado de Wisotzkey y col. (1990) y por su orientación y comentarios en las etapas iniciales del trabajo de investigación. A mis compañeros de la maestría **Yadira, Alex, Mayte, Candy, Claudia, Pablo, Fernando, Sandra, Josefát, Bernardo, Raquel y Jacinto** por todos los momentos que hemos pasado juntos y por que tuve la fortuna de conocerlos, muchas gracias. A **Rosalba Castillo y Salvador Ambríz**, por su amabilidad y atención, al permitirme siempre contar con los materiales y reactivos necesarios, durante el tiempo de mi trabajo. A la empresa **Mexicana de Cananea S.A. de C.V.** por su financiamiento, a través del proyecto del **Fondo ECONOMÍA- CONACYT 2003-C01-12607**, y la autorización para la presentación de resultados obtenidos en el proyecto de investigación. Finalmente al IPICYT por las facilidades otorgadas para la realización del trabajo, a todos los profesores de postgrado del IPICYT por sus enseñanzas y al **CONACYT** por la beca número **193931**.

---

## Índice General

<b>Portada</b>	Pág. i
<b>Constancia de aprobación de la tesis</b>	ii
<b>Créditos institucionales</b>	iii
<b>Dedicatorias</b>	iv
<b>Agradecimientos</b>	v
<b>Índice General</b>	vi
<b>Lista de tablas</b>	x
<b>Lista de figuras</b>	xi
<b>Lista de anexos</b>	xiii
<b>Abreviaturas</b>	xiv
<b>Glosario</b>	xvii
<b>Resumen</b>	xxi
<b>Abstract</b>	xxiii
<b>Capítulo I</b>	1
<b>Introducción</b>	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1 Historia de Cananea	1

---

1.1.2 Industrial Minera México	3
1.1.2.1 Mexicana de Cobre	3
1.1.2.2 Mexicana de Cananea	4
1.1.2.3 Industrial Minera México	4
1.1.3 Problemática actual de Mexicana de Cananea	4
1.1.4 Los minerales	6
1.1.4.1 Historia de la clasificación de los minerales	6
1.1.4.2 Clasificación de los minerales	6
1.1.4.3 Descripción de los sulfuros	8
1.1.4.4 Descripción de la calcopirita	9
1.1.4.5 Presencia de cobre en los minerales sulfurosos	10
1.1.4.6 Yacimientos de sulfuros	10
1.1.4.7 Recuperación de cobre	11
1.2 Biolixiviación	11
1.2.1 Definición de biolixiviación y biooxidación	13
1.2.2 Diferencias entre biolixiviación y biooxidación	14
1.2.3 Aplicación de la biolixiviación	14
1.2.4 Mecanismos de lixiviación	16
1.2.4.1 Mecanismo directo	16
1.2.4.2 Mecanismo indirecto	17
1.2.4.2.1 Mecanismo de ataque indirecto vía tiosulfato	18
1.2.4.2.2 Mecanismo de ataque indirecto vía polisulfuro	18
1.2.4.3 Mecanismo mixto	18
1.2.4.4 Reacciones químicas de los mecanismos directo e indirecto	19
1.2.4.4.1 Mecanismo directo	19
1.2.4.4.2 Mecanismo indirecto completo	19
1.2.4.4.3 Mecanismo indirecto incompleto	19
1.2.4.5 Oxidación del hierro y el azufre	19
1.2.5 Ventajas de la biolixiviación	20
1.2.6 Drenaje ácido de mina	20
1.3 Microorganismos lixiviantes	21
1.3.1 <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	21
1.3.2 Género <i>Leptospirillum</i>	22
1.4 Tres dominios universales	26
1.4.1 Dominios Bacteria y Archaea	26
1.4.2 Divergencia de la vida	27
1.4.3 Principales diferencias entre los dominios	28
1.5 Estudio de las relaciones ecológicas de los microorganismos	29
1.5.1 Técnicas empleadas	30
1.5.2 Análisis de las secuencias de ADN	31
1.5.3 Relaciones filogenéticas	32
1.5.3.1 Reloj molecular	33
1.5.4 Los ribosomas	33
1.5.5 Secuencias de ARNr 16S	35
1.5.6 Características del operón <i>rrn</i>	36

---

1.6 Historia y descripción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	36
1.6.1 Principio de la PCR	37
1.6.2 Ciclos de amplificación	37
1.6.3 Pasos críticos en la PCR	39
1.6.4 Componentes de la reacción	39
1.7 PCR en tiempo real	40
1.7.1 Intercaladores fluorescentes de ADN	41
1.7.2 Curva de disociación	41
1.7.3 Ventajas de la PCR en tiempo real contra la PCR convencional	42
1.8 Extracción de ADN	42
1.9 Objetivo general y objetivos específicos	44
1.9.1 Objetivos específicos	44
<b>Capítulo II</b>	<b>46</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>46</b>
2.1 Materiales y Equipo	46
2.1.1 Material biológico	46
2.1.2 Vectores utilizados	46
2.1.3 Reactivos	47
2.1.4 Equipo	49
2.2 Cepas bacterianas de referencia y condiciones de cultivo	50
2.3 Muestras analizadas	52
2.3.1 Condiciones de mantenimiento y concentración de la biomasa	53
2.3.2 Tinción de Gram	53
2.4 Protocolos probados para la extracción de ADN	54
2.4.1 Protocolo adaptado de Wisotzkey y col. (1990).	55
2.4.2 Protocolo adaptado de Garbor y col. (2003).	56
2.4.3 Protocolo de Ultra Clean Microbial ADN Isolation Kit de MoBio	56
2.5 Amplificación de ADNr 16S por PCR	57
2.6 PCR anidada con oligonucleótidos universales internos	58
2.7 Amplificación de ADNr 16S por PCR y PCR anidada con oligos específicos de género/especie	60
2.8 Clonación de los productos de PCR	62
2.8.1 Protocolo de purificación QIAquick Gel Extraction	62
2.8.2 Protocolo de ligación con el vector de clonación pGEM-T/pGEM-T Easy	63
2.8.3 Protocolo para la preparación de células competentes	63
2.8.4 Protocolo para transformación de células competentes	63
2.9 Aislamiento de ADN plasmídico, digestión y purificación de las clonas seleccionadas	64
2.9.1 Protocolo de extracción de ADN plasmídico (Miniprep), basado en el método de Birnboim y Doly, 1979	64
2.9.2 Protocolo para digestión de ADN plasmídico	65
2.9.3 Protocolo de purificación QIAquick PCR Purification Kit	65

---

2.9.4 Protocolo de cuantificación por corrimiento en gel	65
2.9.5 Protocolo de cuantificación por fluorometría	66
2.10 Análisis de las secuencias y construcción de árboles filogenéticos	66
2.11 Análisis de PCR en tiempo real cuantitativo con SYBR Green Master Mix	66
<b>Capítulo III</b>	<b>68</b>
<b>Resultados</b>	<b>68</b>
3.1 Crecimiento de las cepas de referencia	68
3.2 Tinciones de Gram	68
3.3 Comparación de los protocolos de extracción de ADN	69
3.4 Selección de oligonucleótidos universales para PCR	71
3.5 PCR anidada con oligonucleótidos universales internos	73
3.6 PCR anidada con oligonucleótidos específicos de género/especie	75
3.7 Análisis filogenético de las secuencias de productos de PCR amplificados con oligonucleótidos universales	77
3.8 Análisis filogenético de las secuencias de productos de la PCR anidadas con oligonucleótidos universales internos	79
3.9 Análisis filogenético de las secuencias de productos de la PCR anidadas con oligonucleótidos específicos de género/especie	81
3.10 Resultados de la PCR en tiempo real	83
3.11 Muestras recientes en proceso	85
<b>Capítulo IV</b>	<b>86</b>
<b>Discusión de resultados</b>	<b>86</b>
<b>Resumen de discusión de resultados</b>	<b>101</b>
<b>Capítulo V</b>	<b>103</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>103</b>
<b>Perspectivas y Trabajo Futuro</b>	<b>104</b>
<b>Referencias</b>	<b>105</b>
<b>Anexos</b>	<b>114</b>

---

## Lista de tablas

No.	Descripción	Pág.
1.	Clasificación de los minerales	7
2.	Propiedades físicas de la calcopirita	9
3.	Ejemplos de plantas productoras de cobre por biolixiviación	15
4.	Plantas que realizan la operación de biooxidación	16
5.	Ejemplos de bacterias acidófilas de interés en biolixiviación de metales	30
6.	Ejemplos de métodos para el análisis de la diversidad microbiana	32
7.	Condiciones de cultivo de las cepas bacterianas de referencia	51
8.	Muestras analizadas	52
9.	Protocolos probados para la extracción de ADN	55
10.	Oligonucleótidos universales de ADNr 16S usados en la PCR directa y la PCR anidada	59
11.	Oligonucleótidos de ADNr 16S específicos de género/especie usados en la PCR anidada	60
12.	Secuencias de oligonucleótidos de ADNr 16S específicos de género/especie usados en la PCR directa y la PCR anidada	61
13.	Operaciones unitarias más importantes de los 3 protocolos de extracción de ADN	70
14.	Alineamiento mediante MegAlign de los oligonucleótidos 533F-1492R con las secuencias de los géneros de interés	70
15.	Alineamiento mediante MegAlign de los oligonucleótidos 23FLP-1391R con las secuencias de los géneros de interés	72
16.	Cuantificación de ADN por fluorimetría de las clonas seleccionadas para secuenciar los productos de las PCR anidadas	75
17.	Cuantificación de ADN por fluorimetría de las clonas seleccionadas para secuenciar los productos de la PCR específicos de género/especie	77
18.	Resumen de resultados de las secciones 3.7 a 3.9	82

---

## Lista de figuras

No.	Descripción	Pág.
1.	Vista panorámica de algunas operaciones de lixiviación en terreros y de las plantas ESDE en Mexicana de Cananea	3
2.	Instalaciones de la planta ESDE 2 de Mexicana de Cananea	4
3.	Terreros de Mexicana de Cananea donde se aplica el proceso de lixiviación/biolixiviación	5
4.	Composición química de algunos de los sulfuros más importantes	8
5.	Roca que contiene al mineral calcopirita en forma masiva	9
6.	Esquema típico de la alteración supergénica de una mena con sulfuros metálicos de cobre	11
7.	Detalle de una partícula de calcopirita sin atacar y atacada con microorganismos termófilos extremos	13
8.	Partículas de pirita y calcopirita en presencia de microorganismos mesófilos	14
9.	Esquema del mecanismo directo de biolixiviación	17
10.	Esquema del mecanismo indirecto de biolixiviación	17
11.	Esquema del mecanismo mixto de biolixiviación	18
12.	Drenaje ácido de mina	20
13.	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	22
14.	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	23
15.	Árbol filogenético de bacterias	24
16.	Árbol filogenético de Archaea	25
17.	Árbol filogenético universal con raíz	27
18.	Esquema del ribosoma 70S de <i>E. coli</i>	34
19.	Esquema del operón <i>rrn</i>	36
20.	Esquema de la técnica de PCR	37
21.	Ciclos de la PCR	38
22.	Representación de emisión de fluorescencia del SYBR Green I al unirse al ADN	41
23.	Mantenimiento de los consorcios bacterianos a 37°C y 50°C	53
24.	Concentrados de las muestras antes de la extracción de ADN	53
25.	Esquema del fragmento a amplificar con los oligos 533F-1391R	58
26.	Esquema del fragmento amplificado con los oligos internos universales	59
27.	Esquema de los vectores de clonación usados en el trabajo	62
28.	Cálculos para la preparación de las diluciones usadas en la curva estándar en la PCR en tiempo real	67
29.	Crecimiento de las cepas de referencia bajo las condiciones indicadas por el proveedor	68
30.	Muestras a las que se les realizó tinciones de Gram	69
31.	Productos de amplificación de PCR de muestras problema con oligonucleótidos universales 533F-1391R	72
32.	Digestión con la enzima <i>EcoRI</i> de las clonas seleccionadas para	72

---

comprobar la presencia del fragmento esperado	
33. Cuantificación en gel de ADN plasmídico de de las clonas seleccionadas para secuenciar	73
34. Productos de amplificación de la PCR anidada con oligonucleótidos universales internos	74
35. Digestión con la enzima <i>EcoRI</i> de las clonas seleccionadas para comprobar la presencia del fragmento esperado	74
36. Productos de amplificación de la PCR anidada con oligonucleótidos específicos	76
37. Digestión con la enzima <i>EcoRI</i> de las clonas seleccionadas para verificar la presencia del fragmento esperado	76
38. Árbol filogenético de secuencias parciales de ADNr 16S de clonas aisladas en este estudio con los oligonucleótidos universales 533F-1391R	78
39. Árbol filogenético de las secuencias parciales de ADNr 16S de clonas aisladas en este estudio con PCR anidada	80
40. Árbol filogenético de las secuencias parciales de ADNr 16S de clonas aisladas en este estudio usando oligos específicos de género/especie	81
41. Curva estándar para la PCR en tiempo real del género <i>Leptospirillum</i>	84
42. Curva estándar para la PCR en tiempo real del género <i>Sulfobacillus</i>	84
43. Curva de disociación para el género <i>Leptospirillum</i>	85
44. Curva de disociación para el género <i>Sulfobacillus</i>	85
45. Mapa de las endonucleasas de restricción de 6 pb, que cortan en la secuencia de ADNr 16S de <i>L. ferrooxidans</i> y <i>L. ferriphilum</i>	92

---

**Lista de anexos**

No.	Descripción	Pág.
1.	Mapa de los terreros República y Quebalix I de Mexicana de Cananea	114
2.	Mapa de los terreros Kino y Quebalix II de Mexicana de Cananea	115
3.	Condiciones de cultivo de las cepas de referencia	116
4.	Preparación de medios de cultivo	117
5.	Preparación de soluciones	119
6	Secuencias reportadas de las clonas enviadas al CINVESTAV Unidad Irapuato	121

---

## Abreviaturas

°C	Grados centígrados
<i>A. alternatum</i>	<i>Acremonium alternatum</i>
<i>A. caldus</i>	<i>Acidithiobacillus caldus</i>
<i>A. ferrooxidans</i>	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
<i>A. fontana</i>	<i>Aquamonas fontana</i>
<i>A. like hyphomycete</i>	<i>Acremonium like hyphomycete</i>
<i>A. sp. CSSF-1</i>	<i>Acremonium sp. CSSF-1</i>
<i>A. sp. HAW-OCF3</i>	<i>Acremonium sp. HAW-OCF3</i>
<i>A. thiooxidans</i>	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
<i>A. vulcanalis</i>	<i>Alicylobacillus vulcanalis</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
<i>B. pickettii</i>	<i>Burkholderia pickettii</i>
<i>C. gracilis</i>	<i>Curvibacter gracilis</i>
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
dNTPs	2´deoxinucleótido 5´-trifosfato
<i>E. album</i>	<i>Engyodontium album</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	di-sodio etilendiamina tetracetato
ESDE	Extracción por Solventes y Depósito Electrofítico
<i>F. acidarmanus</i>	<i>Ferroplasma acidarmanus</i>
<i>F. acidophilum</i>	<i>Ferriplasma acidophilus</i>
<i>F. cyprexacervatum</i>	<i>Ferroplasma cyprexacervatum</i>
<i>F. sp. JTC3</i>	<i>Ferroplasma sp.JTC3</i>
h	hora
HCl	Ácido clorhídrico
IPTG	Isopropil D-tiogalactopiranosido
kb	kilo base
kDa	kilo Dalton

---

<i>L. ferriphillum</i>	<i>Leptospirillum ferriphillum</i>
<i>L. ferrooxidans</i>	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>
LB	Luria-Bertani
M	molar
<i>M. cinctum</i>	<i>Myrothecium cinctum</i>
<i>M. sedula</i>	<i>Metallosphaera sedula</i>
min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
ng	nanogramo
nmol	nanomolar
<i>P. brasiliensis</i>	<i>Planctomyces brasiliensis</i>
<i>P. fumosoroseus</i>	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>
<i>P. isarioides</i>	<i>Paecilomyces isarioides</i>
<i>P. limnophilus</i>	<i>Planctomyces limnophilus</i>
<i>P. oshimae</i>	<i>Picrophilus oshimae</i>
<i>P. sp.</i>	<i>Pelomonas sp.</i>
<i>P. sp. BF46</i>	<i>Pseudomonas sp. BF46</i>
<i>P. tenuipes</i>	<i>Paecilomyces tenuipes</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVP	polivinil pirrolidona
<i>R. pickettii</i>	<i>Ralstonia pickettii</i>
s	segundos
<i>S. acidophilus</i>	<i>Sulfobacillus acidophilus</i>
<i>S. ambivalens</i>	<i>Sulfobacillus ambivalens</i>
<i>S. sibiricus</i>	<i>Sulfobacillus sibiricus</i>
<i>S. thermophilus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>S. thermosulfidooxidans</i>	<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>
<i>S. thermotolerans</i>	<i>Sulfobacillus thermotolerans</i>

---

---

<i>S. yellowstonensis</i>	<i>Sulfobacillus yellowstonensis</i>
SDS	Dodecil sulfato de sodio
<i>T. acidophilus</i>	<i>Thermoplasma acidophilus</i>
<i>T. aquaticus</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>T. brockianus</i>	<i>Thermus brockianus</i>
<i>T. igniterrae</i>	<i>Thermus igniterrae</i>
TAE	Buffer tris-acetato
Taq polimerasa	Thermus aquaticus DNA polimerasa
Tris	Tris(hidroximetil)amonimetano
UV	Ultravioleta
w/v	peso por volumen
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indol-D-galactopiranosido
µg	microgramos
µl	microlitro
µmol	micromolar

---

## Glosario

**Archaea.** Clase de procariontes que constituyen uno de los tres linajes evolutivos diferenciados de los organismos actuales; también se denominan arqueobacterias y arqueanos. Estos procariontes, son más similares a los eucariontes que a las denominadas bacterias verdaderas (eubacterias).

**Bacteria.** Se emplea para denominar a todos los organismos unicelulares sin núcleo diferenciado, son los más abundantes del planeta, generalmente poseen pared celular compuesta de peptidoglicanos.

**Biolixiviación.** Se aplica fundamentalmente para la remoción de una sustancia de interés (generalmente, un metal) desde una estructura sólida como el mineral a una forma soluble en solución acuosa desde la cual será posible extraerla. Las bacterias y arqueas que participan en este proceso pueden encontrarse directamente asociadas a los minerales sulfurosos; entre ellas se destacan las bacterias del género *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* que actúan a temperaturas moderadas (mesófilas), a pH muy bajos (acidófilas) y sin requerimientos de fuentes orgánicas de carbono (utilizan el dióxido de carbono del aire). Esta tecnología es utilizada comercialmente para la recuperación de cobre en muchos países del mundo (prácticamente el 30 % se recupera por esta vía) entre los cuales se destaca claramente Chile (mayor productor y exportador mundial).

**Biominería.** Consta de diferentes procesos de la explotación de los minerales, aplicando microorganismos vivos o muertos, o sus productos de metabolismo abarcando desde la concentración de las especies de interés (a través de la bioflotación), de la recuperación de los elementos presentes en ellas o facilitando su recuperación (biolixiviación y biooxidación respectivamente) hasta su acción en tareas de remediación ambiental (biorremediación).

**Biooxidación.** Consiste en un tratamiento con microorganismos capaces de promover la oxidación de la matriz de sulfuros. La biooxidación permite la fácil liberación del oro refractario contenido en minerales sulfurosos

---

(comúnmente pirita y arsenopirita), y, además permite extraer y recuperar otros metales, como cobre y zinc, que constituyen la matriz de sulfuros minerales.

**Blisters.** Envase de plástico transparente que contiene el producto como en una ampolla permitiendo al mismo tiempo presentarlo y protegerlo de golpes durante las operaciones de manipulación y transporte.

**Drenaje ácido de mina.** Es una solución o efluente contaminante de naturaleza inorgánica producida por múltiples factores a partir de la alteración (oxidación) de minerales sulfurosos que se encuentran expuestos al aire, al agua y a microorganismos. Se encuentra frecuentemente en residuos de minas abandonados que contienen minerales sulfurosos metálicos. Se trata de una contaminación múltiple, ya que se producen drenajes fuertemente ácidos, con altas concentraciones de sulfato y de iones metálicos en solución y con precipitados de hidróxidos férricos. La formación de ácido sucede cuando un grupo de bacterias oxidantes del azufre sulfuro y de hierro reducido, transforman la pirita y otros sulfuros en ácido sulfúrico. Se trata de bacterias que son capaces de vivir a valores de pH muy bajos, por esta razón se las llama bacterias acidófilas. Además, obtienen todos sus nutrientes de los elementos minerales que se encuentran en una mina.

**Especie mineral.** Individuos minerales que se caracterizan por una estructura determinada y por una composición química definida dentro de un rango de variaciones y que se encuentran en equilibrio bajo unas condiciones termodinámicas determinadas.

**Lixiviado.** Es el líquido producido por la disolución de minerales o metales bajo condiciones naturales o controladas por acción de un reactivo orgánico o inorgánico de origen natural o antropógeno, o bien por la acción de microorganismos. Puede contener tanto material suspendido o disuelto, generalmente ambos.

**Mesófilos.** Microorganismos que tienen una temperatura óptima de crecimiento comprendida entre 20°C y 45°C. La temperatura mínima se encuentra en el rango de 15°C a 20°C y la temperatura máxima en torno a 45°C.

---

**Mineral.** Compuesto natural inorgánico de estructura cristalina formado como resultado de procesos geológicos

**Montón.** También se llaman pilas, donde se depositan minerales de baja ley económica. El material se amontona comúnmente sobre una superficie impermeabilizada para aplicar un proceso de lixiviación o biolixiviación cuyo tratamiento dura de 1-2 años.

**Organismos autótrofos obligados.** Utilizan el CO<sub>2</sub> del aire como única fuente de carbono

**Organismos heterótrofos.** Obtienen energía metabolizando compuestos orgánicos

**Organismos quimiolitótrofos.** Son aquellos que obtienen su energía mediante la oxidación de materiales inorgánicos

**Saprófito.** En Ecología se llama saprotrofia a la dependencia que muchos organismos tienen para su nutrición de los residuos procedentes de otros organismos, tales como hojas muertas, cadáveres o excrementos.

**Sideróforos.** Son proteínas usadas por las bacterias para absorber hierro, imprescindible para su metabolismo.

**Tajo.** Es un corte profundo hecho con un instrumento cortante, también significa cortadura en un terreno y lugar de trabajo.

**Terrero.** Mineral de baja ley que se apila o amontona en un área previamente preparada y cuyos valores metálicos se recuperan por el proceso de lixiviación. Generalmente, se coloca tal y como procede de mina.

**Termófilos.** Organismos adaptados a temperaturas altas como las que se alcanzan en aguas termales y géiseres, en fuentes hidrotermales submarinas y en las tuberías domésticas de agua caliente. Existe una gran diversidad de bacterias, hongos, plantas y animales que pueden crecer a temperaturas de hasta 50° C; los termófilos pueden crecer y reproducirse por encima de los 50° C. En función de su temperatura óptima de crecimiento se pueden clasificar en termófilos moderados (50-65° C), termófilos (65-85 ° C) y termófilos extremos (> 85° C).

---

**Variedad mineral.** Conjunto que abarca las variaciones de composición y/o estructuras posibles dentro de una especie mineral y, por consiguiente, las modificaciones en las propiedades químicas, en la morfología de los cristales de dicha especie.

---

## Resumen

La detección y tipificación de microorganismos acidófilos de ambientes mineros, macro o microscópicamente mediante su cultivo con medios selectivos requiere de varios días y en algunos casos su identificación llega solo a nivel de género. El método de tipificación basado en el análisis de genes de ADNr 16S ha probado ser una herramienta poderosa, que ha logrado expandir nuestro conocimiento de la diversidad microbiana y su filogenia. Los métodos moleculares tienen la ventaja de poder tipificar organismos que se encuentran en pequeñas cantidades o que son de difícil cultivo *in vitro* y han tenido una valiosa aplicación en la tipificación de consorcios bacterianos de la industria minera en procesos de biolixiviación, los cuales son procesos que ayudan a recuperar metales de sulfuros primarios difícilmente recuperables de manera económica exclusivamente por métodos químicos. Dentro de los organismos importantes en estos procesos, podemos citar a bacterias pertenecientes al género *Leptospirillum*, *Sulfobacillus*, *Acidithiobacillus*, *Acidiphilium* y archaeas pertenecientes al género *Ferroplasma*. Estos microorganismos forman parte de la comunidad microbiana responsable de la generación del drenaje ácido de mina. Dentro de sus características de estas bacterias podemos citar que son quimilito autótrofas, tienen movilidad por la presencia de flagelo y poseen respuestas de quimiotaxis para censar y adaptarse a su medio ambiente, lo cual es importante ya que tienen que adherirse a la superficie de los minerales de los cuales obtienen su energía. Por ejemplo, el género *Ferroplasma* spp. son microorganismos acidófilos que ayudan a acelerar la velocidad de extracción de metales a partir de minerales sulfurosos, mediante la regeneración del  $\text{Fe}^{3+}$  y oxidando pirita a pH ácido. Son aerobios, heterótrofos, crecen mejor en presencia de extracto de levadura.

En el presente trabajo se seleccionó un método adecuado para la extracción de ADN de consorcios microbianos procedentes de escurrimientos y de muestras de mineral recuperadas en barrenos de terreros de la empresa Mexicana de Cananea (Cananea, Sonora, México), así como de pruebas en reactores y de cultivos líquidos mantenidos en matraces. Se evaluó la composición de la diversidad bacteriana, empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de secuencias de ADNr 16S, para lo cual se seleccionaron oligos universales 533F y 1391R que amplifican archaeas y bacterias y se diseñaron oligos universales (UI840F y UI840R) para anidar productos de PCR. Se probaron 8 oligos específicos de especie y los productos obtenidos de la amplificación se ligaron en vectores comerciales pGEM-T o pGEM-T easy y se transformaron en cepas de *Escherichia coli* Top-10F'. Las clonas seleccionadas se secuenciaron y se realizó el análisis filogenético que nos permitió la tipificación de las mismas como pertenecientes a los géneros *Leptospirillum*, *Ferroplasma*, *Sulfobacillus*, *Streptococcus*, *Thermus*, *Acremonium*, por citar los más importantes para el proceso de biolixiviación. También se realizó la estandarización del protocolo para la cuantificación de bacterias (*Leptospirillum* y *Sulfobacillus*) que realizan biolixiviación de minerales que contienen metales

---

sulfurosos, usando oligos específicos de género para ADNr 16S por medio de PCR en tiempo real anidado, el cual puede emplearse para dar un seguimiento de la carga bacteriana predominante en ciertas etapas del proceso de biolixiviación.

Este es el primer trabajo de tipificación molecular de consorcios usados en Mexicana de Cananea para biolixiviación, lo cual sienta las bases para el entendimiento de los procesos biológicos que se desarrollan durante la recuperación de metales.

---

**Abstract****CHARACTERIZATION BY MOLECULAR METHODS OF ACIDOPHILIC MICROORGANISMS PRESENT IN WASTE-ROCK LEACHING OPERATIONS AT MEXICANA DE CANANEA**

The detection and micro and macro characterization of acidophilic microorganisms present in a mine environment by culturing on a selective medium requires the employment of several days and in some cases it is only possible the identification at genus level. The characterization method based on gene analysis of 16S rDNA has proved to be a powerful tool to achieve a deeply knowledge regarding the microbial diversity and its phylogeny. The molecular methods have the advantage of characterize organisms which are present at small traces or which are difficult to culture *in vitro* conditions. These methods have been very valuable in the characterization of bacterial consortium in bioleaching processes of recalcitrant materials for the mining industry. The bioleaching process involves a high capacity to recover primary sulfur metals which are hardly extractable in an economical way by chemical methods. Among the most important microorganisms for this process we can mention bacteria such as *Leptospirillum*, *Sulfobacillus*, *Acidithiobacillus*, *Acidiphilium* and archaea such as the *Ferroplasma* genus. These microorganisms belong to the microbial community responsible of the acid mine drainage generation. These microorganisms are chemiolithoautotrophic, they have mobility due to the presence of a flagellum and possess chemiotaxis responses in order to sense and to adapt to its environment which is important because they have to attach to the mineral surfaces to obtain energy. The *Ferroplasma* spp. are acidophilic microorganisms which accelerate the sulfide minerals alteration through the Fe<sup>3+</sup> regeneration, by oxidizing the pyrite and the ferrous ion under acidic conditions. It is also aerobic and heterotrophic microorganism and grows better in the presence of yeast extract.

In the present work, we selected an efficient method for the DNA extraction of microbial consortium present in acid drains, reactors, large-drill samples and liquid cultures recovered from the waste-rock leaching operations in Mexicana de Cananea (Cananea, Sonora, México). We used the polymerase chain reaction technique (PCR) for the amplification of the 16S rDNA sequences to evaluate the composition of the bacterial diversity. The universal primers 533F and 1391R were used. These amplified DNA from archaea and bacteria. In addition we designed universal primers (UI840F and UI840R) to obtain nested PCR products. We also tested 8 species specific primers and the amplified products were ligated to commercial vectors pGEM-T/pGEM-T easy, and were transformed in *Escherichia coli* Top-10 F' strains. The selected clones were sequenced and the phylogenetic analysis was performed allowing us to typify the samples. The results showed that samples analyzed belong to the *Leptospirillum*, *Ferroplasma*, *Sulfobacillus*, *Streptococcus*, *Thermus* and *Acremonium* genus, to mention the most relevant in the bioleaching process.

---

We also standardized the protocol for the bacterial quantification of *Leptospirillum* y *Sulfobacillus* responsible of the bioleaching of sulfide minerals using the nested real time PCR technique employing genus specific primers for 16S rDNA. This technique could be used for monitoring the predominant bacterial load in certain stages of the bioleaching process.

This is the first work of molecular characterization of consortiums used at Mexicana de Cananea for bioleaching. This work establishes the basis for the understanding of the biologic process taking place during the copper extraction.

---

## Introducción

### 1.1 Antecedentes

#### 1.1.1 Historia Cananea

El 30 de Septiembre de 1899, William Cornell Greene constituye y protocoliza la empresa “The Cananea Consolidated Copper Company, S.A.” conocida como las 4C. Con este hecho se inicia la consolidación y la época moderna de la minería en Cananea.

The Cananea Consolidated Copper Company, S.A., adquirió las principales minas que se encontraban en explotación tales como El Capote, El Oversight, Cobre grande y Puertecitos. Con esto se inició el proceso de consolidación de las operaciones mineras y, con el flujo de importantes inversiones, se logró el desarrollo integral para el beneficio y aprovechamiento de cobre, plata y oro.

En 1917, las 4-C fueron adquiridas por el consorcio minero The Anaconda Copper Mining Company. El relevante descubrimiento de la mundialmente famosa mina La Colorada en 1926, de donde se extrajeron 7 millones de toneladas de mineral con ley promedio de 6.00% de cobre, 0.40% de molibdeno e importantes contenidos de oro y plata, permitieron a la Anaconda superar la gran crisis de 1929. La riqueza de este yacimiento contribuyó a la modernización de las instalaciones metalúrgicas y reposición de equipos mineros. Durante el aprovechamiento de La Colorada, por primera vez en el mundo, se logró beneficiar el metal molibdeno como subproducto de un yacimiento de cobre.

A principios de la década de los 40’s, se inicia la explotación de un yacimiento con mineral de baja ley aplicando el método de minado a cielo abierto, que consiste en la remoción de la capa superficial o sobrecarga de la tierra para hacer accesibles los extensos yacimientos de mineral de baja ley, a gran escala. Este hecho histórico en la vida de la mina de Cananea, el cual coincidió con el agotamiento del mineral rico de La Colorada, colocó a esta operación entre las

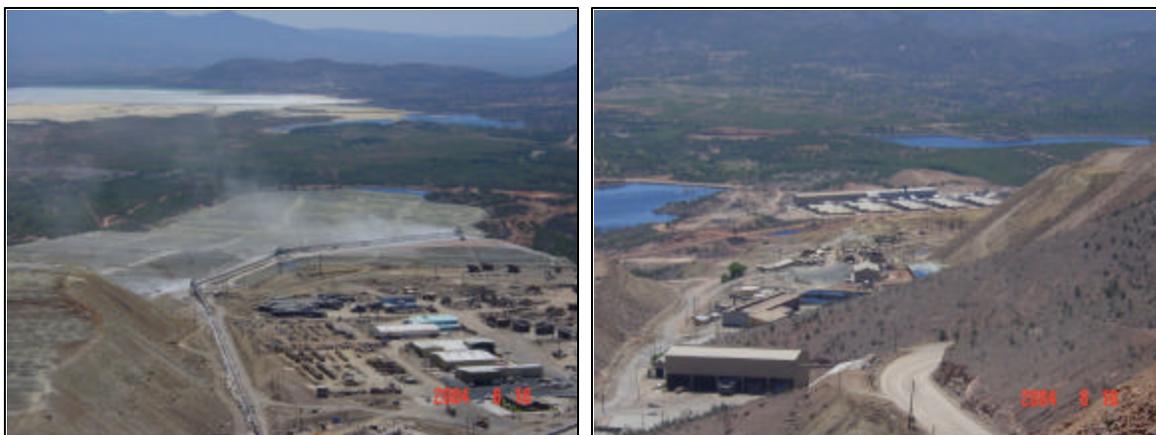
más modernas y eficientes en el aprovechamiento de minerales de cobre considerados de baja ley o contenido. El primer tajo también se llamó Tajo La Colorada. Conjuntamente con el inicio del Tajo La Colorada, se puso en operación una nueva concentradora con capacidad de 12,000 toneladas por día. En esos años el cobre se consideraba metal estratégico por los enfrentamientos bélicos de la Segunda Guerra Mundial.

En 1948 se llevó a cabo el primer envío de cobre ampollado (blister) a la refinería de Cobre de México, S.A., en México, D.F. A partir de entonces Cananea ha abastecido más del 50% del cobre que el país ha requerido para su industrialización. Después de pasar por un periodo crítico para la industria de cobre en los años 50's, se da otro importante impulso a la vida minera con el arranque en 1960 de los trabajos en el Tajo Cananea (el cual fue una expansión del Tajo Sonora Hill). El minado del Tajo Cananea se prolongó hasta 1980.

En el año de 1971 se consumó el proceso de Mexicanización en la Compañía Minera de Cananea, S.A. de C.V. El 51% de las acciones fueron vendidas por Anaconda a inversionistas mexicanos y a entidades descentralizadas del gobierno. En Septiembre de 1986 se arranca la operación de una nueva concentradora con una capacidad de 62,500 toneladas por día, que se sumaban a las 30,000 toneladas por día de la vieja concentradora. Tres años después, a raíz de diversos problemas principalmente de origen financiero, Compañía Minera de Cananea se declara en quiebra y suspende sus operaciones por casi 3 meses para después entrar a una operación administrada por orden judicial hasta el 30 de Septiembre de 1990.

El 1 de Octubre del mismo año Mexicana de Cananea, S.A. de C.V., filial del Grupo México, comienza a administrar y operar la mina de Cananea (Figura 1). En abril de 2005, Southern Peru Copper Corporation (SCC) adquirió Minera México y sus subsidiarias a través de un acuerdo de fusión. Después de dicha transacción Grupo México aumentó su participación indirecta en el capital social

de SCC de un 54.2% a un 75.1%. En octubre, Southern Peru Copper Corporation cambió su denominación por Southern Copper Corporation (Ayala, 1999).



**Figura 1.** Vista panorámica de algunas operaciones de lixiviación en terreros y de las plantas ESDE en Mexicana de Cananea.

## **1.1.2 Industrial Minera México**

Minera México (MM) es la compañía minera más grande en México. MM produce cobre, zinc, plata, oro y molibdeno. MM opera a través de subsidiarias que se agrupan en tres compañías separadas: Mexicana de Cobre, Mexicana de Cananea e Industrial Minera México.

### **1.1.2.1 Mexicana de Cobre**

Mexicana de Cobre opera una mina de cobre de tajo abierto y la operación de 90,000 toneladas métricas por día de mineral de cobre en la Concentradora, 22,000 toneladas métricas de cobre en su Planta ESDE, unas 300,000 toneladas métricas por año en la Fundición, unas 300,000 toneladas métricas por año en la Refinería, unas 150,000 toneladas métricas por año en la Planta de Alambión, unos 15 millones de onzas por año de plata y 100,000 onzas por año de oro en la Planta de Metales Preciosos.

---

### 1.1.2.2 Mexicana de Cananea

Mexicana de Cananea, opera también una mina de cobre de tajo abierto que está catalogada como una de las más grande del mundo en depósitos de mineral de cobre, opera una Concentradora con 80,000 toneladas métricas por día de cobre, y dos Plantas ESDE con una capacidad combinada de 55,000 toneladas métricas por año de cátodos de cobre recuperados por electrodeposición (Figura 2).



Figura 2. Instalaciones de la planta ESDE 2 de Mexicana de Cananea.

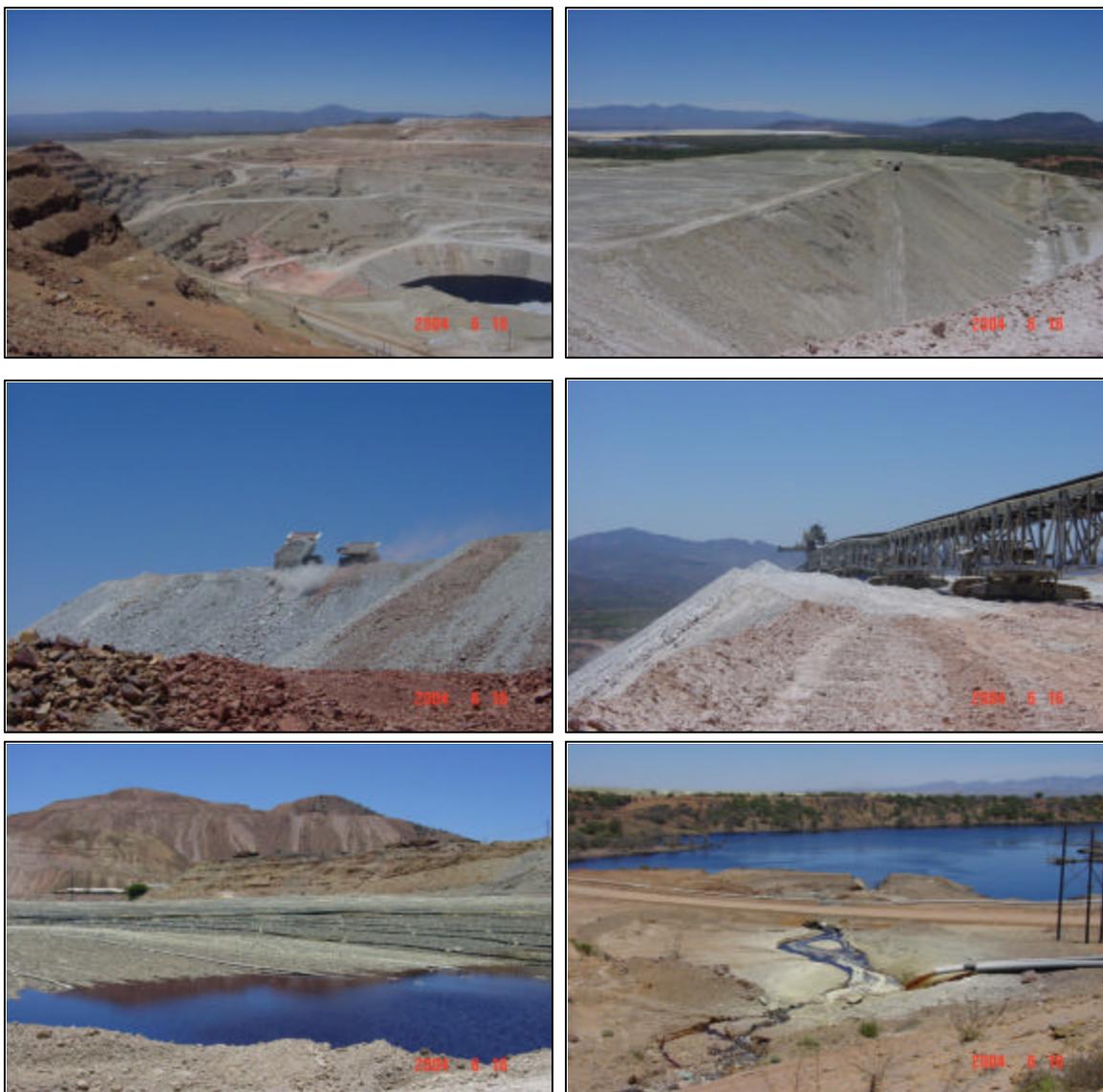
### 1.1.2.3 Industrial Minera México

La empresa Industrial Minera México opera en siete minas subterráneas localizadas en la parte central y norte de México, donde se producen concentrados de zinc, cobre, plata y oro. Esta empresa incluye operaciones de beneficio de minerales empleando la concentración por flotación de minerales de zinc y cobre, entre las que destacan las de San Luis Potosí (Charcas, la mina en producción más grande de México) y de Zacatecas (San Martín, la mina subterránea más grande de México). También incluye operación de minas de carbón en el NW de México.

### 1.1.3 Problemática actual de Mexicana de Cananea

Actualmente, se extrae y recupera cobre por el proceso de lixiviación/biolixiviación ácida en terreros a partir de menas de baja ley (0.15-0.3% Cu). Las menas de cobre donde se extrae el mineral por el proceso de

lixiviación/biolixiviación en terreros de Mexicana de Cananea (Figura 3), contienen principalmente sulfuros secundarios de cobre (calcosita  $\text{Cu}_2\text{S}$  y covelita  $\text{CuS}$ ) aunque también se presentan ocasionalmente minerales oxidados, logrando extracciones de cobre cercanas a 65%. Sin embargo, en los últimos años han disminuido las reservas de sulfuros secundarios, quedando sulfuros primarios como la calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) en el mineral lixiviable, disminuyendo consecuentemente la recuperación de cobre a solo el 30%, debido a que su lixiviación es refractaria en las condiciones actuales del proceso.



**Figura 3.** Terreros de Mexicana de Cananea donde se aplica el proceso de lixiviación/biolixiviación.

#### **1.1.4 Los minerales**

Los minerales son cuerpos de materia sólida del suelo que pueden aparecer de formas muy diversas, ya sea de forma aislada o como componentes fundamentales de las rocas. Las características de los minerales son: compuestos de naturaleza inorgánica, se encuentran en la naturaleza, tienen una estructura cristalina definida y composición química fija. Frecuentemente, los minerales se encuentran en la naturaleza dentro de las rocas y en concentraciones económicas constituyen las llamadas menas (García del Amo, 2000).

##### **1.1.4.1 Historia de la clasificación de los minerales**

Los principios de la clasificación actual de los minerales, basados en la química de estos, fueron establecidos por el químico y mineralogista sueco Berzelus entre 1779 y 1848. El mismo concepto fue desarrollado en la clasificación del geólogo estadounidense James Dana, en 1837. En su obra “A System of Mineralogy”, Dana propuso una clasificación atendiendo a la estructura y a la composición química del mineral (citado por García del Amo, 2000).

El desarrollo de las técnicas de difracción de rayos X permitieron que las estructuras cristalinas fueran conocidas y por lo tanto empleadas para las clasificaciones mineralógicas; la introducción de este criterio permite precisar y crear subdivisiones dentro de las clases definidas según los criterios químicos.

##### **1.1.4.2 Clasificación de los minerales**

La clasificación cristalocímica del mineralogista ruso A. S. Povarennykh, utiliza tanto las propiedades químicas, como estructurales de los minerales (citado por García del Amo, 2000) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación de los minerales.

Tipo	Clase
Compuestos homoatómicos y similares	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sustancias simples</li> <li>2. Carburos, siluros, nitruros y fosfuros</li> </ol>
Sulfuros y compuestos análogos	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Arsenuros, antimonuros, bismuturos</li> <li>2. Telururos</li> <li>3. Sulfuros y selenuros</li> </ol>
Compuestos del oxígeno	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Óxidos</li> <li>2. Hidróxidos y oxihidratos</li> <li>3. Silicatos, borosilicatos, aluminosilicatos, etc.</li> <li>4. Boratos</li> <li>5. Vanadatos</li> <li>6. Arsenatos</li> <li>7. Fosfatos</li> <li>8. Selenatos y teluratos</li> <li>9. Wolframatos y molibdatos</li> <li>10. Cromatos y selenatos</li> <li>11. Sulfatos</li> <li>12. Carbonatos</li> <li>13. Iodatos</li> <li>14. Nitratos</li> </ol>
Haluros	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cloruros, bromuros, ioduros</li> <li>2. Oxiclорuros y oxifloruros</li> <li>3. Fluoruros</li> </ol>

Tomado de: [http://www.uned.es/cristamine/min\\_descr/mindesc\\_mrc.htm](http://www.uned.es/cristamine/min_descr/mindesc_mrc.htm)

Esta clasificación utiliza los siguientes criterios:

- Los tipos de minerales se determinan por criterios químicos, considerando el tipo de compuestos y el carácter más significativo del tipo de enlace atómico. De arriba a abajo se pasa de minerales con enlaces interatómicos de tipo metálico-covalente (compuestos homoatómicos y sulfuros) a otros de tipo covalente (óxidos) hasta llegar a minerales con enlaces esencialmente iónicos (haluros).
- Las clases minerales se determinan según criterios químicos considerando el tipo de aniones o los radicales principales que determina el tipo de compuesto.

La secuencia de clases dentro de un tipo se determina por disminución de valencia y crecimiento de la electronegatividad para los aniones simples, mientras que para los radicales la secuencia se determina por disminución de carga, por

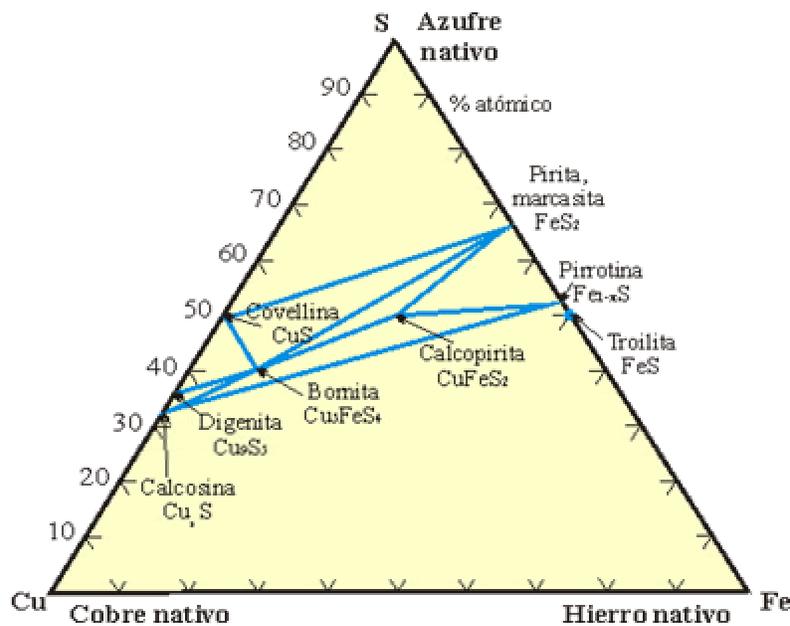
ejemplo  $[\text{ROn}]4-$  -  $[\text{ROn}]3-$  -  $[\text{ROn}]2-$  -  $[\text{ROn}]1-$  donde "n" puede ser 4 ó 3, así como por crecimiento en la fuerza relativa de los enlaces.

- Las subclases minerales se determinan según criterios de tipo estructural que determinan la distribución de los enlaces más fuertes.

Cada clase de minerales puede ser subdividida en subclases considerando el carácter de la estructura atómica del mineral. Dentro de una misma clase pueden aparecer varias subclases estructurales, como los sulfuros y los silicatos, otras por el contrario presentan una o a lo sumo dos subclases.

### 1.1.4.3 Descripción de sulfuros

Una parte importante de los sulfuros son minerales de interés económico. Están formados siempre por la combinación del azufre con uno o más metales. Los minerales de esta clase son en su mayoría opacos, con colores vivos y con rayas de colores característicos. Aquellos minerales no opacos como el cinabrio, el rejalgar, el oropimente o la esfalerita, son transparentes (Figura 4).



**Figura 4.** Composición química de algunos de los sulfuros más importantes (García del Amo, 2000).

---

#### 1.1.4.4 Descripción de la calcopirita

La calcopirita es el mineral de cobre más ampliamente distribuido. Del griego *khalkós*, cobre y *pyrós*, fuego, obtiene el nombre de pirita de cobre. Su fórmula es  $\text{FeCuS}_2$ . Algunas de sus propiedades se muestran en la Tabla 2 y una foto en la Figura 5.

**Tabla 2.** Propiedades físicas de la calcopirita

Sistema cristalográfico	Tetragonal
Color	Amarillo latón
Lustre	Metálico
Dureza	5.5-6
Fractura	Concoidea o irregular
Exfoliación	Poco marcada
Raya	Negra verdosa

#### Aspecto

Frecuentemente se encuentra en masas compactas, los cristales son raros. Se confunde fácilmente con la pirita pero su color es más amarillento.

#### Yacimiento

Se encuentra en general, en vetas metálicas o en rocas más antiguas, muchas veces con pirita o sulfuro de hierro.



**Figura 5.** Roca que contiene al mineral calcopirita en forma masiva (García del Amo, 2000).

---

#### 1.1.4.5 Presencia de cobre en los minerales sulfurosos

El cobre es un metal que no existe en estado puro, sino que esta combinado en una gran variedad de minerales los que se dividen en tres clases: en la primera categoría están los óxidos que se disuelven muy fácilmente en un ácido suave, permitiendo una rápida extracción de cobre, en segundo lugar están los sulfuros secundarios, como la calcosita  $\text{Cu}_2\text{S}$  y la covelita  $\text{CuS}$ , que solo se disuelven por la oxidación mediante el uso de un ácido muy fuerte y un agente oxidante; finalmente, están los sulfuros primarios, la calcopirita  $\text{CuFeS}_2$  y la bornita  $\text{Cu}_5\text{FeS}_4$ , que son minerales insolubles o muy lentamente solubles con tratamiento ácido, por lo que no se lixivian, sino que son tratados mediante piro metalurgia (fundición).

#### 1.1.4.6 Yacimientos de sulfuros

Los yacimientos con sulfuros metálicos expuestos a condiciones de alteración por intemperismo sufren una serie de procesos supergénicos de alteración con zonación vertical en el que se destacan tres grandes zonas (Figura 6):

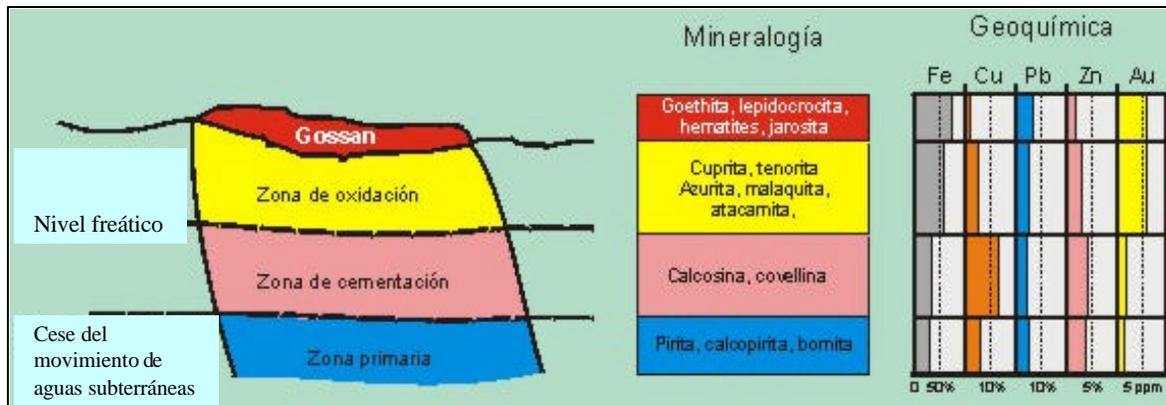
- La zona de oxidación, comprendida entre el nivel freático y la superficie; está caracterizada por un importante enriquecimiento en óxidos e hidróxidos de hierro.

Se puede considerar dividida en dos subzonas: la zona superficial o de Gossan, formada por una acumulación masiva de hidróxidos de hierro y, la situada por debajo de la superficie, en la que aún podemos tener compuestos metálicos oxidados, como sulfatos y cloruros.

- La zona de enriquecimiento secundario, está situada por debajo del nivel freático, es en la que se producen enriquecimientos en sulfuros de cobre secundarios tipo calcosita-covelita.

- La zona primaria, corresponde a los sulfuros primarios inalterados.

En conjunto, la zona de oxidación se caracteriza por un importante enriquecimiento superficial en hidróxidos de hierro tipo goethita, disolución de metales como Zn y Cu fundamentalmente, y concentración diferencial de oro y plata, que además de estar como impurezas en las redes cristalinas de los sulfuros, pasan a estar como elementos nativos, lo que favorece su explotación.



**Figura 6.** Esquema típico de la alteración supergénica de una mena con sulfuros metálicos de cobre (Higuera Higuera, 2006).

#### 1.1.4.7 Recuperación de cobre

La recuperación de cobre por lixiviación/oxidación de la calcosita ( $Cu_2S$ ) es un proceso industrial bien establecido; sin embargo, las más abundantes menas de cobre tienen calcopirita ( $CuFeS_2$ ) que es refractario a este tratamiento industrial. Por esto, en años recientes, se ha incrementado el interés en la aplicación de microorganismos capaces de promover la lixiviación del cobre a partir de sulfuros minerales a diferentes temperaturas (Liu y col., 2006).

### 1.2 Biolixiviación

La biolixiviación de minerales de cobre fue practicada empíricamente muchos siglos antes del descubrimiento de las bacterias como responsables del proceso. En China fue empleada al menos 100 ó 200 años a. C. y en Europa por lo menos desde el siglo II. Durante miles de años se lixivió cobre a partir de minerales de baja ley, sin que los mineros se dieran cuenta que esta extracción es imposible sin la presencia de una bacteria que crece en las minas (Guerrero-

---

Rojas, 1990 y 1998). Esta bacteria fue denominada *Thiobacillus ferrooxidans* por su capacidad de oxidación de especies reducidas de azufre y de hierro, cuando se descubrió en 1947 que su presencia en las aguas de mina del Río Tinto en Huelva, España; causaban el gran deterioro que sufrían los equipos metálicos en las instalaciones de la mina (Leiva, 1999). Este microorganismo acelera el proceso de oxidación hasta un millón de veces respecto a la oxidación química. Las aguas del río presentan características de acidez elevada y gran concentración de metales (González-Toril, 2003). Al proceso en el que intervienen las bacterias se le llamó biolixiviación, del griego *bios*-vida y del latín *lixivia*-lejía, término que reflejaba la capacidad de las bacterias para aumentar el poder corrosivo del agua Departamento de Ingeniería Metalúrgica de la Facultad de Química de la UNAM, 2001.

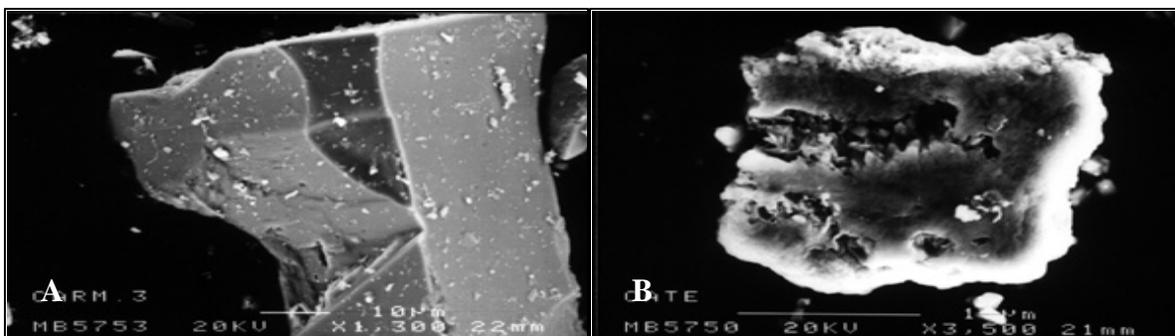
La formación de ácido ocurre cuando un grupo de bacterias oxidantes de especies reducidas de azufre y de hierro transforman la pirita y otros sulfuros en ácido sulfúrico. Estas bacterias son capaces de vivir a pH muy bajos; por esta razón se las llama bacterias acidófilas. Además, ellas obtienen todos sus nutrientes de los elementos minerales que se encuentran en una mina (Goebel y Stackebrandt, 1995). La más conocida de estas bacterias es *Thiobacillus ferrooxidans*, que se emplea actualmente en los procesos de biolixiviación de minerales. Sin embargo, estas bacterias también tienen su lado oscuro, que se manifiesta en la generación de ácido y la posterior lixiviación de metales tóxicos desde desechos abandonados de procesos mineros. A esto lo podemos llamar la “enfermedad bacteriana” de las minas y de los relaves abandonados (Cotoras, 1996).

La “enfermedad” se inicia cuando se encuentran los tres principales agentes causantes: el aire, el agua y las bacterias ferrooxidantes. En esta condición las bacterias atacan a la pirita contenida en un relave o en desechos de la minería y la oxidan, generando ácido y sulfato ferroso. El ión ferroso puede seguir siendo oxidado por las bacterias, para producir el ión férrico. Este último ión

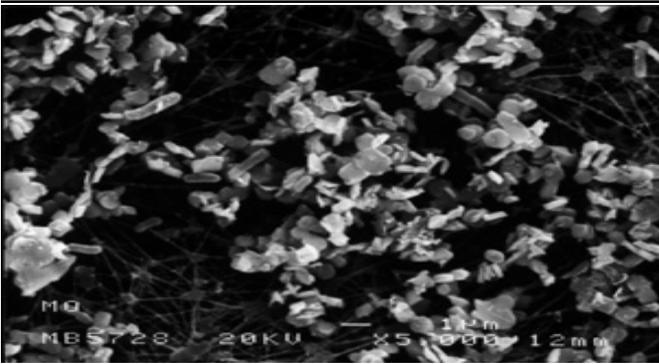
posee capacidades oxidantes muy fuertes, por lo que colabora con la acción de la bacteria, disolviendo diferentes metales que se encuentran en el mineral. La turbidez se genera al precipitar los hidróxidos férricos. La acción concertada del aire, agua y bacteria no se detiene espontáneamente, más bien se potencia a sí misma debido a que va generando las condiciones de acidez y otras que son favorables a la proliferación bacteriana (Cotoras, 1996). Este fenómeno ha sido aprovechado en las explotaciones de cobre en montones, técnica extremadamente barata y eficiente, donde enormes pilas de mineral son irrigadas con agua. Anteriormente las aguas de arrastre se conducían a través de canales a una red de pequeños embalses en los que se enriquecían por decantación y se pasaban a balsas de precipitación conteniendo chatarra de hierro para fijar el cobre metálico. Actualmente, las aguas de arrastre enriquecidas se colectan y se envían a las plantas de extracción por solventes (ES) y electrodeposición (EW) para obtener el cobre metálico (Departamento de Ingeniería Metalúrgica de la Fac. de Química de la UNAM, 2001).

### 1.2.1 Definiciones de biolixiviación y biooxidación

La oxidación bacteriológica de minerales es un término aplicado a la disolución favorecida por microorganismos de los constituyentes del mineral, ya sea para extraer los valores metálicos (proceso de biolixiviación) (Figura 7 y 8), o para remover los constituyentes del mineral que interfieren con la extracción de los valores metálicos por algún método convencional (proceso de biooxidación).



**Figura 7.** Detalle de una partícula de calcopirita sin atacar y atacada con microorganismos termófilos extremos. Panel A) sin atacar y B) atacada (tomado de Departamento de Ingeniería Metalúrgica de la Facultad de Química de la UNAM, 2001).



**Figura 8.** Partículas de pirita y calcopirita en presencia de microorganismos mesófilos (Tomado de Departamento de Ingeniería Metalúrgica de la Facultad de Química de la UNAM, 2001).

### 1.2.2 Diferencias entre biolixiviación y biooxidación

Aunque los términos biolixiviación y biooxidación son frecuentemente usados de manera indistinta, existen diferencias técnicas. Ambos se refieren a la oxidación bacteriana de los constituyentes del mineral para disolver el metal, utilizando microorganismos que oxidan al hierro y/o al azufre (Coram y Rawlings 2002). Sin embargo, la biolixiviación consiste en poner en solución al metal de interés (uranio, cobre, zinc, níquel y cobalto) durante la oxidación bacteriana de sulfuros. El metal se recupera de la solución y el residuo sólido se desecha. La biooxidación es un proceso de pre-tratamiento que utiliza el mismo tipo de microorganismos para oxidar a algún mineral sulfuroso, generalmente pirita o arsenopirita, que contiene oro, plata o ambos metales finamente diseminados, el valor metálico permanece en fase sólida para su posterior recuperación y la solución se desecha.

### 1.2.3 Aplicación de la biolixiviación

Los métodos de lixiviación microbiana están comenzando a ser aplicados para incrementar la recuperación de metales de menas de sulfuros de bajo grado o recalcitrantes a los procesos convencionales usando un pre-tratamiento como en el caso de pirita o arsenopirita que contienen oro ocluido, en un proceso llamado biooxidación (Liu y col., 2006; Quantrini y col., 2005). Actualmente, los microorganismos son usados comercialmente para la extracción de cobre, zinc, uranio, níquel y cobalto por medio de biolixiviación. La biolixiviación ha mejorado la

eficiencia del procesamiento industrial de minerales bajando el capital total y costos de proceso, disminuyendo los daños ambientales asociados con la contaminación derivada de las emisiones de fundición de concentrados sulfurosos (Quantrini y col., 2005) (Tabla 3). La biolixiviación en montones ofrece una significativa ventaja sobre el tratamiento convencional de menas de baja ley porque no requiere una paso de concentración de mineral (Liu y col., 2006). A nivel mundial existen varias plantas usando el proceso de pre-tratamiento (biooxidación) para la recuperación de metales (Tabla 4).

La aplicación comercial de lixiviación en montones, diseñada para explotar la actividad microbiana, se inició en 1980 para la extracción de cobre. La mina Lo Aguirre en Chile procesa cerca de 16,000 toneladas de mineral por día entre 1980 y 1996 usando biolixiviación (Tabla 3). Actualmente, Chile produce cerca de 400,000 toneladas de cátodos de cobre por biolixiviación, representando así el 5% del total de la producción mundial de cobre. Desde 1990, Mina Escondida tiene almacenadas 100 millones de toneladas de mineral de cobre de bajo grado. Todo este material podría ser considerado como un desecho minero sin una apropiada tecnología de biolixiviación en montón (Demergasso y col., 2005).

**Tabla 3.** Ejemplos de plantas productoras de cobre por biolixiviación

Planta	Producción Ton/día	Operación
Lo Aguirre (Chile)	16,000	1980-1996
Mt. Leyshon (Australia)	1,370	1991-(En cierre)
Cerro Colorado (Chile)	16,000	1993- <sup>a</sup>
Girilambone (Australia)	2,000	1993- <sup>a</sup>
Ivan-Zar (Chile)	1,500	1994- <sup>a</sup>
Quebrada Blanca (Chile)	17,300	1994- <sup>a</sup>
Andacollo (Chile)	10,000	1996- <sup>a</sup>
Dos Amigos (Chile)	3,000	1996- <sup>a</sup>
Zaldívar (Chile)	20,000	1998- <sup>a</sup>
Gundpowder's Mammoth Mine (Australia)	1.2 millones de toneladas <i>(in situ)</i>	1991- <sup>a</sup>

a. A la fecha

Tomado de: [www.depa.pquim.unam.mx/~relva/Acercade.html](http://www.depa.pquim.unam.mx/~relva/Acercade.html)

**Tabla 4.** Plantas que realizan la operación de biooxidación

Planta	Producción Ton/día	Operación
Fairview (Sudáfrica)	35	1986, 1991- a
Sao Bento (Brasil)	150	1990- a
Harbour Lights (Australia)	40	1992-1994
Wiluna (Australia)	115	1993- a
Ashanti (Ghana)	1,000	1994- a
Youanmi (Australia)	120	1994-1998

a. A la fecha Tomado de: [www.depa.pquim.unam.mx/~relva/Acercade.html](http://www.depa.pquim.unam.mx/~relva/Acercade.html)

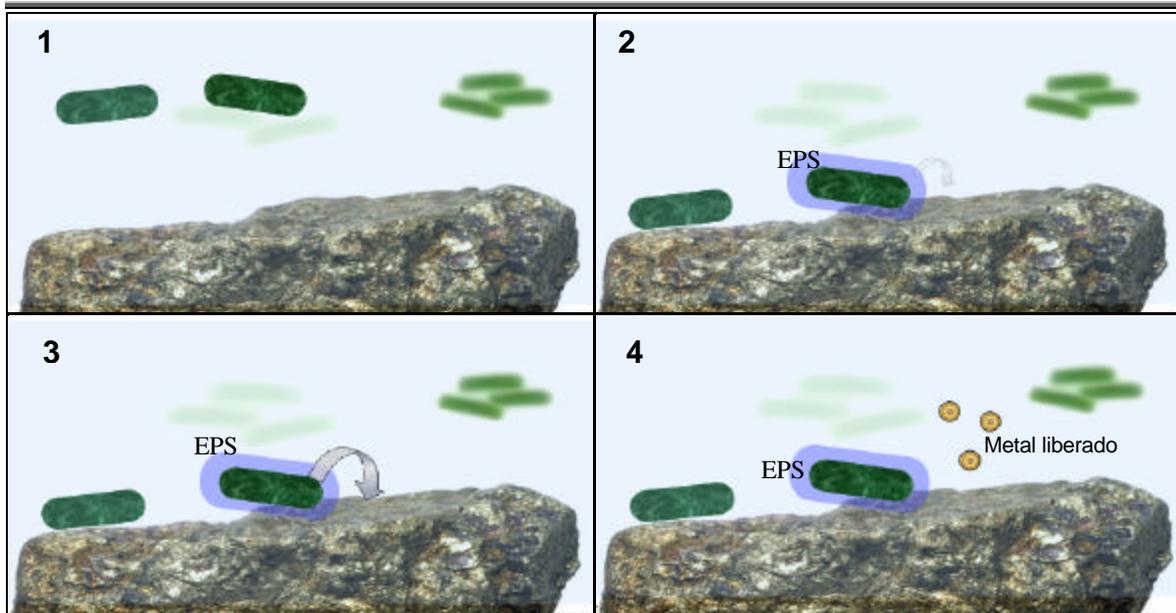
### 1.2.4 Mecanismos de lixiviación

Existen varios mecanismos propuestos de como los microorganismos participan en la lixiviación de minerales, predominando dos mecanismos de acción: 1) el ataque directo o enzimático del mineral por una o más bacterias en donde el contacto físico entre la bacteria y el mineral es necesario y, 2) el ataque indirecto del mineral por uno o más productos del metabolismo de las bacterias, como el ión férrico  $Fe^{3+}$  o los protones  $H^+$ , (el contacto físico entre el mineral y la bacteria no es necesario) (Crundwell, 2003).

#### 1.2.4.1 Mecanismo directo

La bacteria está en contacto directo con la superficie del mineral, promoviendo la oxidación del azufre de los sulfuros metálicos a sulfatos. La oxidación proporciona la energía para el crecimiento de las bacterias (Sand y col. 2001) (Figura 9).

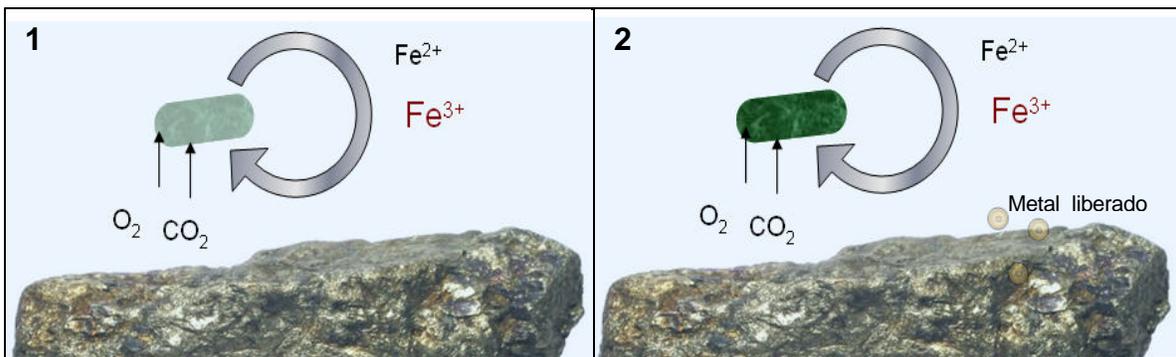
Este mecanismo también es conocido como lixiviación de contacto, puesto que para que exista un ataque biológico a la superficie del mineral, es indispensable la existencia de una capa de lipopolisacáridos o de sustancias exopoliméricas excretadas por la bacteria (EPS) (Gehrke y col. 1998), las cuales sirven como almacén temporal del  $S^{\circ}$  producido (Departamento de Ingeniería Metalúrgica de la Fac. de Química de la UNAM, 2001).



**Figura 9.** Esquema del mecanismo directo de biolixiviación. Figura diseñada por Hugo Aguilera Bandín. 1) Las bacterias se encuentran presentes en el medio con mineral, 2) Las bacterias entran en contacto con el mineral por medio de los exopolímeros (EPS), 3) Los exopolímeros reaccionan con la superficie del mineral, 4) El metal es liberado.

#### 1.2.4.2 Mecanismo indirecto

El sulfuro metálico es oxidado químicamente por la acción del agente oxidante  $Fe^{3+}$ . La función de los microorganismos es regenerar el agente oxidante. Si la oxidación química es completa se obtiene  $Fe^{2+}$  y  $SO_4^{2-}$ . Cuando es incompleta se generan  $Fe^{2+}$  y  $S^0$ , en cuyo caso la bacteria oxida también el azufre elemental  $S^0$  a  $SO_4^{2-}$ , regenerando al medio  $H_2SO_4$  (Figura 10).



**Figura 10.** Esquema del mecanismo indirecto de biolixiviación. Figura diseñada por Hugo Aguilera Bandín. 1) Las bacterias se encuentran presentes en el medio con el mineral, el hierro ferroso  $Fe^{2+}$  lixivia el mineral, 2) El metal es liberado y el hierro ferroso es oxidado a  $Fe^{3+}$  por las bacterias.

### 1.2.4.2.1 Mecanismo de ataque indirecto vía tiosulfato

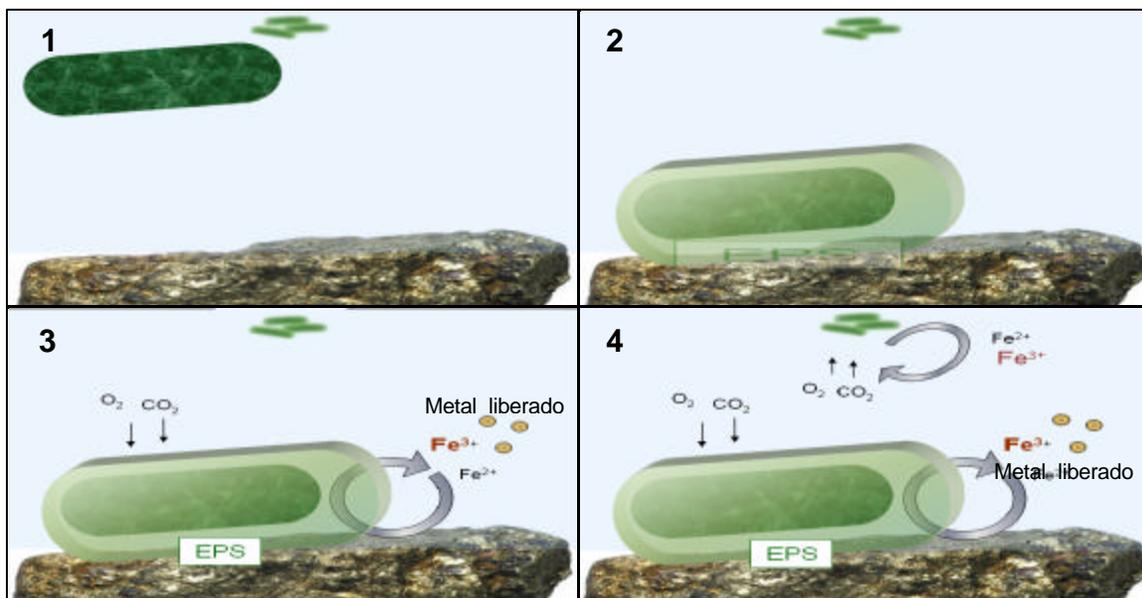
El ión férrico  $\text{Fe}^{3+}$  contenido en la capa de EPS ataca de forma indirecta al sulfuro metálico produciendo ión ferroso  $\text{Fe}^{2+}$  y tiosulfato  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ . El tiosulfato reacciona con el ión férrico  $\text{Fe}^{3+}$  formando varios intermediarios hasta llegar al  $\text{SO}_4^{2-}$  (Sand y col. 2001).

### 1.2.4.2.2 Mecanismo de ataque indirecto vía polisulfuro

Los protones atacan la red cristalina de algunos sulfuros metálicos. El ataque indirecto del mineral por el par  $\text{H}^+/\text{Fe}^{3+}$  al mineral produce  $\text{Fe}^{2+}$  y polisulfuros, y finalmente  $\text{SO}_4^{2-}$ . El papel de las bacterias es de producir  $\text{H}_2\text{SO}_4$  para abastecer de  $\text{H}^+$  y  $\text{Fe}^{3+}$  al medio para que se lleve a cabo el ataque químico.

### 1.2.4.3 Mecanismo mixto

Es la combinación de ambos mecanismos; es decir, un ataque directo e indirecto al mineral por uno o varios microorganismos activos. También es conocido como lixiviación cooperativa (Figura 11).

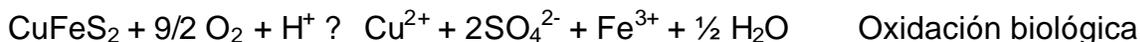


**Figura 11.** Esquema del mecanismo mixto de biolixiviación. Figura diseñada por Hugo Aguilera Bandín. 1) Las bacterias se encuentran presentes en el medio con el mineral, 2) Algunas bacterias participan en contacto directo con el mineral por medio de sus exopolímeros, 3) El metal es liberado, 4) Algunas otras bacterias participan de manera indirecta en el medio, regenerando los iones  $\text{Fe}^{3+}$ .

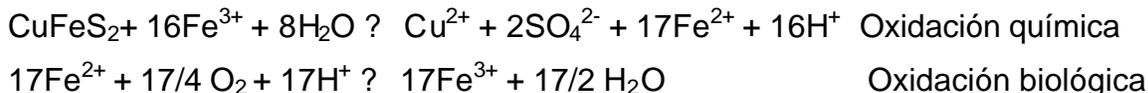
---

### 1.2.4.4 Reacciones químicas de los mecanismos directo e indirecto

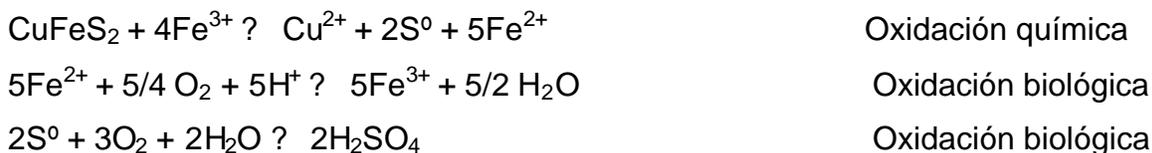
#### 1.2.4.4.1 Mecanismo directo



#### 1.2.4.4.2 Mecanismo indirecto completo



#### 1.2.4.4.3 Mecanismo indirecto incompleto



#### 1.2.4.5 Oxidación del hierro y el azufre

El sistema de oxidación de Fe (II) por *T. ferrooxidans* está relacionado con la membrana celular. La enzima ferrooxidante clave parece ser la citocromo c-Fe<sup>2+</sup> oxidoreductasa, en el proceso también intervienen la coenzima Q y la citocromo a, quienes realizan el transporte de electrones. Existe una proteína de cobre, que sirve como aceptor inicial de electrones de la oxidación de Fe (II): la rusticianina, la cual es fácilmente reducida por Fe (II). Se ha sugerido que las reacciones, suceden en el orden siguiente: la rusticianina reduce un citocromo c, que a su vez reduce otro citocromo y este a su vez a la citocromo oxidasa (Appia-Ayme y col. 1998; Bengrine y col. 1998; Appia-Ayme y col. 1999).

El mecanismo de la oxidación de azufre requiere de sulfito (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) como molécula intermediaria. La energía producida de la oxidación de sulfito a sulfato involucra a las enzimas sulfito oxidasa, ADP sulfurilasa, APS reductasa y adenilato quinasa (Departamento de Ingeniería Metalúrgica de la Facultad de Química de la UNAM, 2001).

---

### 1.2.5 Ventajas de la biolixiviación

A partir de la biolixiviación se generan productos estables (por ejemplo, el arsénico obtenido en menas refractarias de oro y plata se estabiliza mediante precipitación como arseniato de hierro en vez del trióxido de arsénico impuro obtenido por tostación y difícil de eliminar); se requieren tiempos más cortos para obtener permisos ecológicos por lo que se reduce el tiempo de explotación de la zona; se requiere menos tiempo y costo para legalizar los derechos, costo de capital y de operaciones menores (en el caso de minerales de baja ley, el costo energético está limitado al bombeo de las soluciones); ausencia de emisiones de  $\text{SO}_2$ ; requiere de equipos sencillos; la selectividad del ataque microbiológico permite la fácil separación de los subproductos.

### 1.2.6 Drenaje ácido de mina

La disolución oxidativa de minerales sulfurosos causa la formación de drenaje ácido de mina (AMD) y juega un papel importante en el ciclo geoquímico del azufre (Figura 12). Los sulfuros (principalmente pirita,  $\text{FeS}_2$ ) que son expuestos al aire y al agua a través de actividades mineras o geológicas bajo disolución oxidativa, generan ácido sulfúrico (Schrenk y col. 1998; Edwards y col., 2000). Pero también se genera ión férrico que se pone en evidencia por la coloración rojiza de los efluentes, la cual es consecuencia de precipitados de hidróxidos férricos. Además, la presencia del ácido sulfúrico y del ión férrico, favorece a su vez la disolución y concentración de metales tóxicos en solución, tales como arsénico, cobre, zinc, cadmio, plomo, por mencionar algunos.



**Figura 12.** Drenaje ácido de mina. Tomado de Cotoras, 1996.

---

### 1.3 Microorganismos lixiviantes

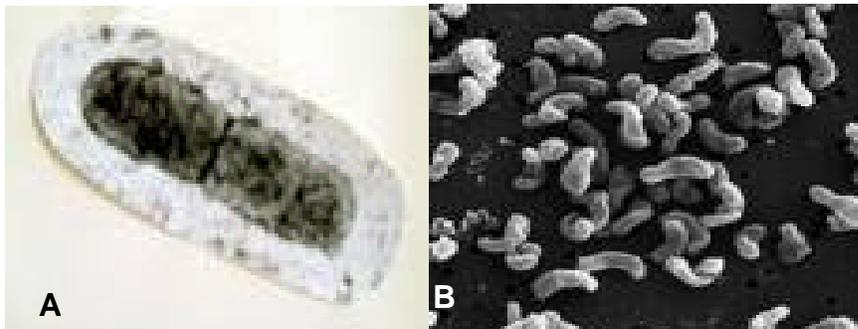
Últimamente, un aumento en el conocimiento de la microbiología y la geoquímica de las menas, conteos bacterianos directos y lecturas indirectas tales como, captación de oxígeno en muestras sólidas y líquidas, potencial redox, pH, concentración de hierro ferroso y temperatura, han proveído de información útil y necesaria de la actividad en consorcio de los microorganismos (Burton y Norris, 2000; Demergasso y col., 2005), así como para el desarrollo de estrategias para reducir la generación de drenajes ácidos contaminantes (Bond y col., 2000). Por otro lado, enriquecimientos microbianos, cultivos puros en soluciones y minerales procedentes de procesos a escala experimental e industrial han proveído un vistazo inicial de los microorganismos importantes asociados con biolixiviación (Demergasso y col. 2005).

Muchas de las bacterias industrialmente importantes que participan en la biolixiviación de minerales, tales como las quimiolitioautótrofas, acidófilas: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*, tienen movilidad por la presencia de un flagelo. Además, estos organismos poseen respuestas de quimiotaxis para censar y adaptarse a su medio ambiente. Esta respuesta es especialmente importante ya que los microorganismos tienen que adherirse a sitios específicos en la superficie de los minerales, los cuales oxidan para obtener su energía (Delgado y col. 1998; Schrenk y col. 1998).

#### 1.3.1 *Acidithiobacillus ferrooxidans*

*Acidithiobacillus ferrooxidans* fue el primer microorganismo aislado de un ambiente ácido de lixiviación y fue considerado el principal catalizador biológico en procesos de lixiviación de metales por lo que ha sido uno de los más estudiados (Figura 13). *A. ferrooxidans* es una  $\alpha$ -proteobacteria quimiolitioautótrofa, que obtiene energía y electrones por la oxidación de compuestos reducidos de azufre a sulfato o Fe (II) a Fe (III). Además es un organismo mesófilo, aerobio facultativo que fija CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> atmosférico para proveerse de carbono y nitrógeno. Crece en

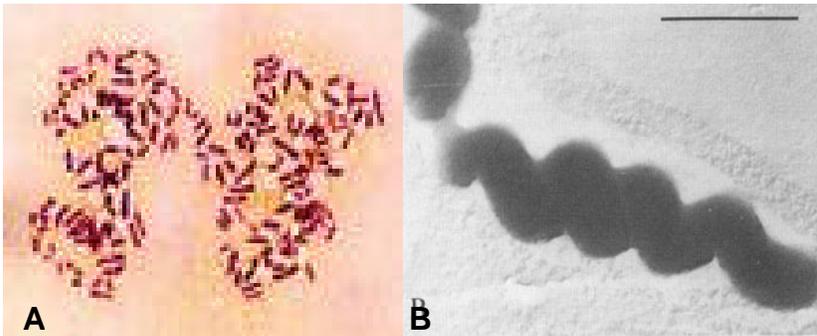
condiciones extremadamente ácidas (pH 1-2) y está frecuentemente confrontado con altas concentraciones de metales, incluido el hierro (Quantrini y col., 2005). En la mayoría de las investigaciones de lixiviación mesófila se había puesto la atención en el papel que desempeñaba *A. ferrooxidans*, pero en estudios recientes se ha sugerido que *Leptospirillum ferrooxidans* juega un rol más significativo (Rawlings y col., 1999).



**Figura 13.** *Acidithiobacillus ferrooxidans*. A) Dibujo de *A. ferrooxidans* (Mandl, s/f), B) Observado en el microscopio electrónico (BIOSHALE, 2004).

### 1.3.2 Género *Leptospirillum*

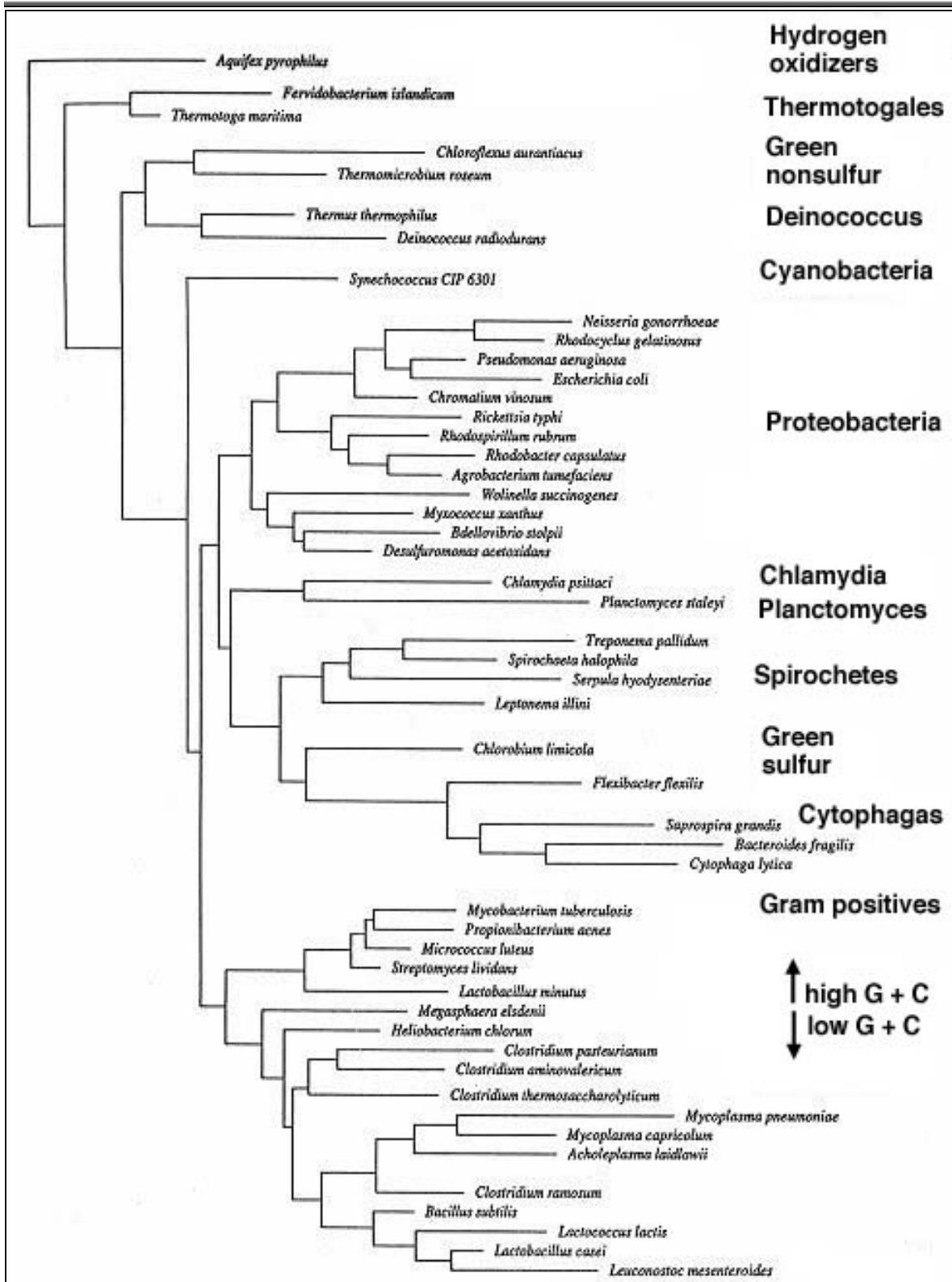
*Leptospirillum* es la bacteria dominante en tanques industriales de biooxidación de flujo continuo, como los empleados en el tratamiento de concentrados de arsenopirita (Coram y Rawlings 2002), plantas de biolixiviación comercial (Romero y col. 2003) y bioreactores (Parro y Moreno-Paz 2003). Las bacterias pertenecientes al género *Leptospirillum* miden entre 0.2-0.6  $\mu\text{m}$  por 0.9-3.5  $\mu\text{m}$ . Son bacterias gram-negativas, en forma espiral o vibrio, pueden formar cocos o pseudo cocos, tienen movilidad por la presencia de un flagelo; son organismos quimiolitótrofos obligados, fijan carbono, usan hierro como donador de electrones y oxígeno como aceptor de electrones, crecen en un rango de pH de 1.3 a 4.0; son mesófilos o termófilos moderados hasta una temperatura de 55°C y crecen por oxidación del ión ferroso (Hippe, 2000) (Figura 14). Además son organismos acidófilos y se consideran uno de los principales agentes responsables del mantenimiento del balance del pH y por lo tanto el mantenimiento de las propiedades fisicoquímicas del ecosistema (Parro y Moreno-Paz 2003).



**Figura 14.** *Leptospirillum ferrooxidans*. A) Observado en el microscopio óptico, B) Observado en el microscopio electrónico (microbewiki.kenyon.edu/index.php/Leptospirillum)

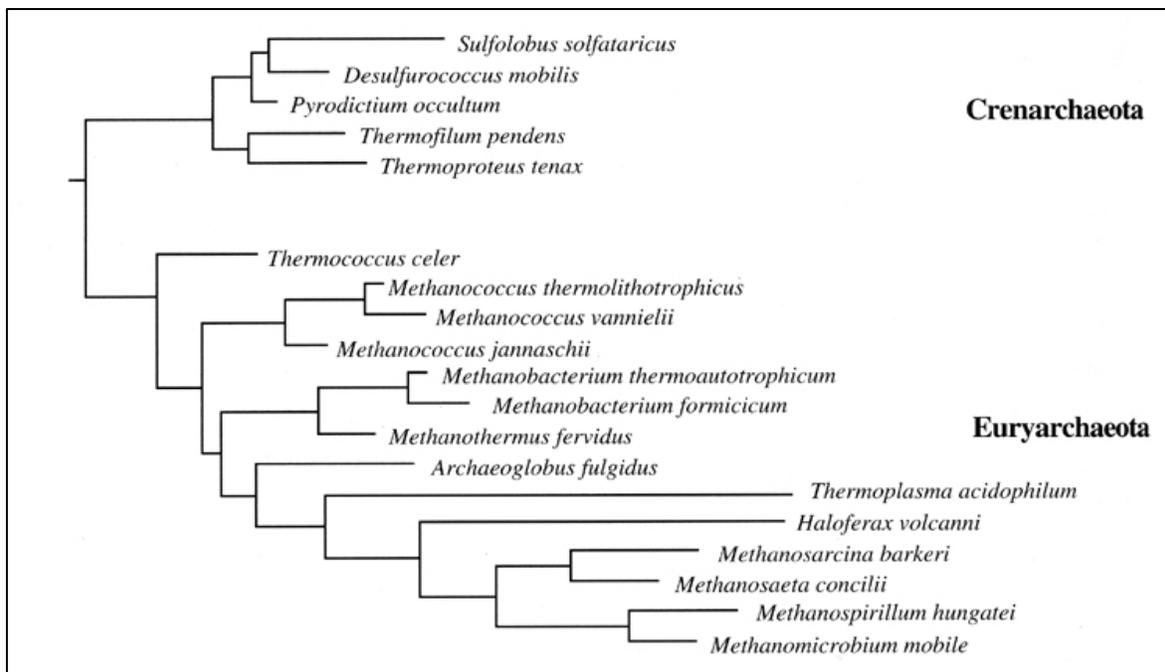
En género *Leptospirillum* ha sido uno de los géneros más estudiado desde el punto de vista molecular. En *L. ferrooxidans* se observó una secuencia consenso para el promotor d28, este tipo de promotor es específico para la expresión de genes flagelares, genes de motilidad y genes quimiotácticos en muchos microorganismos (Delgado y col., 1998).

Una variedad de microorganismos quimiolitótrofos y heterótrofos tales como *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidiphilium cryptum*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (Bridge y Johnson, 1998) entre otros, son responsables de la disolución de metales a partir de sulfuros minerales en ambientes ácidos (De Wulf-Durand y col., 1997). Estos microorganismos quimiolitótrofos y heterótrofos pertenecen principalmente a los grupos de bacterias púrpura y sus microorganismos relacionados (principalmente alfa, delta y gama proteobacterias, gram negativas), así como al grupo bacilli (firmicutes, gram positivos) cuya clasificación se muestra en la Figura 15.



**Figura 15.** Árbol filogenético de bacterias. Este árbol se construyó a partir de secuencias de ADN 16S. Otros organismos comúnmente encontrados en ambientes lixiviantes (Department of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison, 2005).

Otros organismos comúnmente encontrados en ambientes lixiviantes incluyen miembros de los géneros *Ferroplasma*, *Sulfolobus* y *Acidianus* (Liu y col., 2006), encontrados en los grupos Crenarchaeota y Euryarchaeota dentro de las Archaea (Figura 16). Los organismos del género *Ferroplasma* ayudan a acelerar la oxidación de pirita a través de la regeneración de  $Fe^{+3}$  a pH ácidos. *Ferroplasma* pertenece a la familia Ferroplasmaceae, en el orden de los Thermoplasmatales, en la cual se incluye la familia Thermoplasmaceae y Picrophilaceae. El crecimiento a temperaturas mesófilas y la quimiolitotrofia distinguen a este organismo de los otros miembros de los Thermoplasmatales (Golyshina y Timmis 2005). Otras características de los *Thermoplasmatales* o *Thermoplasmales* (Golyshina y col. 2000) son la carencia de una pared celular distintiva en los representantes del género *Thermoplasma* y la presencia de una sola capa en especies de *Picrophilus* (Golyshina y Timmis 2005). Las células de las especies de *Thermoplasma* tienen diferentes tamaños, filamentos y tienen diferentes formas celulares (disco, coccoid) (Golyshina y col., 2000).



**Figura 16.** Árbol filogenético del dominio Archaea. Este árbol es derivado de secuencias de ADNr 16S. Dos grupos principales de Archaea pueden ser definidos, el Crenarchaeota, el cual consiste principalmente de procariontes hipertermófilos dependientes de azufre, y el Euryarchaeota, el cual contiene procariontes halófilos extremos y metanogénicos (Department of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison, 2005).

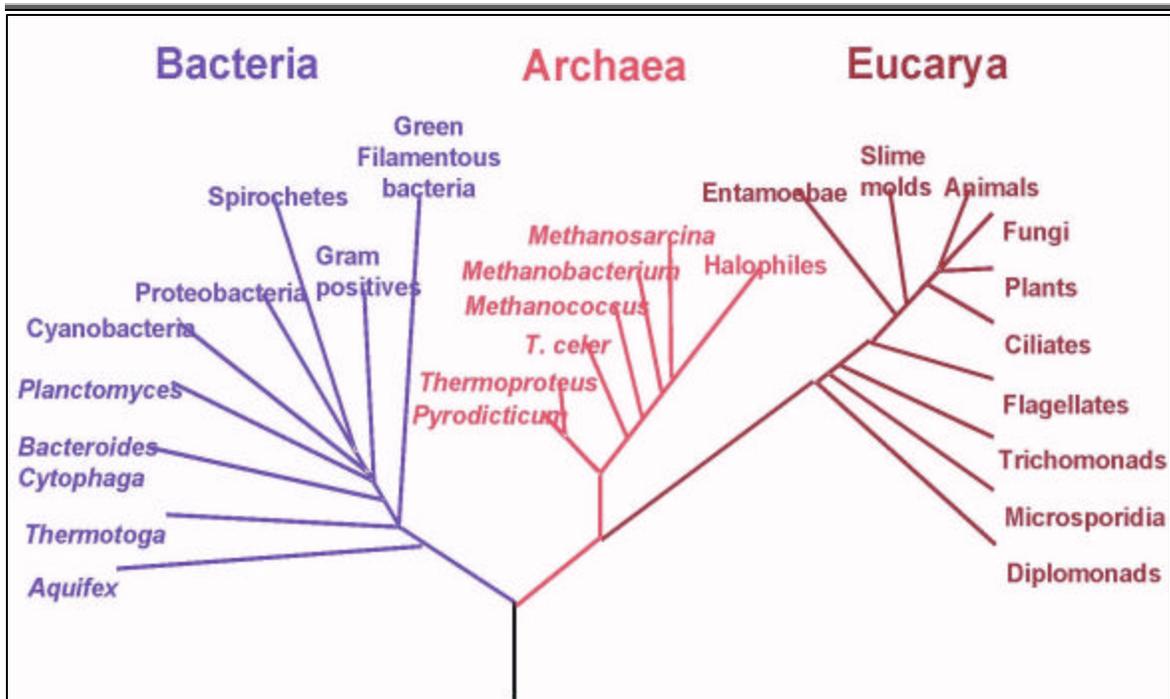
---

## 1.4 Tres dominios universales

Las comparaciones moleculares basadas en secuencias de ADNr 16S muestran que la vida en este planeta está dividida en tres grupos primarios, conocidos como *bacteria*, *archaea* y *eucarya* (Figura 17). En el dominio Eucarya se agrupan células eucariotas, en las cuales los lípidos de la membrana celular son predominantemente ácidos grasos de diéster de glicerol. El dominio Bacteria agrupa células procariotas, los lípidos de la membrana son predominantemente diacilglicerol diéster. El dominio Archaea agrupa células procariotas, en las cuales los lípidos de la membrana son predominantemente isoprenoides de glicerol diéster o diglicerol tetraéster (Woese y col., 1990).

### 1.4.1 Dominio Bacteria y Archaea

El dominio Bacteria, basándose en las diferencias deducidas de las secuencias de ARNr 16S permitió su subdivisión en Thermotogales, bacterias no azufradas, cianobacterias, bacterias gram positivas con bajo contenido de G+C, bacterias gram positivas con alto contenido de G+C, el grupo Cytophaga/Flexibacteria/ Bacteroides, así como los grupos Fibrobacteria, Spirochaetes, Planctomyces/ Chlamydia y las bacterias púrpura (Koch, 2001). A su vez, el dominio Archaea está dividido en dos reinos: el reino Euryarchaeota, el cual es fenotípicamente heterogéneo y agrupa a los microorganismos metanogénicos, a los halófilos extremos, a las especies sulfato-reductoras y a los Thermoplasmatales; y el reino Crenarchaeota que comprende la mayoría de los llamados termoacidófilos, archaeabacteria azufre dependientes, eocytos o termófilos extremos; este es un grupo fisiológicamente homogéneo, en el cual sus hábitats son totalmente termófilos (Woese y col., 1990; Bintrim y col, 1997).



**Figura 17.** Árbol filogenético universal con raíz, muestra los tres dominios (Wikipedia, Princeton University, 2006).

#### 1.4.2 Divergencia de la vida

Como se observa en la Figura 17, la evidencia de ARNr 16S muestra que el último antecesor universal está dado entre Bacteria y la rama Archaea/Eucarya. Koch (2001) sugiere que la primera separación tuvo que hacerse en la manera en que las células fueron capaces de hacer frente a los problemas osmóticos, por ejemplo al adquirir exitosamente una mayor presión osmótica interna, la fuerte pared de las bacterias fue una solución al problema, y la solución eucariote fue el desarrollo de mecanoenzimas y proteínas que pudieron formar el citoesqueleto, el cual puede ejercer el trabajo de mantener la célula y su presión osmótica. El desarrollo del citoesqueleto debió ocurrir en algún momento en el linaje Archaea/Eucarya. Algunas Archaea desarrollaron independientemente un sáculo de constitución diferente, pero similar al de las bacterias en forma y función. La segunda separación para formar nuevos dominios fue debido a diferentes tipos de ventajas evolutivas. Woese (1990) sugirió que esta separación de nuevos dominios fue por ejemplo debido a una habilidad para crecer en temperaturas altas; Koch (2001) sugiere que fue el desarrollo de la fijación del carbono y el

---

proceso de obtención de energía de la metanogénesis. La metanogénesis fue el primer proceso de producción de energía que resultó efectivo en la tierra primitiva.

### 1.4.3 Principales diferencias entre los dominios

No solo las secuencias de ARNr 16S nos permiten dividir a los organismos en un modelo de 3 dominios, muchos otros aspectos de la biología de organismos existentes demuestran las diferencias en los tres dominios. Bacteria y Archaea están caracterizados de Eucarya por otras diferencias generales, más allá de la ausencia de un núcleo, siendo la diferencia más notada el que las células de Eucarya son más grandes. Los procariontes, siendo pequeñas tienen la gran ventaja de no necesitar o usar procesos de transporte como lo necesitan los organismos grandes o multicelulares, e incluso los eucariontes de una sola célula como los protozoos. Además muchos procariontes son saprófitos y tienen diversificadas sus vías metabólicas para usar una variedad de materiales orgánicos e inorgánicos presentes en el ambiente. Algunas Archaeas usan metanogénesis como una fuente de energía y como fuente de carbono en un estado oxidado compatible para generación de citoplasma. Algunas de las razones bioquímicas para dividir procariontes en dos categorías, fue el hallazgo que la metanogénesis es muy diferente de los procesos metabólicos presentes en el resto de los seres vivos (Koch, 2001).

Algunas de las diferencias generales entre los dominios incluyen: las bacterias usan un factor sigma, mientras Archaea y Eucarya usan proteínas de unión TATA para el inicio de la transcripción; algunas de las sintetasas de ARNt de Archaea, están distribuidos entre Eucarya y Bacteria; la traducción de mensajeros, la transcripción y la replicación del ADN en Archaea y Eucarya se parece una a la otra mucho más que con los procesos en Bacteria, incluyendo los factores de iniciación de la traducción; algunas subunidades de la ARN polimerasa están relacionadas en los tres dominios pero en algunos casos las subunidades de Bacteria son un poco distintas; finalmente, hay tres ADN polimerasas en Bacteria,

---

pero solo una en *Methanococcus jannaschii*, la primera archaea en ser secuenciada completamente (Koch, 2001; Brown, 2004; Microbial diversity, 2004).

### 1.5 Estudio de las relaciones ecológicas de los microorganismos

Para estudiar las relaciones ecológicas de microorganismos como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Leptospirillum ferriphilum*, *Ferroplasma acidiphilium*, entre otras, y las dinámicas de las poblaciones durante los procesos de biolixiviación, se requieren de métodos específicos para la identificación de los organismos y su enumeración (Tabla 5). Se han descrito numerosos métodos pero ninguno de ellos ha podido solucionar los problemas ligados al largo tiempo de espera para el desarrollo de las colonias (De Wulf-Durand y col., 1997). Los métodos convencionales como el análisis microscópico y las técnicas de plaqueo no son aplicables debido a la dificultad de la matriz y a la diversidad de parámetros de crecimiento requeridos para cultivar los organismos de interés (Liu y col., 2006). Solo pocos organismos observados microscópicamente pueden ser cultivados por métodos estándar (Barns y col., 1994), principalmente debido a la inadaptabilidad de las bacterias para crecer en medio sólido (De Wulf-Durand y col., 1997). Por otra parte, su aislamiento suele ser muy difícil, debido a que muchos de ellos requieren de la presencia de otros microorganismos, esto es encontrarse en consorcio. Por ejemplo, se ha observado que *A. ferrooxidans* tiene 11 genes candidatos potenciales para receptores de sideróforos de membrana externa, pero no se ha detectado que pueda producirlos. Sin embargo, estos sideróforos son sintetizados y excretados al medio ambiente por muchas bacterias y hongos; esto sugiere que *A. ferrooxidans* puede vivir en ambientes con disponibilidad limitada de Fe (III) y con organismos capaces de producir sideróforos. Los sideróforos son compuestos quelantes de bajo peso molecular que tienen alta afinidad por iones de Fe (III); por lo que se ha sugerido que sistemas de captación de múltiples sideróforos encontrados en *A. ferrooxidans*, pueden hacer que este microorganismo sea capaz de vivir en ambientes donde el hierro es escaso (Quantrini y col., 2005).

**Tabla 5.** Ejemplos de bacterias acidófilas de interés en la biolixiviación de metales

Tipo de microorganismo	Principal modo de metabolismo	Géneros y especies
Mesófilo	Carbón inorgánico y fuente de energía quimiolitótrofa	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , <i>A. thiooxidans</i> , <i>A. prosperus</i> , <i>Leptospirillum ferrooxidans</i>
	Carbón orgánico y fuente de energía quimiolitótrofa	<i>Acidiphilium cryptum</i> y heterótrofos relacionados
	Carbón orgánico e inorgánico y fuente de energía quimiolitótrofa (heterótrofos facultativos)	<i>A. acidophilus</i> , <i>A. organovorans</i> , <i>A. cuprinus</i>
Termófilos moderados	Carbón inorgánico y fuente de energía quimiolitótrofa	<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> , <i>Metallosphaera sedula</i>
Termófilos extremos	Carbón inorgánico y fuente de energía quimiolitótrofa	<i>Sulfolobus solfaraticus</i> , <i>S. acidocaldarius</i> , <i>Acidianus brierleyi</i> , <i>A. infernus</i>

### 1.5.1 Técnicas empleadas para el estudio de microorganismos

Los microorganismos son extremadamente difíciles de estudiar, debido a su pequeño tamaño y a su simplicidad morfológica. Una de las técnicas empleadas, es la observación microscópica directa de los microorganismos en muestras naturales por tinción la cual produce en forma indirecta un conteo de población en uno o dos ordenes de magnitud más altos que los leídos en cultivos de las mismas muestras. Esto significa que podemos estudiar solo cerca del 1% de las células en una muestra por cultivo. Ya que alrededor del 99% de las células no pueden ser cultivadas, una posibilidad es que las células no cultivables sean microorganismos similares o idénticos filogenéticamente a la minoría cultivable pero en su estado fisiológico, éstos muestran ser recalcitrantes al cultivo. Otra posibilidad es que las células remanentes representen nuevos linajes de bacterias que son filogenéticamente diferentes de los miembros cultivados de la comunidad y no pueden ser cultivados en medio estándar (Rondon y col., 1999). Se han desarrollado ensayos inmunológicos; sin embargo, un problema constante es que múltiples serotipos pueden estar presentes en aislados diferentes de una sola especie (De Wulf- Durand y col., 1997; Liu y col., 2005).

---

### 1.5.2 Análisis de secuencias de ADN

El análisis filogenético basado en el uso de las secuencias de ADN ha sido usado para identificar microorganismos y revelar la complejidad de las poblaciones microbianas en los ambientes de biolixiviación (Liu y col., 2006). Las especies de *Acidithiobacillus* han sido identificadas principalmente en ambientes ácidos de mina por medio de un análisis de ácidos grasos-fosfolípidos (PLFA), pero esta técnica es relativamente laboriosa y consume tiempo (Liu y col., 2006). La electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante da una buena indicación del nivel de diversidad en la muestra, y puede identificar cepas por comparación con una muestra conocida; sin embargo, este método no es cuantitativo. La hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) ha sido desarrollada para miembros de *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* y el género *Acidiphilium* (Amann y col. 1990; Peccia y col. 2000; Bond y col. 2000), (Tabla 6). Mientras esta técnica representa un importante paso hacia análisis cuantitativos de poblaciones de microorganismos, es laboriosa y consume tiempo. Los métodos moleculares basados en la detección de la diversidad genómica, tales como el contenido de G+C, la hibridación ADN-ADN y el análisis de ARN, han sido usados para obtener un análisis filogenético de bacterias oxidantes de hierro y azufre (De Wulf-Durand y col., 1997). Barns y col. (1994), detectaron la presencia de organismos previamente desconocidos, colectando poblaciones microbianas ambientales directamente a través de aislamientos y secuenciación de genes específicos. Por lo tanto, los análisis filogenéticos son usados para determinar las relaciones evolutivas y el desarrollo de los miembros de la comunidad a estudiar con aquellas especies cultivadas y descritas (Barns y col., 1994). Existen varias alternativas para analizar el ADN de un organismo y poder usar estos datos para su clasificación filogenética; métodos moleculares como la amplificación de secuencias por medio de PCR, hibridación ADN-ADN, DDGE, entre otros involucran el análisis de secuencias de genes, tales como el ARNr 16S para examinar la diversidad filogenética, como se muestra en la Tabla 6 (Rondon y col. 1999).

**Tabla 6.** Ejemplo de métodos empleados para el análisis de la diversidad microbiana.

Method	Comments
Culturing	Not representative
16S rRNA gene sequence analysis	Cloning required: provides identification of members of community
In situ hybridization	Labor intensive, can be used to identify metabolically active microorganisms
Substrate utilization	Measures metabolic diversity
DNA-DNA reassociation kinetics	Provides a global view of genetic complexity of sample
ARDRA	More useful for simple communities, useful for comparative analysis
PCR amplification or expression cloning	Functional diversity target
BAC libraries	Permanent archive of genetic information from sampled environment; phylogenetic and functional diversity
Flow cytometry	Enumeration of microorganisms
RNA dot or slot blot	Representation of metabolically active members of a community
SSCP	Comparative analysis
%GC content	Global view of community diversity
T-RFLP	Comparative analysis
DGGE or TGGE	Used to monitor enrichment, comparative analysis

Abbreviations: ARDRA, amplified ribosomal DNA restriction analysis; BAC, bacterial artificial chromosomes; DGGE, denaturing-gradient gel electrophoresis; SSCP, single-strand conformational polymorphisms; TGGE, temperature-gradient gel electrophoresis; T-RFLP, terminal-restriction-fragment-length polymorphisms.

Tomado de Rondon y col. (1999).

### 1.5.3 Relaciones filogenéticas

La evaluación cronológica de las relaciones filogenéticas requiere la utilización de moléculas con contenido informativo codificado, un reloj molecular. La hipótesis del reloj molecular descrita por Zuckerkandl y Pauling (1962), asume que el número de cambios en la secuencia de las moléculas, equivale al tiempo transcurrido desde la divergencia de dos líneas evolutivas que comparten la molécula en cuestión. Tanto proteínas como ácidos nucleicos han sido ampliamente usados como relojes moleculares en la resolución de filogenias de distintos grupos de seres vivos, pero son los ácidos nucleicos los que han presentado mayor incidencia ya que tienen la ventaja de que los cambios mutacionales quedan reflejados en la secuencia, evento que no siempre ocurre con las proteínas (Herrera-Cuadra, s/f).

---

### 1.5.3.1 Reloj molecular

Un reloj molecular que permita detectar las relaciones evolutivas más amplias debe tener las siguientes características: debe tener distribución universal, no debe estar sujeto a transmisión horizontal, debe poseer funcionalidad (de modo que la presión selectiva que actúe sobre la molécula sea mínima), la longitud de la secuencia debe ser suficiente (>200 pb para que las estimaciones de semejanza tengan validez estadística), la tasa de cambio (al menos en una parte de la molécula) debe ser lo suficientemente baja para permitir la detección de las relaciones evolutivas lejanas, y desde el punto de vista metodológico, es importante que la secuencia no sea excesivamente larga para poder aplicar técnicas de secuenciación en un corto plazo (Herrera-Cuadra, s/f).

### 1.5.4 Los ribosomas

Los ribosomas son el sitio de síntesis de proteínas, el nombre ribosoma deriva del hecho de que estas partículas en *Escherichia coli* consisten de 2/3 partes de ARN y 1/3 parte de proteína, tiene un coeficiente de sedimentación de 70S (S por Svedberg). El ribosoma 70S se compone de dos subunidades diferentes con valores de sedimentación (Svedbergs) de 30S y 50S. La subunidad pequeña (30S) consiste de una molécula de ARNr 16S y 21 proteínas diferentes, mientras que la subunidad grande (50S) contiene una molécula de ARNr 5S y otra molécula de ARNr 23S, con 34 proteínas diferentes (Figura 18). En procariotes hay tres ARNr: 5S (120 nucleótidos aprox.), 16S (1600 nucleótidos aprox.), y 23S (3000 nucleótidos aprox.) (Olsen y col., 1986).

Debido a que los ribosomas son muy importantes para la función celular e interaccionan con un gran número de moléculas como el ARN mensajero (ARNm), el ARN de transferencia (ARNt); las secuencias de las moléculas de ARNr están presentes en todos los organismos y se han conservado notablemente a través de la evolución. Las mutaciones en estas regiones causan que el organismo no sobreviva. Estas estructuras primarias están compuestas por regiones alternadas de alta y baja variabilidad. Las regiones con secuencias variables contienen

información de bajo nivel filogenético, mientras que las regiones con secuencias conservadas contienen información de los eventos evolutivos tempranos. En bacterias en crecimiento podemos encontrar una gran cantidad de copias de ARNr (Olsen y col., 1986).

Los ARNr combinan muchas propiedades las cuales, los hacen únicos para diversas aplicaciones. Primero, son universalmente distribuidos, permitiendo la comparación de relaciones filogenéticas entre todos los organismos y permitiendo la construcción de un “árbol de la vida”. Segundo, los ARNr son genes débilmente afectados por transferencia horizontal, tanto que proveen un marco sólido para evaluar cambios en los linajes. Tercero, los ARNr son mosaicos de genes funcionales altamente conservados (Acinas y col. 2004).

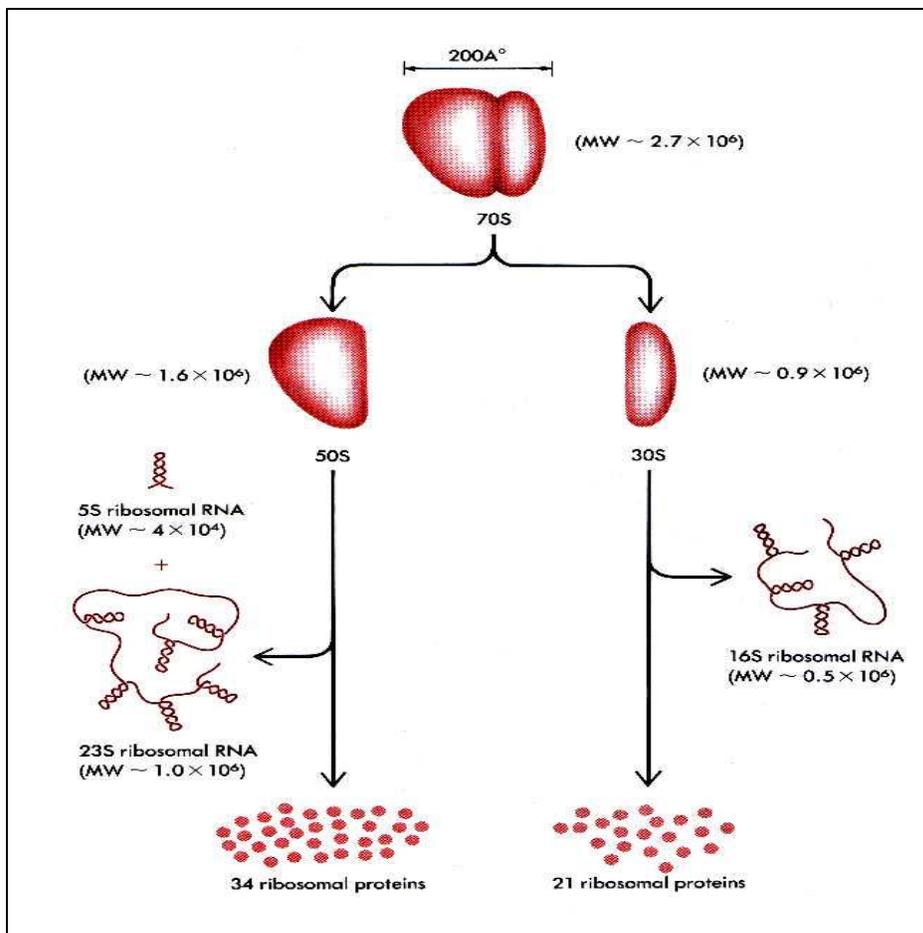


Figura 18. Esquema del ribosoma 70S de *E. coli*. Tomado de Herrera-Cuadra, (s/f).

---

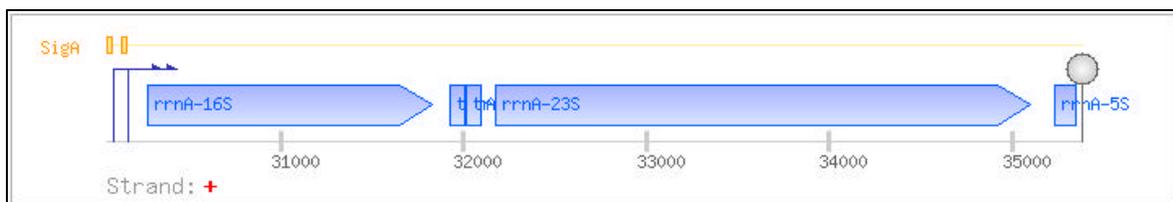
### 1.5.5 Secuencias de ARNr 16S

Inicialmente se realizaron estudios de secuenciación del ARNr 16S, para la construcción de un árbol filogenético, esto debido a su universalidad, alta conservación en estructura y función. Posteriormente, los estudios se extendieron al ARNr 23S; sin embargo, las secuencias del ARNr 16S presentan la ventaja de contar con un sitio muy conservado para el diseño de los oligonucleótidos abarcando casi toda la región. La secuenciación completa del ARNr 5S, debido a su tamaño pequeño, es más rápida y económica, e incluso podría proporcionar información adecuada, aunque el número de bases es pequeño. Sin embargo, el análisis de ARNr 16S parece ser el más adecuado, comparado con el ARNr 5S, debido a que las pequeñas diferencias en los nucleótidos del ARNr 5S afectan mucho más al resultado final que en el caso del ARNr 16S (Herrera-Cuadra, s/f). La secuencia de ARNr 16S tiene aproximadamente un tamaño 13 veces mayor que el del ARNr 5S, conteniendo por tanto mayor información filogenética (Olsen y col., 1986). Por otro lado, el tamaño de los productos de amplificación de las regiones de ARNr 16S son de 1500 pb aproximadamente, lo cual es una ventaja para secuenciarlo respecto al ARNr 23S ya que en una sola reacción de secuenciación podemos obtener la secuencia completa al diseñar oligonucleótidos que abarquen regiones de 1000 pb, mientras que para secuenciar el ARNr 23S se requiere más de una reacción por ser regiones más grandes.

Mediante el análisis de las secuencias parciales del ARNr 16S es posible encontrar patrones de secuencias específicos para grupos, especies o incluso serotipos bacterianos, ya que es posible encontrar regiones de 20 a 30 bases que son exclusivas de una sola especie bacteriana. La precisión de las inferencias filogenéticas de las secuencias de ARNr depende del número de bases comparadas y para ser efectivas, deben ser preferentemente consideradas 1000 pb para cada organismo preferentemente (Herrera-Cuadra, s/f).

### 1.5.6 Características del operón *rrn*

Los tres ARNr llamados 16S, 23S, y 5S, están típicamente codificados juntos en un operón, los cuales contienen frecuentemente un espacio interno de transcripción y al menos un ARNt (Acinas y col. 2004) (Figura 19); sin embargo, la organización puede variar. En la bacteria *Thermus thermophilus*, el gen de 16S está codificado separado del operón y es transcrito independientemente del 23S y 5S. El gen 5S está separado de los genes de 16S y 23S en *Pirellula marina*, y los tres ARNr son transcritos separadamente en *Leptospira interrogans* y en *Thermoplasma acidophilum* (Zaporojets y col., 2003). Se ha demostrado que los genomas bacterianos pueden contener entre 1 y 15 operones *rrn* (Acinas y col. 2004).



**Figura 19.** Esquema del operón *rrn* (National Center for Biotechnology Information, 1988).

### 1.6 Historia y descripción de la Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método propuesto en 1970 por H. Ghobind Khorana y sus colaboradores (Sambrook y col. 2001). Sin embargo, sus ideas fueron olvidadas debido a que no se contaba con una ADN polimerasa termoestable y la síntesis de oligos era más arte que ciencia. Quince años después la técnica fue concebida y puesta en práctica por Kary Mullis y colaboradores en CETUS Corporation quienes describieron la amplificación *in vitro*. El uso de una polimerasa termoestable incrementa la eficiencia de los PCR y abrió la puerta a la automatización del método. Es una técnica simple, robusta, rápida (Sambrook y Russell, 2001) y muy sensible, con aplicaciones en diversos campos, incluyendo biología molecular, diagnósticos clínicos, análisis forenses y genética de poblaciones (Tsai y Olson, 1992; Mullis 1993).

### 1.6.1 Principio de la PCR

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica que permite amplificar secuencias específicas de ADN o ARN, de tal manera que es posible detectar copias únicas de genes. Se basa en el principio de replicación *in vivo* del ADN realizado por polimerasas para asegurar que las células hijas tengan una copia exacta del genoma madre. *In vitro* consiste en realizar ciclos repetitivos de desnaturalización del ADN molde, el alineamiento de los oligonucleótidos con las secuencias complementarias al ADN de interés, y la extensión mediante la actividad de una Taq ADN polimerasa (Figura 20). Los oligonucleótidos se alinean en sentido opuesto en los extremos del fragmento del ADN que se desea amplificar, de tal manera que después de la síntesis de la cadena complementaria se inicia el ciclo nuevamente y se repite durante 30 veces o el número de ciclos que se indique (Arredondo, s/f).

Esta técnica permite amplificar genes que se encuentren en una copia o concentraciones menores a 1 ng, de tal forma que se obtengan concentraciones que los hagan visibles al teñirlos con bromuro de etidio y observarlos en luz UV.

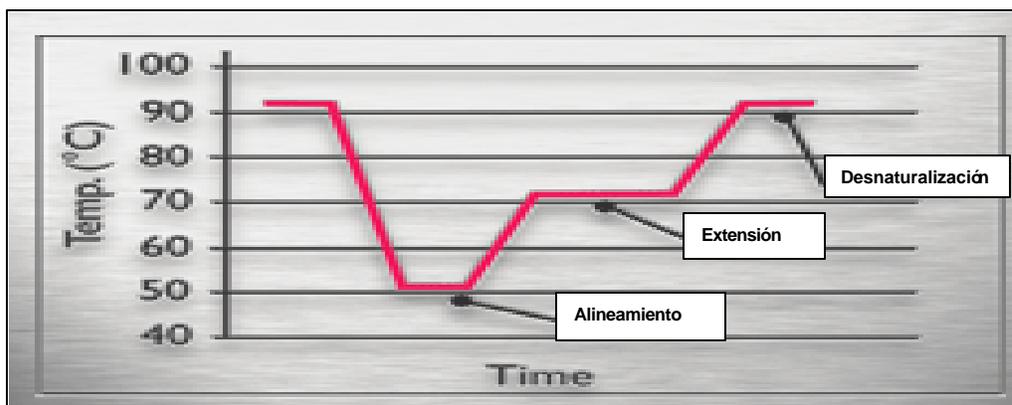


Figura 20. Esquema de la técnica de PCR.

### 1.6.2 Ciclos de amplificación

Al inicio de la reacción, las dos cadenas de ADN se encuentran apareadas en forma de dúplex. Este ADN se desnaturaliza al calentarlo a 94°C aproximadamente por 1 min., lo que resulta en la separación de las dos hebras.

Posteriormente, se enfría la mezcla entre 40-60°C, durante 1 min. aproximadamente, los dos oligonucleótidos iniciadores se alinean con las secuencias complementarias del ADN, los cuales tienen un grupo OH en el extremo 3', lo que permite que se inicie la síntesis de la cadena complementaria por la Taq ADN polimerasa cuando se eleva la temperatura a 72°C por 1 min. (Figura 21). Generalmente, una reacción de PCR es precedida por una etapa de desnaturalización inicial de 94°C por 10 min. aproximadamente y al final de las repeticiones de los ciclos de amplificación, se realiza una extensión final de 72°C por 5 min. aproximadamente para asegurar que se completen las cadenas nuevas.

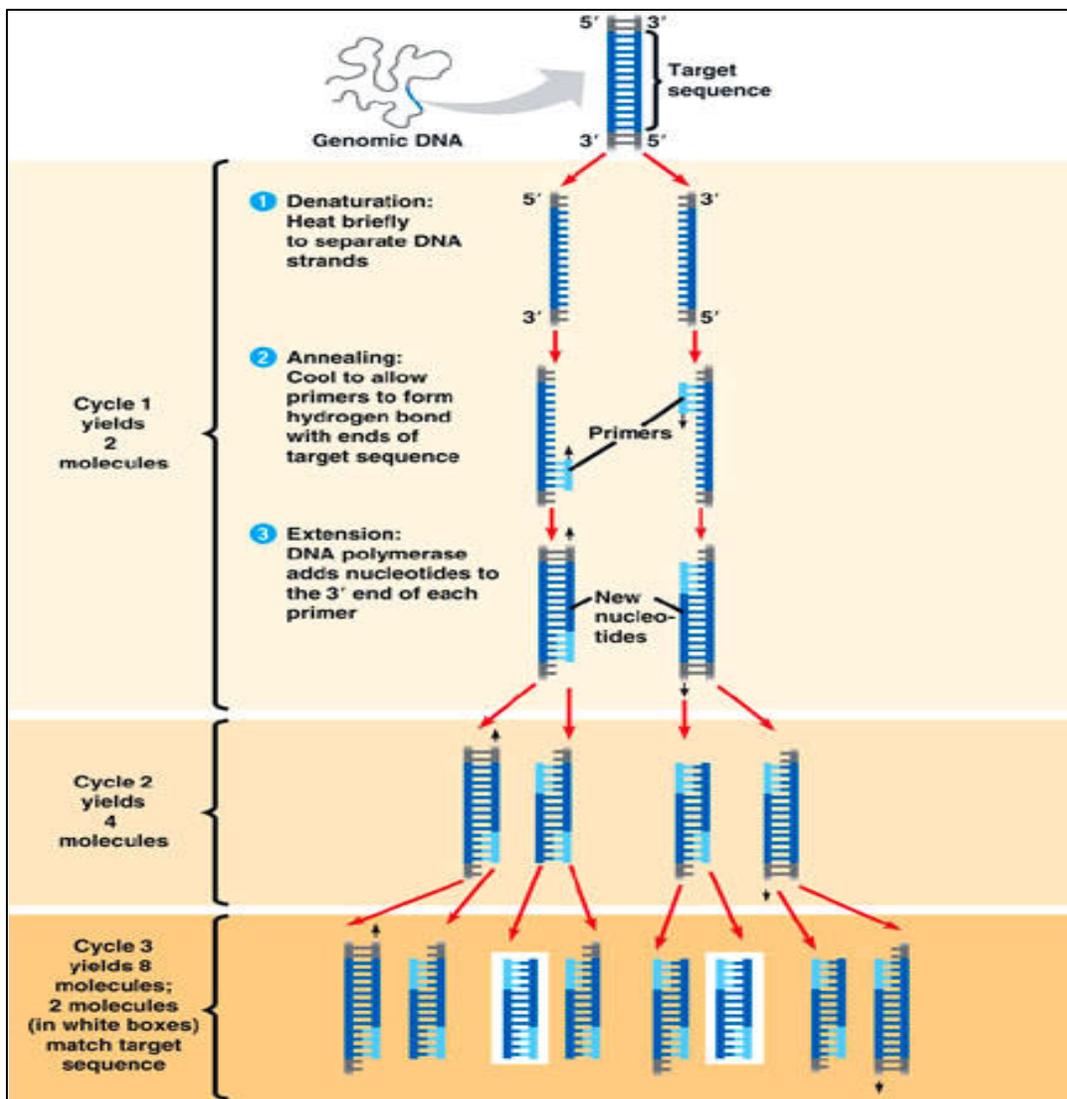


Figura 21. Ciclos de la PCR ([fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/mol\\_gen.htm](http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/mol_gen.htm) s/f).

---

### 1.6.3 Pasos críticos en la PCR

Existen varios pasos críticos en esta técnica siendo uno de ellos la desnaturalización, ya que depende de este paso el que se abran las cadenas y que los oligonucleótidos se alinien con las secuencias complementarias. Además, la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos determinará la especificidad de la PCR, ya que cuando la temperatura es muy baja el apareamiento puede ser inespecífico y, cuando la temperatura es muy alta, los oligos pueden no alinearse con las regiones complementarias Bond y col. 2000 lo que resulta en una amplificación nula.

La concentración de  $MgCl_2$ , es otro parámetro crítico que puede interferir con una PCR exitosa así como la presencia de inhibidores de la Taq polimerasa en la muestra problema (Arredondo, s/f).

### 1.6.4 Componentes de la reacción

- La enzima Taq ADN polimerasa lleva a cabo la síntesis de la cadena complementaria del ADN en el sentido 5' a 3' siempre que exista un grupo -OH libre en la posición 3' del oligonucleótido. Esta enzima es termoestable y permite que se den varios ciclos a 94°C.
- La solución amortiguadora estándar contiene KCl 50 mM, Tris-HCL 10 mM pH 8.4,  $MgCl_2$  1.5 mM. La concentración del ión  $Mg^{2+}$  es muy importante, ya que de ella depende la eficiencia de la amplificación, su concentración varía de 1.5 – 2.5 mM; sin embargo, es importante mantener baja la concentración de EDTA (es un quelante de cationes mono y divalentes), el cual puede modificar la concentración final del  $Mg^{2+}$ .
- Los oligonucleótidos deben tener una longitud de 15 a 30 nucleótidos para garantizar una unión específica y su secuencia debe presentar la mayor similitud posible con la secuencia blanco (100% en las últimas 5 ó 6 bases en el extremo 3'). Se debe evitar que los oligonucleótidos presenten secuencias

---

complementarias en sus extremos 3', para evitar la formación de dímeros o de concatenámeros.

● Los dNTPs se agregan a la mezcla en una concentración equimolar de aproximadamente 200  $\mu$ M; es muy importante mantener la concentración entre los 4 dNTPs lo que evita que la Taq ADN polimerasa incorpore algún dNTP equivocado en algunas posiciones. Concentraciones de dNTPs que exceden los 50 mM inhiben la actividad de la Taq ADN polimerasa (Arredondo, s/f).

### 1.7 PCR en tiempo real

El PCR en tiempo real es un método reciente, altamente sensible, con el cual se pueden procesar muchas muestras simultáneamente para la detección y cuantificación de microorganismos (Labrenz y col., 2004). Debido a que usa fluorocromos y un detector de fluorescencia, la PCR en tiempo real directa es más sensible que un PCR convencional pudiendo detectar picogramos de nuestro gen objetivo. Este método se usa en investigación para cuantificar la expresión de los genes y para confirmar la expresión diferencial de los mismos. En laboratorios analíticos el PCR en tiempo real es usado para medir la abundancia de secuencias particulares de ADN o ARN; en la clínica y en la industria se usa para buscar mutaciones y polimorfismos de un solo nucleótido (Sambrook y Russell, 2001).

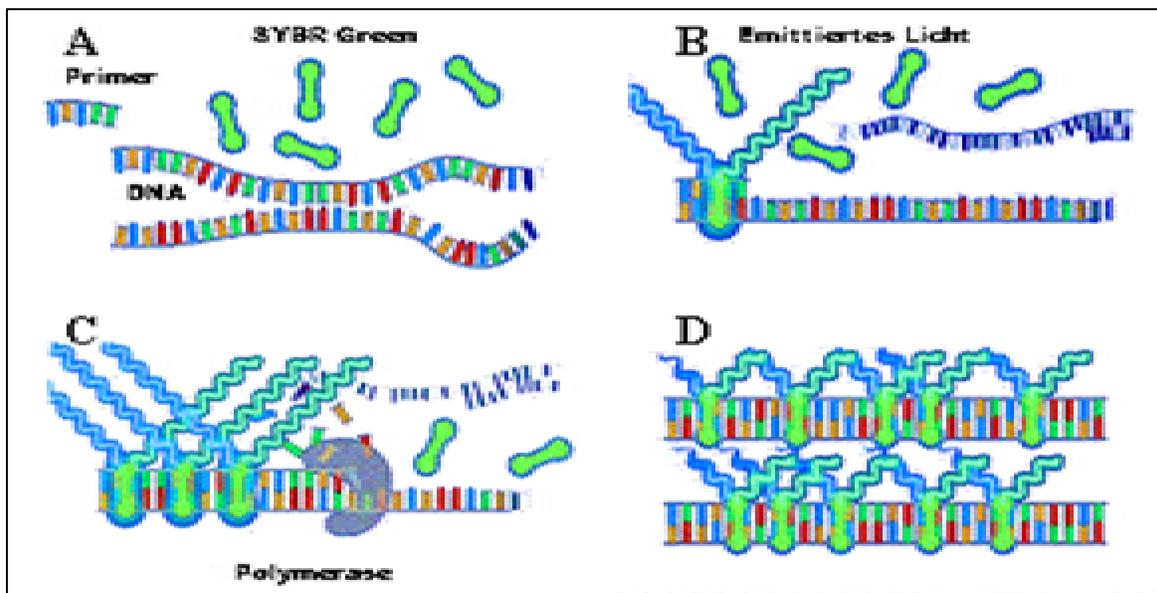
La concentración inicial de la secuencia blanco puede ser expresada como número de ciclo (Ct) requerido para alcanzar un umbral de amplificación. La secuencia blanco en una muestra desconocida puede ser cuantificada por interpolación en una curva estándar.

Dos métodos han sido desarrollados para cuantificar secuencias blanco de ADN por PCR en tiempo real, uno de ellos usa las sondas TaqMan en las cuales la señal de fluorescencia es generada después de la extensión del oligonucleótido por la Taq polimerasa. En este método la fuerza de la señal es proporcional a la

cantidad de ADN blanco y no es influenciada por la acumulación de productos no específicos, tales como dímeros de oligonucleótidos, los cuales no hibridan con las sondas marcadas. El otro método de PCR en tiempo real usa Intercaladores de ADN, que a pesar de ser menos específicos que las sondas TaqMan, son más versátiles y menos costosos.

### 1.7.1 Intercaladores fluorescentes de ADN

Los intercaladores de ADN como el bromuro de etidio y el SYBR Green I (Figura 22) son universales para detectar solo dobles hebras de ADN generadas durante el PCR, independientemente del molde y los oligonucleótidos usados en la reacción. Debido a que muchas moléculas de fluoróforo pueden unirse a cada producto de ADN, la intensidad de la señal generada es alta y proporcional al total de masa de ADN generado durante el PCR y es independiente del número de tipos de moléculas producidos (Sambrook y Russell, 2001).



**Figura 22.** Representación de emisión de fluorescencia del SYBR Green I al unirse al ADN (PCR, 2004).

### 1.7.2 Curva de disociación

Al final del PCR, el termociclador/fluorómetro puede ser programado para generar una curva de desnaturalización térmica del ADN amplificado y la lectura

de la temperatura de separación de las dos cadenas de ADN (temperatura de disociación= $T_m$ ). La forma de la curva de disociación indica si los productos amplificados son homogéneos y la  $T_m$  provee información sobre si el producto ha sido amplificado específicamente (Sambrook y Russell, 2001). En el caso de observar más de un pico en la curva de disociación, podemos inferir que se amplificó más de un producto.

### **1.7.3 Ventajas de la PCR en tiempo real contra la PCR convencional.**

La habilidad para cuantificar la amplificación de ADN durante la fase exponencial de la PCR, cuando ninguno de los componentes de la reacción es limitante, resulta en una gran precisión en la cuantificación de las secuencias blanco. En contraste, al PCR normal, en el cual la cantidad de producto leída es el punto final de la reacción. El PCR tiempo real no se ve afectado por las variaciones en los componentes de la reacción y es menos sensible a diferencias en la eficiencia de amplificación (Sambrook y Russell, 2001). La PCR en tiempo real permite observar la amplificación ciclo a ciclo y no requiere de geles para ver los productos, a su vez es más rápido y sensible.

Recientemente, se han descrito muchos métodos de PCR en tiempo real para bacterias y archaeas en muestras acuosas, de suelos y en sedimentos. La sensibilidad y especificidad pueden incrementarse, si se realizan procedimientos de PCR anidada, donde la amplificación inicial se realiza con un par de oligonucleótidos con poca especificidad (Labrenz y col., 2004).

### **1.8 Extracción de ADN**

En muchos trabajos se ha intentado incrementar la extracción de ADN de muestras de suelos y muestras de naturaleza mineral de diferente procedencia usando tratamientos físicos severos tales como agitación mecánica y sonicación para lisar las células microbianas. Tales tratamientos pueden dañar el ADN debido a que las células microbianas pueden permanecer unidas a partículas coloidales del suelo o a la materia orgánica. La extracción de ADN de muestras de suelos

siempre resulta en la co-extracción de sustancias húmicas y carbohidratos, las cuales interfieren con la detección y cuantificación del ADN. Esta contaminación puede inhibir a la Taq ADN polimerasa en las reacciones de PCR (Tsai y Olson, 1992), interferir en las digestiones con las enzimas de restricción y también reducir la eficiencia de la transformación (Zhou y col., 1996). El bromuro de hexadecimetilamonio (CTAB) y la polivinilpolipirrolidona (PVPP), han sido usados para remover eficientemente contaminantes del suelo como lo son los ácidos húmicos y los carbohidratos; de tal forma que se pueden obtener ADN de suficiente pureza (Tsai y Olson, 1992; Zhou y col., 1996).

En general, las bacterias que participan en biolixiviación cuentan con un sistema que les permite tolerar condiciones extremas, ya sea temperatura y/o pH, por lo que es difícil extraer ADN eficientemente con métodos convencionales usados para extraer esta molécula de bacterias patógenas de humanos o de plantas. La base del éxito para poder amplificar genes por PCR es contar con ADN en cantidad y calidad suficiente.

Dentro de la biolixiviación se han desarrollado trabajos para caracterizar los consorcios y entender mejor los procesos de extracción de metales, disminuyendo los costos económicos y ambientales (Szapiro, 2005). Por ejemplo, Coram y Rawlings (2002) encontraron que bacterias oxidantes de hierro pertenecientes al género *Leptospirillum* son de gran importancia en reactores de biooxidación de flujo continuo o reactores de tanque agitado (Okibe y col. 2003), los cuales se emplean para extraer metales de interés comercial como el oro. Los mismos autores también estudiaron la diversidad existente en este género analizando muestras aisladas de diferentes localizaciones geográficas, ayudando así a la clasificación de especies y subespecies. Por otro lado, Demergasso y col. (2005) analizaron la comunidad microbiana en una mina de sulfuros de cobre de baja ley que se encuentra en operación en Chile. En este trabajo analizaron la dinámica de los grupos filogenéticos en diferentes etapas en el ciclo de lixiviación y los correlacionaron con los parámetros físicos y químicos de la pila o montón.

Observaron que la distribución temporal de las secuencias de ADNr 16S puede dividirse en tres periodos. En la primera etapa *A. ferrooxidans* y archaeas como *Sulfurisphaera* fueron dominantes; en la segunda etapa se detectaron principalmente los grupos *Leptospirillum* y *Ferroplasma*; y finalmente en la tercera etapa microorganismos como *Sulfobacillus* fueron dominantes mientras que *Ferroplasma* fue la única archaea detectada. Este tipo de datos pueden ser usados para obtener información cuantitativa más detallada de la estructura de las comunidades microbianas y para poder explorar las vías metabólicas de la comunidad.

### **1.9 Objetivo general**

El objetivo del presente estudio fue evaluar diferentes métodos para la extracción de ADN de bacterias y archaeas presentes en cultivos obtenidos a partir de muestras de mineral lixiviado, escurrimientos, reactores y muestras de barreno, colectadas directamente en los terreros de lixiviación de la empresa Mexicana de Cananea (Cananea, Sonora, México), con el fin de investigar qué géneros y qué especies de microorganismos están presentes en los consorcios que están involucrados en la extracción del cobre por biolixiviación de los minerales sulfurosos.

#### **1.9.1 Objetivos específicos**

- Emplear varios métodos para la extracción de ADN de bacterias y archaeas
- Seleccionar *in silico* oligos universales que fueran eficientes para amplificar los genes de ARNr 16S de bacterias y archaeas relacionadas con biolixiviación
- Realizar PCR directa y anidada con oligos universales y género/especie específicos para obtener productos de amplificación de secuencias de ADNr 16S de bacterias y archaeas involucradas en la biolixiviación
- Clonar y secuenciar los productos de amplificación
- Analizar filogenéticamente las secuencias obtenidas

- Estandarizar la técnica de PCR en tiempo real para cuantificar la cantidad o proporción de algunas especies involucradas en biolixiviación de los consorcios analizados.

---

**Materiales y métodos**
**2.1 Material y Equipo****2.1.1 Material biológico**

<b>Material biológico</b>	<b>Proveedor</b>
<i>Escherichia coli</i> <b>Top 10F'</b> F' {lacIq Tn10 (TetR)} <i>mcrA</i> . ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) F80 <i>lacZ</i> .M15. <i>lac?</i> 74 <i>recA1 deoR araD139. (ara-leu)</i> 7697 <i>galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Donadas por el Dr. Gerardo Argüello Astorga, investigador del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
Cepas bacterianas de referencia: <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> IFO13701 <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> IFO14246 <i>Acidiphilium cryptum</i> IFO14242	Institute of Fermentation Osaka, Japón
Cepas bacterianas de referencia: <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSMZ14887 <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> DSMZ14882 <i>Acidiphilium cryptum</i> DSMZ2389 <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> DSMZ2705 <i>Acidimicrobium ferrooxidans</i> DSMZ10331 <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> DSMZ9293 <i>Sulfobacillus disulfidooxidans</i> DSMZ12064	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Alemania

**2.1.2 Vectores utilizados**

<b>Vector y características</b>	<b>Proveedor</b>
<b>pGEM-T y pGEM-T Easy</b> ®: vector de clonación para productos de PCR	Promega Corporation

---

**2.1.3 Reactivos**

<b>Reactivos</b>	<b>Proveedor</b>
Acetato de potasio	Sigma Chemical Co.
Acetato de sodio	Sigma Chemical Co.
Ácido acético glacial	J. T. Baker
Ácido bórico	J. T. Baker
Ácido clorhídrico	Industrial Kem de León S.A. de C.V.
Ácido sulfúrico	J. T. Baker
Agar grado bacteriológico	Invitrogen
Agarosa	Promega
Alcohol isoamílico	Industrial Kem de León S.A. de C.V.
ARNasa	Roche
Azufre	J. T. Baker
Azul de bromofenol	USB, Merck
Bacto-triptona o peptona	MoBio
Bromuro de etidio	Promega
Buffer de reacción para PCR	Promega
Carbenicilina	Marca genérica
Cloroformo	Industrial Kem de León S.A. de C. V.
Cloruro de calcio	Riedel de Haen
Cloruro de cobalto	J. T. Baker
Cloruro de cobre	Preparado en el Lab. Químico del Inst. de Metalurgia, UASLP
Cloruro de magnesio	Promega
Cloruro de potasio	J. T. Baker
Cloruro de sodio	J. T. Baker
Cloruro de zinc	J. T. Baker
CTAB	Aldrich
Desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Promega

Dodecil sulfato de sodio (SDS)	USB
EDTA	Fisher Bistec, USB
Enzimas de restricción ( <i>EcoRI</i> , <i>NcoI</i> , <i>SacI</i> , <i>Apa I</i> , <i>SpeI</i> )	Promega, Roche y New England Biolabs
Etanol	Fermont
Extracto de levadura	Fluka
Fenol	Invitrogen
Fosfato de potasio dibásico	J. T. Baker
Fosfato de potasio monobásico	J. T. Baker
Glucosa	Promega
Glicerol	Sigma Chemical Co.
Hidróxido de sodio	Industrial Kem de León S.A. de C.V.
IPTG	Promega
Isopropanol	Industrial Kem de León S.A. de C.V.
Kit PicoGreen	Sigma Chemical Co.
Kit QIAquick gel extraction	Qiagen
Kit QIAquick PCR purification	Qiagen
Kit Ultra Clean Microbial ADN Isolation	MoBio
Lisozima	USB
Marcador de ADN de 1 Kb	Invitrogen
Marcador de 1 Kb ADN ladder	New England Biolabs
Mercaptoetanol	Aldrich-Sigma
Molibdato de sodio	J. T. Baker
Nitrato de calcio	Sigma Chemical Co.
Nitrato de potasio	Riedel de Haen
Oligonucleótidos	Sigma Genosys
Perlas de zirconia/sílice 212-300 $\mu\text{m}$	Sigma
Plásmido pGEM-T y pGEM-T Easy	Promega
Polipeptona	Bioxon

Polivinilpirrolidona (PVP)	Sigma
Proteasa K	Invitrogen
Sacarosa	Phyto Technology Lab.
Sulfato de amonio	J. T. Baker
Sulfato de magnesio	Sigma Chemical Co.
Sulfato de zinc	Phyto Technology Lab.
Sulfato ferroso	Sigma Chemical Co.
SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR	Applied Biosystems
Taq polimerasa	Roche, Promega
Tiosulfato de sodio	J. T. Baker
Tris base	Promega
Tween 20	Sigma Chemical Co.
X-Gal	Biolane
Xilencianol	USB

#### 2.1.4 Equipo

Equipo	Proveedor
Agitador magnético con placa de calentamiento	Corning, USA
Autoclave eléctrica Sterilmatic mod. STM-E tipo C	Market Forge, USA
Autoclave de olla	
Balanza analítica eléctrica mod. SA210D	Scientech, USA
Balanza granataria mod. 1400	Ohaus, USA
Baño maría eléctrico mod. Isotemp 1025	Fisher Scientific, USA
Cámaras bioclimáticas	Lumistell, México
Cámara de electroforesis horizontal mod. Minisub-cell GT	Bio-Rad, Italia
Cámara de electroforesis	OWL Separation System, USA
Cámara fotográfica mod. DSCF717	Sony Cyber Shot, Japón

Campana de extracción de humos mod. CS línea 2000	Fisher-Aldher, USA
Campana de flujo laminar	VECO S.A.de C.V., México
Campana de flujo laminar	Fisher-Aldher, USA
Centrífuga refrigerada mod. RC 5C Plus	Sorvall, USA
Congelador, mod. CVC15	Nieto, México
Espectrofotómetro mod. DU 530	Beckman, USA
Fluorómetro mod. Genios	Tecan, USA
Fotodocumentador de geles mod. EpiChemi3 Darkroom	UVP, USA
Fuente de poder mod. EC105	Termo EC, USA
Fuente de poder mod. Power PAC300	Bio-Rad, USA
Microcentrífuga mod. Mini Spin	Eppendorf, Alemania
Microcentrífuga refrigerada mod. 5415	Eppendorf, Alemania
Placa de calentamiento mod. PC420	Corning, USA
Potenciómetro mod. 430	Corning, USA
Refrigerador mod. R-14	Torrey, México
Termociclador mod. Touchene Gradient	Techne, Inglaterra
Termociclador mod. TC-412	Techne, Inglaterra
Termociclador PCR tiempo real mod.	Bio-Rad, USA
Termomezclador R mod. 22331	Eppendorf, Alemania
Ultracongelador mod. UN-6613A35	Nuaires, USA
Vortex, mod. Genie 2	Fisher Scientific, USA

## 2.2 Cepas bacterianas de referencia y condiciones de cultivo

Las cepas de referencia fueron adquiridas del Institute of Fermentation Osaka, Japón (IFO) y de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Alemania (DSMZ). Se usaron las siguientes cepas de referencia: *Acidithiobacillus thiooxidans* IFO 13701, *Acidithiobacillus thiooxidans* DSMZ 14887, *Acidithiobacillus ferrooxidans* IFO 14246, *Acidithiobacillus ferrooxidans*

DSMZ 14882, *Acidiphilium cryptum* IFO 14242, *Acidiphilium cryptum* DSMZ 2389, *Leptospirillum ferrooxidans* DSMZ 2705, *Acidimicrobium ferrooxidans* DSMZ 10331, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* DSMZ 9293, *Sulfobacillus disulfidooxidans* DSMZ 12064 (Tabla 7). Los medios de cultivo y las siembras se realizaron siguiendo las indicaciones de los proveedores (Anexo 3).

Las cepas se adquirieron basándonos en los reportes de la literatura donde se menciona que son los organismos más comúnmente encontrados en consorcios bacterianos que participan en la biolixiviación o la biooxidación (Coram y Rawlings, 2002; Demergasso y col. 2005). Estos organismos se emplearon para estandarizar el método de extracción de ADN y para el método de PCR.

**Tabla 7.** Condiciones de cultivo de las cepas bacterianas de referencia

Cepa Referencia	Número	Medio de cultivo	Temperatura	pH
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> <sup>a</sup>	IFO 13701	224	30°C	4.0-4.6
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> <sup>a</sup>	DSMZ 14887	71	28°C	4.4-4.7
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>a</sup>	IFO 14246	235	30°C	3.0
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>a</sup>	DSMZ 14882	882	25°C	1.8
<i>Acidiphilium cryptum</i> <sup>a</sup>	IFO 14242	234	30°C	3.0
<i>Acidiphilium cryptum</i> <sup>a</sup>	DSMZ 2389	269	30°C	3.0
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i> <sup>a</sup>	DSMZ 2705	882	30°C	1.8
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i> <sup>b</sup>	DSMZ 10331	709	50°C	1.7
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> <sup>b</sup>	DSMZ 9293	665	50°C	1.9-2.4
<i>Sulfobacillus disulfidooxidans</i> <sup>b</sup>	DSMZ 12064	812	50°C	2.25

<sup>a</sup> Bacterias mesófilas

<sup>b</sup> Bacterias termófilas moderadas

### 2.3 Muestras analizadas

Las muestras analizadas fueron cultivos líquidos de los escurrimientos o mineral en roca lixiviado mantenidos en matraz, cultivos en reactores de tanque agitado, mineral de barrenos con desorción y escurrimientos frescos tomados en los terreros de Mexicana de Cananea (Cananea, Sonora, México) (Tabla 8, Anexo 1).

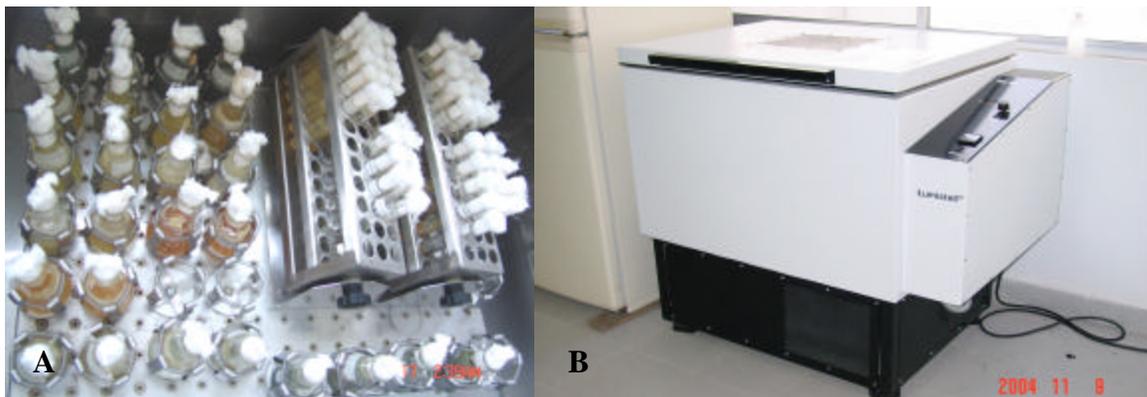
**Tabla 8.** Muestras analizadas

<p><b>Cultivos líquidos en matraz</b> <b>Mesófilas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•KIE (escurrimiento)</li> <li>•QIE (mineral en roca)</li> </ul> <p><b>Termófilas moderadas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•QINTMOFeAH (mineral en roca)</li> <li>•QINTMOSAH (mineral en roca)</li> <li>•K12TMOFeSA (derrame)</li> <li>•K12TMOFeSH (derrame)</li> <li>•K34TMOFeSA (derrame)</li> <li>•K34TMOFeSH (derrame)</li> <li>•R1236TMOFeSA (derrame)</li> <li>•R1236TMOFeSH (derrame)</li> <li>•QINTMOCPFeA o H (mineral en roca)</li> <li>•QINTMOCPFeSA o H (mineral en roca)</li> <li>•K12TMOCPFe o SA (derrame)</li> <li>•K12TMOCPFe o SH (derrame)</li> <li>•K34TMOCPFe o SA (derrame)</li> <li>•K34TMOCPFe o SH (derrame)</li> <li>•R1236TMOCPFe o SA (derrame)</li> <li>•R1236TMOCPFe o SH (derrame)</li> </ul>	<p><b>Cultivos en reactor (Tanque agitado)</b> <b>Termófilas moderadas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•R1 Quebalix I Norte (Conc. CuFeS<sub>2</sub>)</li> <li>•R2 Kino 12 (Conc. CuFeS<sub>2</sub>)</li> <li>•R3 Quebalix I Norte (Sulfuros primarios, Mineral de Cananea)</li> <li>•R4 Kino 12 (Sulfuros primarios, Mineral de Cananea)</li> </ul>
	<p><b>Escurrimientos frescos (Junio 2006)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Kino</li> <li>•Quebalix I</li> </ul>
	<p><b>Escurrimientos frescos (Septiembre 2006)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• AK Kino</li> <li>•A1Q1 Quebalix I</li> <li>•AQ Quebalix I</li> <li>•AR República</li> <li>•Alamo</li> <li>•Cananea</li> <li>•MVI</li> <li>•Mexicana III</li> <li>•Mezcla (A3,A4 y A2) Quebalix II</li> </ul>
<p><b>Mineral en roca (Barrenos)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•República celda #1 (0-3 m)</li> <li>•Quebalix I celda #11 (0-3 m)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•República celda #2 (0-3 m)</li> <li>•Quebalix I celda #15 (0-3 m)</li> </ul>

A=Autótrofa, H=Heterótrofa, CP=Calcopirita, Fe=Hierro, S=Azufre, K=Kino, Q=Quebalix, R=República, TMO=Termófila moderada, Cu=Cobre.

### 2.3.1 Condiciones de mantenimiento y concentración de la biomasa

Los cultivos se mantuvieron a 37°C para microorganismos mesófilos y a 50°C para microorganismos termófilos moderados, con 150-200 ml de medio líquido de sales minerales conteniendo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7.5 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{X7H}_2\text{O}$  3.32 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.03 mM,  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{X7H}_2\text{O}$  0.05 M para microorganismos mesófilos y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.03 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{X7H}_2\text{O}$  4.15 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.14mM, KCl 1.34mM, extracto de levadura 0.25 g/l, S en polvo 0.06 M,  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{X7H}_2\text{O}$  0.05 M para microorganismos termófilos moderados (Figura 23). Los cultivos fueron concentrados por centrifugación a 5,900xg por 10 min (Sorvall RC 5C plus, USA) (Figura 24).



**Figura 23.** Mantenimiento de los consorcios bacterianos A) 37°C, B) 50°C



**Figura 24.** Concentrados de las muestras antes de la extracción de ADN. A) Cepas de referencia, B) Muestras de reactores, Barrenos, C) Matracas y escurrimientos.

### 2.3.2 Tinción de Gram

La tinción de Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para la visualización de bacterias, sobre todo en muestras clínicas. Debe su nombre al bacteriólogo danés Christian Gram, que desarrolló la técnica

en 1844. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose Bacteria Gram positivas a las bacterias que se visualizan de color violeta y Bacteria Gram negativas a las que se visualizan de color rosa.

El protocolo para realizar la tinción se realizó de la siguiente manera: Se puso la muestra en un portaobjetos limpio, se dejó secar a temperatura ambiente, se fijó la muestra al calor (flameando 3 veces aprox.), se agregó azul violeta (*crystal violeta*) y se esperó 1 min (este tinte dejará de color morado las bacterias Gram positivas). Se enjuagó con agua, se añadió lugol (solución de  $I_2$  al 1% en equilibrio con KI al 2% en agua destilada) y se esperó 1 minuto, se lavó con agua y se agregó alcohol-acetona y se esperó 15 segundos. Se enjuagó con agua, se agregó *safranina* y se esperó 30 s (este tinte dejará de color rosado las bacterias Gram negativas). Se enjuagó con agua y se observó al microscopio óptico a 100x con aceite de inmersión.

#### **2.4 Protocolos probados para la extracción de ADN**

Debido a que la cantidad y la calidad del ADN extraído son fundamentales para los procesos de amplificación y clonación de genes, y a que existen reportes de dificultades para su extracción en microorganismos acidófilos, se probaron 9 protocolos de extracción de ADN (Tabla 9). Estos protocolos incluyen entre sus pasos la adición de enzimas, compuestos que eliminan carbohidratos y sustancias húmicas, así como molienda, sonicación, calentado en microondas, etc. Algunos de ellos habían sido probados previamente en el laboratorio y otros fueron recomendados por los doctores Jizhong Zhou y Purificación López. Cabe mencionar que las concentraciones de enzimas empleadas son en algunos casos 10 veces superiores a las recomendadas en protocolos convencionales para la extracción de ADN bacteriano.

**Tabla 9.** Protocolos probados para la extracción de ADN.

No.	Protocolo	Referencia
1	Protocolo D (N-laurilsarcosina al 10%, SDS al 10%, Proteinasa K)	Alpuche-Solís, 1999
2	Protocolo SET (Sacarosa, Tris-EDTA, SDS, Acetato de sodio)	González-Toril y col., 2003
3	Protocolo VIII (N-laurilsarcosina al 10%, SDS al 10%, Lisozima, Proteinasa K)	Adaptación de los métodos V y VI
4	Protocolo XII (Microondas)	Oho (Hoshino y col. 2004)
5	Protocolo XIII (Microondas, perlas de zirconia/sílice)	Adaptación de los métodos XIII y Garbor y col, 2003
6	Protocolo de Zhou y col. 1996 (molienda con nitrógeno líquido)	Zhou y col. 1996
7	Protocolo adaptado de Wisotzkey y col. 1990 (Acetato de sodio)	Wisotzkey y col.1990
8	Protocolo de adaptado de Garbor y col. 2003 (Perlas de zirconia/sílice)	Garbor y col., 2003
9	Protocolo XV (Ultra Clean Microbial ADN Isolation Kit)	Kit comercial (MoBio)

Alpuche-Solís, 1999 es un protocolo empleado para la extracción de ADN de plantas, los métodos V y VI son modificaciones de protocolos para la extracción de ADN de suelos.

De estos 9 protocolos, 3 resultaron ser eficientes para la extracción de ADN de nuestras muestras ya que se pudieron observar productos de amplificación como se detalla en la sección de resultados. Los 3 protocolos se describen a continuación:

#### **2.4.1 Protocolo adaptado de Wisotzkey y col. (1990).**

Las extracciones de ADN de las muestras de estudio se realizaron centrifugando 250 ml de las muestras a 2,300xg por 10 min a 4°C; para la lisis celular, se resuspendieron las células añadiendo la solución NaCl 0.15M-EDTA 0.01M pH 8.0, lisozima (2 mg/ml) y se incubaron por 1 h a 37°C. Posteriormente se adicionó Proteinasa K (2 mg/ml) y se incubaron las muestras por 2 h a 60°C, agitando vigorosamente cada 30 min. Se añadieron 100 µl de SDS al 10% y 200 µl de acetato de sodio 5M pH 8.0. La solución se incubó la extracción de ADN por 10 min a 60°C, se centrifugó y se repitió dos veces el proceso de adición de SDS y acetato de sodio. Para la eliminación de proteínas, se colocaron los

---

sobrenadantes en un tubo limpio y se adicionó un volumen de cloroformo-álcool isoamílico (24:1); se mezclaron y se centrifugaron a 9,300 xg por 10 min. Se separó el sobrenadante y para precipitar los ácidos nucleicos, se agregó un volumen de isopropanol frío y la mezcla se incubó la extracción de ADN a -20°C por 1 h. Se centrifugó a 16,100 xg por 15 min a 4°C. Se lavó la pastilla con etanol al 70% y se centrifugó por 3 min a 9,300 xg. La pastilla se dejó secar y se resuspendió en 50 µl de TE 1X.

#### **2.4.2 Protocolo adaptado de Garbor y col. (2003).**

Las muestras de 250 ml, 1 ó 2 L se concentraron por centrifugación a 6,000 xg por 8 min. Posteriormente la pastilla se homogenizó en vortex a máxima velocidad por 5 min con 750 µl de del buffer de lisis (Tris 100 mM pH 8.0, EDTA 100 mM pH 8.0, NaCl 1.5 M, CTAB 1%). Posteriormente se agregó lisozima (2.5 mg/ml), proteinasa K (1 mg/ml) y 0.7g de perlas de zirconia/sílice (0.1 mm de diámetro); las muestras se incubaron por 30 min a 37°C y se agitaron a máxima velocidad de 5 a 10 min en vortex. Se agregaron 200 µl de SDS al 20% y se mezclaron e incubaron por 2 h a 65°C, agitando vigorosamente cada 30 min. Se colectaron los sobrenadantes después de centrifugarlos a 6,000 xg por 10 min. Se lavaron las pastillas dos veces adicionando 500 µl del buffer de lisis, agitando en vortex. Se incubaron a 65°C por 10 min y se centrifugaron a 6,000 xg. Para eliminar a las proteínas se añadió a los sobrenadantes un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). La fase acuosa se pasó a un tubo limpio y para precipitar los ácidos nucleicos se añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol y se incubó toda la noche a 4°C. Se centrifugó a 16,000 xg, se lavó el precipitado con etanol al 70%, y se centrifugó a 16,000 xg por 3 min. Se secó la pastilla y resuspendió en TE 1X.

#### **2.4.3 Protocolo de Ultra Clean Microbial ADN Isolation Kit de MoBio.**

Se adicionaron 1.8 ml del concentrado bacteriano en un tubo nuevo de 1.9 ml. Se centrifugaron por 30 s, se decantó el sobrenadante, se centrifugaron 30 s más y se eliminó el sobrenadante con pipeta. Se resuspendió la pastilla celular

---

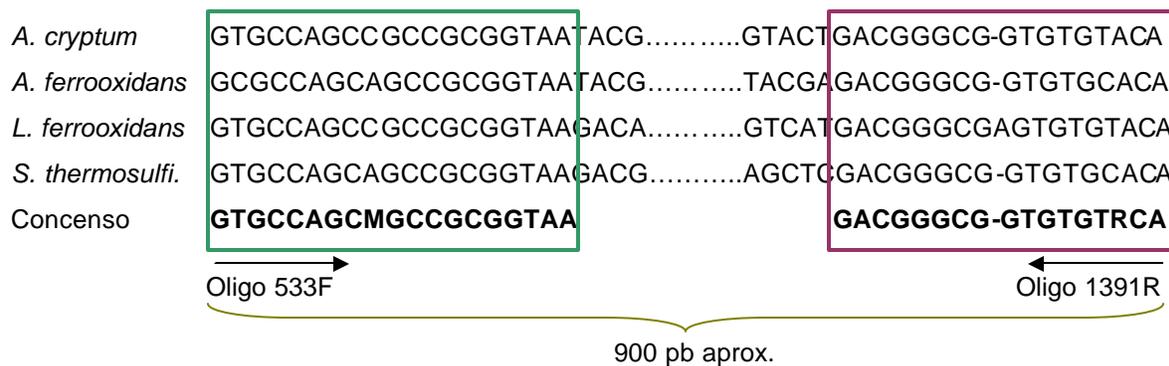
con 300 µl de la solución Microbead y se agitó suavemente en vortex. Se transfirió la solución de células a un tubo con micro perlas. Se adicionaron 50 µl de la solución MD1, se incubó a 65°C por 10 min. Se agitó en vortex a máxima velocidad por 10 min, se centrifugó a 10,000 xg por 30 s. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.9 ml. A este se le adicionaron 100 µl de la solución MD2 al sobrenadante, se agitó en vortex por 5 s, y se almacenó a 4°C por 10 min. Se centrifugaron los tubos por 1 min a 10,000 xg. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, se agregaron 900 µl de la solución MD3 y se agitó en vortex por 5 s. Se cargaron 700 µl de la solución en el tubo con filtro, y se centrifugó a 10,000 xg por 30 s, se adicionó el sobrenadante restante y se centrifugó por 30 s. Se descartó todo el filtrado. Se adicionaron 300 µl de la solución MD4 y se centrifugó por 30 s. Se puso el tubo con filtro en un tubo nuevo de 1.9 ml y se agregaron 50 µl de la solución MD5 en el centro del filtro, se centrifugó a 10,000 xg por 30 s y se descartó el tubo con filtro. Se almacenaron los 50 µl eluidos a -20°C.

El ADN obtenido en cualquiera de los tres protocolos se puede usar inmediatamente o almacenarse a -20°C, para análisis posteriores.

## 2.5 Amplificación de ADNr 16S por PCR

Los genes que transcriben el ARNr 16S fueron amplificados por PCR en un volumen total de 25 µl conteniendo 1 µl de ADN genómico directo y diluciones 1:10 ó 1:100, buffer de PCR 1X, 200 µM de dNTPs, 1.5mM ó 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de cada oligonucleótido sentido y reverso, y 2.5 U de Taq polimerasa (Promega, Roche). La temperatura de alineamiento y la concentración de MgCl<sub>2</sub>, fueron optimizadas por medio de gradientes en PCR (diferentes temperaturas de 51°C-59°C, diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub> de 1.5- 2.5 mM). En la reacción, el oligonucleótido sentido seleccionado fue el universal 533F (Bond y col., 2000) y el oligonucleótido reverso seleccionado fue el universal 1391R (Barns y col., 1994) (Tabla 10). Se realizó un análisis *in silico* usando el programa DNASTAR (Fundado en la Universidad de Winsconsin, por el Profesor de Genética Frederick

Blattner en 1980. Lasergene, EUA), para alinear varios oligonucleótidos reportados en la literatura con secuencias de ADNr 16S de los posibles organismos esperados en los consorcios de biolixiviación. Se usó el termociclador Touchgene Gradient (Techne, Inglaterra) o el termociclador TC-412 (Techne, Inglaterra) para las reacciones de ciclado por medio de una desnaturalización inicial a 94°C por 10 min, seguido por 40 ciclos a 94°C por 1 min, 55°C por 1.5 min y 72°C por 2 min, con una extensión final a 72°C por 10 min (Barns y col., 1994). También se usó el protocolo de Durand, (1996) las reacciones de incubación fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, seguido por 30 ciclos a 94°C por 1 min, 60°C por 1 min y 72°C por 2 min, con una extensión final a 72°C por 7 min. Los productos de las reacciones de PCR fueron detectados por electroforesis en gel, cargando 10 µl de la mezcla de reacción y 2 µl de buffer de carga 6X (glicerol 50%, EDTA 1mM, Azul de bromo fenol 0.25%, Xilencianol 0.25%) en un gel de agarosa al 1% corrido a 70V por 45 min aproximadamente. El gel fue teñido con bromuro de etidio y observado bajo luz ultravioleta (UPV, EpiChemi3 Darkroom, USA). El tamaño esperado de los fragmentos de PCR es de aproximadamente 1 Kb (Figura 25).

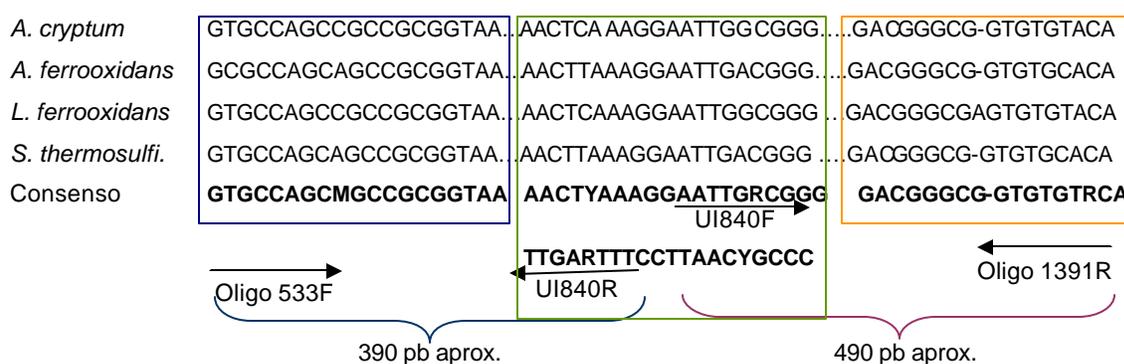


**Figura 25.** Esquema del fragmento a amplificar con los oligonucleótidos 533F-1391R. Oligonucleótidos en letras negras.

## 2.6 PCR anidada con oligonucleótidos universales internos

En las muestras que no se obtuvo producto de amplificación usando los oligos 533F y 1391R, se sometieron a un segundo PCR agregando 1 µl directo del

producto de amplificación del primer PCR. Para el segundo PCR se utilizaron oligonucleótidos universales que se diseñaron en la región interna de las secuencias de ADNr 16S, obtenidas de la base de datos del GenBank, de las siguientes especies: *Acidianus brierleyi*, *Acidimicrobium ferrooxidans*, *Acidiphilium cryptum*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Thiobacillus caldus*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Metallosphaera sedula*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* y *Sulfolobus acidocaldarius*. Los oligonucleótidos degenerados diseñados fueron el UI840F y el UI840R formando los siguientes pares UI840F y 1391R, ó 533F y UI840R para la reacción anidada (Tabla 10); siguiendo las mismas condiciones en la preparación de la mezcla de reacción y el protocolo de PCR anteriormente descrito para el programa de De Wulf-Durand y col. (1997). El tamaño esperado de los fragmentos del PCR anidado es de aproximadamente 500 pb (Figura 26).



**Figura 26.** Esquema de fragmento amplificado con oligos internos universales. Los oligos UI840F y UI840R fueron diseñados en este trabajo. Oligonucleótidos en letras negras.

**Tabla 10.** Oligonucleótidos universales de ADNr 16S usados en la PCR directa y en la PCR anidada

Oligo	Secuencia de nucleótidos 5´-3´
533F <sup>a</sup>	GTG CCA GCM GCC GCG GTA A
1391R <sup>b</sup>	GAC GGG CGG TGT GTR CA
UI840F <sup>c</sup>	AAC TYA AAG GAA TTG RCG GG
UI840R <sup>c</sup>	CCC GYC AAT TCC TTT RAG TT

a Diseñados por Hugenholtz y col.(1998), citado por Bond y col. (2000)

b Diseñados por Lane y col. (1991), citados por Barns y col. (1994)

c Diseñados en este trabajo, por Elida Gómez

## 2.7 Amplificación de ADNr 16S por PCR y PCR anidada con oligos específicos de género/especie

Se amplificaron los genes que transcriben el ARNr 16S en un primer PCR en un volumen total de 25 µl conteniendo 1 µl de ADN genómico directo, amortiguador de PCR 1X, 200 µM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de cada oligonucleótido sentido y reverso (Tabla 11 y 12), y 2.5 U de Taq polimerasa (Promega, Roche). En cada reacción del primer PCR, el juego de oligonucleótidos usados sentido y reverso es como se indica en la Tabla 11. Se usó el termociclador Touchgene Gradient (Techne, Inglaterra) o el termociclador TC-412 (Techne, Inglaterra) para las reacciones de incubación y fueron realizadas siguiendo el programa de De Wulf-Durand y col. (1997), como se describió anteriormente. Posteriormente se realizó un segundo PCR con la preparación de la mezcla de reacción igual al del primer PCR y los juegos de oligonucleótidos sentido y reverso usados están indicados en las Tablas 11 y 12. Los productos de las reacciones de PCR fueron detectados por electroforesis en gel, cargando 10 µl de la mezcla de reacción en un gel de agarosa al 1%, corrido a 70V por 45 min y teñido con bromuro de etidio y observado bajo luz ultravioleta (UVP, EpiChem3 Darkroom, USA). El tamaño esperado de los fragmentos de PCR es variable para cada género, aproximadamente de 420 a 1000 pb (Tabla 11).

**Tabla 11.** Oligonucleótidos de ADNr 16S específicos de género/especie usados en la PCR anidada

Especificidad Género/especie	PCR	Oligonucleótido Sentido	Oligonucleótido Reverso	Tamaño del fragmento (pb)
<i>Acidiphilium</i> <sup>a</sup>	1º.	ACIDO594F <sup>c</sup>	EUB1492R <sup>e,f</sup>	921
	2º.	ACIDO594F <sup>c</sup>	ACIDO 1150R <sup>g</sup>	557
<i>Leptospirillum</i> <sup>a</sup>	1º.	EUB27F <sup>e,f</sup>	LEPTO679R <sup>c</sup>	642
	2º.	LEPTO176F <sup>g</sup>	LEPTO679R <sup>c</sup>	520
<i>Sulfobacillus</i> <sup>a</sup>	1º.	EUB27F <sup>e,f</sup>	SULFO1137R <sup>c</sup>	1,091
	2º.	SULFO170F <sup>c</sup>	SULFO606R <sup>c</sup>	426
<i>Acidimicrobium</i> <sup>a</sup>	1º.	ACIM223F <sup>d</sup>	EUB1492R <sup>e,f</sup>	1269
	2º.	ACIM223F <sup>d</sup>	ACIM110R <sup>d</sup>	887
<i>Thiobacillus caldus</i> <sup>b</sup>	1º.	CALD460F <sup>c</sup>	EUB1492R <sup>e,f</sup>	1,054
	2º.	CALD460F <sup>c</sup>	CALD1475R <sup>c</sup>	1,016
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> <sup>b</sup>	1º.	THIO458F <sup>c</sup>	EUB1492R <sup>e,f</sup>	1,057
	2º.	THIO458F <sup>c</sup>	THIO1473R <sup>c</sup>	1,017

<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>b</sup>	1º.	FERRO458F <sup>c</sup>	EUB1492R <sup>e,f</sup>	1,057
	2º.	FERRO458F <sup>c</sup>	FERRO1473R <sup>c</sup>	1,017
<i>Ferroplasma</i> <sup>d</sup>	1º.	533F <sup>e</sup>	1391R <sup>e</sup>	800
	2º.	FERROP <sup>d</sup>	1391R <sup>e</sup>	540

<sup>a</sup> Oligonucleótidos específicos de género

<sup>b</sup> Oligonucleótidos específicos de especie

<sup>c</sup> Oligonucleótidos reportados por De Wulf-Durand, 1997

<sup>d</sup> Oligonucleótido específico de género, diseñado en este trabajo por Elida Gómez

<sup>e</sup> Oligonucleótidos universales

<sup>f</sup> Oligonucleótidos diseñados por Lane, 1991

<sup>g</sup> Oligonucleótidos diseñados por Goebel y Stackebrandt, 1995

**Tabla 12.** Secuencias de oligonucleótidos de ADNr 16S específicos de género/especie usadas en la PCR directa y el PCR anidada

Especificidad de género/especie	Oligo	Secuencia de nucleótidos 5´-3´
Universales	EUB27F <sup>a</sup>	GAG TTT GAT CCT GGC TCA G
	EUB1492R <sup>a</sup>	TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T
<i>Acidiphilium</i>	ACIDO594F <sup>a</sup>	ACA GTC AGG CGT GAA ATT CCT G
	ACIDO1150R <sup>a</sup>	AGA GTG CCC ACC CAA ACA T
<i>Leptospirillum</i>	LEPTO176F <sup>a</sup>	CGA ATA GTA TCC GGT TCC G
	LEPTO679R <sup>a</sup>	AAA TTC CGC TTC CCT CTC C
<i>Sulfobacillus</i>	SULFO170F <sup>a</sup>	CAA TCC CGC ATA CGT TCC
	SULFO606R <sup>a</sup>	AAA CCG CTA CGT ATC GCA C
	SULFO1137R <sup>a</sup>	GAA CCG CTG GCA ACA CAC
<i>Acidimicrobium</i>	ACIM223F <sup>b</sup>	CTA TCA GCT TGT TGG TG
	ACIM110R <sup>b</sup>	GAA TTA ACT CCG GCA GTC
<i>T. caldus</i>	CALD460F <sup>a</sup>	ATC CGA ATA CGG TCT GCT A
	CALD1475R <sup>a</sup>	TAT ACC GTG GTC GTC GCC
<i>A. thiooxidans</i>	THIO458F <sup>a</sup>	GGG TGC TAA TAW CGC CTG CTG
	THIO1473R <sup>a</sup>	TAC CGT GGT CAT CGC CCT
<i>A. ferrooxidans</i>	FERRO458F <sup>a</sup>	GGG TTC TAA TAC AAT CTG CT
	FERRO1473R <sup>a</sup>	TAC CGT GGT AAC CGC CCT
<i>Ferroplasma</i>	FERROP576F <sup>c</sup>	CTG CAA AAC TTG AGA TCG GGT G

<sup>a</sup> El número corresponde a la posición en *Escherichia coli* del primer nucleótido del oligonucleótido (5´-3´).

<sup>b</sup> El número corresponde a la posición en *Acidimicrobium ferrooxidans* del primer nucleótido del oligo (5´-3´)

<sup>c</sup> El número corresponde a la posición en *Ferroplasma* del primer nucleótido del oligonucleótido (5´-3´)

## 2.8 Clonación de los productos de la PCR

Los productos obtenidos en las reacciones de PCR que dieron las bandas de los tamaños esperados se cortaron y purificaron con el Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Posteriormente, se ligaron en el vector pGEM-T o en pGEM-T Easy de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Promega) (Figura 27) y se usaron para transformar células competentes de *E. coli* Top-10F' por medio choque térmico. Las células competentes transformadas se sembraron en cajas conteniendo medio Luria-Bertani (LB) con carbenicilina (0.1 mg/ml), 40 µl de IPTG (100 mM) y 15 µl de X-Gal (40 mg/ml). Después de la incubación a 37°C por 18 h, las unidades formadoras de colonias de color blanco que indicaban presencia de vector con el inserto, fueron enumeradas. Al menos 7 transformantes de cada caja fueron crecidas toda la noche en 3 ml de medio líquido LB suplementado con carbenicilina, para su posterior extracción de ADN plasmídico.

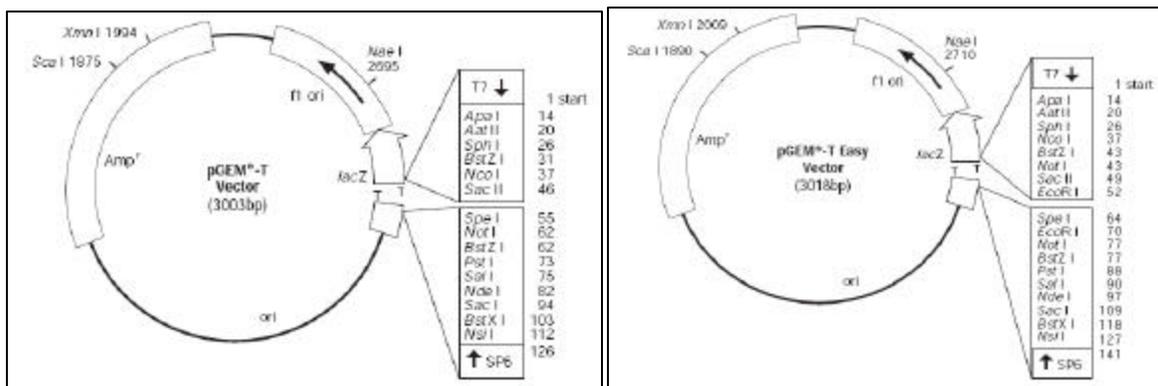


Figura 27. Esquemas de los vectores usados en el trabajo

### 2.8.1 Protocolo de purificación QIAquick Gel Extraction (Qiagen)

Se cortó el gel de agarosa con un bisturí limpio con etanol, se pesó el fragmento del gel en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente se adicionaron 3 volúmenes del buffer QG a un volumen del gel (100 mg=100 µl). Se incubó a 50°C por 10 min hasta disolver el gel, se adicionó un volumen de isopropanol a la muestra y se mezcló. Se puso la columna en un tubo receptor nuevo, para unir el ADN se aplicó la muestra en la columna y se centrifugó por 1 min a 15,600 xg. Se descartó el filtrado y se puso la columna en el mismo tubo. Para lavar el ADN, se

---

adicionaron 0.75 ml del buffer PE y se centrifugó 1 min a 15,600 xg. Se descartó el filtrado y se centrifugó de nuevo 1 min a 15, 600 xg. Se puso la columna en un tubo eppendorf limpio y para eluir el ADN, se adicionaron 30 µl de buffer EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8.5), se dejó reposar 1 min y se centrifugó 1 min a 15, 600 xg.

### **2.8.2 Protocolo de ligación con el vector de clonación pGEM-T/pGEM-T Easy**

Para cada reacción se mezclaron cada uno de los componentes del kit en el siguiente orden: 5 µl del buffer de ligación 2X, 1 µl de vector pGEM-T o pGEM-T Easy (50 ng), 2 µl de producto de PCR, 1 µl T4 ADN ligasa, 1 µl de agua; para un volumen final de 10 µl, se mezcló por pipeteo y se almacenó a 4°C durante toda la noche.

### **2.8.3 Protocolo para preparación de células competentes**

Se inocularon 500 µl de un pre-inóculo crecido durante toda la noche, en un matraz de 250 ml con 50 ml de medio LB. Se incubó el matraz a 37°C por 90 min, con agitación a 200 rpm. Se colocó el medio en botellas Sorvall frías y se centrifugó durante 7 min a 6,000 xg, se descartó rápidamente el sobrenadante y se colocaron las botellas en un baño de hielo. Se agregó a cada botella Sorvall, 7.7 ml de una solución fría de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M – Glicerol al 15%, se resuspendieron las células agitando las botellas en vortex de manera alternada de 5 a 10 s y colocando en hielo. Se centrifugaron por 7 min a 6,000 xg y se descartó el sobrenadante rápidamente y se colocaron las botellas nuevamente en hielo. Se agregaron 1.27 ml de la solución de CaCl<sub>2</sub>-Glicerol (a cada botella Sorvall), se resuspendieron en vortex de 5 -10 s alternadamente incubando en hielo hasta resuspender totalmente. Se alicuotaron 30 µl de células en cada tubo eppendorf frío, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C.

### **2.8.4 Protocolo para transformación de células competentes**

Se colocó el tubo de células competentes congelado en un baño de hielo, una vez descongeladas las células se añadieron 2 µl del vector ligado con el fragmento de interés y se mezcló por pipeteo. Se colocó el tubo en hielo por 15

---

min, posteriormente para realizar el choque térmico se llevó a un baño a 43°C de 1 a 2 min, y se colocó de nuevo en baño de hielo por 5 a 10 min. Se añadió 1 ml de medio LB líquido y se incubó 1 h a 37°C con agitación (200 rpm). Se concentraron las células por centrifugación 30 s a 15,600 xg, se eliminó el sobrenadante. Se sembraron 100 µl de las células concentradas en medio LB con carbenicilina.

Las cajas de medio LB sólido+antibiótico se prepararon 15 min antes de sembrar las células concentradas, se añadió: 40 µl de IPTG 100 mM y 20 µl de X-Gal 40 mg/ml.

## **2.9 Aislamiento de ADN plasmídico, digestión y purificación de las clonas seleccionadas**

A las clonas crecidas durante toda la noche se les realizó la extracción de ADN plasmídico siguiendo el protocolo de Birnboim y Doly, 1979. A los plásmidos obtenidos, dependiendo del origen, se les realizaron digestiones con enzimas de restricción usando *EcoRI*, *ApaI*, *SpeI*, *NcoI* y *SacI* (Promega, Invitrogen), para comprobar la presencia y tamaño esperado del fragmento clonado. Las clonas que dieron el fragmento del tamaño esperado, se purificaron con QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) siguiendo las indicaciones del proveedor. Las muestras se cuantificaron para conocer su concentración por medio de corrimiento en gel, usando marcador cuantificado de 1 Kb ADN ladder (Biolabs) y/o Fluorómetro GENios (Tecan, USA) y se enviaron al CINVESTAV Unidad Irapuato para secuenciar.

### **2.9.1 Protocolo de extracción de ADN plasmídico (Miniprep), basado en el método de Birnboim y Doly, 1979.**

Se creció un inóculo de bacterias transformadas en tubos Falcon de 15 ml con 3 ml de medio LB líquido con carbenicilina durante 18-24 h a 37°C. Se transfirieron 1.5 ml a un tubo eppendorf, se centrifugaron a 15,600 xg durante 30 min y se repitió la operación. La pastilla bacteriana se resuspendió en 100 µl de solución I (Anexo 3), agitando en vórtex. Se agregaron 2 µl de ARNasa (10

---

mg/ml). Se añadieron 200  $\mu$ l de la solución II (Anexo 3) preparada al instante; se mezcló suavemente por inversión hasta que la suspensión se vio translúcida. Se agregaron 150  $\mu$ l de la solución III (Anexo 3) y se mezcló por inversión. Se dejó reposar en hielo por 3 min y se centrifugó a 15,600 xg por 3 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo y se agregaron 900  $\mu$ l de etanol absoluto, se dejó reposar en hielo durante 3 min y se centrifugó a 15,600 xg por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 15,600 xg por 2 min. Se eliminó el sobrenadante, se dejó secar invirtiendo el tubo en una servitoalla y se resuspendió la pastilla en 50  $\mu$ l de TE pH 8.0.

### **2.9.2 Protocolo para digerir ADN plasmídico**

Para cada reacción se mezclaron 1  $\mu$ l de amortiguador 10X, 0.3  $\mu$ l de cada enzima de restricción, 2  $\mu$ l de ADN plasmídico y 6.4  $\mu$ l de agua; obteniendo un volumen final de 10  $\mu$ l. La mezcla se dejó incubar por 2 h y se observó la digestión por corrimiento en gel de agarosa al 1%.

### **2.9.3 Protocolo de purificación QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)**

Se adicionaron 5 volúmenes del buffer PB a un volumen de la muestra de PCR y se mezcló. Se puso la columna en un tubo de colección de 2 ml, para unir el ADN se añadió la muestra en la columna y se centrifugó por 30 s a 15,600 xg. Se descartó el filtrado y se centrifugó 1 min más. Se puso la columna en un tubo eppendorf limpio de 1.5 ml y para eluir el ADN se adicionaron 30  $\mu$ l del buffer EB (Tris-HCl 10 mM) en el centro de la columna, se dejó reposar la columna por 1 min y se centrifugó a 15,600 xg.

### **2.9.4 Protocolo de cuantificación por corrimiento en gel**

Se preparó un gel de agarosa al 1%, se cargaron 10  $\mu$ l de la muestra a cuantificar con 2  $\mu$ l de buffer de carga. Se usó como marcador de peso molecular un marcador cuantificado de 1 kb ADN ladder (Biolabs). La banda de 3 kb corresponde a una concentración de 125 ng de ADN.

---

### 2.9.5 Protocolo de cuantificación por fluorometría

Se preparó la solución de Picogreen 1:400 en TE 1X y por cada pozo de la placa se añaden 198 µl de la solución de Picogreen con 2 µl del ADN a cuantificar o estándar. Los estándares se prepararon a partir de ADN de lambda de un kit previamente cuantificado (50 ng/µl, 25ng/µl, 10 ng/µl, 5ng/µl y 1ng/µl). Se protegió la placa con papel aluminio y se llevo al fluorómetro GENIUS para su lectura.

### 2.10 Análisis de secuencias y construcción de árboles filogenéticos

Las secuencias de las clonas obtenidas se compararon por medio del programa BLAST con la base de datos de nucleótidos. Se recuperaron de la base de datos un grupo de secuencias que dieron un valor significativo de BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Comparamos nuestras secuencias de interés con aquellas obtenidas de la base de datos por medio de un alineamiento múltiple usando el programa ClustalW v1.82 (Higgins y col., 1994) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). La construcción de los árboles filogenéticos se hizo con el método de *neighbor joining* empleando el modelo de Kimura con una tasa de transición-transversión de 2; el soporte de cada una de las ramas se evaluó por bootstrap usando 100 permutaciones por medio del programa MEGA v3.1 (Kumar y col., 2004) (<http://www.megasoftware.net/>).

### 2.11 Análisis de la PCR tiempo real cuantitativo con SYBR Green Master Mix

Los genes que fueron detectados en PCR iniciales fueron cuantificados por PCR en tiempo real usando los productos obtenidos de un primer PCR. El PCR en tiempo real fue realizado en un instrumento detector i-cycler (Biorad). Las mezclas del PCR cuantitativo se prepararon conteniendo: SYBR Green Master mix 1X (SYBR Green I, AmpliTaq Gold® ADN polimerasa, dNTPs con dUTP, una referencia pasiva y los componentes del amortiguador optimizados), 1 mM de cada oligonucleótido, para reacciones con un volumen total de 50 µl. La PCR en tiempo real fue realizada usando juegos de oligonucleótidos específicos de género y especie para ADNr 16S anteriormente descritos para PCR convencional. Para realizar el PCR se empleó el programa de De Wulf-Durand y col. (1997), las

reacciones de amplificación se realizaron como se describió anteriormente. Se realizó un primer PCR convencional con las condiciones anteriormente descritas para la PCR con oligonucleótidos específicos de género/especie; posteriormente se realizó la PCR en tiempo real anidado, tomando 1 µl del producto de amplificación del primer PCR. La curva estándar para cada género/especie fue hecha con plásmidos cuantificados por fluorometría que contenían el fragmento esperado; esta curva fue realizada por duplicado con diluciones seriadas de  $1 \times 10^8$  copias a  $1 \times 10^3$  copias durante cada experimento de PCR en tiempo real. Las muestras que se analizaron, fueron aquellas en las que se tipificaron los siguientes géneros: *Leptospirillum ferriphilum* y *Sulfobacillus thermotolerans*, ya que estos géneros son de los principales microorganismos involucrados en la biolixiviación de sulfuros minerales. Las muestras y los blancos se analizaron por duplicado. La preparación de los estándares se realizó como se indica en la Figura 28.

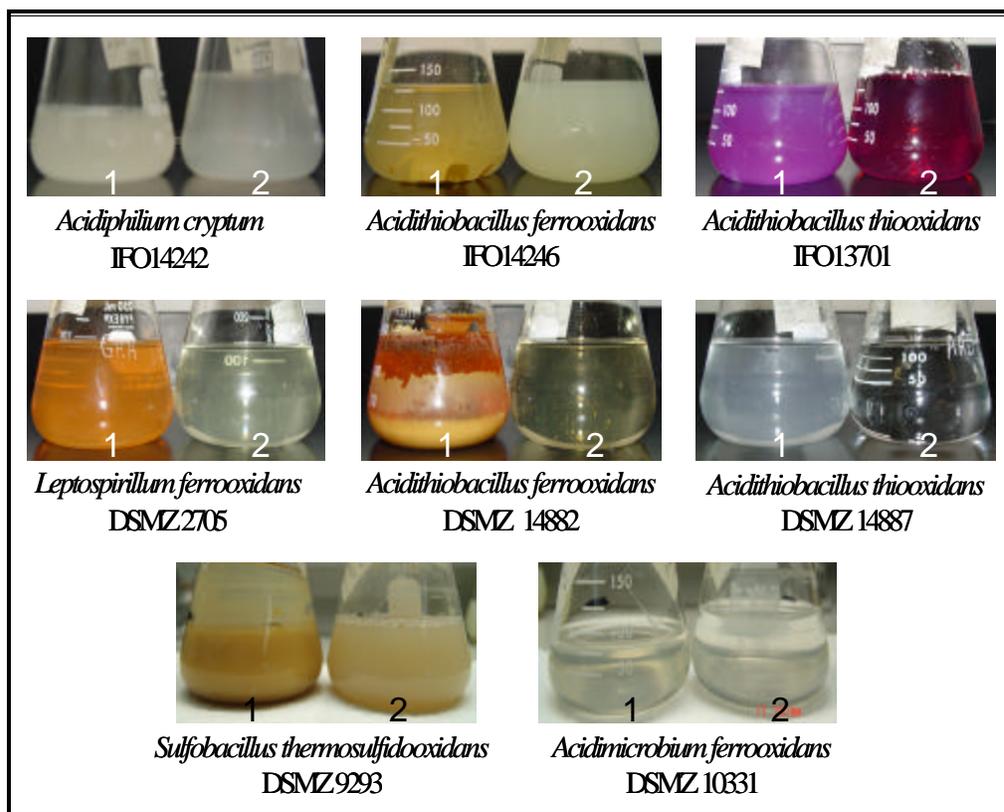
Cálculo del número de copias	Preparación de estándares para KIE-Lepto4
<p>Tamaño del inserto: 520 pb                      Tamaño del vector: +3015 pb                      Total: 3535 pb X 650 KDa = 2 297 750 g de plásmido</p> <p style="text-align: center;">↓                      Peso promedio de bases de DNA (pb)</p> <p>Usando el número de <u>Avogadro</u>, se divide entre los gramos de plásmido:  <math>\frac{6.023 \text{ E}+23 \text{ copias}}{2\,297\,750 \text{ g plásmido}} = 2.621 \text{ E}+17 \text{ copias/g de plásmido}</math></p> <p><math>\frac{2.621 \text{ E}+17 \text{ copias}}{\text{g plásmido}} \times \frac{1 \text{ g}}{1 \text{ E}+09 \text{ ng}} = 2.621 \text{ E}+08 \text{ copias/ng}</math></p> <p>Se prepara un STOCK con una concentración de 1ng/µl</p>	<p><math>C1V1=C2V2</math>  <math>V1 = \frac{1 \text{ ng/}\mu\text{l} \times 50 \mu\text{l}}{57.56 \text{ ng/}\mu\text{l}} = 0.868 \mu\text{l}</math>                      57.56 ng/µl (Concentración del miniprep)</p> <p>Se tomaron 0.868 µl y de aforo a 50 µl                      Stock 1ng/µl → 2.621 E+08 copias</p> <p>Diluciones seriadas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>↙ Dil. 1:10 → 2.621 E+07 copias= 0.1 ng</li> <li>↙ Dil. 1:10 → 2.621 E+06 copias=0.01 ng</li> <li>↙ Dil. 1:10 → 2.621 E+05 copias=0.001 ng</li> <li>↙ Dil. 1:10 → 2.621 E+04 copias=0.0001 ng</li> <li>↙ Dil. 1:10 → 2.621 E+03 copias=0.00001 ng</li> <li>↙ Dil. 1:10 → 2.621 E+02 copias=0.000001 ng</li> <li>↙ Dil. 1:10 → 2.621 E+01 copias=0.0000001 ng</li> <li>↙ Dil. 1:10 → 2.621 E+00 copias</li> </ul>

**Figura 28.** Cálculos para la preparación de las diluciones seriadas usadas en la curva estándar en la PCR en tiempo real

## Resultados

### 3.1 Crecimiento de las cepas de referencia

Las cepas de referencia se crecieron de acuerdo a las indicaciones de los proveedores (Figura 29), sin embargo, hubo dos cepas de referencia que no crecieron en los medios sintéticos específicos para ellos. Las cepas que no crecieron son *A. cryptum* DSMZ 2983 y *S. disulfidooxidans* DSMZ 12064.

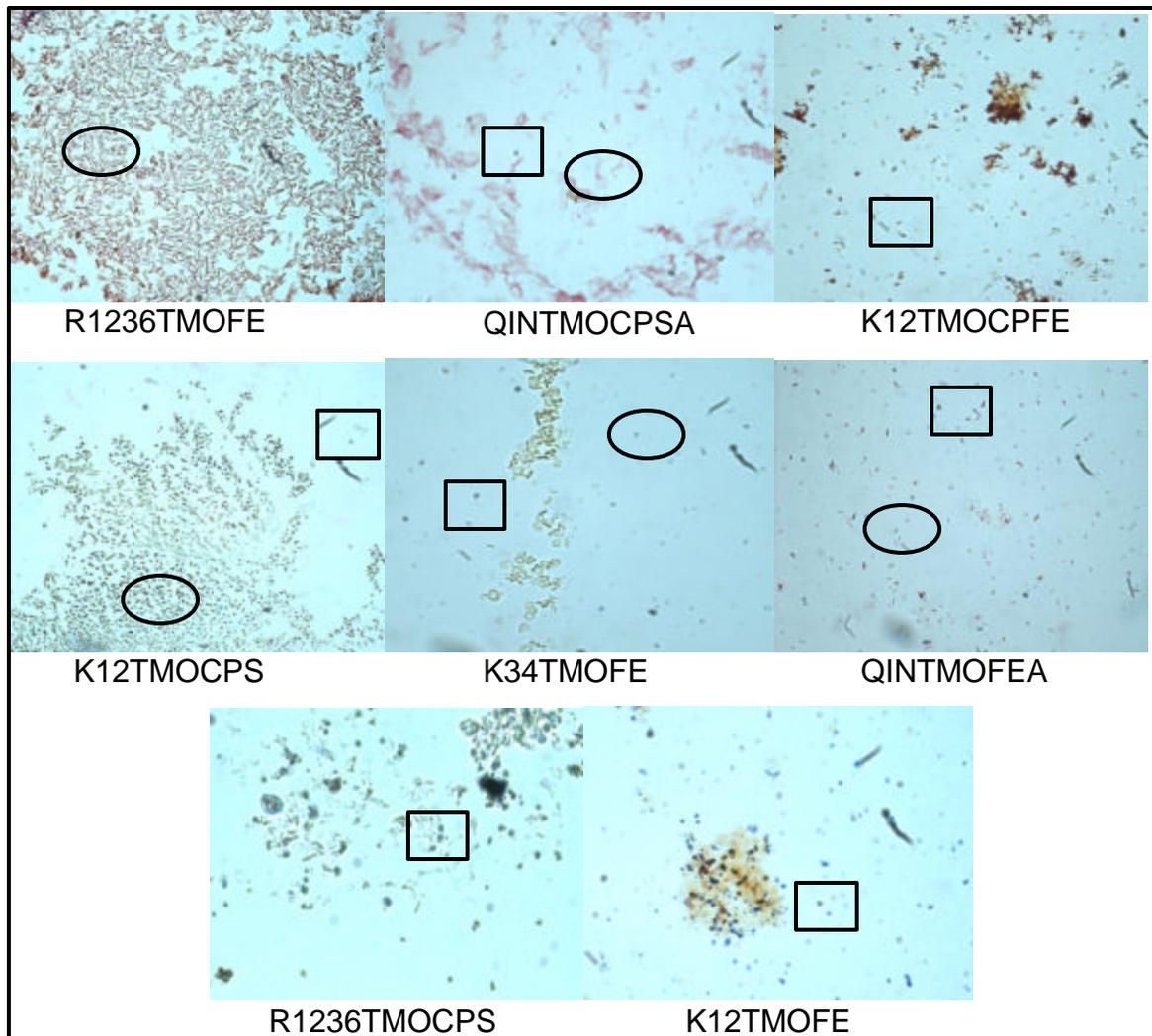


**Figura 29.** Crecimiento de cepas de referencia bajo las condiciones indicadas por el proveedor. <sup>1</sup> Pulpa vieja (20-45 días), <sup>2</sup> Resiembra nueva (0 días).

### 3.2 Tinciones de Gram

Las muestras de mineral lixiviado en roca, escurrimientos y derrames fueron colectadas directamente en los terreros de lixiviación bajo operación en Mexicana de Cananea, durante el período de Enero 2004 a Septiembre del 2006 (Anexos 1 y 2). La tinción de Gram realizada a los cultivos indicó la presencia de cocos Gram negativos, cocos y bacilos Gram-positivos (Figura 30), confirmando los resultados

con lo encontrado en la literatura en otras minas donde se realiza biolixiviación (Hippe, 2000; Parro y Moreno-Paz 2003).



**Figura 30.** Muestras a las que se les realizó tinciones de Gram. Las muestras se describen en la Tabla 8. ○ Gram-negativos, □ Gram-positivos.

### 3.3 Comparación de los protocolos de extracción de ADN

A pesar que con ninguno de los 3 protocolos de extracción de ADN seleccionados (Tabla 13), se pudo detectar ADN genómico ni en el gel, ni por fluorimetría, concluimos que fueron eficaces ya que con cualquiera de los 3 se observan productos de amplificación por PCR, usando los oligos universales 533F y 1391R para ADNr 16S. El protocolo que se seleccionó es el Garbor y col. (2003)

porque es el protocolo más completo y económico, a pesar de ser un poco largo y laborioso; también es con el que obtuvimos ADN en la mayoría de los consorcios.

**Tabla 13.** Operaciones unitarias más importantes de los 3 protocolos de extracción de ADN

MÉTODO	1.Wisotzkey y col. 1990 (modificado)	2.Garbor y col. 2003(modificado)	3. Ultra Clean
Buffer de lisis	✓	✓	✓ (Microbead solution)
Uso de enzimas líticas (lisozima y proteinasa K)	✓	✓	
PVP o CTAB		✓	
Acetato de sodio 5M	✓		
Perlas de zirconia/ sílice		✓	✓
Incubación prolongada con agitación	✓	✓	
Agitación prolongada en vortex		✓	✓
Columnas con filtro			✓
2 extracciones adicionales a los botones con buffer de lisis	✓	✓	
Lavados con cloroformo – alcohol isoamílico (24:1)	✓	✓	
Precipitación con isopropanol	✓	✓	✓

### 3.4 Selección de oligonucleótidos universales para PCR

La amplificación por PCR se realizó con desoxioligonucleótidos universales de ADNr 16S para bacterias y archaeas mezclándose con 1 µl de ADN directo, dilución 1:10 ó 1:100 de la extracción. A pesar de que Bond y col. (2000), mencionan que el uso de los oligos 533F con 1492R, son universales para amplificar bacterias, en nuestro caso los desoxioligonucleótidos no funcionaron en la amplificación por PCR. Al buscar los sitios de alineamiento del oligonucleótido reverso 1492R, con el programa MegAlign (DNASTAR), en las secuencias de los posibles géneros a encontrar en los consorcios, se observó que este no se

alineaba adecuadamente dando una similitud de 43%-57% y en algunos casos, alineándose como oligonucleótido sentido y no como reverso, lo cual no generaría producto de PCR. Sólo en los géneros *Acidimicrobium* y *Acidianus* se alineaba con una similitud mayor al 95%. En cambio, el desoxioligonucleótido 533F se alineó con los posibles géneros de *Sulfolobus*, *Sulfobacillus*, *Metallosphaera*, *Leptospirillum*, *Acidithiobacillus*, *Acidiphilium*, *Acidimicrobium* y *Acidianus* dando una similitud de 89%-95% (Tabla 14). Por otro lado, Barns y col. (1994) emplearon el desoxioligonucleótido 1391R, el cual también fue analizado en el programa MegAlign para verificar si se alinearía en los posibles géneros esperados, dando una similitud de 87%-100% (Tabla 15). Por lo que seleccionamos el par 533F-1391R para los análisis iniciales de PCR. Las bandas que se obtuvieron de aproximadamente 1 kb (Figura 31), fueron ligadas en el vector de clonación pGEM-T o pGEM-T easy. Se analizaron 97 clonas y los plásmidos purificados de 32 clonas positivas que liberaron el fragmento esperado (Figura 32), se cuantificaron en gel (Figura 33) y se mandaron secuenciar al CINVESTAV Unidad Irapuato. Las secuencias reportadas fueron de 803 a 1,008 pb (Anexo 6).

**Tabla 14.** Alineamiento en MegAlign de los oligos 533F-1492R con las secuencias de los géneros de interés

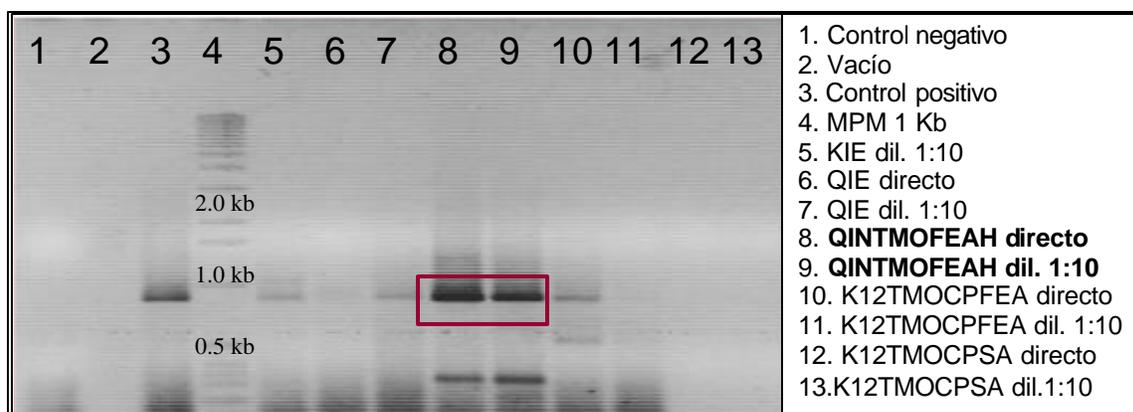
Género	Oligo 533 F (19 bases) en el genoma*	Oligo 1492 R (22 bases) en el genoma*	Bases alineadas de los oligos		% de similitud	
			533F	1492R	533F	1492R
<i>Sulfolobus</i>	733-751	1009-1014	1-19	5-10	89.5	83.3
<i>Sulfobacillus</i>	455-473	161-156	1-19	12-15	94.7	100
<i>Metallosphaera</i>	445-463	56-28	1-19	2-21	89.5	43.3
<i>Leptospirillum</i>	460-478	19-4	1-19	4-12	89.5	46.7
<i>Acidithiobacillus</i>	484-500	255-228	3-19	1-22	94.1	55.6
<i>Acidiphilium</i>	435-453	233-206	1-19	1-22	94.7	55.6
<i>Acidimicrobium</i>	471-489	1465-1443	1-19	2-22	89.5	95.2
<i>Acidianus</i>	770-788	1766-1743	1-19	1-22	89.5	95.5

\*Secuencias de ADNr 16S

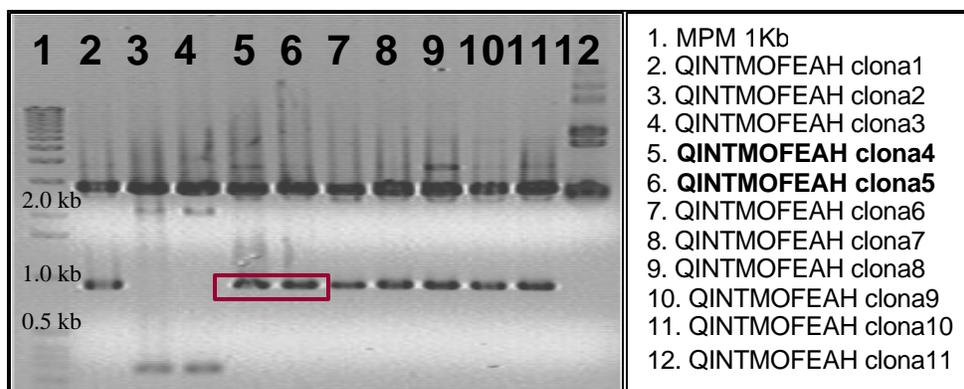
**Tabla 15.** Alineamiento en MegAlign con los oligos 23FLP-1391R con las secuencias de los géneros de interés.

Género	Oligo 23FLP (38 bases) en el genoma*	Oligo 1391 R (17 bases) en el genoma*	Bases alineadas de los oligos		% de similitud	
			23FLP	1391R	23FLP	1391R
<i>Sulfolobus</i>	829-863	131-122	6-36	1-10	54.1	87.5
<i>Sulfobacillus</i>	1377-1395	1344-1326	1-16	1-17	60	94.1
<i>Metallosphaera</i>	1187-1229	1340-1325	3-38	1-14	37.1	100
<i>Leptospirillum</i>	1116-1091	1357-1339	14-38	1-17	57.1	94.1
<i>Acidithiobacillus</i>	523-484	1376-1358	4-18	1-17	35.9	94.1
<i>Acidiphilium</i>	450-437	1327-1309	7-18	1-17	91.7	94.1
<i>Acidimicrobium</i>	1256-1281	1359-1342	2-37	1-16	37.8	93.8
<i>Acidianus</i>	267-318	1667-1652	3-38	1-14	44.4	100

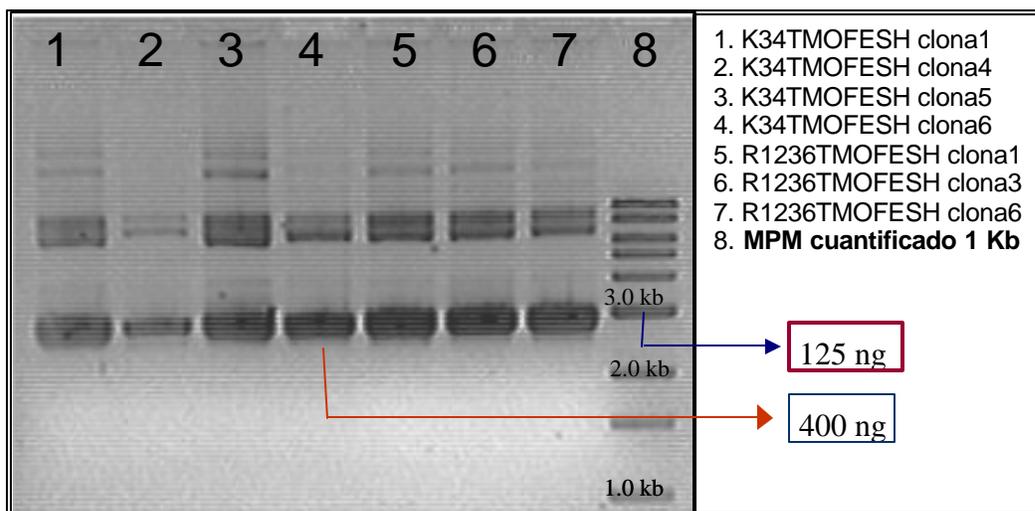
\*Secuencias de ADNr 16S, Oligonucleótido 23FLP fue reportado por Barns y col. 1994.



**Figura 31.** Productos de amplificación de PCR de muestras problema con oligos universales 533F-1391R. Productos corridos a 70V en gel de agarosa al 1% y observados con luz UV. MPM, Marcador de peso molecular; Control positivo= *Xantomona campestris*.



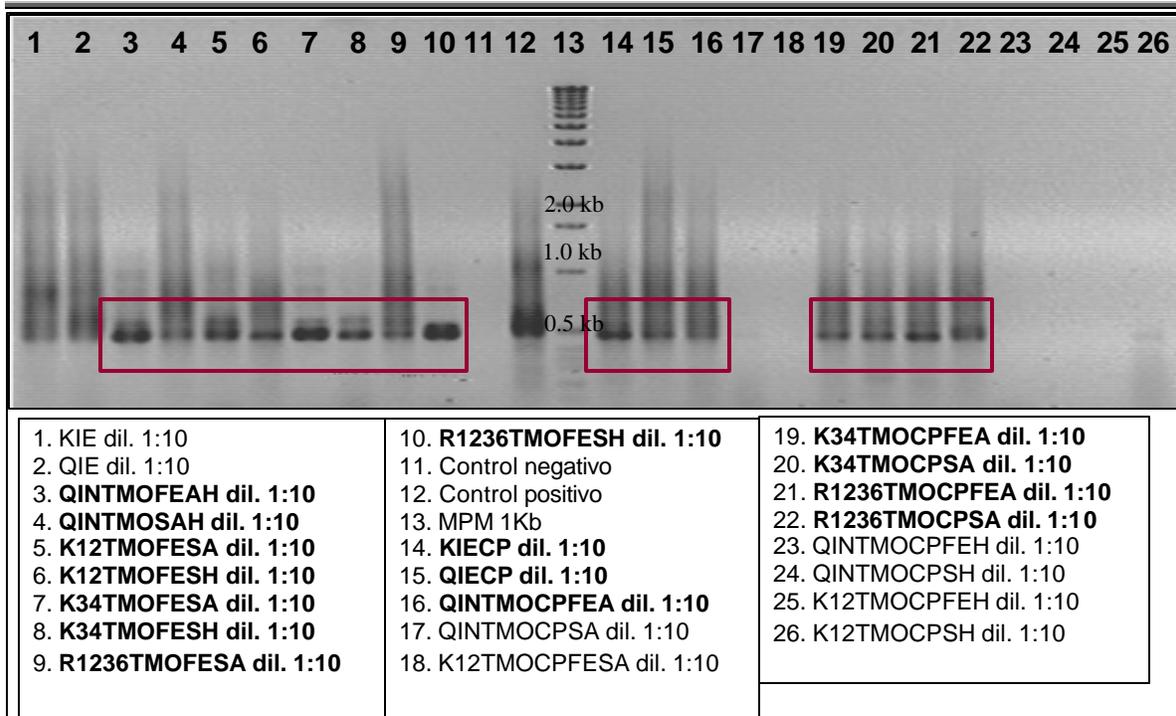
**Figura 32.** Digestión con la enzima *Eco*RI de las clonas seleccionadas para comprobar la presencia del fragmento esperado. Productos corridos a 70V en gel de agarosa al 1% y observados con luz UV.



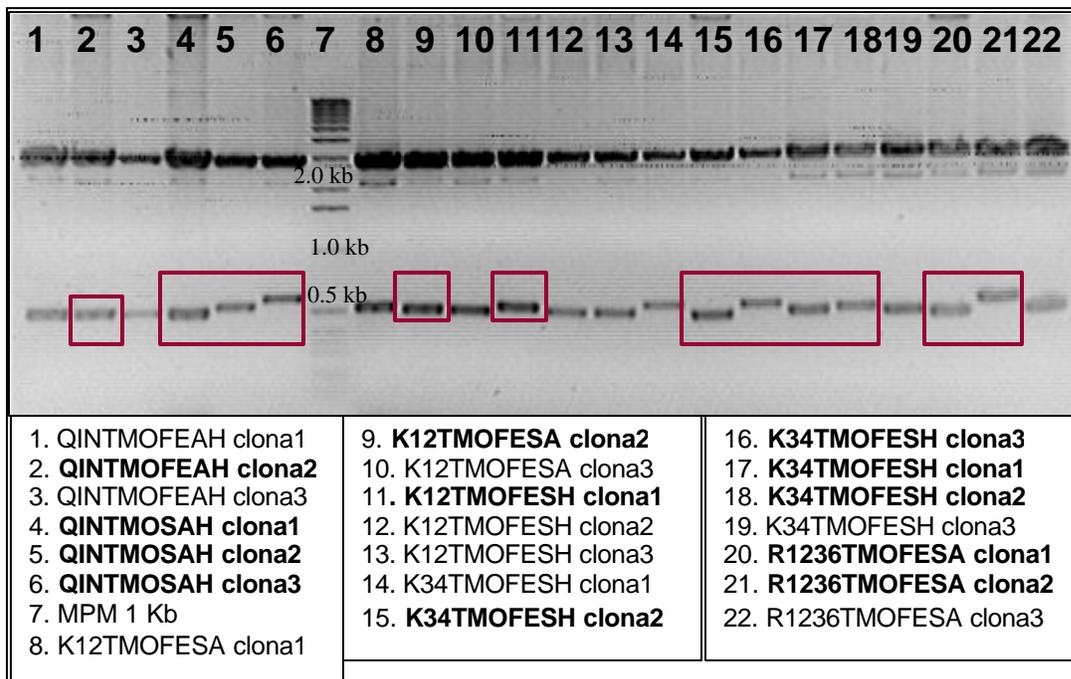
**Figura 33.** Cuantificación en gel del ADN plasmídico de las clonas seleccionadas para secuenciar. Productos corridos a 70V en gel de agarosa al 1% y observados con luz UV. Se cargaron 10  $\mu$ l de la miniprep.

### 3.5 PCR anidada con oligonucleótidos universales internos

Se analizaron por PCR anidada utilizando los pares de oligonucleótidos UI840F-1391R ó 533F-UI840R aquellas muestras en las que no se obtuvieron bandas en la primera amplificación usando los oligonucleótidos universales. Las bandas amplificadas se detectaron en el gel de agarosa y fueron de aproximadamente 500 pb (Figura 34). Estas bandas se ligaron en el vector de clonación pGEM-T easy. Se analizaron 42 clonas, se purificaron los plásmidos de 21 clonas positivas que liberaron el fragmento del tamaño esperado y algunas que presentaban bandas con tamaños por arriba o por abajo del esperado (Figura 35). El ADN plasmídico obtenido de las clonas positivas se cuantificó por fluorimetría usando un rango de estándar de 1-50 ng/ $\mu$ l y en algunos casos diluyendo las muestras problema, obteniéndose la ecuación  $y=76.371 * X + 28.184$ , con una  $R=0.99939$ ; para interpolar la fluorescencia de muestras problema (Tabla 16) y se enviaron a secuenciar al CINVESTAV Unidad Irapuato. Las secuencias obtenidas tuvieron un tamaño de 480-579 pb (Anexo 6).



**Figura 34.** Productos de amplificación de la PCR anidada con oligos universales internos. Productos corridos a 70V en gel de agarosa al 1% y observados con luz UV. Las muestras con letras negras están marcadas con recuadros y fueron las seleccionadas para clonación.



**Figura 35.** Digestión con la enzima *EcoRI* de las clonas seleccionadas para comprobar la presencia del fragmento esperado. Productos corridos a 70V en gel de agarosa al 1% y observados con luz UV. Las muestras en letras negras y en recuadros fueron las clonas seleccionadas para enviar a secuenciar.

**Tabla 16.** Cuantificación de ADN por fluorometría de las clonas seleccionadas para secuenciar.

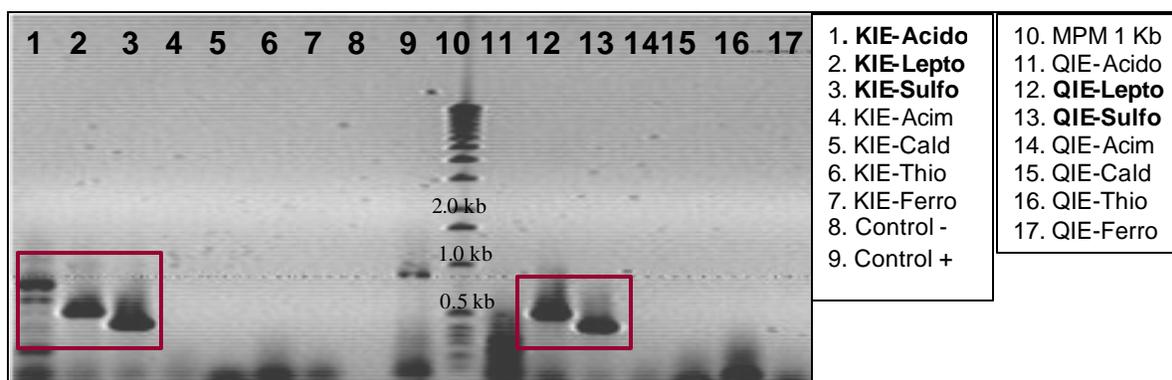
Muestra	Concentración (ng/μl)	Muestra	Concentración (ng/μl)
Blanco	0	K34TMOFESH1	537.47
Std. 50 ng/μl	49.57	K34TMOFESH2	622.85
Std. 25 ng/μl	25.98	R1236TMOFESA1	498.93
Std. 5 ng/μl	4.23	R1236TMOFESA2	498.64
Std. 1 ng/μl	1.58	R1236TMOFESH3	536.99
QINTMOFEAH2	573.77	KIECP1	423.66
QINTMOSAH1	534.70	QIECP1	55.66
QINTMOSAH2	536.20	QIECP2	478.49
QINTMOSAH3	535.66	QINTMOCPFEA3	426.15
K12TMOFESA1	447.63	K34TMOCPFEA2	405.08
K12TMOFESH1	555.80	K34TMOCPSA1	349.78
K34TMOFESA2	545.15	K34TMOCPSA2	357.30
K34TMOFESA3	362.95	R1236TMOCPFEA3	342.74

### 3.6 PCR anidada con oligonucleótidos específicos de género/especie

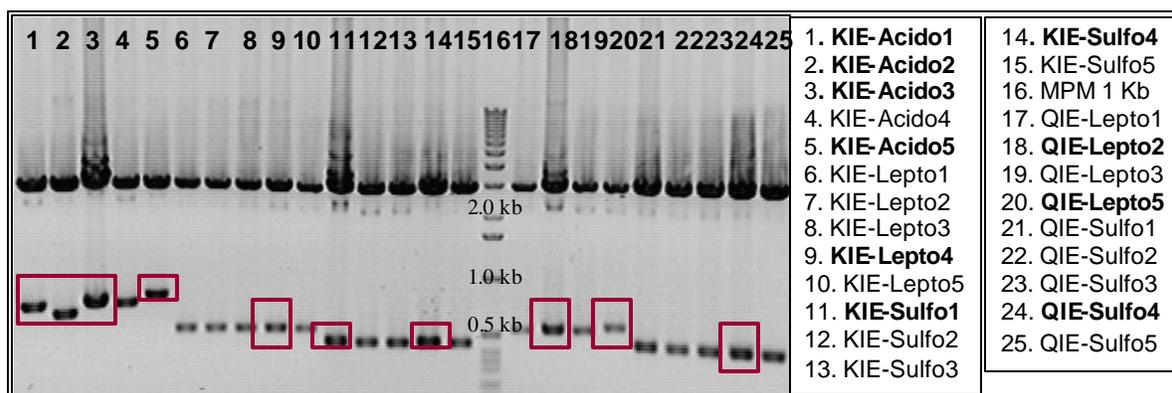
Debido a la existencia de pares de oligonucleótidos género/especie específicos para algunas bacterias involucradas en biolixiviación, realizamos un PCR con algunos pares de oligos reportados por De Wulf-Durand y col. 1997 (ver sección 2.7 de materiales y métodos).

En análisis de la PCR anidada con oligonucleótidos específicos de género para *Leptospirillum*, *Acidiphilium*, *Sulfobacillus*, *Acidimicrobium*; así como oligonucleótidos específicos de especie para *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, *T. caldus*, obtuvimos bandas de productos de amplificación solo para los géneros *Acidiphilium*, *Leptospirillum* y *Sulfobacillus* (Figura 36). Para comprobar que las bandas que se obtuvieron fueran específicas para el género dicho, se ligaron en el vector de clonación pGEM-T easy. Se analizaron 24 clonas y los plásmidos purificados de 10 clonas positivas que liberaron el fragmento del tamaño esperado

(Figura 37) se cuantificaron por fluorimetría interpolando datos en la ecuación  $y=729.6 * X + 45.002$ ,  $R=0.99931$ . En general estas preparaciones dieron valores menores que los mostrados en la Tabla 16 (Tabla 17). Las muestras se mandaron a secuenciar al CINVESTAV Unidad Irapuato. Las secuencias reportadas fueron de 426-836 pb (Anexo 6).



**Figura 36.** Productos de amplificación de la PCR anidada con oligonucleótidos específicos. Productos corridos a 70V en gel de agarosa al 1% y observados con luz UV. KIE=Consortio Kino I Escurrimiento, QIE=Quebalix I Escurrimiento, Acido=producto de amplificación con oligonucleótidos específicos para *Acidiphilium*, Lepto= Con oligonucleótidos específicos para *Leptospirillum*, Sulfo=Oligonucleótidos específicos para *Sulfobacillus*, Acim= Oligonucleótidos específicos para *Acidimicrobium*, Cald= Oligonucleótidos específicos para *T. caldus*, Thio= Oligonucleótidos específicos para *A. thiooxidans*, Ferro= Oligonucleótidos específicos para *A. ferrooxidans*. Las muestras en letras negras y en recuadros fueron las seleccionadas para clonación.



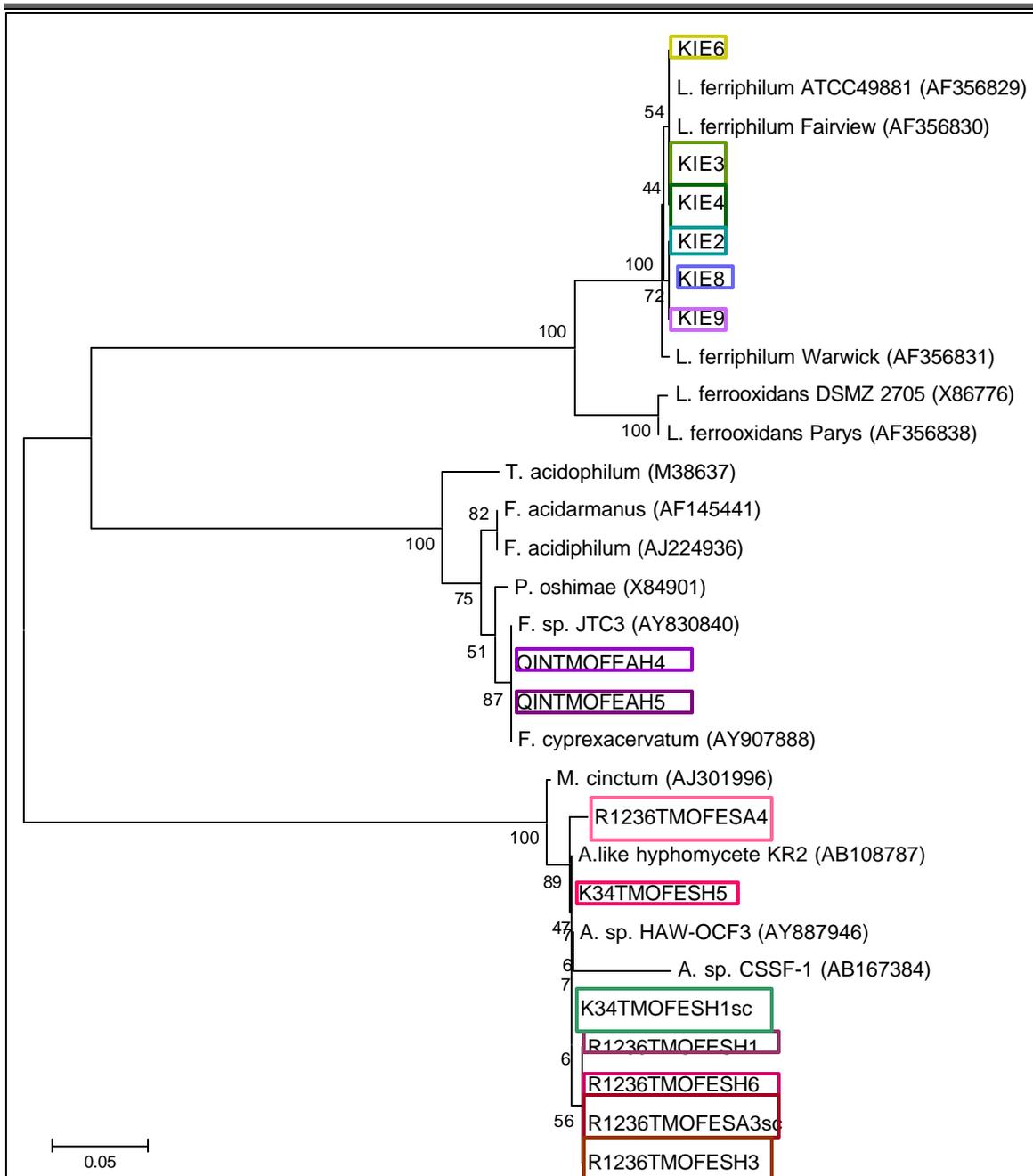
**Figura 37.** Digestión con la enzima *EcoRI* de las clonas seleccionadas para verificar presencia del fragmento esperado. Productos corridos a 70V en gel de agarosa al 1% y observados con luz UV. KIE=Consortio Kino I Escurrimiento, QIE=Quebalix I Escurrimiento, Acido=producto de amplificación con oligonucleótidos específicos para *Acidiphilium*, Lepto= Con oligonucleótidos específicos para *Leptospirillum*, Sulfo=Oligonucleótidos específicos para *Sulfobacillus*, Acim= Oligonucleótidos específicos para *Acidimicrobium*, Cald= Oligonucleótidos específicos para *T. caldus*, Thio= Oligonucleótidos específicos para *A. thiooxidans*, Ferro= Oligonucleótidos específicos para *A. ferrooxidans*, Número final del nombre=Número de clona. Los recuadros muestran las bandas que se cortaron para purificarlas y mandar secuenciar, las letras negras indican el nombre de las muestras seleccionadas.

**Tabla 17.** Cuantificación de ADN por fluorometría de las clonas seleccionadas para secuenciar

Muestra	Concentración (ng/μl)	Muestra	Concentración (ng/μl)
Blanco	0	KIE-Acido5	57.53
Std. 50 ng/μl	50.54	KIE-Lepto4	57.56
Std. 25 ng/μl	23.92	KIE-Sulfo1	55.70
Std. 5 ng/μl	4.77	KIE-Sulfo4	58.22
Std. 1 ng/μl	1.76	QIE-Lepto2	54.55
KIE-Acido1	60.76	QIE-Lepto5	49.18
KIE-Acido2	65.46	QIE-Sulfo4	54.61
KIE-Acido3	57.72		

### 3.7 Análisis filogenético de las secuencias de productos de PCR amplificados con oligonucleótidos universales.

Las clonas secuenciadas en el presente trabajo fueron identificadas al compararlas con la base de datos por medio del programa BLAST. Las secuencias reportadas que se obtuvieron con el par de oligonucleótidos universales 533F-1391R brindaron los siguientes datos: las clonas de KIE2, 3, 4, 6, 8 y 9 dieron una identidad del 98% (835/846) de bases alineadas de nuestra secuencia vs. bases de la secuencia encontrada en la base de datos GenBank del gen ARNr 16S de *Leptospirillum ferriphilum*. Las clonas de QINTMOFeAH4 y 5 dieron una identidad del 99% (892/897) con el gen ARNr 16S de *Ferroplasma cyprexacervatum* y *F. sp. JTC3*. Las clonas de R1236TMOFeSH1, 3 y 6, K34TMOFeSH1sc y 5, R1236TMOFeSA3 y 4, K34TMOFeSH4 y 6, R1236TMOFeSA1 y 8 dieron una identidad del 99% (976/982) con el gen ARNr 18S de *Acremonium-like hyphomycete* y *Acremonium sp. CSSF-1* y HAW-OCF3 (Figura 38). Las clonas de QIE2, 3 y 5, QINTMOSA1 y 2, K12TMOFeSA4 y K12TMOFeSH4 y 5, no se tomaron en cuenta para los alineamientos, ya que el tamaño de las secuencias es de 92-338 pb, tamaño menor al esperado de aproximadamente 900 pb (Anexo 6). Las secuencias de las clonas K34TMOFeSA7 y K12TMOFeSA3 no fueron reportadas, debido a la poca calidad del electroferograma.

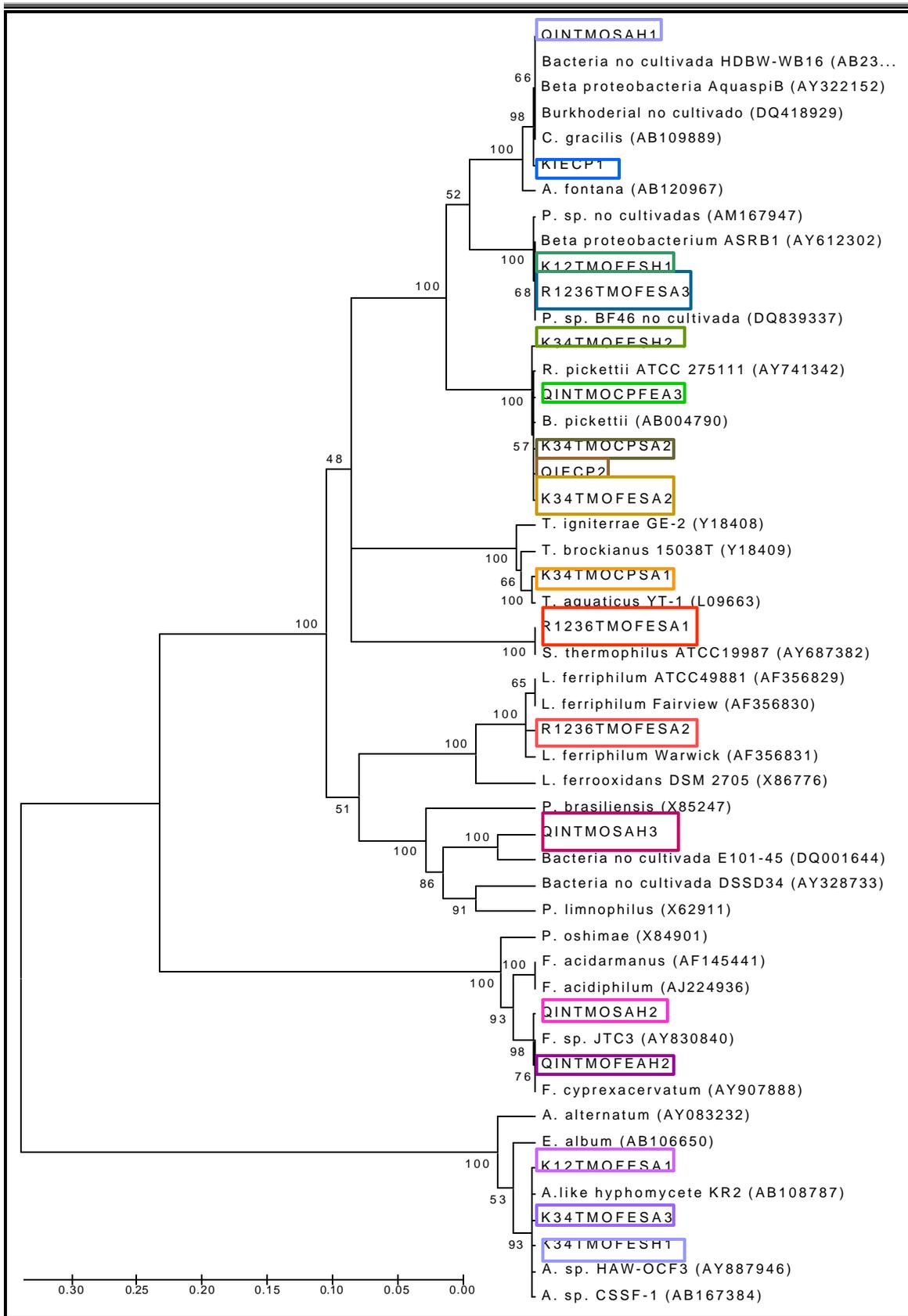


**Figura 38.** Árbol filogenético de secuencias parciales de ADNr 16S de clonas aisladas en este estudio con los oligos universales 533F y 1391R. Las secuencias fueron comparadas con genes de ARNr 16S de Bacterias, Archaeas y Hongos disponibles en el GenBank. La Figura ilustra las ramas de agrupaciones en base a identidad de secuencias de clonas obtenidas de muestras tomadas en Cananea, Sonora, con otros organismos ya reportados. El árbol fue realizado por el método de Neighbor-Joining, analizando secuencias de 890-900 pb con el programa MEGA 3.1. Las muestras reportadas en este trabajo están en recuadros y los números de acceso de las secuencias ya reportadas en la base de datos se encuentran entre paréntesis. La escala representa el número de sustituciones por sitio. El porcentaje Bootstrap de 100 muestra la confianza de la formación de un grupo (rama) en el árbol. L= *Leptospirillum*, F=*Ferroplasma*, P=*Picrophilus*, T=*Thermoplasma*, E=*Engyodontium*, M=*Myrothecium*, A=*Acremonium*.

---

### 3.8 Análisis filogenético de las secuencias de productos de la PCR anidada con oligonucleótidos universales internos anidados

Las secuencias reportadas por el CINVESTAV, de las clonas que se obtuvieron del PCR anidado con oligonucleótidos universales UI840F-1391R, mostraron los siguientes resultados: la clona R1236TMOFeSA2 dio una identidad del 97% (496/507) con el gen de ARNr 16S de *Leptospirillum ferriphilum*; la clona QINTMOFeAH2 y la clona QIMTMOSAH2 dieron una identidad del 99% (500/501) con el gen de ARNr 16S de *Ferroplasma cyprexacervatum* y *F. sp. JTC3*; la clona K34TMOCPSA1 dio una identidad del 99% (502/506) con el gen ARNr 16S de *Thermus aquaticus*; la clona R1236TMOFeSA1 dio una identidad del 99% (488/489) con el gen ARNr 16S de *Streptococcus thermophilus*; K34TMOFeSH2, K34TMOCPSA2, QIECP2, K34TMOFeSA2 y QINTMOCPFeA3 dieron una identidad del 99% (493/497) con el gen de ARNr 16S de *Ralstonia pickettii* y *Burkholderia pickettii*; las clonas KIECP1 y QINTMOSAH1 dieron una identidad del 99% (494/496) con el gen ARNr 16S de *Curvibacter gracilis*, Bacteria no cultivada HDBW-WB16, Betaproteobacteria AquaspiB; la clona QINTMOSAH3 dio una identidad del 95% (485/508) con el gen ARNr 16S de una Bacteria no cultivada clona E101-45, *Planctomyces brasiliensis*, Bacteria no cultivada DSSD34 y *P. limnophilus*; las clonas K12TMOFeSH1 y R1236TMOFeSA3 dieron una identidad del 99% (501/502) con el gen ARNr 16S de *Beta proteobacterium* ASRB1 y con una *Pseudomonas sp.* no cultivada y *Pelomonas sp.* no cultivadas; las clonas K12TMOFeSA1, K34TMOFeSH1 y K34TMOFeSA3 dieron una identidad del 99% (506-509) con el gen ARNr 18S de *Acremonium sp. HAW-OCF3* y *CSSF-1* y *Acremonium-like hyphomycete* (Figura 39). La clona K34TMOCPFeA2 dio una identidad del 99% (497/500) con el gen cloroplasto de *Nymphaea alba* y con el gen ARNr 16S de *Nymphaea tuberosa*; la clona QIECP1 dio una identidad del 99% (512/516) con el gen ARNr 18S de *Nolana hemifusa* y *Nicotiana tabacum* (datos no mostrados). La clona R1236TMOCPFeA 3 no se tomó en cuenta para los resultados, ya que la secuencia reportada es menor (122pb) al tamaño esperado, ver tabla de resumen de resultados Tabla 18 (Anexo 6).

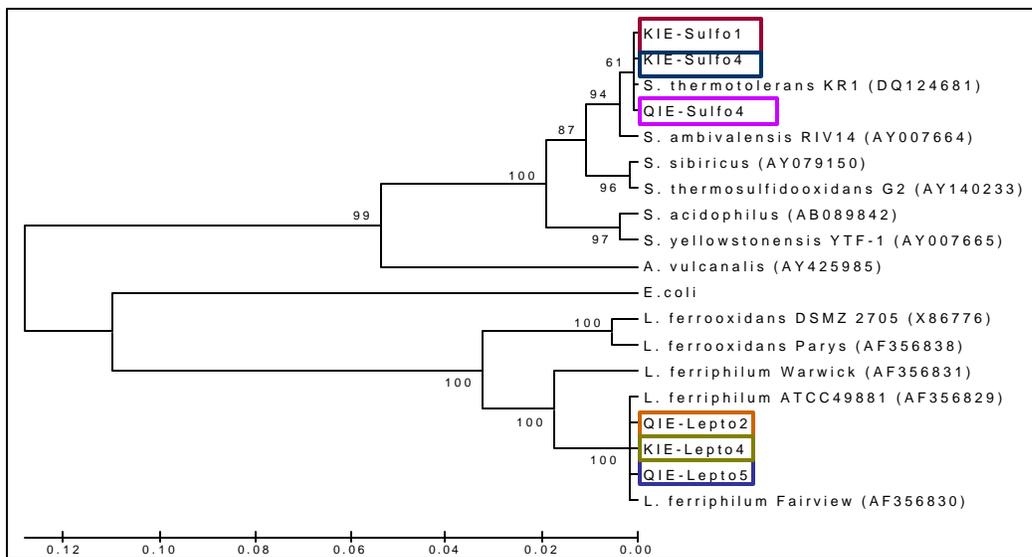


**Figura 39.** Árbol filogenético de secuencias parciales de ADNr 16S de clonas aisladas en este estudio con PCR anidada. Las secuencias fueron comparadas con genes de ADNr 16S de Bacterias, Archaeas y Hongos disponibles en el GenBank.

La Figura ilustra las ramas obtenidas en base a identidad de secuencias de clonas obtenidas de una muestras tomadas en Cananea, Sonora, con otros organismos ya reportados. El árbol fue realizado por el método de Neighbor-Joining, analizando la secuencia de 568 pb usando el programa Mega 3.1. La escala representa el número de sustituciones por sitio. El porcentaje Bootstrap de 100 muestra la confianza de la formación de un grupo (rama) en el árbol. A. fontana=Aquamonas fontana, P. sp. no cultivada=Pelomonas sp. no cultivada, C=Curvibacter, R=Ralstonia, B=Burkholderia, T=Thermoplasma, S=Streptococcus, L=Leptospirillum, P. brasiliensis=Planctomyces brasiliensis, P. limnophilus=Planctomyces limnophilus, P. oshimae=Picrophilus oshimae, F=Ferroplasma, A. alternatum=Acremonium alternatum, A. like hyphomycete=Acremonium-like hyphomycete, A. sp. HAW-OCF3= Acremonium sp.HAW.OCF3, A. sp. CSSF-1= Acremonium sp. CSSF-1, E=Engyodontium.

### 3.9 Análisis filogenético de las secuencias de productos de PCR anidadas con oligonucleótidos específicos de género/especie

Los análisis de la PCR anidada con oligonucleótidos específicos de género o especie, dieron los siguientes resultados: las clonas KIE-lepto4, QIE-lepto 2 y 5 dieron una identidad del 99% (520/521) con *Leptospirillum ferriphilum*, las clonas KIE-sulfo1 y 4, QIE-sulfo4 dieron una identidad del 99% (424/426) con *Sulfobacillus thermotolerans* (Figura 40).



**Figura 40.** Árbol filogenético de secuencias parciales de ADNr 16S de clonas aisladas en este estudio usando oligos específicos de género/especie. Las secuencias fueron comparadas con genes de ADNr 16S de *Leptospirillum* y *Sulfobacillus* disponibles en el GenBank. La Figura ilustra las ramas definidas mostrando agrupaciones en base a identidades de las secuencias de clonas obtenidas de muestras tomadas en Cananea, Sonora, con secuencias de bacterias ya reportadas. El número entre paréntesis es el número de acceso de las secuencias obtenidas de la base de datos. El árbol fue realizado por el método de Neighbor-Joining, analizando secuencias de 426 y

521 pb para *Sulfobacillus* y *Leptospirillum* respectivamente con el programa Mega 3.1. La escala representa el número de sustituciones por sitio. El porcentaje Bootstrap de 100 muestra la confianza de la formación de un grupo (rama) en el árbol. L= *Leptospirillum*, S= *Sulfobacillus*, A=*Alicyclobacillus*, E=*Escherichia*.

Las secuencias de las clonas KIE-acido 1-5 no se añadieron en los resultados; ya que a pesar de haber tenido el tamaño esperado, el análisis de la secuencia de dichos productos de la PCR no arroja la identidad esperada con el género *Acidiphilium*. Probablemente haya que mejorar el diseño de los oligos reportados por De Wulf-Durand, 1997 (Anexo 6).

**Tabla 18.** Resumen de resultados de las secciones 3.7 a 3.9

Tipo de muestra	Nombre de la clona	Género o especie encontrada	Tipo de PCR
Matraz, mesófilas	KIE 2	<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	Directo amplificado con oligos universales
	KIE 3	<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	
	KIE 4	<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	
	KIE 6	<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	
	KIE 8	<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	
	KIE 9	<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	
	KIE-Acido 1*	<i>Pseudomona psyringe</i>	Anidada con oligos específicos para género/especie
	KIE-Acido 2*	<i>Pseudomona psyringe</i>	
	KIE-Acido 3*	<i>Pseudomona psyringe</i>	
	KIE-Acido 5*	<i>Pseudomona psyringe</i>	
	KIE-Lepto 4	<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	
	KIE-Sulfo 1	<i>Sulfobacillus thermotolerans</i>	Anidada con oligos universales
	KIE-Sulfo 4	<i>Sulfobacillus thermotolerans</i>	
	KIE cp 1	<i>Curvibacter</i>	
	QIE 2*	<i>Brevibacillus</i>	
	QIE 3*	<i>Brevibacillus</i>	
	QIE 5*	<i>Brevibacillus</i>	
	QIE-Lepto 2	<i>Leptospirillum</i>	
	QIE-Lepto 5	<i>Leptospirillum</i>	
	QIE-Sulfo 4	<i>Sulfobacillus thermotolerans</i>	
QIE cp 2	<i>Ralstonia pickettii</i>		
QIE cp 1	<i>Nolana humifusa</i>	Anidada con oligos universales	
Matraz, termófilas moderadas	K12TMOFeSA 1	<i>Acremonium</i>	Directa con oligos universales
	K12TMOFeSA 3**	-	
	K12TMOFeSA 4*	<i>Brevibacillus</i>	Anidada con oligos universales
	K12TMOFeSH 1	<i>Beta proteobacteria</i>	
	K12TMOFeSH 4*	<i>Streptomyces no cultivado</i>	Directa con oligos universales
	K12TMOFeSH 5	<i>Delta proteobacteria</i>	
	K34TMOFeSA 2	<i>Ralstonia pickettii</i>	Anidada con oligos universales
	K34TMOFeSA 3	<i>Acremonium</i>	
	K34TMOFeSA 7**	-	Directa con oligos universales
	K34TMOFeSH 1sc	<i>Acremonium</i>	
	K34TMOFeSH 1	<i>Acremonium</i>	Anidada con oligos universales
	K34TMOFeSH 2	<i>Ralstonia pickettii</i>	
	K34TMOFeSH 4	<i>Acremonium</i>	Directa con oligos

	K34TMOFeSH 5	<i>Acremonium</i>	universales
	K34TMOFeSH 6	<i>Acremonium</i>	
	K34TMOCPFeA 2	<i>Nymphaea alba</i>	Anidada con oligos universales
	K34TMOCPSA 2	<i>Ralstonia sp.</i>	
	K34TMOCPSA 1	<i>Thermus aquaticus</i>	
	QINTMOFeAH 2	<i>Ferropasma cyprexacervatum</i>	
	QINTMOFeAH 3	<i>Ferropasma cyprexacervatum</i>	Directa con oligos universales
	QINTMOFeAH 4	<i>Ferropasma cyprexacervatum</i>	
	QINTMOFeAH 5	<i>Ferropasma cyprexacervatum</i>	
	QINTMOSAH 1 sc*	<i>Bacteria no cultivada</i>	
	QINTMOSAH 2sc*	<i>Bacteria no cultivada</i>	
	QINTMOSAH 1	<i>Curvibacter gracilis</i>	Anidada con oligos universales
	QINTMOSAH 2	<i>Ferropasma cyprexacervatum</i>	
	QINTMOSAH 3	<i>Bacteria no cultivada</i>	
	QINTMOCPFeA 3	<i>Ralstonia pickettii</i>	
	R1236TMOFeSA 1	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
	R1236TMOFeSA 2	<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	
	R1236TMOFeSA 3	<i>Beta proteobacteria</i>	
	R1236TMOFeSA 1sc	<i>Acremonium</i>	Directa con oligos universales
	R1236TMOFeSA 3sc	<i>Acremonium</i>	
	R1236TMOFeSA 4	<i>Acremonium</i>	
	R1236TMOFeSA 8	<i>Acremonium</i>	
	R1236TMOFeSH 1	<i>Acremonium</i>	
	R1236TMOFeSH 3	<i>Acremonium</i>	
	R1236TMOFeSH 6	<i>Acremonium</i>	
	R1236TMOCPFeA 3*	<i>Ralstonia no cultivada</i>	Anidada con oligos universales

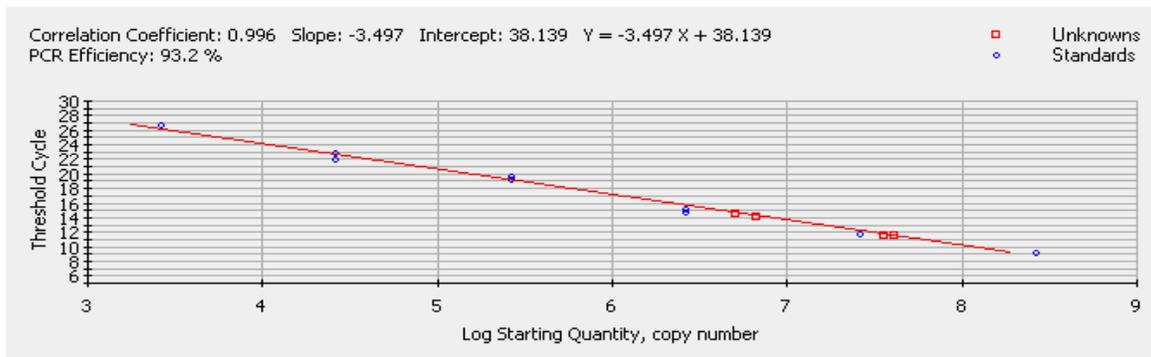
\*Secuencias que no se tomaron en cuenta en la realización de los árboles filogenéticos,

\*\*Secuencias no reportadas por el CINVESTAV, ya que el electroferograma era poco confiable.

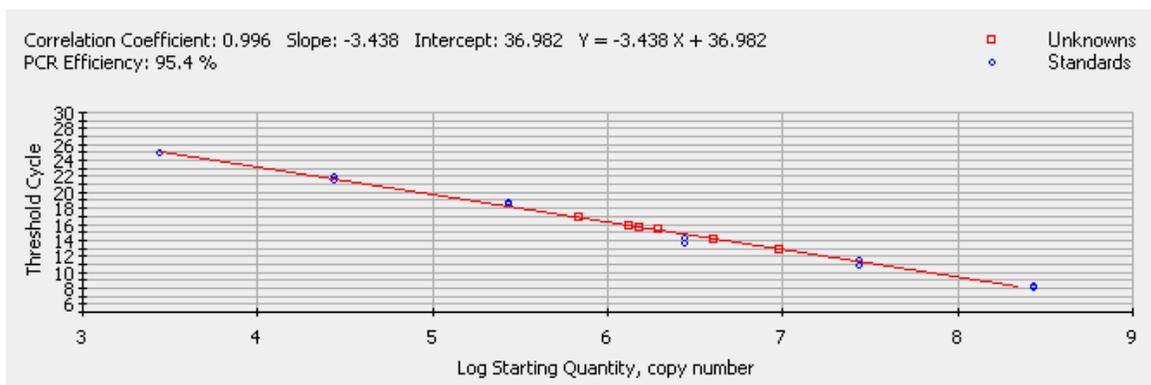
### 3.10 Resultados de PCR en tiempo real

Primero amplificamos por PCR fragmentos de 642 pb y 1091pb para *Leptospirillum* y *Sulfobacillus* respectivamente, usando una combinación de oligonucleótidos universal/específico de género para ADNr 16S; posteriormente realizamos a los productos amplificados un PCR anidado, empleando juegos de oligonucleótidos específicos de género en la región interna del primer juego de oligonucleótidos para obtener una mayor especificidad (ver Tabla 11), dando productos de 520 pb y 429 pb para *Leptospirillum* y *Sulfobacillus*, respectivamente. Estos productos fueron purificados por columna, clonados en pGEM-T easy y cuantificados por fluorometría; 1 ng de ADN molde es equivalente a  $2.62 \times 10^8$  copias basado en un tamaño de 520 pb para el producto de clonación de *Leptospirillum* y  $2.69 \times 10^8$  copias basado en un tamaño de 426 pb para el producto de clonación de *Sulfobacillus*. Estos ADN moldes fueron usados como estándares para realizar la curva de calibración en el PCR en tiempo real. Se obtuvieron eficiencias de amplificación similares con las dos especies usando

oligonucleótidos específicos siendo 93.2% y 95.3% para *Leptospirillum* y *Sulfobacillus*, respectivamente (Figura 41 y 42). El rango lineal en cada reacción cubrió 7 órdenes de magnitud de 260 a  $2.6 \times 10^8$  copias. El límite de detección se encontró aproximadamente en  $2.6 \times 10^2$  copias en el ensayo, y ningún valor por debajo de éste límite fue considerado para los resultados.



**Figura 41.** Curva estándar para la PCR en tiempo real del género *Leptospirillum*

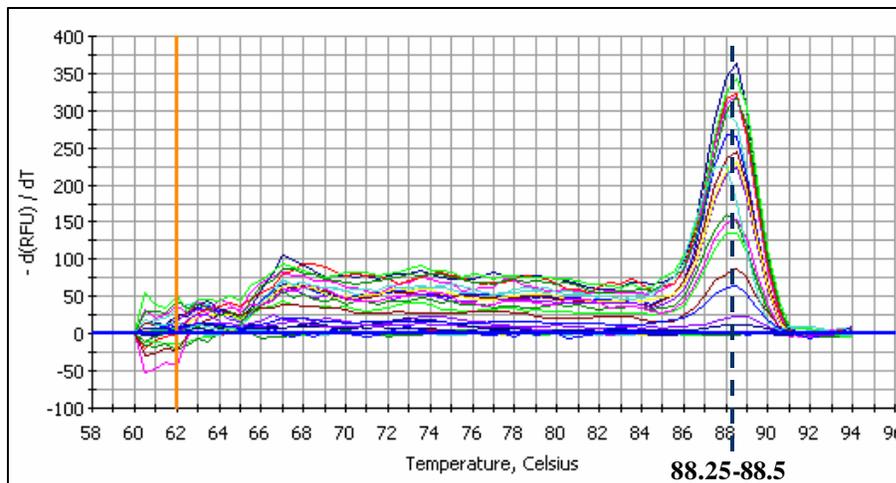


**Figura 42.** Curva estándar para la PCR en tiempo real del género *Sulfobacillus*

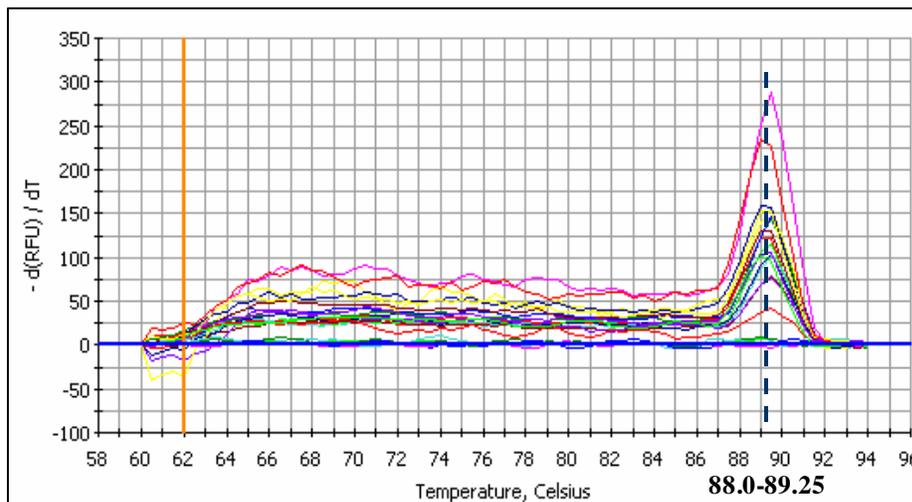
Una vez optimizadas nuestras curvas estándares se procedió a analizar las muestras problema donde se habían detectado los dos géneros mencionados.

Para *Leptospirillum* en la muestra KIE se cuantificaron  $3.79 \times 10^7$  copias, un Ct de 11.64 y una Tm 88.5; mientras que en la muestra QIE se cuantificaron  $5.79 \times 10^6$  copias, un Ct de 14.5 y una Tm 88.25 (Figura 43). Para *Sulfobacillus* en la muestra KIE se cuantificaron  $9.91 \times 10^5$  copias, un Ct de 16.44 y una Tm de 89.25; mientras

que para la muestra QIE se cuantificaron  $6.69 \times 10^6$  copias, un Ct de 13.65 y una  $T_m$  de 89.0 (Figura 44).



**Figura 43.** Curva de disociación para el género *Leptospirillum*. Se señala la temperatura de disociación para la muestra QIE fue de 88.25 y para la muestra KIE fue de 88.5.



**Figura 44.** Curva de disociación para el género *Sulfobacillus*. Se señala la temperatura de disociación para la muestra QIE fue de 89.0 y para la muestra KIE fue de 89.25.

### 3.11 Muestras recientes en proceso

Las muestras de reactores, barrenos con desorción y escurrimientos (Junio 2006), se encuentran en la etapa del análisis filogenético. Y los escurrimientos (Septiembre 2006) se encuentran en proceso de secuenciación.

---

**Discusión de resultados**

Los métodos convencionales para la extracción de ADN, deberían ser apropiados para la mayoría de los casos, pero diferentes combinaciones y modificaciones de los protocolos de extracción y purificación son necesarios para algunas condiciones y muestras específicas. En este trabajo fue necesario incrementar las concentraciones finales de lisozima y proteinasa K, así como agregar agitación en los periodos de incubación.

El método de extracción que produzca buena cantidad y calidad de ADN es una parte importante para poder realizar amplificaciones por PCR, ya que en este tipo de bacterias que viven en ambientes acidófilos no es fácil obtener su ADN total de una buena calidad y en cantidad suficiente para análisis posteriores; usualmente es raro poder observar ADN genómico en un gel de calidad. La mayoría de las veces es necesario realizar una PCR o hasta PCR anidada para lograr observar productos de amplificación los cuales indican la presencia inicial del ADN (López-García y col. 2002; Moreira y col. 2004).

En el primer paso de la extracción de ADN es necesaria la adición del amortiguador de extracción para aumentar el pH de la solución, ya que si se trabaja con un pH ácido se puede causar la hidrólisis del ADN. Por otro lado, es muy importante eliminar inhibidores en muestras de minerales, las cuales pueden estar frecuentemente contaminadas con sustancias que pueden tener un efecto inhibitorio en la PCR (Bond y col., 2000), tales como iones metálicos, especialmente hierro y cobre, aniones incluyendo cloruro, sulfato, ácido húmico y otros materiales asociados al tipo de muestra (Liu y col., 2005), por lo que es importante incluir compuestos que eliminen contaminantes (Zhou y col., 1996), o añadir un paso para purificar el ADN extraído.

En la extracción de ADN, el tratamiento de lisis celular con SDS y fricción, es más frecuentemente usado para cultivos puros y con sedimentos (Zhou y col.,

---

1996; Garbor y col. 2003). Trevors y col. (1992) encontraron que el protocolo de lisis celular basado en SDS produce mayor cantidad de ADN en comparación con el protocolo de lisis celular basado en congelamiento y descongelamiento con sarcosil, reportado por otros autores. More y col. (1994) demostraron que el porcentaje de células completas remanentes en el sedimento después del tratamiento con SDS, fue más bajo (13%) que el porcentaje de células completas después de 10 minutos de tratamiento de molienda con perlas de vidrio (26%). Los resultados de Zhou y col. (1996) indican que una lisis celular basada en SDS en combinación con tratamiento alto en sales y calor, fue el más efectivo para muestras de suelos, pero no para algunas bacterias Gram positivas. La combinación de SDS con homogenización con perlas de vidrio, resulta en una mayor eficiencia de lisis celular para endoesporas de *Bacillus* (More y col., 1994). Sin embargo, la homogenización de molienda con perlas de vidrio aunado con otro método físico por ejemplo sonicación, generalmente causa daño severo al ADN (Zhou y col., 1996).

El protocolo de Wisotzkey y col. (1990) emplea el tratamiento de lisis con SDS, mientras que el protocolo del kit de MoBio y el protocolo de Garbor y col. (2003) usan en combinación los tratamientos SDS y molienda con perlas de vidrio. En nuestro trabajo, los 3 protocolos mostraron una mayor eficiencia para la extracción de ADN de Gram positivos, como de Gram negativos respecto a los otros 6 protocolos probados (ver Tabla 9). Por otro lado, fue necesaria la modificación de los protocolos convencionales aumentando la concentración de las enzimas (lisozima y proteinasa K), adicionando agitación al momento de las incubaciones e incrementando las veces de la extracción a la pastilla de células con el amortiguador de lisis. De tal forma que se combinaron métodos químicos, físicos y enzimáticos para la extracción eficiente del ADN. Al final el método seleccionado fue el protocolo modificado de Garbor y col., (2003).

El protocolo de termociclado de Barns y col. 1994 fue el primero en emplearse al inicio del este trabajo para realizar amplificaciones directas,

---

produciendo fragmentos de 900 pb aprox. Posteriormente se seleccionó el protocolo de termociclado reportado por De Wulf-Durand y col. (1997) para trabajar todas las muestras que se les realizó PCR anidado, dando como resultado secuencias de 500 pb aprox., debido a que este último programa tiene menor número de ciclos, con una temperatura de alineamiento más alta (dando mayor especificidad) y produciendo una cantidad suficiente de ADN visible en geles de agarosa.

Los oligonucleótidos reportados en la literatura como universales, por ejemplo el 1492R, no siempre funcionan para todas las muestras o posibles géneros de microorganismos esperados (Barns y col., 1994; Edwards y col., 2000), por lo que es importante analizar y rediseñar oligos (López-García y col., 2002). En algunos casos es necesario realizar un PCR anidado para obtener mayor cantidad del producto de amplificación o un producto específico. Nuestro par de oligos analizados *in silico* y seleccionados (533F-1391R) fueron eficientes para amplificar tanto bacterias como archaeas aunque en algunos casos se requirió usar un PCR anidada. Es común que al trabajar con bacterias o archaeas que viven en condiciones extremas (pH, temperatura), se dificulte la extracción de ADN y la concentración de molde no es suficiente para poder observar una amplificación con una PCR directa, por lo que se requiere realizar una PCR anidada (comunicación personal de Purificación López, Labrenz y col. 2004).

En ambientes de lixiviación mineral es muy difícil realizar la medición del número de células microbianas debido a factores tales como variaciones en el grado en el cual las células se asocian con el sólido, variaciones en el grado de ruptura celular, grado en el cual el ADN de las células rotas puede ser adsorbido por el sólido, variación de la degradación del ADN debido a la exposición con las fuertes condiciones químicas seguido de desintegración celular. Sin embargo, es posible aplicar la técnica de PCR en tiempo real para la cuantificación de miembros específicos de la población o estimación de carga bacteriana de ADN y demostrada su buena calidad para su posible amplificación por PCR convencional,

---

de tal forma que garanticemos la presencia de ADN consistentemente en todas las muestras analizadas. De esta manera es posible monitorear los cambios en especies microbianas seleccionadas en respuesta a variaciones ambientales (Liu y col, 2005).

Demergasso y col. (2005) observaron que la sucesión microbiana en los montones de lixiviación es muy parecida a los datos moleculares disponibles en ambientes tipo drenaje ácido de mina (AMD). La comunidad es dominada por los géneros de *Leptospirillum* y de *Ferroplasma* en las más extremas condiciones de pH ácidos y altas fuerzas iónicas. Contrariamente, *Acidithiobacillus* y *Sulfobacillus* son los principales componentes en pH ligeramente ácidos (pH 2.0-5.0) y una baja conductividad. Probablemente las muestras tomadas de los cultivos líquidos como KIE se encuentren en condiciones ácidas extremas aunque estas variables no fueron medidas en nuestro caso ya que las muestras provienen de cultivos líquidos estandarizados y no de muestreo directo en el terrero, o que el muestreo en los terreros se realizó en el momento en que se encontraban en condiciones parecidas, favoreciendo la identificación del género *Leptospirillum*. Será importante comparar los organismos presentes en las muestras de escurrimiento que están en proceso de secuenciación. La presencia de un sistema de captación múltiple para Fe (III) en *A. ferrooxidans* puede ayudar a explicar por qué, este microorganismo está virtualmente ausente después de prolongadas pruebas de biolixiviación de muestras minerales en reactores y en cultivos líquidos en los cuales la proporción de Fe (III) a Fe (II) es muy alta. En estas circunstancias el género *Leptospirillum* parece dominar la población microbiana, una observación que ha sido atribuida a su habilidad para crecer en presencia de altas concentraciones de Fe (III) lo cual la selecciona contra *A. ferrooxidans* (Quantrini y col., 2005). También se han observado cambios anuales en la composición de la población microbiana y estas variaciones muestran una fuerte correspondencia con las condiciones físicas y químicas del ambiente (Bond y col., 2000; Demergasso y col., 2005). Los cambios en las comunidades pueden estar relacionados a la dinámica de los principales sustratos tales como el hierro ferroso

---

disponible y al incremento de los niveles de iones inhibitorios como el sulfato lo que para nuestras muestras analizadas podría indicar que el proceso de biolixiviación se encontraba en la etapa final, o bien que la proporción de Fe (III) a Fe (II) era muy alta en el momento de muestrear los cultivos líquidos.

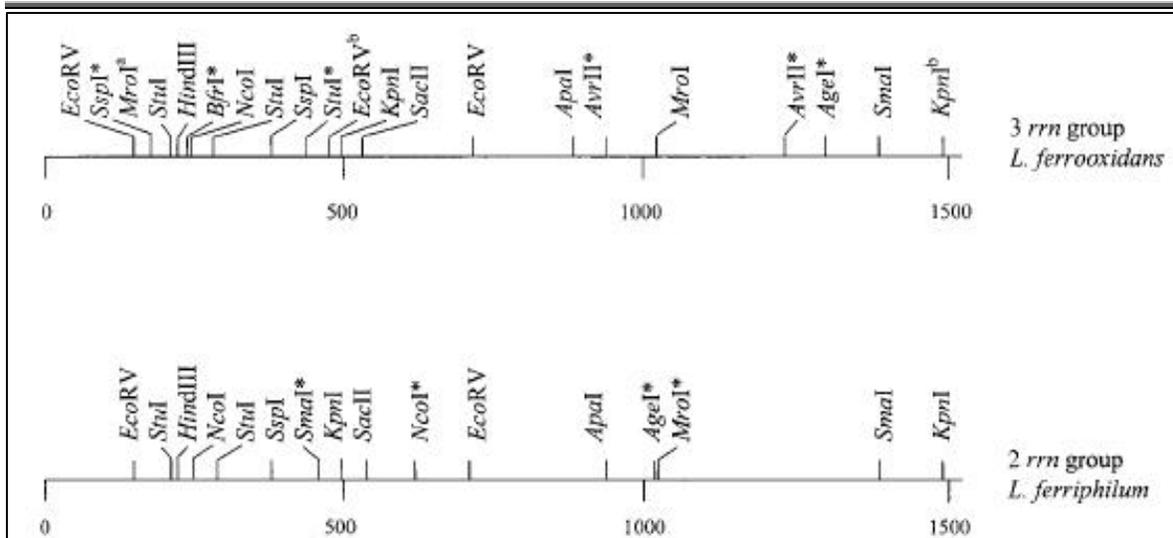
Los análisis filogenéticos de fragmentos de ADNr 16S mostraron que en nuestras muestras encontramos principalmente bacterias, tales como *Leptospirillum*, *Sulfobacillus* y archaeas como *Ferroplasma*; donde sus principales características metabólicas son la oxidación de hierro y azufre. Todas las secuencias analizadas de *Leptospirillum* fueron afiliadas al grupo II, el cual tiene un contenido de GC entre 55-58% (Bond y col., 2000; Coram y Rawlings, 2002).

Diferentes tipos de *Leptospirillum* han sido detectados en diferentes ambientes ácidos (Bond y col., 2000; Coram y Rawlings, 2002). *Leptospirillum* ha sido formalmente reconocido como un género bacteriano contando con diferentes miembros dentro de este género (Hippe, 2000) y estos miembros forman grupos distintos filogenéticamente en el taxón Nitrospira (Bond y col., 2000). Basados en la filogenia, tres posibles grupos han sido sugeridos: el grupo I generalmente referido como *L. ferrooxidans* porque *L. ferrooxidans* cepa DSM2705 pertenece a este grupo y el grupo II nombrado *L. ferriphilum* ya que no existe una distinción morfológica entre sus miembros (Coram y Rawlings, 2002). Ambos grupos son autotróficos y usan el hierro ferroso como su donador de electrones. Tienen un crecimiento óptimo a temperaturas de 26 a 30°C (Grupo I) y 30 a 40°C o más (Grupo II) (Coram y Rawlings, 2002). Las secuencias del grupo III (Bond y col., 2000) tienen baja similitud con las secuencias existentes del grupo I y II y probablemente representen un nuevo género en *Leptospirillum* dentro del grupo de leptospirilla; sugiriendo que también son autótrofos y oxidadores de hierro que pueden crecer a temperaturas mayores de 45°C. El grupo I leptospirilla tiene un contenido de G+C en el ADN genómico en una proporción del 49 al 52% y tres copias de los genes *rrn*, que codifican para 16S-23S-5S. El grupo II leptospirilla tiene una proporción de G+C del 55 al 58% y dos copias de los genes *rrn*, y el

---

grupo III leptospirilla tienen una similitud del 89 al 93 % con las secuencias de ADNr 16S de los grupos I y II, este grupo no ha sido muy estudiado.

En bioreactores comerciales para lixiviación de metales que operan a 40°C, *L. ferriphilum* está reportado por ser el miembro predominante de la comunidad y los grupos II y III son también encontrados en biopelículas del drenaje ácido de mina. Contrariamente, las secuencias relacionadas a *Leptospirillum* encontradas en el Río Tinto, fueron afiliadas al grupo I (González-Toril y col., 2003). Interesantemente, miembros que pertenecen a un mismo grupo fueron aislados de localizaciones geográficas muy diferentes; por ejemplo, organismos del grupo I han sido aislados de Rumania, Montana, Inglaterra, Gales, Idaho y Chile. Coram y Rawlings (2002) observaron la presencia de sitios de corte para 4 endonucleasas (*Agel*, *MorI*, *NcoI* y *SmaI*) los cuales permiten la identificación del grupo leptospirilla con dos copias de los genes *rrn* y 6 endonucleasas (*Agel*, *AvrII*, *BalI*, *EcoRV*, *SspI* y *StuI*) para identificar el grupo con tres copias de genes *rrn* (Figura 45). El sitio de corte *Agel* está presente en las secuencias de ADNr 16S en ambos grupos pero con suficiente diferencia en la posición para permitir una identificación específica. Además observaron que *ApaI*, *HinIII*, *KpnI* y *SacII* no pueden ser usadas para distinguir entre leptospirillas, pero estas enzimas de restricción pueden ser usadas como herramienta de diagnóstico para distinguir entre *Leptospirillum*, *Acidithiobacillus caldus*, *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* (Coram y Rawlings, 2002). El análisis de restricción es un método preliminar que nos puede indicar que productos de PCR obtenidos con oligonucleótidos específicos del género *Leptospirillum* pertenecen al grupo I o II, sin embargo en nuestro estudio la mayoría de las clonas interesantes fueron secuenciadas y con esta información pudimos inferir a que grupo de leptospirilla pertenecen nuestras clonas (grupo II), sin embargo en trabajos futuros donde se requieran analizar un gran número de clonas, la estrategia de restricción es recomendable.



**Figura 45.** Mapa de las endonucleasas de restricción de 6 pb, que cortan en la secuencia de ADN r16S de *L. ferrooxidans* y *L. ferriphilum*. Los sitios de restricción informativos se encuentran marcados con asteriscos.

*Leptospirillum ferriphilum*, encontradas en este trabajo: son células pequeñas curvadas o spirilla, miden 0.3- 0.6  $\mu\text{m}$  de ancho y 0.9-3.5  $\mu\text{m}$  de largo (Hippe, 2000; Coram y Rawlings, 2002). Las células jóvenes tienen forma de vibrio pero en cultivos viejos de 4 días, las células son principalmente en forma espiral formada por dos a cinco vueltas. Gram negativos, forman esporas y tienen movilidad por la presencia de un flagelo polar. Su crecimiento es aeróbico y quimilítico autótrofo, con hierro ferroso o pirita como fuente de energía. El pH óptimo para su crecimiento es de 1.4-1.8 y una temperatura de 30°C-37°C, algunos aislados tienen la capacidad de crecer a 45°C.

Por otro lado las archaeas pertenecientes al género *Ferroplasma*, también encontradas en este trabajo son aerobios obligados y autótrofos. Son capaces de crecer con Fe (II) y Mn (II), con la adición de pequeñas concentraciones de carbono orgánico y no son capaces de crecer aeróbicamente en presencia de compuestos de azufre reducido. Son microorganismos acidófilos que ayudan a la oxidación acelerando la velocidad de alteración de minerales sulfurados con contenidos metálicos. La alteración oxidativa de los sulfuros (pirita,  $\text{FeS}_2$ ), juega un papel importante en el ciclo geoquímico del azufre y causa la formación de drenaje

---

ácido de mina (AMD). La distribución geográfica de las cepas de *Ferroplasma* es muy amplia., habitan en menas conteniendo pirita, arsenopirita y cobre, sistemas de drenaje ácido de mina, salmueras ácidas y campos geotérmicos (Golyshina y Timmis, 2005). La familia Ferroplasmaceae contiene miembros mesófilos y termófilos moderados, todos ellos son ácido-resistentes que exhiben propiedades eco-fisiológicas similares a las bacterias oxidantes de hierro y azufre. La combinación de estas propiedades marca a *Ferroplasma* para importantes aplicaciones industriales en procesos de biooxidación (Golyshina y Timmis, 2005).

Secuencias relacionadas a *Ferroplasma* han sido encontradas dominando la población microbiana en el sitio de generación ácida Iron Mountain, en California (EUA) (Bond, 2000), en sitios geotermales de la Isla Caribeña de Montserrat (Burton y Norris, 2000); también se ha encontrado en columnas de laboratorio inoculadas con soluciones de procesos de biolixiviación industrial de cobre que operan con altas concentraciones de sulfato. La existencia de secuencias relacionadas a microorganismos termófilos sugiere la presencia de microambientes con altas temperaturas en los terreros (Demergasso y col., 2005). En nuestro trabajo aunque no se encontraban temperaturas superiores a los 50°C, las concentraciones de sulfato en la calcopirita pudieron ser condiciones que favorecieron la presencia de este género.

Algunas de las características del género *Ferroplasma* que han descrito los investigadores son: células pleomórficas o cocci irregulares, crecen quimiorganotróficamente, quimiomixotróficamente y posiblemente quimioautotróficamente. Forma colonias redondas, pequeñas y blancas en medio sólido con extracto de levadura. El contenido de G+C es de 36.5- 37% (Dopson y col., 2004). Las archaeas pertenecientes a este género son de morfología irregular, durante la fase exponencial son pleomórficas de 0.3 a 1.0 µm por 1.0 a 3.0 µm, en la membrana tienen una zona de transporte de electrones y no tienen pared celular, son capaces de oxidar  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  y pirita ( $\text{FeS}_2$ ). Son autótrofos, aunque también pueden ser heterótrofos por que crecen mejor con extracto de

---

levadura. Son capaces de crecer con Fe (II) y Mn (II), con la adición de pequeñas concentraciones de carbono orgánico y no son capaces de crecer aeróbicamente en presencia de compuestos de azufre reducido (Edwards y col., 2000; Golyshina y col., 2000; Gihring y col., 2003). Puede crecer a una temperatura de entre 15 y 45°C, con pH entre 1.3 y 2.2 (Edwards y col., 2000; Golyshina y col., 2000; Gihring y col., 2003). La alta abundancia de *Ferroplasma* spp. en menas de pirita y en ambientes lixiviantes, sugieren que juegan un papel significativo en los procesos biogeoquímicos (Golyshina y Timmis, 2005). La membrana celular de *Ferroplasma* contiene lípidos caldarchaetidilglicerol tetraéter, los cuales tienen una permeabilidad extremadamente baja de protones, como resultado del casco isoprenoide que probablemente sea la mayor contribución para tolerar los extremos ácidos de estos microorganismos carentes de pared celular. La presencia e identificación del género *Ferroplasma*, sugiere la participación activa en la biolixiviación de calcopirita en los cultivos líquidos, y también un alto nivel de acidez y fuerza iónica en la solución.

Por otro lado, secuencias de *Sulfobacillus* fueron relacionadas a cepas y clonas obtenidas del Parque Nacional Yellowstone, en pilas de biolixiviación de pirita y calcopirita con procesos termófilos (Dopson y col., 2004) y en sedimentos de drenajes ácidos de minas. Demergasso y col., (2005) sugieren que organismos como *Sulfobacillus* están más en competencia con organismos oxidantes de hierro que con organismos oxidantes de azufre (Bridge y Jonson, 1998). *Alicyclobacillus* y *Sulfobacillus* comparten la mayoría de las características fenotípicas descritas, explicando la posible confusión entre estos dos géneros. Por ejemplo, *S. thermosulfidooxidans* son células de 0.6-0.8 µm de ancho y 1.0-6.0 µm de longitud, no tienen movilidad, son gram positivos (variables), forman esporas, crecen en un pH de 1.1-5.0 con una temperatura de 20-60°C. Son autótrofos en presencia de azufre, minerales sulfurosos y hierro ferroso. Tienen un porcentaje de G+C en su ADN de 53.6-53.9% (Durand, 1996).

---

*S. thermotolerans* tipificada en este trabajo, es una bacteria acidófila, aerobia, formadora de esporas, Gram positiva, la cual también ha sido aislada de la pulpa de concentrados sulfurosos que contenían oro, procesadas a 40°C en una planta recuperadora de oro en Siberia. Las células tienen una forma curvada ligeramente, tienen un diámetro de 0.8-1.2 µm y una longitud de 1.5-4.5 µm. La cepa Kr1<sup>T</sup> tiene forma esférica oval, retráctil, tiene endoesporas localizadas subterminalmente. El rango de temperatura de crecimiento fue de 20-60°C, con una temperatura óptima de 40°C. El rango de pH para su crecimiento en medio conteniendo iones ferrosos fue de 1.2-2.4, con un pH óptimo de 2.0; el rango de pH de crecimiento en medio conteniendo S<sup>o</sup> de 2.0-5.0, con un pH óptimo de 2.5. La cepa Kr1<sup>T</sup> fue mixotrófica, oxidante de hierro ferroso, azufre elemental, tetratiónato o minerales sulfurosos como fuente de energía en presencia de 0.02% de extracto de levadura u otro substrato orgánico. El contenido de G+C en el ADN de la cepa Kr1<sup>T</sup> fue de 48.2±0.5%. Esta cepa muestra bajo nivel de reasociación ADN-ADN con las cepas de especies conocidas de *Sulfobacillus* (11-44%). El análisis de las secuencias ARNr 16S revelaron que Kr1<sup>T</sup> forma un grupo filogenéticamente separado con un alto grado de similitud entre las secuencias de nucleótidos (98.3-99.6%) y un bootstrap de 100% soportando el grupo filogenético de *Sulfobacillus*. Con base en las propiedades fisiológicas y los resultados de los análisis filogenéticos, la cepa Kr1<sup>T</sup> puede ser afiliada a una nueva especie de el género *Sulfobacillus*, para la cual el nombre de *S. thermotolerans* sp. nov. es propuesto (Bogdanova y col., 2006). El contenido de G+C de nuestra clona de *S. thermotolerans* es similar al citado anteriormente y la presencia de esta bacteria en los cultivos líquidos sugiere posiblemente la participación activa en el proceso de biolixiviación.

*Thermus aquaticus* fué otro género encontrado en este trabajo; es una bacteria que pertenece al grupo Deinococcus-Thermus, fue descubierta en 1969, por Thomas Brock y Hudson Freeze de la Universidad de Indiana, en la región Great Fountain del Parque Nacional Yellowstone (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Esta bacteria puede vivir en temperaturas de 50-80°C, aunque su temperatura

---

óptima de crecimiento es de 70°C, es quimiótrofa. *T. aquaticus*, se ha vuelto famosa como fuente de enzimas termoestables, particularmente la Taq polimerasa y otras como la aldolasa.

La caracterización de la ecología microbiana de el Río Tinto (España), un hábitat extremo con un pH extremadamente ácido y con altas concentraciones de metales pesados, revelaron un inesperado nivel de riqueza microbiana. Una variedad de microorganismos eucariontes fueron aislados, entre ellos muchas cepas de hongos que fueron identificadas y sus características fisiológicas estudiadas, lo cual concuerda con algunos géneros de hongos encontrados en el presente trabajo. Nuevas cepas de hongos fueron aisladas del Río Tinto. 52% de ellas fueron capaces de crecer *in vitro* usando medio enriquecido con aguas del río. Estas cepas de hongos pertenecen a 6 géneros de basidiomicetes (*Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Tremella*, *Holtermannia*, *Leucosporidium* y *Mrakia*) y 2 géneros de ascomicetos (*Candida* y *Williopsis*). En adición 349 cepas de hyphomycetes pertenecientes a 17 géneros (muchos de ellos ascomicetos) fueron aislados y estudiados. 29 cepas pertenecen al género *Penicillium* (16 especies), 102 cepas incluían los géneros *Scytalidium*, *Bahusakala*, *Phoma* y *Heteroconium* o mostraron micelio estéril dematiaceo, los cuales probablemente son hyphomycetes. También se caracterizaron cepas de los géneros *Lecythophora* y *Acremonium* y de los zygomycetes del género *Mortierella*. El análisis de los principales componentes de los grupos *Acremonium* y *Lecythophora* muestra que tienen preferencias ambientales similares a los de los hongos dematiaceos (pigmentados). Las muestras fueron divididas en dos grupos: las muestras de los sitios en la zona de la mina en la cual la mayoría de las cepas de dematiaceos, *Acremonium* y *Lecythophora* fueron aislados, y los sitios que no fueron en la zona de mina y muestras de la estación 5, en la cual fueron principalmente aislados hongos del género *Penicillium* (López-Archilla y col., 2004). Las secuencias de 18S ADNr de *Acremonium* encontradas en el presente trabajo, concuerdan con los géneros encontrados en trabajos anteriores en que se menciona la presencia de filamentos eucariontes (Edwards y col., 2000). La presencia de estos organismos

en ambientes con altas concentraciones de metales pesados como en nuestro trabajo, sugiere un posible papel en la actividad metabólica de la comunidad microbiológica, ya sea ayudando a movilizar los metales o captándolos (bioremediación).

También en el presente trabajo encontramos secuencias relacionadas a *Ralstonia*, concordando con el análisis del lodo de un tanque en Bélgica, en el cual fue contaminada con altas concentraciones de metales pesados y reveló la presencia de *Ralstonia* (Dunn y Hind, 2000). Esta bacteria además de sus genes cromosómicos, tiene dos plásmidos grandes - el material genético que está aparte de los genes cromosómicos necesarios para la función ordinaria de la célula. Estos plásmidos contienen los genes que hacen a *Ralstonia* resistente a los efectos dañinos de una amplia gama de metales pesados, incluyendo el zinc, el cadmio, el cobalto, el plomo, el cobre, el mercurio, el níquel, y el cromo. *Ralstonia* tiene otra ventaja, los metales pesados tienden a acumularse en la superficie de la célula por lo que podrían ser empleadas para fines de bioremediación (Dunn y Hind, 2000).

En el presente trabajo, también se encontró una secuencia relacionada con *Streptococcus thermophilus*. Los *Streptococos* son un género diverso, son los cocos Gram-positivos, no móviles, no generan esporas, se encuentran agrupados en pares o formando cadenas. Los miembros de este género varían extensamente en patogenicidad. La mayoría de los estreptococos son anaerobios facultativos, y algunos son anaerobios obligados. El género se clasifica con base en la morfología de la colonia, de hemólisis, de reacciones bioquímicas, y de especificidad serológica. Son divididas en tres grupos por el tipo de hemólisis en las placas de agar de sangre: beta-hemolítico, alfa-hemolítico o gamma-hemolítico. La agrupación serológica se basa en diferencias antigénicas (carbohidratos de la pared de célula), en proteína pili-asociada a la pared de célula, y en la cápsula del polisacárido en estreptococos del grupo B. *Streptococcus thermophilus* es una bacteria termófila, gram positiva, no patógena,

---

tiene forma de cocos, sus hábitat son múltiples, su temperatura óptima de crecimiento es de 45°C.

La vida en ambientes extremos, como estos caracterizados por pH bajo, requiere de distintas adaptaciones celulares que compensen en diferentes problemas ecofisiológicos experimentados en el hábitat. Algunas de estas adaptaciones conocidas o sospechadas importantes para la vida en ambientes ácidos incluyen: estabilidad de la membrana y mantenimiento del gradiente de protones (lípidos), transportadores y chaperonas, adaptación ácida de las enzimas (enzimas intracelulares a pH óptimo anormal), etc. (Golyshina y Timmis, 2005). La cadena transportadora de electrones reveló en *Ferroplasma* sp. una proteína putativa hemo-cobre oxidasa terminal, citocromo b, proteínas azufre-hierro Rieske y una proteína azul cobre (Tyson y col., 2004). Se sugirió que estas proteínas se ensamblan en un supercomplejo oxidasa terminal similar al complejo SoxM de *Sulfolobus acidocaldarius*, demostrado previamente que es el único supercomplejo respiratorio que combina características de quinol y citocromo c oxidasa. La secuencia característica de la proteína azul cobre de *Ferroplasma* del grupo II mostró algunas secuencias homólogas con la rusticianina de *A. ferrooxidans* y sulfocianinas (SoxE) de *Sulfolobus*, los cuales pueden ser componentes de una cadena transportadora de electrones para la oxidación del hierro (Golyshina y Timmis, 2005).

En este estudio, describimos ensayos PCR en tiempo real con SYBR Green para detectar y cuantificar ADNr 16S de bacterias y archaeas involucradas en biolixiviación de menas de sulfuros minerales. Dicho tipo de ensayos se han aplicado para cuantificar cargas bacterianas en otros géneros (Labrenz, 2004). La presencia de ambas regiones conservadas y variables en todas las secuencias de ADNr 16S, permiten el diseño de oligos considerados universales, así como oligos específicos de género o especie (Liu y col., 2005). Los resultados obtenidos en la PCR en tiempo real anidada de las extracciones de ADN cuantificaron la carga bacteriana en un rango de  $10^5$ - $10^7$  copias. Además de *L. ferriphilum* sabemos que

---

contiene dos copias de los genes *rrn* por genoma, la relación entre el número de microorganismos y el número de genes ADNr 16S presentes en la muestra es 1:2 aprox.

Se detectó que en el consorcio KIE existe *Leptospirillum* en un orden de magnitud superior a *Sulfobacillus*, lo cual puede indicar que el cultivo líquido al momento de muestrear tenía un pH muy ácido y tal vez una etapa más avanzada de biolixiviación comparado con el consorcio QIE, en el cual al momento del muestreo según los resultados cuantificados en PCR en tiempo real este consorcio tiene similar carga bacteriana de *Leptospirillum* y *Sulfobacillus*. La información obtenida en la cuantificación de la PCR en tiempo real, nos permite evaluar los cambios en las proporciones de los microorganismos en los consorcios y evaluar en que etapa del proceso de biolixiviación se encuentran nuestros cultivos, así como correlacionar estos datos con la eficiencia del proceso, por medio del porcentaje de recuperación de cobre. En la industria minera uno podría monitorear concentraciones de sulfatos o acidez y definir el grado de avance en la biolixiviación y al mismo tiempo detectar si la carga bacteriana de géneros de organismos que toleren condiciones extremas no es adecuada y tal vez adicionarlos en forma de inóculos para mejorar la liberación de metales en materiales recalcitrantes en escurrimientos de los terreros.

La aplicación de la biotecnología para la extracción y recuperación de metales, sobre todo de baja ley, está en rápido crecimiento (Demergasso y col., 2005). La existencia de bacterias y archaeas identificadas en este trabajo y sus diferentes cargas bacterianas sugieren que las actividades metabólicas de los microorganismos habitantes de los montones de lixiviación pueden ser muy diferentes e interactuar entre ellos conforme avanza el proceso de biolixiviación (Demergasso y col., 2005). Las archaeas exhiben características eco-fisiológicas que los hacen superiores a las bacterias para la biolixiviación; por ejemplo promueven la disolución oxidativa de la calcopirita y de otros minerales, como

esfalerita y pirita, a 65°C/pH 1.2, mucho mejor que *A. ferrooxidans* a 30°C/pH 2.0 (Konishi y col., 1999).

---

**Resumen de discusión de resultados**

En la primera parte de este trabajo mediante el método modificado de extracción de ADN de Garbor y col. (2003) y PCR directa y anidada identificamos géneros y especies de microorganismos presentes en los terreros de lixiviación de Mexicana de Cananea por medio de un análisis filogenético de secuencias parciales de ADNr 16S de las muestras de cultivos líquidos. También se analizaron muestras de barrenos, escurrimientos y reactores cuyas clonas se encuentran en secuenciación. En la segunda parte con el objeto de evaluar la evolución y dinámica de los microorganismos en los reactores, se estandarizó la técnica de PCR en tiempo real, empleando oligos específicos de género para *Sulfobacillus* y *Leptospirillum*.

Los resultados obtenidos del análisis filogenético de las secuencias arrojaron la identificación de dos géneros de bacterias (*Leptospirillum* y *Sulfobacillus*) y un género de Archaea (*Ferroplasma*), que actualmente son empleados en procesos de biolixiviación de cobre en montón en la mina Lo Aguirre en Chile. Además de otros géneros de bacterias y hongos que se ha visto son resistentes a altas concentraciones de metales, pero aún no se ha estudiado su participación en los procesos de biolixiviación y sería interesante ahondar en su estudio.

Las cepas de *Ferroplasma* tienen considerables usos potenciales biotecnológicos para aplicaciones en biominería (por ejemplo, movilización de metales por oxidación biológica de menas insolubles), y como fuente de nuevas enzimas extremófilas y otros productos biológicos relevantes para biotecnología (Golyshina y Timmis, 2005). La prevalencia de descubrimientos recientes de la archaea *Ferroplasma* en soluciones ricas en hierro, caracterizadas por condiciones constantes de pH ácido y temperaturas moderadas, indican que este microorganismo, a pesar de su velocidad de crecimiento lenta, está mejor

adaptado a estos ambientes que otros tipos de bacterias, tales como *A. ferrooxidans*, y juega un papel principal en el ciclo de hierro de estos ambientes.

La presencia de microorganismos como *Sulfobacillus* y *Sulfolobales* oxidantes de azufre en el primer paso del ciclo, en lugar de microorganismos mesófilos puede revelar condiciones favorables para termófilos moderados en los montones de lixiviación. Comúnmente los cambios muestran relación con la dinámica de los principales substratos, como hierro ferroso disponible y el incremento de niveles de iones inhibitorio como sulfato.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el análisis de PCR en tiempo real, nos muestran la posible etapa en la que se encontraban los cultivos al momento de la extracción de ADN, ya que mientras en el consorcio KIE predomina *Leptospirillum* sobre *Sulfobacillus*, en el consorcio QIE se encuentran en proporciones casi iguales *Leptospirillum* y *Sulfobacillus*. Información adicional como tiempo de lixiviación de las muestras, pH y porcentaje de recuperación del metal serían importantes para relacionar los tipos de microorganismos y la etapa biológica del proceso.

---

## Conclusiones

- El método adaptado de Garbor y col. (2003) es eficiente para extraer el ADN de consorcios bacterianos presentes en muestras minerales.
- Los oligonucleótidos universales 533F-1391R son eficientes para amplificar bacterias, archaeas y hongos, así como los oligonucleótidos universales internos UI840F y UI840R diseñados en este trabajo son eficientes para obtener productos de PCR mediante una PCR anidada .
- Los oligonucleótidos específicos de género/especie generan productos de PCR en los consorcios de Mexicana de Cananea, principalmente del género *Leptospirillum* y *Sulfobacillus*.
- Los géneros de bacterias (*Leptospirillum* y *Sulfobacillus*) y la archaea (*Ferroplasma*) encontrados en este estudio pueden ser los responsables del proceso de biolixiviación en los terreros de Mexicana de Cananea.
- Es posible cuantificar por PCR en tiempo real anidada, géneros como *Leptospirillum* y *Sulfobacillus*.
- La mayor proporción de carga bacteriana ( $1 \times 10^7$ ) de *Leptospirillum* en KIE respecto a *Sulfobacillus* ( $1 \times 10^5$ ) puede relacionarse con un estado más avanzado de biolixiviación.

---

## Perspectivas y Trabajo Futuro

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, es necesario continuar con el estudio y tipificación de la diversidad microbiana presente en los terreros de lixiviación de Mexicana de Cananea, por medio de la amplificación de ADNr 16S; es necesario realizar experimentos con las enzimas de restricción para comprobar patrones de digestión en los posibles géneros a encontrar, como una estrategia preliminar a la secuenciación.

También hay que continuar el análisis de los cambios de proporciones de carga bacteriana por PCR en tiempo real de las especies, para poder evaluar y seleccionar aquellos que sean más eficientes en la lixiviación de minerales sulfurosos. Esto podría hacerse en diferentes etapas de un sistema de reactores, columnas o directamente muestreando en los terreros.

Una vez identificado el o los microorganismos que participan principalmente en biolixiviación, los cuales están presentes en los consorcios de terreros muestreados, se podrán hacer estudios de cambios en la expresión génica para entender mejor los genes involucrados en diferentes condiciones, y en su caso, poder sobre expresar aquellos genes que codifiquen proteínas que participen directamente en el proceso de biolixiviación, modificando genéticamente los microorganismos de interés comercial y ecológico.

Para tener un mayor conocimiento de la diversidad biológica de ambientes ácidos es necesario el cultivo, aislamiento y caracterización de las especies nuevas detectadas. Así como realizar investigaciones de las vías metabólicas y entender las estrategias de supervivencia microbiana.

---

## Referencias

- Acinas, S. G., Marcelino, L. A., Klepac-Ceraj, V., y Polz, M. F. (2004). Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in Genomes with multiple *rrn* operons. *J. Bacteriol.* **186**: 2629-2635.
- Alpuche-Solís, A. G. (1999). Análisis of transgenic tomato plants with ACC oxidasa suppressed by sense constructs. University of Nottingham. Tesis de doctorado. Nottingham, Inglaterra.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., y Stahl, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 1919-1925.
- Appia-Ayme, C., Bengrine, A., Cavazza, C., Giudici-Ortoni, M. T., Bruschi, M., Chippaux, M., y Bonnefoy, V. (1998). Characterization and expresión of the co-transcribed *cyc1* and *cyc2* genes encoding the cytochrome *c<sub>4</sub>* (*c<sub>552</sub>*) and a high-molecular-mass cytochrome *c* from *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020. *FEMS Microbiology Letters.*, **167**: 171-177.
- Appia-Ayme, C., Guilliani, N., Ratouchniak, J., y Bonnefoy, V. (1999). Characterization of fan operon encoding two *c*-type cytochromes, an *aa<sub>3</sub>*-type cytochrome oxidase, and rusticyanin in *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC33020. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 4781-4787.
- Arredondo-Peter, R. (s/f). La reacción en cadena de la polimerasa, PCR: un impacto reciente en la biología molecular (Septiembre 2004).
- Ayala, R. F. (1999). Complejo Minero Metalúrgico de Cananea [gmexico.com.mx/cananea.com/Historia/100ANIOS.HTM](http://gmexico.com.mx/cananea.com/Historia/100ANIOS.HTM) (Octubre 2005).
- Barns, S. M., Fundyga, R. E., Jeffries, M. W., y Pace, N. R. (1994). Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**: 1609-1613.
- Bengrine, A., Guilliani, N., Appia-Ayme, C., Jedlicki, E., Holmes, D. S., Chippaux, M., y Bonnefoy, V. (1998). Sequence and expression of the rusticyanin

- 
- structural gene from *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC33020 strain. *Biochimica et Biophysica Acta.*, **1443**: 99-112.
- Bintrim, S. B., Donohue, T. J., Handelsman, J., Roberts, G. P., y Goodman, R.M. (1997). Molecular phylogeny of Archaea from soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**: 277-282.
- BIOHALE (2004). [bioshale.brgm.fr/description\\_objectives.asp](http://bioshale.brgm.fr/description_objectives.asp) (Enero 2007).
- Birnboim H. C. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids. Reseaech.* 7:1513-1523.
- Bogdanova T. I., Tsaplina, I.A., Kondrat'eva, T.F., Duda, V.I., Suzina, N. E., Melamun, V. S., Tourova, T. P., y Karavaiko, G.I. (2006). *Sulfobacillus thermotolerans* sp. non., a thermotolerant, chemolithotrophic bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 1039-1042.
- Bond, P. L., Smriga, S. P., y Bandfield, J. F. (2000). Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Appl. Environ Microbiol.*, **66**: 3842-3849.
- Bridge, T. A. M. y Johnson, D. B. (1998). Reduction of soluble iron and reductive dissolution of ferric iron-containing minerals by moderately thermophilic iron-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 2181-2186.
- Brown, J. W. (2004). Lecture 15- The Archaea y Lecture16- Eukaryotes. [mbio.ncsu.edu/JWB/MB409/lecture](http://mbio.ncsu.edu/JWB/MB409/lecture). (Abril 2005).
- Burton, N. P., y Norris, P. R. (2000). Microbiology of acidic, geothermal springs of Montserrat: environmental rDNA analysis. *Extremophiles.*, **4**: 315-320.
- Microbial diversity: let's tell it how it is (2004). [ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/coffeebrk/](http://ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/coffeebrk/) (Marzo 2005).
- Coram, N. J., y Rawlings, D. E. (2002). Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. Nov. dominates South African comercial biooxidation tanks that operate at 40°C. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 838-845.
- Cotoras, D., (1996). Drenaje ácido de mina. [biohidrica.cl/BIOHIDRICA\\_NPublicacion04.htm](http://biohidrica.cl/BIOHIDRICA_NPublicacion04.htm). (Junio 2006).
-

- 
- Crundwell, F. K. (2003). How do bacteria interact with minerals?. *Hydrometallurgy*, **71**: 75-81.
- De Wulf-Durand, P., Bryant, L. J., y Sly, L.I. (1997). PCR-Mediated detection of acidophilic, bioleaching-associated bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 2944-2948.
- Delgado, M., Toledo, H., y Jerez, C. A. (1998). Molecular cloning, sequencing, and expression of a chemioreceptor gene from *Leptospirillum ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 2380-2385.
- Demergasso, C. S., Galleguillos, P. A., Escudero, L. V., Zepeda, V. J., Castillo, D., y Casamayor, E. O. (2005). Molecular characterization of microbial population in a low-grade cooper ore bioleaching test heap. *Hydrometallurgy*. **80**: 241-253.
- Department of Bacteriology, University of Winsconsin-Madison (2005).  
[bact.wisc.edu/.../MajorGroupsOfProkaryotes](http://bact.wisc.edu/.../MajorGroupsOfProkaryotes) (Enero 2007)
- Departamento de Ingeniería Metalúrgica de la Facultad de Química de la UNAM, (2001). Biolixiviación de Minerales.  
[depa.pquim.unam.mx/~relva/Acercade.html](http://depa.pquim.unam.mx/~relva/Acercade.html). (Enero 2005).
- Dopson, M., Baker-Austin, C., Hind, A., Bowman, J. P., y Bond, P. L. (2004). Characterization of *Ferroplasma* isolates and *Ferroplasma acidarmanus* sp. Nov., extreme acidophiles from acid mine drainage and industrial bioleaching environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**: 2079-2088.
- Dunn, J., and Hind, G. (2000). Scientists decode genes of microbe that thrives in toxic metals. [sciencedaily.com/releases/2000/12/001205071815.htm](http://sciencedaily.com/releases/2000/12/001205071815.htm) (Junio 2006).
- Durand, P. (1996). Primary Structure of the 16S rRNA gene of *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* by direct sequencing of PCR amplified gene and its similarity with that of others moderately thermophilic chemolithotrophic bacteria. *System. Appl. Microbiol.*, **19**: 360-364.
- Edwards, K. J., Bond, P. L., Gihring, T. M., y Banfield, J. F. (2000). An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. *Science*, **287**: 1796-1799.

- 
- Garbor, E. M., de Vries, E. J., y Janssen, D. B. (2003). Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbial Ecology*, **44**: 153-163.
- García del Amo, D., Calvo Pérez, B., Vladimirovich Gavrilenko, E., Cueto Hirschberger, R., y García García, E. (2000). Crista-Mine, Mineralogía descriptiva. [uned.es/cristamine/i/nicio.htm](http://uned.es/cristamine/i/nicio.htm). (Enero 2006).
- Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D., y Sand, W. (1998). Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 2743-2747.
- Gihring, T. M., Bond, P. L., Peters, S. C., y Banfield, J. F. (2003). Arsenic resistance in the archaeon "*Ferroplasma acidarmanus*": new insights into the structure and evolution of the ars genes. *Extremophiles*. **7**: 123-130.
- Goebel, B. M., y Stackebrandt, E. (1995). Molecular analysis of the microbial biodiversity in a natural acidic environment, In C. A. Jerez, T. Vargas, H. Toledo, y J. V. Wiertz, *Biohydrometallurgical processing.*, Universidad de Chile, 43-52.
- Golyshina, O. V., Pivovarova, T.A., Karavaiko, G. I., Kondrat'eva, T. F., Moore, E. R. B., Abraham, W. R., Lünsdorf, H., Timmis, K. N., Yakimov, M. M., y Golyshin, P. N. (2000). *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of the *Archaea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**: 997-1006.
- Golyshina, O.V., y Timmis, K.N. (2005). *Ferroplasma* and relatives, recently discovered cell wall- lacking archaeas making a living in extremely acid, heavy metal-rich environments. *Environ. Microbiol.*, **7**: 1277-1288.
- González-Toril, E., Llobet-Brossa, E., Casamayor, E. O., Amann, R., y Amils R. (2003). Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**: 4853-4865.
- Guerrero Rojas, J. J. (1990). Recuperación de valores metálicos por vía biohidrometalúrgica. [groups.msn.com/BioMining](http://groups.msn.com/BioMining) (Enero 2005).

- 
- Guerrero Rojas, J. J. (1998). Biotecnología en la disolución y recuperación de metales. [monografias.com/trabajos13/biomtek/biomtek.shtml](http://monografias.com/trabajos13/biomtek/biomtek.shtml). (Febrero 2005).
- Gutiérrez–Ruiz, M. E. (s/f). Minería en México [union.org.mx/guia/actividadesyagravios/mineria.htm](http://union.org.mx/guia/actividadesyagravios/mineria.htm) (Octubre 2005).
- Herrera Cuadra J. M. (s/f). Filogenia bacteriana mediante el análisis del rRNA 16S. [biologia.iztacala.unam.mx/biblioteca\\_en\\_linea/](http://biologia.iztacala.unam.mx/biblioteca_en_linea/). (Noviembre 2005).
- Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J. D., Higgins, D. G., y Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids. Res.*, **22**: 4673-4680. <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>
- Higueras Higueras, P. (2006). Productos de la meteorización. [uclm.es/users/higueras/yymm/YM5.html](http://uclm.es/users/higueras/yymm/YM5.html). (Septiembre 2006).
- Hippe, H. (2000). *Leptospirillum* gen. nov. (ex Markosyan 1972), nom. rev., including *Leptospirillum ferrooxidans* sp. nov. (ex Markosyan 1972), nom. rev., and *Leptospirillum thermoferrooxidans* sp. nov. (Golovacheva *et al.* 1992). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**: 501-503.
- Hoshino, T., Kawaguchi, M., Shimizu, N., Hocino, N., Ooshima, T., y Fujiwara, T. (2004). PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using gft genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious disease*. **48**: 195-199.
- Koch, A. L. (2001). Bacterial origins. *Encyclopedia of life sciences*. [www.els.net](http://www.els.net). (Diciembre 2005).
- Konishi, Y., Asai, S., Tokushige, M., y Suzuki, T. (1999). Kinetics of the bioleaching of chalcopyrite concentrate by acidophilic thermophile *Acidianus brierleyi*. *Biotechnol. Prog.*, **15**: 681-688.
- Kumar, S., Tamura, K., y Nei, M. (2004). MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics.*, **5**: 150-163. <http://www.megasoftware.net/>

- 
- Labrenz, M., Brettar, I., Christen, R., Flavier, S., Bötel, J., y Höfle, M. G. (2004). Development and application of a real-time PCR approach for quantification of uncultured bacteria in the Central Baltic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4971-4979.
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt y M. Goodfellow, *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. J. Wiley & sons, New Cork, 115-175.
- Leiva, H., Badilla, R., y Espejo, R. (1999). Obreras invisibles del cobre. [bioplanet.net/magazine/bio\\_sepoct\\_1999/bio\\_1999\\_sepoct\\_reportaje.htm](http://bioplanet.net/magazine/bio_sepoct_1999/bio_1999_sepoct_reportaje.htm). (Febrero 2006).
- Liu, C. Q., Plumb, J., y Hendry, P. (2006). Rapid Specific Detection and Quantification of Bacteria and Archaea Involved in Mineral Sulfide Bioleaching Using real-Time PCR. *Biotechnol. and Bioengineer.* **94**:330-336.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaria, P., Baltimore, D., y Darnell, J. (2003). *Molecular Cell Biology*, fourth edition, W. H. Freeman and company. New York, Capítulo 4, 7 y 10.
- López-Archilla, A.I., González, A.E., Terrón, M.C., y Amils, R. (2004). Ecological study of the fungal populations of the acidic Tinto River in southwestern Spain. *Can. J. Microbiol./Rev. Can. microbiol.* **50**: 923-934.
- López-García, P., Gaill, F., y Moreira, D. (2002). Wide bacterial diversity associated with tubes of the vent worm *Riftia pachyptila*. *Environ. Microbiol.*, **4**: 204-215.
- Mandl, M. (s/f). [orion.chemi.muni.cz/acidithiobacillus/staff.htm](http://orion.chemi.muni.cz/acidithiobacillus/staff.htm) (Diciembre 2006).
- More, M. L., Eric, J. B., Silva, M. C., Ghiorse, W.C., y Madsen, E. L. (1994). Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Appl. Environmental. Microbiology.*, **60**: 1572-1580.
- Moreira, D., Rodríguez-Valera, F., y López-García, P. (2004). Analysis of a genome fragment of a deep-sea uncultivated Group II euryarchaeote

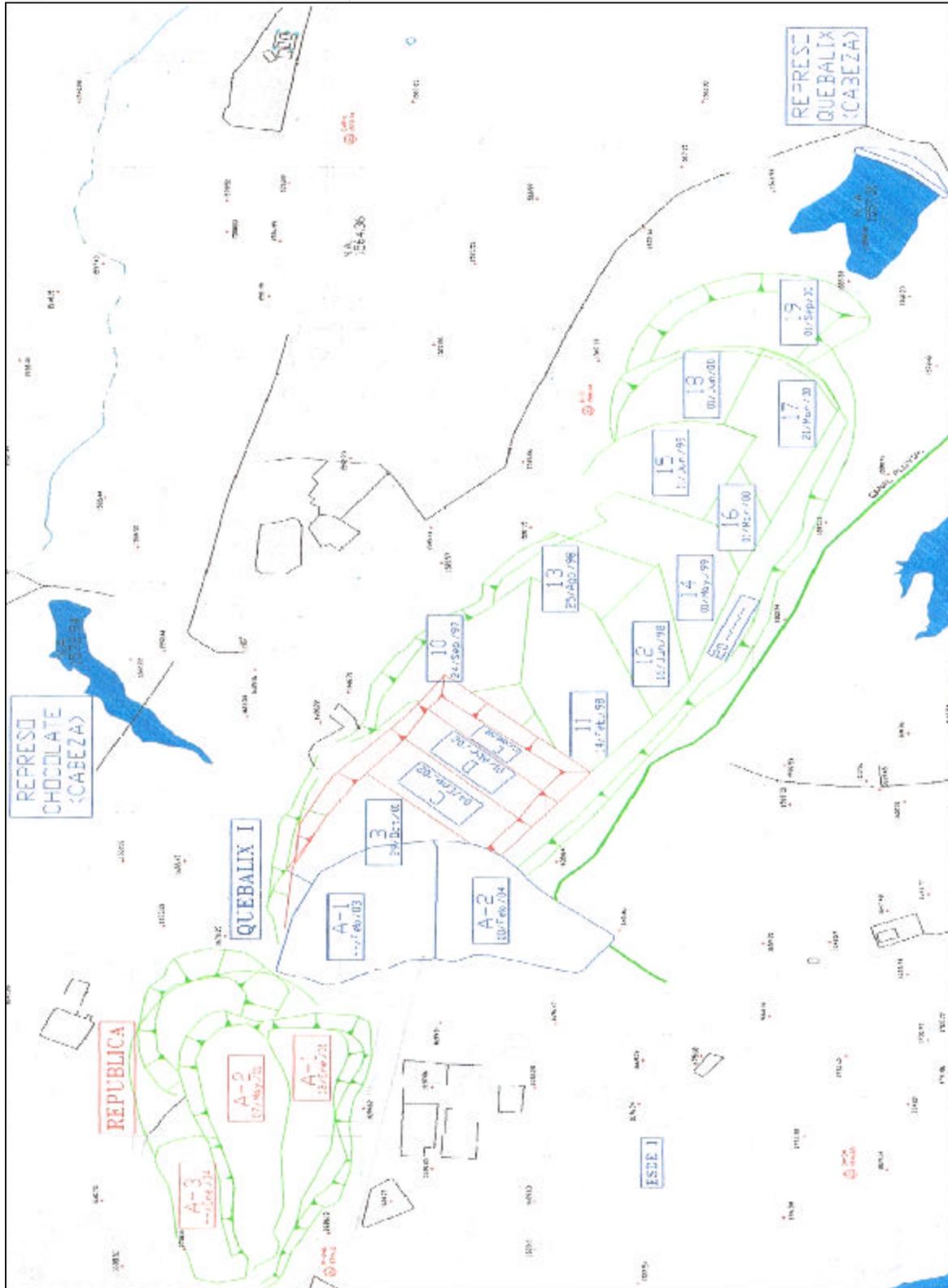
- 
- containing 16S rDNA, a spectinomycin-like operon and several energy metabolism genes. *Environmental Microbiology.*, **6**: 959-969.
- Mullis, K. B. (1993). The polymerase chain reaction. [nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html). (Septiembre 2004).
- National Center for Biotechnology Information, (1988). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Febrero 2005-a la fecha).
- Okibe, N., Gericke, M., Hallberg, K. B., y Johnson, D.B. (2003). Enumeration and characterization of acidophilic microorganisms isolated from a pilot plant stirred-tank bioleaching operation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**: 1936-1943.
- Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N.R., y Stahl, D. A. (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Ann. Rev. Microbiol.*, **40**: 337-365.
- Parro, V., y Moreno-Paz, M. (2003). Gene function analysis in environmental isolates: The *nif* regulon of the strict iron oxidizing bacterium *Leptospirillum ferrooxidans*. *PNAS.*, **100**: 7883-7888.
- PCR (2004) [edoc.hu-berlin.de/.../HTML/chapter1.html](http://edoc.hu-berlin.de/.../HTML/chapter1.html) (Enero 2007).
- Peccia, J., Marchand, E. A., Silverstein, J., y Hernández, M. (2000). Development and application of small-subunit rRNA probes for assessment of selected *Thiobacillus* species and members of the Genus *Acidiphilium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 3065-3072.
- Quantrini, R., Jedlicki, E., y Colmes, D. S. (2005). Genomic insights into the iron uptake mechanisms of the biomining microorganism *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, **32**: 606-614.
- Rawlings, D. E., Tributsch, H., y Hansford, G. S. (1999). Reasons why “*Leptospirillum*”-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. *Microbiol.*, **145**: 5-13.
- Romero, J., Yañez, C., Vásquez, M., Moore, E. R. B., y Espejo, R. T. (2003). Characterization and identification of an iron-oxidizing, *Leptospirillum*-like

- 
- bacterium, present in the high sulfate leaching solution of a comercial bioleaching plant. *Research in Microbiology.*, **154**: 353-359.
- Rondon, M. R., Goodman, R. M., y Handelsman, J. (1999). The earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. *TIBTECH.*, **17**: 403-409.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning a laboratory manual*, Argentin, J., Irwin, N., Janssen, K. A., Curtis, S., Zierler, M., Dickerson, M., Sialiano, I., McInerny, N., Brown, D., Schaefer, S. third edition, CSHL PRESS. New York, Capítulo 1, 5, 8, 12 y 15.
- Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P. G., y Schippers, A. (2001). (Bio)chemistry of bacterial leaching-direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy.*, **59**: 159-175.
- Schrenk, M. O., Edwards, K.J., Goodman, R. M., Hamers, R. J., y Banfield, J. F. (1998). Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: Implications for generation of acid mine drainage. *Science.*, **279**: 1519-1521.
- Szapiro, I. (2005). *Uso de Microorganismos en la Industria Minera.* [proteccionline.com/numeros\\_antteriores/nro59/contenidos\\_09.htm](http://proteccionline.com/numeros_antteriores/nro59/contenidos_09.htm). (Enero 2006).
- Trevors, J. T., Lee, H., y Cook, S. (1992). Direct extraction of DNA from soil. *Microb. Releases.*, **1**: 111-115.
- Tsai, Y. L., y Olson, B. H. (1992). Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 2292-2295.
- Tyson, G. W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E. E., Ram, R. J., Richardson, P. M., Solovyev, V. V., Rubin, E. M., Rokhsar, D. S., y Banfield, J. F. (2004). Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature.* **428**: 37-43.
- Wikipedia, Princeton University. (2006) [search.com/reference/Evolution](http://search.com/reference/Evolution) (Enero 2007).

- 
- Wisotzkey, J. D., Jurtshuk, P., y Fox, G.E. (1990). PCR amplification of 16S rDNA from lyophilized cell cultures facilitates studies in molecular systematics. *Current Microbiology*, **21**: 325-327.
- Woese, C. R., Kandler, O., y Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Of Sci.*, **87**: 4576-4579.
- Zaporjets, D., French, S., y Squires, C. L. (2003). Products transcribed from rearranged *rrn* genes of *Escherichia coli* can assemble to form functional ribosomes. *J. Bacteriol.*, **185**: 6921-6927.
- Zhou, J., Bruns, M. A., y Tiedje, J. M. (1996). DNA recovery from soil of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 316-322.
- Zuckerandl, E., y Pauling, L. (1962). Molecular disease, evolution, and genetic heterogeneity. *Horizons in Biochemistry*. Edited by M. Kasha and B. Pullman. Academic Press, New York. pp. 189-225.
- DNA structure. (2004). [tigger.uic.edu/.../phys/phys461/phys450/ANJUM04/](http://tigger.uic.edu/.../phys/phys461/phys450/ANJUM04/). (Agosto 2006).
- Molecular genetics (2006). [fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/mol\\_gen.htm](http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/mol_gen.htm) (Enero 2007).

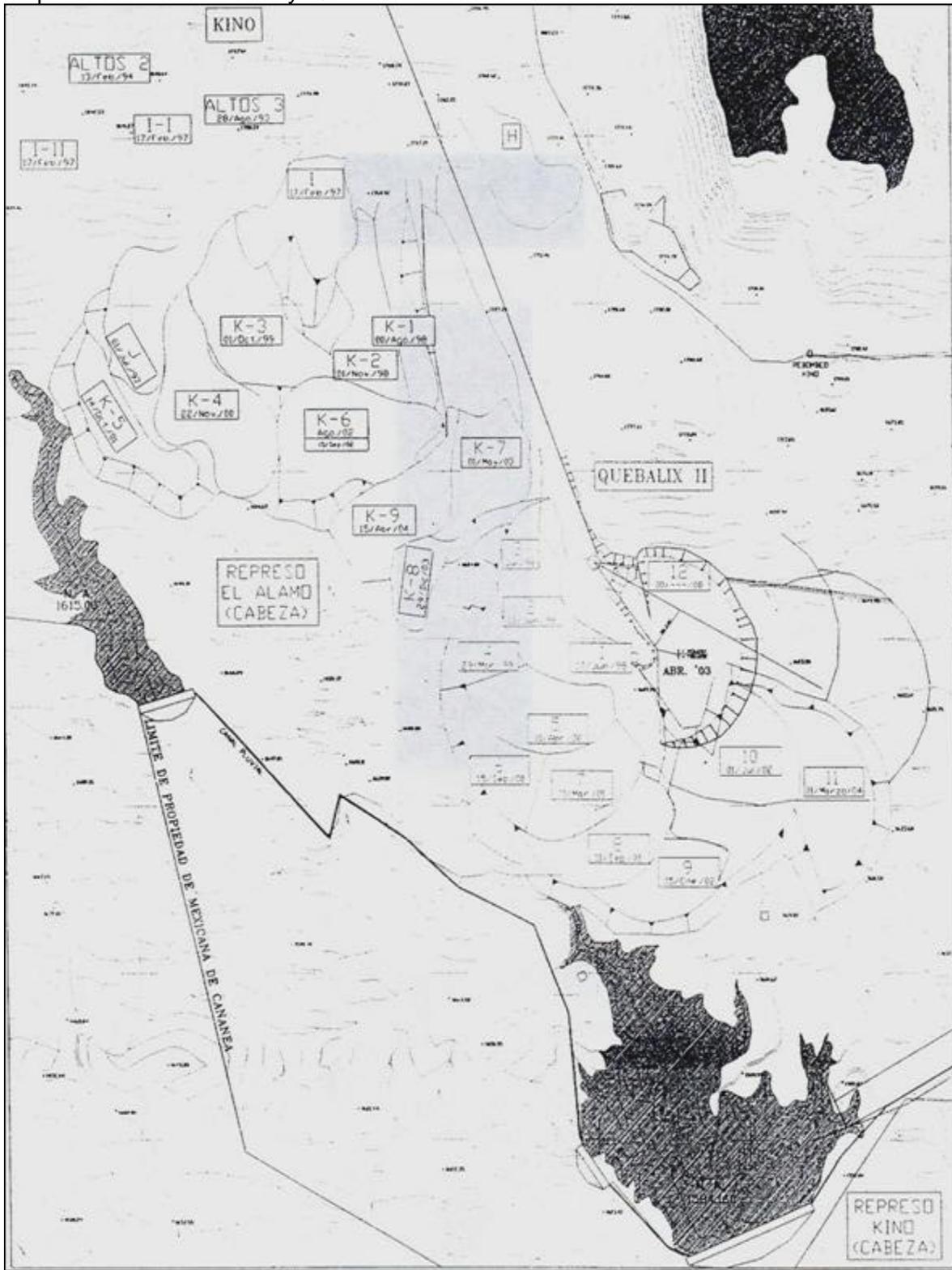
# Anexo 1

Mapa de los terreros República y Quebalix I de Mexicana de Cananea



## Anexo 2

Mapa de los terreros Kino y Quebalix II de Mexicana de Cananea



---

### Anexo 3

Condiciones de cultivo de las cepas de referencia

Cepa Referencia	Número de cepa	Medio de cultivo	Temperatura	pH
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	IFO 13701	224	30°C	4.0-4.6
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	DSMZ 14887	71	25°C	4.4-4.7
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	IFO 14246	235	28°C	3.0
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	DSMZ 14882	882	25°C	1.8
<i>Acidiphilium cryptum</i>	IFO 14242	234	28°C	3.0
<i>Acidiphilium cryptum</i>	DSMZ 2389	269	28°C	3.0
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	DSMZ 2705	882	30°C	1.8
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	DSMZ 10331	709	45°C	1.7
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	DSMZ 9293	665	50°C	1.9-2.4
<i>Sulfobacillus disulfidooxidans</i>	DSMZ 12064	812	35°C	2.25

IFO (Institute of Fermentation Osaka, Japón)

DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)

## Anexo 4

### Preparación de medios de cultivo

Medio	Receta
Medio de cultivo Luria-Bertani (LB) sólido	Pesar 2.5 g de bacto-triptona, 1.25 g de extracto de levadura, 2.5 g de NaCl, 7.5 g de agar microbiológico. Aforar a 250 ml con agua destilada y ajustar el pH a 7.5 con NaOH.
Medio LB líquido	Pesar 2 g de bacto-triptona, 1 g de extracto de levadura, 2 g de NaCl, aforar a 200 ml y ajustar el pH a 7.5 con NaOH.
Medio 224	Pesar 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1.5 g de $\text{KNO}_3$ , 1.5 g de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.25 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.125 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.005 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.5 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.15 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.05 g de extracto de levadura, 0.5 g azufre (esterilizado aparte), 5 mg de azul de bromofenol y aforar a 500 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 4.0-4.6 con $\text{H}_2\text{SO}_4$ y esterilizar en autoclave.
Medio 234	1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.05 g de KCl, 0.25 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , polipeptona (esterilizado aparte), glucosa (esterilizado aparte) y aforar a 500 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 3.0 con $\text{H}_2\text{SO}_4$ y esterilizar en autoclave.
Medio 235	1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.25 g de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.25 g de $\text{MgSO}_4$ , 0.05 g de KCl, 0.005 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 20 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (esterilizado aparte) y aforar a 500 ml con agua destilada. Ajustar el pH a 3.0 con $\text{H}_2\text{SO}_4$ y esterilizar en autoclave.
Medio 269	Pesar 2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1 g de KCl, 0.5 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.3 g de extracto de levadura (esterilizado aparte), 1.0 g de glucosa (esterilizado aparte), aforar a 1000 ml con agua destilada. Ajustar el pH a 3.0 con $\text{H}_2\text{SO}_4$ y esterilizar en autoclave.
Medio 882	Solución A: 132 mg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 53 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 27 mg de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 147.0 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , aforar a 950 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 1.8 con $\text{H}_2\text{SO}_4$ 10N y esterilizar en autoclave. Solución B: 20 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , aforar con 50 ml de $\text{H}_2\text{SO}_4$ 0.25N. Ajustar el pH a 1.2 Solución de elementos traza: 62 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 68 mg de $\text{ZnCl}_2$ , 64 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 31 mg de $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 10 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 67 mg de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , aforar a 1000 ml con agua destilada. Ajustar el pH a 1.8 con $\text{H}_2\text{SO}_4$ 10N, esterilizar las

	<p>soluciones separadamente a 112°C por 30 min.</p> <p>Antes de usar, mezclar la solución A, B y 1 ml de la solución de electos traza. El pH final del medio debe ser 1.8</p>
Medio 665	<p>Solución A: 3 g de <math>(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4</math>, 0.10 g de KCl, 0.50 g de <math>\text{K}_2\text{HPO}_4</math>, 0.5 g de <math>\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math>, 0.01 g de <math>\text{Ca}(\text{NO}_3)_2</math>, aforar a 700 ml con agua destilada y ajustar el pH a 2.0-2.2 con <math>\text{H}_2\text{SO}_4</math></p> <p>Solución B: 44.2 g de <math>\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math>, 300 ml de agua destilada y 1 ml de <math>\text{H}_2\text{SO}_4</math> 10N.</p> <p>Solución C: 20 ml de extracto de levadura (1%w/v en agua).</p> <p>Después de esterilizar en autoclave, combinar las tres soluciones.</p> <p>El pH final del medio debe ser de 1.9-2.4</p>
Medio 709	<p>Pesar 0.5 g de <math>\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math>, 0.4 g de <math>(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4</math>, 0.2 g de <math>\text{K}_2\text{HPO}_4</math>, 0.1 g de KCl, aforar a 1000 ml con agua destilada y ajustar el pH a 2.0 con <math>\text{H}_2\text{SO}_4</math></p>
Medio 812	<p>Pesar 3.0 g de <math>(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4</math>, 0.1 g de KCl, 0.5 g de <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math>, 0.5 g de <math>\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math>, 0.1 g de <math>\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}</math>, 0.1 g de extracto de levadura, aforar a 1000 ml con agua destilada y ajustar el pH a 2.25 antes de esterilizar en autoclave.</p> <p>Antes de usar adicionar por litro, 10 ml de una solución de glutatión al 10% (w/v) esterilizada por filtración.</p>
Medio 71	<p>Pesar 3 g de <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math>, 0.50 g de <math>\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math>, 3 g de <math>(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4</math>, 0.25 g de <math>\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math>, 5 g de <math>\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}</math> (esterilizado aparte), aforar a 1000 ml con agua destilada. Ajustar el pH a 4.4-4.7 y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min.</p>

## Anexo 5

### Preparación de soluciones

Solución	Receta
Acetato de sodio 5M pH 5.2	Pesar 20.51 g de Acetato de sodio y aforar a 50 ml con agua destilada.
Birboim I	Para 150 ml: Glucosa 50 mM, Tris 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0, aforar con agua destilada y esterilizar en autoclave.
Birboim II	Para 10 ml: NaOH 0.2M, SDS 1%, aforara con agua destilada. Preparar al momento de usar.
Birboim III	Para 100 ml: Acetato de potasio 5M, 11.5 ml de ácido acético glacial, aforar con agua destilada y esterilizar en autoclave.
Buffer de carga para ADN/ARN 6X	Para 2ml: Glicerol 50%, EDTA 1mM, Azul de bromofenol 0.25% y Xilencianol 0.25%.
Buffer Salina-EDTA	Mezclar NaCl 0.15M con EDTA 0.01M y aforar a 50 ml con agua destilada.
CaCl <sub>2</sub> 0.1M	Pesar 0.444 g de CaCl <sub>2</sub> y aforar a 40 ml con agua destilada.
Carbenicilina (100 mg/ml)	Disolver 1 g. de carbenicilina en 10 ml de agua desionizada estéril y alicuotar.
Cloroformo : Alcohol isoamílico (24:1)	Mezclar 240 ml de cloroformo con 10 ml de alcohol isoamílico.
EDTA 0.5M pH 8.5	Pesar 18.61 g de EDTA, aforar a 100 ml con agua destilada y ajustar el pH con ojuelas de NaOH.
EDTA 1M pH 8.5	Pesar 37.2 g de EDTA, aforar a 100 ml con agua destilada y ajustar con ojuelas de NaOH.
Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico (24:24:1)	Mezclar 100 ml de fenol, 100 ml de Cloroformo y 4.2 ml de alcohol isoamílico.
IPTG 100mM	Pesar 0.2383 g de IPTG, aforar a 1 ml con agua destilada y esterilizar por filtración.
Marcador de peso molecular de 1 Kb (200 ng/μl)	Mezclar 15 μl de TE1X pH 8.0, 5 μl de buffer de carga y 5 μl de ADN ladder 1Kb (1 μg/ μl).
NaCl 3M	Pesar 26.3 g de NaCl y aforar a 150 ml con agua destilada.
NaOH 5M	Pesar 8 g de NaOH y aforar a 40 ml con agua destilada.
SDS 20%	Pesar 8 g de SDS y aforar a 40 ml con agua destilada.
TAE 50X	Pesar 121 g de Tris base, mezclar con 28.55 ml de ácido acético glacial y 50 ml de EDTA 0.5M (pH 8.0). Aforar a 500 ml con agua

	destilada.
TE 10X	Mezclar Tris 100mM con EDTA 10mM y aforar a 50 ml con agua destilada. Ajustar el pH a 8.0
Tris 1M pH 8.0	Pesar 60.5 g de Tris base, aforar a 500 ml con agua destilada y ajustar el pH con NaOH
Tris 2M pH 8.0	Pesar 24.23 g de Tris base, aforar a 100 ml con agua destilada y ajustar el pH con HCl.
X-Gal 40 mg/ml	Pesar 40 mg de X-Gal y aforar a 1 ml con dimetil-formamida.

---

## Anexo 6

Secuencias reportadas de las clonas enviadas al CINVESTAV Unidad Irapuato

**CLONA: KIE2, pU, pGEMT, CD, 22 DE JUNIO DEL 2005**

**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

### CCGCGGGATT

CACAGGAACAGCTATGCCATGATTACGCCAGCTATTTAGGTGACACTATAGACACTCAAGCTAT  
GCTCCAACGCGTGGGAGCTTCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGACTAGTGATTGTGCC  
AGCCGCCGCGGTAAGACAGAGGTGCAAGCGTTGTTCCGGAGTACTGGCGTAAGAGTCTGTAGG  
TGGTCTGTCAAGTCTTGGTGAAAGGCCGTGGCTTAACCATGGGAA TGCCAAAGAGACTGGCA  
GACTGGAGGCTGGAGAGGAAGCGGAATTTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGAA  
GGAAGGCCGGTGGCGAAGGCCGGCTTCTGGAACAGACCTGACACTGAGAGACGAAAGCGTG  
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAACGATGGGTTACTAAGTGTGG  
GAGGGTTAAACCTCCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGC  
AAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGTGCATGTGGTTTAATTC  
GACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGCCGCGAGTAGGAAACCGAGAGGGGAC  
CGACCGGTTCCAGTCCGGAAGCGGAACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAG  
GTGTTGGGTTCCAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTCTGTTGCCACCGGGTTCATGCCG  
GGCACTCTGAGGGGACTGCCAGCGACAAGTTGGAGGAAGGAGAGGATGACGTCAAGTCATCA  
TGCCCTTATGCCAGGGCCACACACGTGCAACAATGGCCGGTACAGACGAAAGCAAGACCG  
AGAGGTGGAGCAAATCCGAGAAAGCCGGGCCAGTTCCGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTC  
ATGAGGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTTCCCGGGCCTTG  
CACACACCGCCCGTC

**CLONA: KIE4, pU, pGEMT, CD, 22 DE JUNIO DEL 2005**

**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

### CCGCGGGATT

GTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACAGAGGTGGCAAGCGTTGTTCCGGAGTTACTGGGCGTAAAGA  
GTCTGTAGTGGTCTGTCAAGTCTTTGGTGAAAGGCCGTGGCTTAACCATGGGAATGCCAAAG  
AGACTGGCA GACTGGAGGCTGGGAGAGGGAAGCGGAATTTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGT  
AGATATCAGAAGGAAGGCCGGTGGCGAAGGCCGCTTCTGGAACAGACCTGACACTGAGAGA  
CGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAACGATGTGTA  
CTAAGTGTGGGAGGGTTAAACCTCCCGTGCCGCAGCCAACGCAGTAAGTACCCCGCCTGGGG  
AGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGTGCAT  
GTGGTTTAATTCG  
ACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGCCGCGAGTAGGAAACCGAAAGGGGACC  
GACCGGTTCCAGTCCGGAAGCGGAACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAG  
GTGTTGGGTTCCAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTCTGTTGCCACCGGGTTCATGCCG  
GGCACTCTGAGGGGACTGCCAGCGACAAGTTGGAGGAAGGAGAGGATGACGTCCAAGTCATC  
ATGGCCCTTATGCCAGGGCCACACACGTGCAACAATGGCCGGTACAGACGGAGCCAAGACC  
GAGAGGTGGAGCAATCCGAGAAAGCCGGTCTAGTTCCGATTGAGGTCTGCACTCGACCTCA  
TGAAGTCGGATTCCGCTAGTAATCGCCCATCACCATGGGGCGGTGA

**CLONA: KIE8, pU, pGEMT, CD, 22 DE JUNIO DEL 2005**

**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

### CCGCGGGATT

ACACTATAGATACTCAGCTATGCATCCACGCGTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGG  
CGGCCGCACTAGTGATTGTGCCAGCCGCCGCGGTAAGACAGAGGTGGCAGCGTTGTTCCGGA  
GTTACTGGGCGTAAAGAGTCTGTAGGTGGTCTGTCAAGTCTTTGGTGAAAGGCCGTGGCTTAA  
CCATGGGAATGCCAAAGAGACTGGCAGACTGGAGGCTGGAGAGGGAAGCGGAATTTCTGGTG

---

TAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGAAGGAAGGCCGGTGGCGAAGGCCGCTTCCTGGAACAG  
ACCTGACACTGAGAGACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG  
CCCTAAACGATGGGTAAGTGTGGGAGGGTTAAACCTCCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAG  
TACCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA  
CAAGCGGTGGTGCATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATG  
CCGCGAGTAGGAAACCGAGAGGGGACCGACCGGTTGAGTCCGGAAGCGGAACAGGTGCTGC  
ATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCCTGAGGTGTTGGGTTGAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTC  
GCCCTCTGTTGCCACCGGGTCATGCCGGGCACTCTGAGGGGACTGCCAGCGACAAGTTGGA  
GGAAGGAGAGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTATGCCAGGGCCACACACGTGCAACA  
ATGGCCGGTACAGACGAAAGCAAGACCGAGAGGTGGAGCAAATCCGAGAAAGCCGGGCCCA  
GTTCCGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAGGTGCGAATCGCTAGTAATCGCGTGCCAGC  
AGCCGCGGTAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACACCGCCCGTC

**CLONA: 6QINTMOFEAH3, pU, pGEMT-easy, CD, 18 DE OCTUBRE DEL 2005**

**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 225-228 + 229-234**

**GAATTCGATT**

GACGGGCGGTGTGTGCACACCGTTACCGCGGCGGCTGGCACACCTATGTATTACCGCAGCG  
GCTGGCACGCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGC  
ACAGGAAATAGCCATGTCGTTACCGCGGCGGCTGGCACACTGACGGGCGGTGTGTGCAGAC  
GGGCGGTGTGTACACACCTTACCGCGGCTG **AATCACTAGT**

**CLONA: 6QINTMOFEAH4, pU, pGEMT-easy, CD, 18 DE OCTUBRE DEL 2005**

**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 906-909 + 910-915**

**GAATTCGATT**

GTGCCAGCAGCCGCGTAACACCCGCAGCACAAGTGGTGGTCACTTTATTGAGCCTAAAGCGTT  
CGTAGCCGGTTTTGTAATCTTCAGGTAAATCCTGAAGCCTAACTTCAGAAGGCCTGAAGAGA  
CTGCAAACTTGAGATCGGGTGAGGTTAAACGTACTTTGAGGGTAGGGGTAAAATCCTGTAAT  
CCTGGAAGGACGACCGGTGGCGAAGGCGTTTAACTAGAACGAATCTGACGGTGAGGAACGAA  
GGCTAGGGTAGCAAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCCTAGCTGTAACACTGCCCACTTGA  
TGTTGCTTTTCCGTTGAGGGAAGGCAGTGTCCGAGCGAAGGTGTTAAGTGGGCCGCTTGGA  
AGTATGGTTCGCAAGACTGAAACTTAAAGGAAATTGCCGGGGAGCACCCGCAACGGGAGGAAATG  
TGCAGTTAATTGGATTCAACGCCGAAAACCTCACCGGGAACGACCTGTGGATGAGAGTCAAC  
CTGACGAGTTTACTCGATAGCAGGAGAGGTGGTGCATGGCCGTCGTCAGCTCGTACCGTAGG  
GCGTTCACTTAAGTGTGATAACGAGCGAGACCCACATCTCTAATTGCTAATGTATATGCGAATA  
TACATGCACTTTAGAGAGACCGCCATCGCTAAGATGGAGGAAGGAGCGGTGACGCGCAGGTC  
AGTATGCCCGAATTTCCCGGGCTACACGCGCACTACAAAGAACGGGACAATGCGTTGCAAC  
CTCGAAAGGGGAAGCTAATCGCGAAACCCGTCCATAGTTAGGATTGAGGGCTGTAACCTGCC  
CTCATGAATCTGGATTCCGTAGTAATCGCGGGTCAACAACCCGCGGTGAACATGCCCTGCTC  
CTTGACACACCGCCCGTC **AATCACTAGT**

**CLONA: 6QINTMOFEAH5, pU, pGEMT-easy, CD, 18 DE OCTUBRE DEL 2005**

**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 907-910 + 911-916**

**GAATTCGATT**

GTGCCAGCAGCCGCGGTAACACCCGCAGCACAAGTGGTGGTCACTTTATTGAGCCTAAAGCG  
TTCGTAGCCGGTTTTGTAATCTTCAGGTAAATCCTGAAGCCTAACTTCAGAAGGCCTGAAGAG  
ACTGCAAACTTGAGATCGGGTGAGGTTAAACGTACTTTGAGGGTAGGGGTAAAATCCTGTAA  
TCCGGAAGGACGACCGGTGGCGAAGGCGTTTAACTAGAACGAATCTGACGGTGAGGAACGA  
AGGCTAGGGTAGCAAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCCTAGCTGTAACACTGCCCACTTG  
ATGTTGCTTTTCCGTTGAGGGAAGGCAGTGTCCGAGCGAAGGTGTTAAGTGGGCCGCTTGGG

---

AAGTATGGTCGCAAGACTGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACCGCAACGGGAGGAAT  
GTGCGGTTTAAATTGGATTCAACGCCGGAAAACCTACCGGGAAACGACCTGTGGATGAGAGTCAA  
CCTGACGAGTTTACTCGATAGCAGGAGAGGTGGTGCATGGCCGTCGTCAGCTCGTACCGTAG  
GGCGTTCACTTAAGTGTGATAACGAGCGAGACCCACATCTCTAATTGCTAATGTATATGCGAAT  
ATACATGCACTTTAGAGAGACCGCCATCGCTAAGATGGAGGAAGGAGCGGTGACGGCAGGT  
CAGTATGCCCGAATTTCCCGGGCTACACGCGCACTACAAAGAACGGGACAATGCGTTGCAA  
CCTCGAAAGGGGAAGCTAATCGCGAAACCCGTCCATAGTTAGGATTGAGGGCTGTAACCTCGC  
CCTCATGAATCTGGATTCCGTAGTAATCGCGGGTCAACAACCCGCGGTGAACATGCCCTGCT  
CCTTGACACACCGCCCGTC **AATCACTAGT**

**CLONA: KIE 3, pU, pGEMT, CD, 18 DE OCTUBRE DEL 2005**  
**SITIO: *SacII*, CCGCGG + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 814-817 + 818-823**

**CCGCGGGATT**

TGGCTTAACCATGGGAATGCCAAAGAGACTGGCAGACTGGAGGCTGGGAGAGGGGAAGCGGA  
ATTTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGAAGGAAGGCCAGTGGCGAAGGCCGGCTT  
CCTGGAACAGACCTGACACTGAGAGACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG  
GTAGTCCACGCCCTAAACGATGGGTACTAAGTGTGGGAGGGTTAAACCTCCCGTGCCGCAGC  
CAACGCAGTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGAC  
GGGGGCCCGCACAAGCGGTGGTGCATGTGGTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCT  
GGGCTTGACATGCCCGGAGTAGGAAACCGAAAGGGGACCGACCGGTTCACTCCGGAAGCGG  
AACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGGTTCACTCCGCAACG  
AGCGCAACCCTCGCCCTCTGTTGCCACCGGGTCATGCCGGGCACTCTGAGGGGACTGCCAG  
CGACAAGTTGGAGGAAGGAGAGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTATGCCAGGGCCAC  
ACACGTGCAACAATGGCCGGTACAGACGGAAGCAAGACCGAGAGGTGGAGCAAATCCGAGAA  
AGCCGGTCCCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT  
CGCGTGCCAGCCGCGCGGTAAGCGCCAGCAGCCGACCGGTGTGTGCACACACCGCCCGTC  
**AATCACTAGT**

**CLONA: KIE6, pU, pGEMT, CD, 18 DE OCTUBRE DEL 2005**  
**SITIO: *SacII*, CCGCGG + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 907-910 + 911-916**

**CCGCGGGATT**

GTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACAGAGGTGGCAAGCGTTGTTCCGAGTTACTGGGCGTAAAGA  
GTCTGTAGGTGGTCTGTCAAGTCTTTGGTGAAAGGCCGTGGCTTAACCATGGGAATGCCAAAG  
AGACTGGCAGACTGGAGGCTGGGAGAGGGAAAGCGGAATTTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGT  
AGATATCAGAAGGAAGGCCGGTGGCGAAGGCCGGCTTCTGGAACAGACCTGACACTGAGAGA  
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTGTA  
CTAAGTGTGGGAGGGTTAAACCTCCCGTGCCGCAGCCAACGCAGTAAGTACCCCGCCTGGGG  
AGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGTGCAT  
GTGGTTTAATTCG  
ACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGCCGCGAGTAGGAAACCGAAAGGGGACC  
GACCGGTTCACTCCGGAAGCGGAACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAG  
GTGTTGGGTTCACTCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTCTGTTGCCACCGGGTCACTGCCG  
GGCACTCTGAGGGGACTGCCAGCGACAAGTTGGAGGAAGGAGAGGATGACGTCAAGTCATCA  
TGCCCTTATGCCAGGGCCACACACGTGCAACAATGGCCGGTACAGACGGAAGCAAGACCG  
AGAGGTGGAGCAATCCGAGAAAGCCGGTCTAGTTCCGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCA  
TGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCCATCAGCATGGGGCGGTGAATTCGTTCCCGGGCCTT  
GTACACACCGCCGTC **AATCACTAGT**

**CLONA: KIE9, pU, pGEMT, CD, 18 DE OCTUBRE DEL 2005**  
**SITIO: *SacII*, CCGCGG + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 904-907 + 908-913**

---

**CCGCGGGATT**

GTGCCAGCCGCCGCGGTAAGACAGAGGTGGCAAGCGTTGTTCCGAGTTACTGGGCGTAAAGA  
GTCTGTAGGTGGTCTGTCAAGCTTTTGGTGAAAGGCCGTGGCTTAACCATGGGAATGCCAAAG  
AGACTGGCAGACTGGAGGCTGGAGAGGGGAAGCGGAATTTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTA  
GATATCAGAAGGAAGGCCGGTGGCGAAGGCCGCTTCTGGAACAGACCTGACACTGAGAGAC  
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAACCGATGGGTAC  
TAAGTGTGGGAGGGTTAACCTCCCCTGCCAGCAGCCGCGGTAAGTACCCCGCCTGGGGAGT  
ACGGCCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGTGCATGTG  
GTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGCCCGGAGTAGGAAACCGA  
GAGGGGACCGACCGGTTCCAGTCCGGAAGCGGAACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG  
TGCCGTGAGGTGTTGGGTTCCAGTCCCAGCAGCGCAACCCTCGCCCTCTGTTGCCACCGG  
GTCATGCCGGGCACTCTGAGGGGACTGCCAGCGACAAGTTGGAGGAAGGAGAGGATGACGT  
CAAGTCATCATGGCCCTTATGCCAGGGCCACACACGTGCAACAATGGCCGGTACAGACGAA  
AGCAAGACCGAGAGGTGGAGCAAATCCGAGAAAGCCGGGCCAGTTCCGATTGAGGTCTGCA  
ACTCGACCTCATGAGTCCGAATCGTAGTAATCGCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTTT  
CCGGGCCTTGACACACCCGCCCGTC **AATCACTAGT**

**CLONA: 6R1236TMOFESH 1, pU, pGEMT-easy, CD, 14 DE NOVIEMBRE DEL 2005**  
**SITIO: EcoRI, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

**GAATTCGATT**

TGGCCGGTCCGCCTCTCCGCGTGCAATGGTCCGGCCGGGCCTTCCCTCTGTGGAACCCCAT  
ACCCTTCACTGGGCGTGGCGGGGAAACAGGACTTTACTTTGAAAAATTAGAGTGCTCCAGGC  
AGGCCTATGCTCGAATACATTAGCATGGAATAATAAAATAGGACGCGCGGTTCTATTTTGTGG  
TTTATAGGACCGCCGTAATGATTAATAGGGACAGTCGGGGGCATCAGTATTCAACTGTCAGAG  
GTGAAATTCTTGATCAGTTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTATT  
AATCAGGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAAC  
TATGCCGACTAGGGATCGGACGGTGTATTTCATGACCCGTTCCGGCACCTTACGAGGAATCAA  
GTGCTTGGGCTCCAGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAACTTAAAGAAATTGACGGAAGG  
GCACCACCAGGGGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCC  
AGACACAATAGGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTGCATGGC  
CGTTCTTAGTTGGTGGGGTACTTGTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGACCTTAACCTGCT  
AAATAGCACGCATTGCTCCGGCAGTGCCTGCTTCTTAGAGGGACTTTCCGGCTCAAGCCGAA  
GGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCGCGCGCTA  
CACTGACGGGGTCAAGGATTCCTTGGCCGAAAGCCCGGTAATCTTGTAGCCCCCGTCCG  
TGCTGGGGATAGACATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATCCCTAGTAAGCGCAAGTCA  
TCAGCTTGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGCACACACCCGCCCGTC

**CLONA: 6R1236TMOFESH 6, pU, pGEMT-easy, CD, 14 DE NOVIEMBRE DEL 2005**  
**SITIO: EcoRI, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

**GAATTCGATT**

GGCCGTCCGCTCTCCGCGTGATGGTCCGGCCGGGCTTTCCTCTGTGGACCCCATACCCTTC  
ACTGGGCGTGGCGGGAAACAGGACTTTACTTGAAAAATTAGAGTGCTCCAGGCAGGCCTATG  
CTCGAATACATTAGCATGGAATAATAAAATAGGACGCGCGGTTCTATTTTGTGGTTTATAGGA  
CCGCCGTAATGATTAATAGGGACAGTCGGGGGCATCAGTATTCAACTGTCAGAGGTGAAATTC  
TTGGATCAGTTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTATTAAATCAGGAA  
CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGAC  
TAGGGATCGGACGGTGTATTTCATGACCCGTTCCGGCACCTTACGAGGAATCAAAGTGCTTGGG  
CTCCAGGGGGGAGTATGGTCCGAAGGCTGAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCA  
GGGGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCCAGACACAAT  
AGGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAG  
TTGGTGGGGTACTTGTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATAGCAC  
GCATTGCTCCGGCAGTGCCTGCTTCTTAGAGGGACTTTCCGGCTCAAGCCGAAGGAAGTTT

---

GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCGCGCGCTACACTGACG  
GGGTCAGCGAGTTCCTTGGCCGAAAGGCCCGGTAATCTTGTAGCCCCGTCGTGCTGGGG  
ATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATCCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGC  
GTTGATTACGTCCCTGCCCTTGCACACACCGCCCGTC

**CLONA: 6K34TMOFESH 1, pU, pGEMT-easy, CD, 14 DE NOVIEMBRE DEL 2005**  
**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

**GAATTCGATT**

GACGGGCCGGTGTGTACAAAGGGCAGGGACGTAATCAACGCAAGCTGATGACTTGCCTTACT  
AGGGATTCCTCGTTGAAGAGCAATAATTGCAATGCTCTATCCCCAGCACGACGGGGGCTAACA  
AGATTACCCGGGCCCTTTCGGCCAAGGAAGTCTGACCCCGTCAGTGTAGCGCGCGCGCGGA  
CCAGAACATCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTCAAACCTCCTTCGGCTTGAGCCGAA  
AGTCCCTCTAAGAAGCCAGCGCACTGCCGGAGCAATGCGGGCTATTTAGCAGGTTAAGGTCT  
CGTTCGTTATCGCAATTAAGCAGACAAGTACCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACCACCA  
CCCACAAAATCAAGAAAGAGCTCTCAATCTGTCAATCCTTATTGTGTCTGGACCTGGTGAGTTT  
CCCCGTGT

TGAGTCAAATTAAGCCGCAGGCTCCACCCCTGGTGGTGCCCTTCCGTCAATTTCTTTAAGTTTC  
AGCCTTGCAGCATACTCCCCTGGAGCCCAAGCACTTTGATTTCTCGTAAGGTGCCGAACGG  
GTCATGAATAACACCGTCCGATCCCTAGTCGGCAGATTTTATGGTTAAGACTACGACGGTATCT  
GATCGTCTTCGATCCCCTAACTTTTCGTTCTGATTAATGAAAACATCCTTGCCAAATGCTTTTCG  
CAGTAGTTAGTCTTCAACTGATCCAAGAATTTACCTCTGACAGTTGAATACTGATCCCCCGA  
CTGTCCCTATTAATCATTACGGCGGTCTATAAACCAACAAAATAGAACCGCGCGTCTATTTT  
ATTATTCCATGCTAATGTATTTCGAGCATAGGCCTGCCTGGAGCACTCTAATTTTTCAAAGTAATG  
TCCTGTTTCCCGCCACGCCAGTGAAGGGTATGGGGTTCCACAGAAGGAAAGGCCCGGCCGG  
ACCAGTGCACGCGGTGAGGCGG

**CLONA: 6K34TMOFESH 4, pU, pGEMT-easy, CD, 14 DE NOVIEMBRE DEL 2005**  
**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

**GAATTCGATT**

GTGCCAGCCCGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGTGGTTAAAAAG  
CTCGTAGTTGAACCTTGGGCCTGGCTGGCCGGTCCGCCTCACCGCGTGCCTGGTCCGGCC  
GGCCCTTCCCTCTGTGGAACCCCATACCCTTCACTGGCGTGGCGGGGAAACAGGACATTT  
ACTTTGAAAAAATTAGAGTGTCCAGGCAGGCCTATGCTCGAATACATTAGCATGGAATAATAA  
AATAGGACGCGCGTCTATTTTGTGGTTTATAGGACCGCCGTAATGATTAATAGGGACAGTC  
GGGGGCATCAGTATTCAACTGTGAGAGGTGAAATTTCTGGATCAGTTGAAGACTAACTACTGC  
GAAGGCATTTGCCAAGGATGTTTTATTAATCAGGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATC  
AGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGACGGTGTATTTCATGAC  
CCGTTCCGCACCTTACGAG

AAATCAAAGTGCTTGGGCTCCAGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGAC  
GGAAGGGCACCACCAGGGGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACC  
AGGTCCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTTGTGGGTGGTGGTGC  
ATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGGTGAAGTGTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGACCTTAA  
CCTGCTAAATAGCCCGCATTGCTCCGGCAGTGCCTGGCTTCTTAGAGGACTTTCCGGCTCAAG  
CCGAAGGAAGTTTGAAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCGCACGCGC  
GCTACACTGACGGGTGAGCGAGTTCCTTGGCCGAAAGGCCCGG

**CLONA: 6K34TMOFESH 5, pU, pGEMT-easy, CD, 14 DE NOVIEMBRE DEL 2005**  
**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

**GAATTCGATT**

GACGGGCCGGTGTGTGCAGACGGGCTGTGTGTGCAAAGGGCAGGGACGTAATCAACGCAAGC  
TGATGACTTGCCTTACTAGGGATTCCTCGTTGAAGAGCAATAATTGCAATGCTCTATCCCCAG  
CACGACGGGGGCTAACAAGATTACCCGGGCCTTTCGGCCAAGGAAGTCTGACCCCGTCAG

---

TGTAGCGCGCGTGCGGCCAGAACATCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTCAAACCTTC  
CTTCGGCTTGAGCCGAAAGTCCCTCTAAGAAGCCAGCGCACTGCCGGAGCAATGAGGGCTAT  
TTAGCAGGTTAAGGTCTCGTTTCGTTATCGCAATTAAGCAGACAAGTCACCCCA CCAACTAAGAA  
CGGCCATGCACCACCACCACAAAATCAAGAAAAGAGCTCTCAATCTGTCAATCCTTATTGTGTC  
TGGACCTGGTGAGTTTCCCCGTGTTGAGTCAAATTAAGCCGCAGGCTCCACCCCTGGTGGTG  
CCCTTCCGTCAATTTCTTTAAGT  
TTCAGCCTTGCGACCATACTCCCCCTGGAGCCCAAGCACTTTGATTTCTCGTAAGGTGCCGAA  
CGGGTCATGAATAACACCGTCCGATCCCTAGTCGGCATAGTTTATGGTTAAGACTACGACGGT  
ATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACTTTTCGTTCTGATTAATGAAAACATCCTTGGCAAATGCTT  
TCGCAGTAGTTAGTCTTCAACTGATCCAAGAATTTACCTCTGACAGTTGAATACTGATGCCCC  
CGACTGTCCCTATAAATCATTACGGCGGTCCTATAACCAACAAAACAGAACCAGCGCGTCTATT  
TTATTATTCCATGCTAATGTATTGAGCATAGGCCTGCCTGGAGCACTCTAATTTTTCAAAGTAA  
ATGTCCTGTTTCCCGCCACGCCAGTGAAGGTATGGGGTTCCACAGAAGGGAAAGGCCCG

**CLONA: 6K34TMOFESH 6, pU, pGEMT-easy, CD, 14 DE NOVIEMBRE DEL 2005**  
**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

**GAATTCGATT**

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGTGGTTAAGAAG  
CTCGTAGTTGAACCTTGGGCCTGGCTGGCCGGTCCGCCTCACCGCGTGCCTGGTCCGGCC  
GGGCCTTCCCTCTGTGGAACCCCATACCCTTCACTGGGCGTGGCGGGGAAACAGGACATTT  
ACTTTGAAAAAATTAGAGTGCTCCAGGCAGGCCTATGCTCGAATACATTAGCATGGAATAATAA  
AATAGGACGCGCGGTTCTATTTTGTGGTTTATA GGACCGCCGTAATGATTAATAGGGACAGTC  
GGGGGCATCAGTATTCAACTGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATCAGTTGAAGACTAACTACTGC  
GAAAGCATTGCCAAGGATGTTTTCTTAATCAGGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATC  
AGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGACGGTGTATTTCATGAC  
CCGTTCCGGCACCTTACGAG  
AAATCAAAGTGCTTG GGCTCCAGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGAC  
GGAAGGGCACCACCAGGGGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACC  
AGGTCCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGAGAGATCTTTCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTG  
CATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGGTGACTTGTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGACCTTA  
ACCTGCTAAATGGCCCGCATTGCTCCGGCAGTGCGCTGGCTTCTTAGAGGACTTTCCGGCTCAA  
GCCGAAGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGC  
GCGCTACACTGACGGGTCAGCGAGTTCTTGGCCGAAAGGCCCGGGTATCTTGTAGCCCCG  
TCGTGCTGGG

**CLONA: QIE2, pU, pU, pGEMT-easy, CD, 14 DE NOVIEMBRE DEL 2005**  
**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 281-284 + 285-290**

**GAATTCGATT**

GTGCCAGCCGCGCGGTAAGAAGCCAAACCACCAGACAGAGAACATATCTATACAAAAGAACA  
TATCCTCCTCACTGATGATATCAAGACAACCCTAGCCAACCAAAAAGGCTGTAAAATCCCAGAA  
GTCCAGTACCTCCTCCCTCCTCAAATGGCCACACCAGCCTGTCCTGCCGGCACAAGACC  
AATTTATCTCTTAAGCGCTTATATAGATCCATAGAACACTCAAACAGCAGCAGAAAATACCTCCT  
GCACACACCGCCGTC **AATCACTAGT**

**CLONA: QIE3, pU, pU, pGEMT-easy, CD, 14 DE NOVIEMBRE DEL 2005**  
**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 103-106 + 107-112**

**GAATTCGATT**

GACGGGCGGTGTGTGCATTACCGCGGCGGCTGGCACACCTACGTATTGCCGCGGCGGCTGG  
CACACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC **AATCACTAGT**

---

**CLONA: QIE5, pU, pU, pGEMT-easy, CD, 14 DE NOVIEMBRE DEL 2005**  
**SITIO: EcoRI, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: SpeI, AATC + ACTAGT, POSICION: 103-106 + 107-112**

**GAATTCGATT**

GACGGGCGGTGTGTGCATTACCGCGGCGGCTGGCACACCTACGTATTGCCGCGGCGGCTGG  
CACACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC **AATCACTAGT**

**CLONA: 6QINTMOSAH 3, pU, pU, pGEMT-easy, CD, 14 DE NOVIEMBRE DEL 2005**  
**SITIO: EcoRI, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: SpeI, AATC + ACTAGT, POSICION: 116-119 + 120-125**

**GAATTCGATT**

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGTGTGCCA  
GCCGCGCGGTAAGATAGGCTTGTACACACCGCCCGTCACACC **AATCACTAGT**

**CLONA: 6QINTMOSAH 1, pU, pGEMT-easy, CD, 14 DE NOVIEMBRE DEL 2005**  
**SITIO FINAL: SpeI, AATC + ACTAGT, POSICION: 339-342 + 343-348**  
**NOTA: La secuencia perdió el sitio inicial de clonación.**

GGCGGCGGCTGGTACATCTACGTATTACCGCGGCGGCTGGCACACCGACGGGCGGTGTGTG  
CACTCCTCATTGGGGTCTTTTTCAAATGGGCAGTGGTACAGTCCGTTCGGCGTGTGGCTTCA  
TCCTTGTAGAGGGGGTGGTTGCGGGCATCAGTCTCGTTGGACTGGCGGCGAGCAGGCAGCA  
CGCCGTTTAGGATGGCCTCGTCTTTTTGGGATCCAGGCAGAATGTTGAAGTCGTCAGGTCCAA  
GGGGCTTCCGGTCCAAGCTGTCCCGAGATCGTCACGTTAGTTTTGAGTGGGCGGGCAGAAAGC  
AATCACGACTTACCGCGGCGGCTGGCAC **AATCACTAGT**

**CLONA: 6K12TMOFESA 4, pU, pGEMT-easy, CD, 17 DE NOVIEMBRE DEL 2005**  
**SITIO: EcoRI, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: SpeI, AATC + ACTAGT, POSICION: 193-196 + 197-202**

**GAATTCGATT**

GACGGGCGGTGTGTACAGGAGGTTTACCGCGGCTGCTGGCACACCTACGTATTACCGCGGCG  
GCTGGCACACCTATGTATTACCGCGGCGGCTGGCACACCTATGTATTACCGCAGCTGCTGGC  
ACACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACACCTATGTATTACCGCGGCGGCTGGCAC  
**AATCACTAGT**

**CLONA: 6K12TMOFESH 4, pU, pGEMT-easy, CD, 17 DE NOVIEMBRE DEL 2005**  
**SITIO: EcoRI, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: SpeI, AATC + ACTAGT, POSICION: 112-115 + 116-121**

**GAATTCGATT**

GACGGGCGGTGTGTACACCGGCGGTTACCGCGGCGGCTGGCACGCCTACGTATTACCGC  
GGCTGCTGGCACTCCTATGTATTACCGCGGCGGCTGGCAC **AATCACTAGT**

**CLONA: 6K12TMOFESH 5, pU, pGEMT-easy, CD, 17 DE NOVIEMBRE DEL 2005**  
**SITIO: EcoRI, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: SpeI, AATC + ACTAGT, POSICION: 146-149 + 150-155**

**GAATTCGATT**

GACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTACCGCGGCGGCTGGCACACCTATGTATT  
ACCGCAGCGGCTGGCACGCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACACCTATGTATTACCGC  
GCTGCTGGCAC **AATCACTAGT**

---

**CLONA: 6R1236TMOFESH3, pU, pGEMT-easy, CD, 23 DE NOVIEMBRE DEL 2005**  
**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

**GAATTCGATT**

GACGGGCGGTGTGTGCAAAGGGCAGGGACGTAATCAACGCAAGCTGATGACTTGCGCTTACT  
AGGGATTCTCGTTGAAGAGCAATAATTGCAATGCTCTATCCCCAGCACGACGGGGGCTAACA  
AGATTACCCGGGCTTTTCGGCCAAGGAAGCTGCTGACCCCGTCAGTGTAGCGCGCGCGCGG  
CCCAGAACATCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTCAAACCTCCTTCGGCTTGAGCCGA  
AAGTCCCTCTAAGAAGCCAGCGCACTGCCGGAGCAATGCGTGCTATTTAGCAGGTTAAGGTCT  
CGTTCGTTATCGCAATTAAGCAGACAAGTCACCCCACTAAGAACGGCCATGCACCACCA  
CCCACAAAATCAAGAAAGAGCTCTCAATCTGTCAATCCCTATTGTGTCTGGACCTGGTGAGTTT  
CCCCGTGTGAGTCAAATTAAGCCGAGGCTCCACCCCTGGTGGTGCCCTTCGGTCAATTTCT  
TTAAGTTTCAGCCTTGCGACCAT  
ACTCCCCCTGGAGCCCAAGCACTTTGATTCCCTCGTAAGGTGCCGAACGGGTCATGAATAACA  
CCGTCCGATCCCTAGTCGGCAGTATTTTATGGTTAAGACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGA  
TCCCCTAACTTTTCGTTCTGATTAATGAAAACATCCTTGCCAAATGCTTTTCGCAGTAGTTAGTCT  
TCAACTGATCCAAGAATTTACCTCTGACAGTTGAATACTGATGCCCCGACTGTCCCTATTAA  
TCATTACGGCGGTCTATAAACCAACAAATAGGACCGCGCGTCTATTTATTATTCATGCTAA  
TGTATTACGGCATAGGCCTGCCTGGAGCACTCTATTTTTTCAAAGTAAAGTCTGTTTCCCCG  
CCACGCCAGTGAAGGGTATGGGTTCCACAAAGGTATAGGCCCGGCCGACCATGTC

**CLONA: R1236TMOFeSA1, pU, pGEMT-easy, CD, 12 DE ENERO DEL 2006**  
**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**NOTA: secuencia corta.**

**GAATTCGATT**

GTGCCAGCCGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGTGGTTAAAAAG  
CTCGTAGTTGAACCTTGGGCCTGGCTGGCCGGTCCGCCTCACCAGTGCCTGGTCCGGCC  
GGGCCTTTCCCTCTGTGGAACCCCATACCCTTCACTGGGCGTGCCGGGAAACAGGACATTT  
ACTTTGAAAAAATTAGAGTGCTCCAGGCAGGCCTATGCTCGAATACATTAGCATGGAATAATAA  
AATAGGACGCGCGGTTCTATTTTGTGGTTTATAGGACCGCCGTAATGATTAATAGGGACAGTC  
GGGGGCATCAGTATTTCAACTGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATCAGTTGAAGACTAACT  
ACTGCGGAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTATTAATCAGGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGA  
CGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGACGGTGTATT  
CATGACCCGTTCCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTGCTTGGGCTCCAGGGGGAGTATGGTCG  
CAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGGGTGGAGCCTGCGGCTTAA  
TTTGACTC

**CLONA: R1236TMOFeSA3, pU, pGEMT-easy, CD, 12 DE ENERO DEL 2006**  
**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**NOTA: secuencia corta y poco seguro.**

**GAATTCGATT**

GTGCCAGCCGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGTGGTTAAAAAG  
CTCGTAGTTGAACCTTGGGCCTGGCTGGCCGGTCCGCCTCACCAGTGCCTGGTCCGGCC  
GGGCCTTTCCCTCTGTGGAACCCCATACCCTTCACTGGGCGTGCCGGGAAACAGGACATTT  
ACTTTGAAAAAATTAGAGTGCTCCAGGCAGGCCTATGCTCGAATACATTAGCATGGAATAATAA  
AATAGGACGCGCGGTTCTATTTTGTGGTTTATAGGACCGCCGTAGTGATTAATAGGGACAGT  
CGGGGGCATAAGTATTCAACTGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATCAGTTGAAGACTAACTACTG  
CGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTATTAATCAGGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGAT  
CAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGACGGTGTATTTCATGA  
CCGTTCCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTGCTTGGGCTCCAGGGGGAGTATGGTCCGAAGG  
CTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGGGTGGAGCCTGCGGCTTTAATTTGA  
CTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGAG

---

**CLONA: R1236TMOFeSA4, pU, pGEMT-easy, CD, 12 DE ENERO DEL 2006**  
**SITIO: EcoRI, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**NOTA: secuencia corta y poco segura.**

**GAATTCGATT**

GACGGGCGGTGTGTACAAAGGGCAGGGACGTAATCAACGCAAGCTGATGACTTGGCCTTACC  
AGGGATTCTCGTTGAAGAGCAATAATTGCAATGCTCTATCCCAGCACGACGGGGGCTAACA  
AGATTACCCGGGCCTTTCGGCCAAGGAAGCTCGCTGACCCCGTCAGTGTAGCGCGCGTGC  
CCAGAACATCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTCAAACCTCCTTCGGCTTGAGCCGAA  
AGTCCCTCTAAGAAGCCAGCGCACTGCCGGAGCAATGCCGGCTATTTAGCAGGTTAAGGTCT  
CGTTCGTTATCGCAATTAAGCAGACAAGTCACCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACCACCA  
CCCACAAAATCAAGAGAGCGCTCTCAATCTGTCAATCCTTATTGTGTCTGGACCTGGTGAGTTT  
CCCCGTGTTGAGTCAAATTAAGCCGAGGCTCCACCCCTGGTGGTGCCCTTCCGTCAATTTCT  
TTAAGTTTCAGCCTTGGCACCATACTCCCCCTGGAGCCCAAGCACTTTGATTTCTCGTAAGGTG  
CCGAACGGGTCATGAATAACACCGTCCGATCCCTAGTCGGCATAAGTTTATGGTTAAGACTACG  
ACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACTTTTCGTTCTGATTAATGAAAACATCCTTGCCAA  
ATGCTTTCGCAGTAGTTAGTCTTCAACTGATCCAAGAATTTACCTCTGACAGTTGAATACTGAT  
GCCCCGACTGTCCCTATTAATCATTACGGCGGTCCTATAAACCAACAAAATAGAACC

**CLONA: R1236TMOFeSA8, pU, pGEMT-easy, CD, 12 DE ENERO DEL 2006**  
**SITIO: EcoRI, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**NOTA: secuencia corta y poco segura.**

**GAATTCGATT**

GTGCCAGCCGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGTGGTTAAAAAG  
CTCGTAGTTGAACCTTGGGCTGGCTGGCCGGTCCGCCTCACCGCGTGCCTGGTCCGGCC  
GGCCTTTCCCTCTGTGGAACCCATA CCCTTCACTGGGCGTGGCGGGGAAACAGGACATTT  
ACTTTGAAAAAATTAGAGTGCTCCAGGCAGGCCTATGCTCGAATACATTAGCATGGAATAATA  
AATAGGACGCGCGGTTCTATTTTGTGGTTTATAGGACCGCCGTAGTGATTAATAGGGACAGT  
CGGGGGCATAAGTATTCAACTGTCAGAGGTGAAATCCTTGGATCAGTTGAAGACTAACTACTG  
CGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCAATTAATCAGGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGAT  
CAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGACGGTGTATTTCATGA  
CCCGTTCCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTGCTTGGGCTCCAGGGGGAGTATGGTTCGCAAGG  
CTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGGGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGAC  
TCAACACGGGGAAACTCACAGGTCCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCT  
TGATTTTGTGGGTGGTGG

**CLONA: KIE2, pU-pR, pGEMT, CD, 22 DE FEBRERO DEL 2006**  
**SITIO: SacII, CCGCGG + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: SpeI, AATC + ACTAGT, POSICION: 904-907 + 908-913**

**CCGCGGGATT**

GACGGGCGGTGTGTGCAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGCGATTACTA  
GCGATTCCGACCTCATGAGGTGAGTTGCAGACCTCAATCCGAAGTGGGCCCGGCTTTCTCG  
GATTTGCTCCACCTCTCGGTCTTGTCTTTCGCTGTACCGGCCATTGTTGCACGTGTGTGGCCC  
TGGGCATAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCTCTCCTTCCCTCCAACCTGTCGCTGGCAGT  
CCCCTCAGAGTGCCCGGCATGACCCGGTGGCAACAGAGGGCGAGGGTTGCGCTCGTTGCGG  
GACTGAACCCAACACCTCACGGCACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTTCCGCTTCC  
GGACTGAACCGGTCCGCTCCCTCTCGGTTTCTACTCGCGGCATGTCAAGCCCAGGTAAGGT  
TCTTCGCGTTGCGTCAATTA  
AACCACATGCACCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGGCGCC  
GTACTCCCAGGGCGGGTACTTA CCGCGGCTGCTGGCACGGGAGGTTTAAACCTCCCACACT  
TAGTACCCATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTC  
GTCTCTCAGTGTGAGGTCTGTTCCAGGAAGCCGCTTCCGCCACCGGCTTCCCTTCTGATATCT  
ACGATTTACCGCTACACCAGAAATTCGCTTCCCTCTCCAGCCTCCAGTCTGCCAGTCTCTT

---

TGGCATTCCCATGGTTAAGCCACGGCCTTTCACCAAAGACTTGACAGACCACCTACAGACTCT  
TTACGCCAGTAACCTCCGAACAACGCTTGCCACCTCTGTCTTACCGCGGGCGGCTGGCAC  
AATCACTAGT

**CLONA: KIE2, pU, pGEMT, CD, 22 DE FEBRERO DEL 2006**  
**SITIO: *SacII*, CCGCGG + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

**CCGCGGGATT**

GACGGGCGGTGTGTGCAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGCGATTACTA  
GCGATTCCGACCTCATGAGGTGCGAGTTGCAGACCTCAATCCGAAGTGGGCCCGGCTTTCTCG  
GATTTGCTCCACCTCTCGGTCTTGCTTTTCGTCTGTACCGGCCATTGTTGCACGTGTGTGGCCC  
TGGGCATAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCTCTCCTTCCCTCCAATTGTGCTGCTGGCAGT  
CCCCTCAGAGTGCCCGGCATGACCCGGTGGCAACAGAGGGGCGAGGGTTGCGCTCGTTGCGG  
GACTGAACCCAACACCTCACGGCACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTTCCGCTTCC  
GACTG  
AACCGGTCGGTCCCCTCTCGTTTTCTACTCGCGGCATGTCAAGCCCAGGTAAGGTTCTTCGC  
GTTGCGTCAATTAACCACATGCACCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTT  
TCAACCTTGCGGCCGTAACCTCCAGGGCGGGTACTTACCGCGGCTGCTGGCACGGGAGGTTT  
AACCTCCACACTTAGTACCCATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTG  
CTCCCCACGCTTTTCGTCTCTCAGTGTGAGGTCTGTTCCAGGAAGCCGCCTTCGCCACCGGCCT  
TCCTTCTGATATCTACGCATTTACCGCTACACCAGAAATTCCGCTTCCCTCTCCAGCCTCCAG  
TCTGCCAGTCTCTTTGGCATTCCCATGGTTAAGCCACGGCCTTTCACCAAAGACTTGACAGAC  
C

**CLONA: KIE2, pR, pGEMT-easy, CD, 22 DE FEBRERO DEL 2006**  
**SITIO: *SpeI*, ACTAGT + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

**ACTAGTGATT**

GTGCCAGCCCGCCGCGTAAGACAGAGGTGGCAAGCGTTGTTCCGAGTTACTGGGCGTAAAGA  
GTCTGTAGGTGGTCTGTCAAGTCTTTGGTGAAAGGCCGTGGCTTAACCATGGGAATGCCAAAG  
AGACTGGCAGACTGGAGGCTGGAGAGGGGAAGCGGAATTTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTA  
GATATCAGAAGGAAGGCCGGTGGCGAAGGCGGCTTCCCTGGAACAGACCTGACACTGAGAGAC  
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAACCGATGGGTAC  
TAAGTGTGGGAGGGTTAAACCTCCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGTACCCCGCCTGGGGAG  
TACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGTCATGT  
GGTTTAATTCGACGCAACGCAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGCCGCGAGTAGGAAACC  
GAGAGGGGACCGACCGTTTCAGTCCGGAAGCGGAACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCT  
CGTGCCGTGAGGTGTTGGTTTCAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTCTGTTGCCACC  
GGTTCATGCCGGGCACTCTGAGGGGACTGCCAGCGACAAGTTGGAGGAAGGAGAGGATGAC  
GTCAAGTCATCATGGCCCTTATGCCAGGGCCACACACGTGCAACAATGGCCGGTACAGACG  
AAAGCAAGACCGAGAGGTGGAGCAAATCCGAGAAAGCCGGGCCAGTTCCGATTGAGGTCTG  
CAACTCGACCTC

**CLONA: KIE 2, pU, pGEMT, CD, 27 DE ENERO DEL 2006**  
**SITIO: *SacII*, CCGCGG + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 901-904 + 905-910**

**CCGCGGGATT**

GACGGGCGGTGTGTGCAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGCGATTACTA  
GCGATTCCGACCTCATGAGGTGCGAGTTGCAGACCTCAATCCGAAGTGGGCCCGGCTTTCTCG  
GATTTGCTCCACCTCTCGGTCTTGCTTTTCGTCTGTACCGGCCATTGTTGCACGTGTGTGGCCC  
TGGGCATAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCTCTCCTTCCCTCCAATTGTGCTGCTGGCAGT  
CCCCTCAGAGTGCCCGGCATGACCCGGTGGCAACAGAGGGGCGAGGGTTGCGCTCGTTGCGG  
GACTGAACCCAACACCTCACGGCACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTTCCGCTTCC  
GGACTGAACCGGTCCGCTCCCCTCTCGTTTTCTACTCGCGGCATGTCAAGCCCAGGTAAGGT

---

TCTTCGCGTTGCGTCAATTA  
AACCACATGCACCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGCC  
GTACTCCCAGGGCGGGTACTTACCGCGGCTGCTGGCACGGGAGGTTTAAACCCTCCACACT  
TAGTACCCATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTC  
GTCTCTCAGTGTCAGGTCTGTTCCAGGAAGCCGCCTTCGCCACCGGCCCTTCCTTCTGATATCT  
ACGCATTTACCGCTACACCAGAAATTCCGCTTCTCTCCAGCCTCCAGTCTGCCAGTCTCTTT  
GGCATTCCCATGGTTAAGCCACGGCCTTTCACCAAAGACTTGACAGACCACCTACAGACTCTT  
TACGCCAGTAACTCCGAACAACGCTTGCCACCTCTGTCTTACGCGGCGGCTGGCAC

**AATCACTAGT**

**CLONA: QINTMOFeAH5, pR, pGEMT-easy, CD, 27 DE ENERO DEL 2006**  
**SITIO: *SpeI*, ACTAGT + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**NOTA: secuencia corta y poco segura.**

**ACTAGTGATT**

GTGCCAGCAGCCGCGGTAACACCCGCATCACAAGTGGAGGGCACTTTATTGAGCCTAAAGMA  
TKSATAGCCGGWTTTGTAWRTCTT

**CLONA: 6QINTMOFEAH5, pU-pR, pGEMT-easy, CD, 31 DE ENERO DEL 2006**  
**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 907-910 + 911-916**

**GAATTCGATT**

GACGGGCGGTGTGTGCAAGGAGCAGGGGCATGTTACCGCGGGTGTGACCCGCGGATTACT  
ACGGAATCCAGATTCATGAGGGCGAGTTACAGCCCTCAATCCTAACTATGGACGGGTTTCGCG  
ATTAGCTTCCCCTTTCGAGGTTGCAACGCATTGTCCCGTTCCTTTGTAGTGCGCGTGTAGCCCG  
GGAAATTCGGGGCATACTGACCTGCCGTGCACCGCTCCTTCTCCATCTTAGCGATGGCGGT  
CTCTCTAAAGTGCATGTATATTCCGCATATACATTAGCAATTAGAGATGTGGGTCTCGCTCGTTAT  
CACACTTAAGTGAACGCCCTACGGTACGAGCTGACGACGGCCATGCACCACCTCTCCTGCTAT  
CGAGTAACTCGTCAGGTTGACTCTCATCCACAGGTCGTTCCCGGTGAGTTTTCCGGCGTTGA  
ATCCAATTA  
CCGCACATTCCTCCCGTTGCGGTGCTCCCCCGCCAATTCCTTTAAGTTTCAGTCTTGCGACCA  
TACTTCCCAAGCGGCCACTTAACACCTTCGCTCCGACACTGCCTTCCCTCAACGGAAAAGCA  
ACATCAAGTGGGCAGTGTTCACAGCTAGGACTACCCGGGTATCTAATCCGGTTTGTACCCTA  
GCCTTCGTTCCCTCACCGTCAGATTCGTTCTAGTTAAACGCCTTCGCCACCGGTTCCTTCCA  
GGATTACAGGATTTTACCCTACCCTGAAAGTACGTTTAAACCTCACCCGATCTCAAGTTTTGCA  
GTCTCTTACAGGCTTCTGAAGTTAGGCTTCAGGATTTACCTGAAGATTTACAAAACCGGCTACG  
AACGCTTTAGGCTCAATAAAGTGACCACCATTGTGCTGCGGGTGTACCGCGGCTGCTGGCA  
C **AATCACTAGT**

**CLONA: KIE Acido1, pU, pGEMT-easy, CD, 24 DE MARZO DEL 2006**  
**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 744-747 + 748-753**

**GAATTCGATT**

ACAGTCAGGCGTGAAATTCCTGATTAGGGACTCATTTTTAAAAGGCTGGTTTTTATGAGCCTGG  
CATCACCAGCATTCCCTCCAAGGATAGCCTCTGCTCGCCTTCAATATTTTATAGCAAGTGCCCT  
GGGTGAGGGGGTGGAAATGCCAGTGTCTGGCCATAAACGTCTCACATATAAAGAGTTACACG  
CTCCATTTCAACCGCGGCAGAGGGGAATCCAGGTGCAAGAGGACACTCCAGCTTTTGGCTC  
AAGCAGAAAATTATGATTGAAAGAAGAAGCTGCGATGTTTAAATTCACCCGCAATCTGGAAGAT  
GTTTTGTCCAGGAECTCAGACATGAGGTGTTGGGAGAAAGGAGAGAAAGTGACACTAAGAATC  
CTTCTTGCCTTCACTTGGGCTCATGATCGCTCCCAACCCTGCCAGTCGCCCCACCAGCAC  
GAGGCAAATGACTGTCTTACGCTCCGAACATTAATTAAGACATCAGCATTGCATTAGTCTGC  
AATGGACCATCAACGATCAAGAAAAAATACAAAGGAGAAATGAAATAGCTCATCCGAAAAGTC  
CTACTGTCATCGTGTATTTTTGCTTTGCTAAGCCCAAGATATAATTTACTCACTGCTCTCTT

---

GCAAACAAAAGGGCCGTGATAGCCTGGCAACGTTGAAGAGCCCCTCTCAAATCCCCAAGGA  
AATTACAACCTGGGCAGGAATTTACGCCTGACTGT **AATCACTAGT**

**CLONA: KIE Acido2, pU, pGEMT-easy, CD, 24 DE MARZO DEL 2006**  
**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 670-673 + 674-679**

**GAATTCGATT**

ACAGTCAGGCGCGAAATTCCTGCTCAAGCAACAGAACGTCGCTCGGATTGACGTCGTCATTA  
CATTGCGCATGGCATCTCGAAAGTCCC GGGTAATGGCGGCAATGCCGAAAGCGATTCTGAGA  
TGCAGGATGAGGACGCCGGTGAGTCCTCTGCTGCTGGTAATCCGCTTGATGCATACGCCAGC  
AATCTTAACGAGCTAGCACGTCAGGGTCGGATCGATCCATTGTTGGTCCGCGAGCATGAGGTC  
GAGCGGGTGGCGCAGATTCTTGCCCGTCGGCGCAAGGACAACCCGTTGCTCGTTGGGGAGG  
CAGGGGTTGGCAAGACTGCAATTGCTGAAGGCCTTGCCAAGCGGATCGTAGATAACCAAGTG  
CCCGAACTGCTTGCCAATAGCNTGGTCTACTCGCTGGATCTTGCGCTTTGCTGGCTGGCACG  
AAGTATCGTGTTGATTTTCGAGAAGCGATTCAAAGCGCTCTTGAATGAGCTGCGTAAGCGGCC  
CAGGCGGTTCTCTTCATCGACGAAATTCATACCATTATCGGGCGGGTGTGCGTCTGGTGG  
GGTTATGGATGCTTCCAATCTGCTCAAGCCGCTTCTTNGTCCGGTGAGATCCGGTGCATTGG  
TTCTACAACCTTTCAGGAATTTACGCCTGACTGT **AATCACTAGT**

**CLONA: KIE Acido3, pU, pGEMT-easy, CD, 24 DE MARZO DEL 2006**  
**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 745-748 + 749-754**

**GAATTCGATT**

ACAGTCAGGCGTGAAATTCCTGATTAGGGACTCATTTTTAAAAGGCTGGTTTTTATGAGCCTGG  
CATCACCAGCATTCCCTCCAAGGATAGCCTCTGCTCGCCTTCAATATTTTATAGCAAGTGCCCT  
GGGTGAGGGGGTTGGAATGCCAGTGTCTGGCCATAAACGTCACATATAAAGAGTTACACG  
CTCCCATTTCAACCGCGGCAGAGGGGAATCCAGGTGCAAGAGGACACTCCAGCTTTTGGCTC  
AAGCAGAAAATTATGATTGAAAGAAGAAGCTGCGATGTTTAAATTCACCCGCAATCTGGAAGAT  
GTTTTGTCCAGGAACTCAGACATGAGGTGTTGGGAGAAAGGAGAGAAAGTGACACTAAGAATC  
CTTCTTGCCCTTCACTTGGGCCTCATGATCGTCCCAACCCTGCCAGTCGCCCCACCAGCAC  
GAGGCAAATGACTGTCTTCCAGCTCCGAACATTAATATTAAGACATCAGCATTGCATTAGTCTGC  
AATGGACCATCAACGATCAAGAAAAAATACAAAGGAGAAATGAAATAGCTCATCCGAAAAGTC  
CTACTGTATCGTGTATTTTTTTGCTTTGCTAAGCCCAAGATATAATTTACTCACTGCTCTCTT  
GCAAACAAAAGGGCCGTGATAGCCTGGCAACGTTGAAGAGCCCCTCTCAAATCCCCAAGGA  
AATTACAACCGGGGCAGGAATTTACGCCTGACTGT **AATCACTAGT**

**CLONA: KIE Acido5, pU, pGEMT-easy, CD, 24 DE MARZO DEL 2006**  
**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 847-850 + 851-856**

**GAATTCGATT**

ACAGTCAGGCGTGAAATTCCTGCCCTGAATTCTGAAGGCTGCCTACAGTATTTGTTGGGTTG  
CTTCTGGTTCCAAGTGCCAGAAAAATCCACATAACTCAAAGTAAAGTCCCAAGGGAGTTGA  
ATGGCTGACAGAGCTGCAAAGACCAGGCACAAATGGCTGCAGGTGCCAGACCATGTCCTCA  
CGGTTCTCCTCTATCTCTTCTGCCCGCTTCTCTGAATTGGCTTCACTTCTCCAAGTTGGGGGC  
TCACCAAACTCCCAGAAGTTCTGGCTTTGTAACAGCAATGGAGAAAACACCCACGTTCCAA  
GCAGGTTTAGAAAACTGGGAGGCTGAGGCTCACTGGATGGTTTGGATCATCTATCTACCTAT  
GAACCAAGGCACTATGGTCTCCGGTCAATCCACCCTTAGAACTCAGTGGGGAGTGAGTGAG  
GCCCA  
CCAGCCATGCAGACTAAGAGAAAGCAAAGGAACACTGTTCAAAGGGGACAGCTGGATGCTG  
TTAGCAGAGAACGAATGCTGGCAGGCAAAGAGCAGGAACATCTACCATGTCCAGCCCCACTT  
CAAAGAAACCCGTGTTTTAAGTTACTTTGAGCAGGTTTCTGGTTTTTGTACCAAAACAGACTAAA  
TATTTAGAAAAATGTGTCCAAAGTGCTNTGTGTATGTGAGGGGGAGGGAGGGGAATAAAAAATG

---

AGTAAGATAGATTTTCAGTGGTCAAGCCCTTTACCATTTTGTAGGGGAAGATAAAGCCAATATATG  
TAAATTATACATCACAAGAAAGAGCTTGTTCAGGGGATATAGAACCCCCAGGAATTTTCGCGC  
CTGACTGT **AATCACTAGT**

**CLONA: KIE Lepto4, pU, pGEMT-easy, CD, 24 DE MARZO DEL 2006**  
**SITIO: EcoRI, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: SpeI, AATC + ACTAGT, POSICION: 532-535 + 536-541**

**GAATTCGATT**

CGAATAGTATCCGGTTCCGTGAAGGGGGCCGGGGAAAGGGAGGCCTCTGGTACAAGCTTCCG  
CTCCTGGATGAGCCCATGGCCCATCAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGA  
CGGGTAGCTGGTCTGAGAGGACAACCAGCCACACTGGCACTGAGACACGGGCCAGACTCCTA  
CGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGCGCAATGGGGGCAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGT  
GTGGGAAGAAGGCTTTTCGGGTTGTAAACCACTTTTGCCCGGGACGAAAGGGGGGACCTGAAT  
AAGGTTGCCCGATGACGGTACCGGGAGAATAAGCCACGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAAGACAGAGGTGGCAAGCGTTGTTTCGGAGTTACTGGGCGTAAAGAGTCTGTAGGTGGTCT  
GTCAAGTCTTTGGTGAAGGCCGTGGCTTAACCACGGGAATGCCAAAGAGACTGGCAGACTG  
GAGGCTGGGAGAGGGAAGCGGAATTT **AATCACTAGT**

**CLONA: KIE Sulfo 1, pU, pGEMT-easy, CD, 24 DE MARZO DEL 2006**  
**SITIO: EcoRI, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: SpeI, AATC + ACTAGT, POSICION: 437-440 + 441-446**

**GAATTCGATT**

CAATCCCGCATACGTTCCCTACGGGAAGAAAGCTGGGCAACTGGCGCTCATTGCGGAGCTCGC  
GGCCATTAGCTAGTTGGGGGGTAACGGCCTCCCAAGGCGACGATGGGTAGCCGGCCTGA  
GAGGGTGAACGGCCACACTGGGNCTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA  
GGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGACGGCCTT  
CGGGTTGTAAGCTCTGTCTGTTCGGGACGAAGACCGGGACGGGAGTCCCGGGGAGCCGGTA  
CCGACGAAGGAAGCCCCTGCAAACACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGGGGGCAAG  
CGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTGCGATACGTAGCGGTTT  
**AATCACTAGT**

**CLONA: KIE Sulfo 4, pU, pGEMT-easy, CD, 24 DE MARZO DEL 2006**  
**SITIO: EcoRI, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: SpeI, AATC + ACTAGT, POSICION: 437-440 + 441-446**

**GAATTCGATT**

CAATCCCGCATACGTTCCCTACGGGAAGAAAGCTGGGCAACTGGCGCTCATCGCGGAGCTCGC  
GGCCATTAGCTAGTTGGGGGGTAACGGCCTCCCAAGGCGACGATGGGTAGCCGGCCTGA  
GAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGTCACGGCCCAGACTCCTACGNAGGCAGCAGTA  
GGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGACGGCCTT  
CGGGTTGTAAGCTCTGTCTGTTCGGGACGAAGACCGGGACGGGAGTCCCGGGGAGCCGGTA  
CCGACGAAGGAAGCCCCTGCAAACACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGGGGGCAAG  
CGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTGCGATACGTAGCGGTTT  
**AATCACTAGT**

**CLONA: QIE Lepto2, pU, pGEMT-easy, CD, 24 DE MARZO DEL 2006**  
**SITIO: EcoRI, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: SpeI, AATC + ACTAGT, POSICION: 532-535 + 536-541**

**GAATTCGATT**

CGAATAGTATCCGGTTCCGTGAAGGGGGCCGGGGAAAGGGAGGCCTCTGGTACAAGCTTCCG  
CTCCTGGATGAGCCCATGGCCCATCAGCTAGTTGGCAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGA  
CGGGTAGCTGGTCTGAGAGGACAACCAGCCACACTGGCACTGAGACACGGGCCAGACTCCTA

---

CGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGCGCAATGGGGGCAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGT  
GTGGGAAGAAGGCTTTTCGGGTTGTAAACCACTTTTGCCCGGGACGAAAGGGGGGACCTGAAT  
AAGTTGCCCGATGACGGTACCGGGAGAATAAGCCACGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAAGACAGAGGTGGCNAGCGTTGTTCCGAGTTACTGGGCGTAAAGAGTCTGTAGGTGGTCT  
GTCAAGTCTTTGGTAAAAGGCCGTGGCTTAACCATGGGAATGCCAAAGAGACTGGCAGACTG  
GAGGCTGGGAGAGGGAAGCGGAATTT **AATCACTAGT**

**CLONA: QIE Lepto5, pU, pGEMT-easy, CD, 24 DE MARZO DEL 2006**  
**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 561-564 + 565-570**

**GAATTCGATT**

CGAATAGTATCCGGTTCCTGTAAGGGGGCCGGGAAAGGGAGGCCTCTGGTACAAGCTTCCG  
CTCCTGGATGAGCCATGGCCATCAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGA  
CGGGTAGCTGGTCTGAGGGGACAACCAGCCACACTGGCACTGAGACACGGGCCAGACTCCTA  
CGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGCGCAATGGGGGCAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGT  
GTGGGAAGAAGGCTTTTCGGGTTGTAAACCACTTTTGCCCGAGACAAAAGGGGGGACCTGAAT  
AAGTTGCCCGATGACGGTACCGGGAGAATAAGCCACGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAAGTCAGAGGTGGCAAGCGTTGTTCCGAGTTACTGGGCGTAAAGAGTCTGTAGGTGGTCT  
GTCAAGTCTTTGGTAAAAGGCCGTGGCTTAACCATGGGAATGCCAAAGAGACTGGCAGACTG  
GAGGCTGGGAGAGGNAAGCGGAATTTAGCGGGATTTGGAGAGGGAAGCGGAATTT  
**AATCACTAGT**

**CLONA: QIE Sulfo 4, pU, pGEMT-easy, CD, 24 DE MARZO DEL 2006**  
**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 437-440 + 441-446**

**GAATTCGATT**

CAATCCCGCATACGTTCTACGGGAAGAAAGCTGGGCAACTGGCGCTCATTGCGGAGCTCGC  
GGCCATTAGCTAGTTGGGGGGGTAACGGCCTCCAAGGCGACGATGGGTAGCCGGCCTGA  
GAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA  
GGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGACGGCCTT  
CGGGTTGTAAGCTCTGTCTGTCCGGACGAAGACCGGGACGGGAGTCCCAGGGGAGCCGGTA  
CCGACGAAGGAAGCCCCTGCAAACACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGGGGGCAAG  
CGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCCGGTCCGATACGTAGCGGTTT  
**AATCACTAGT**

**CLONA: K12TMOFESA1, pU, pGEMT-easy, CD, 25 DE ABRIL DEL 2006**  
**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 520-523 + 524-529**

**GAATTCGATT**

GACGGGCGGTGTGTACAAAGGGCAGGGACGTAATCAACGCAAGCTGATGACTTGCCTTACT  
AGGGATTCTCGTTGAAGAGCAATAATTGCAATGCTCTATCCCCAGCACGACGGGGGCTAACA  
AGATTACCCGGGCCTTTTCGGCCAAGGAAGTCTGACTGACCCCGTCAGTGTAGCGCGCGTGCGGC  
CCAGAACATCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTCAAACCTCCTTCGGCTTGAGCCGAA  
AGTCCCTCTAAGAAGCCAGCGCACTGCCGGAGCAATGCGGGCTATTTAGCAGGTTAAGGTCT  
CGTTTCGTTATCGCAATTAAGCAGACAAGTCACCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACCACCA  
CCCACAAAATCAAGAAAGAGCTCTCAATCTGTCAATCCTTATTGTGTCTGGACCTGGTGAGTTT  
CCCCGTGTTGAGTCAAATTAAGCCGCAGGCTCCACCCCTGGTGGTGCCCTCCCGTCAATTCCT  
TTGAGTT **AATCACTAGT**

**CLONA: K12TMOFESH1, pU, pGEMT-easy, CD, 25 DE ABRIL DEL 2006**  
**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 537-540 + 541-546**

---

**GAATTCGATT**

GACGGGCGGTGTGTGCAACTTTCTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTA  
TTCACCGCGGCAAGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTTCGAGTTGCAGA  
CTACGATCCGGACTACGACCGGGTTTCTGGGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCAGCCCTC  
TGTCGGCCATTGTATGACGTGTGTAGCCCTACCCATAAGGGCCATGATGACCTGACGTCAT  
CCCCACCTTCTCCGTTTGTACCGGCAGTCTCATTAGAGTGCCCTTTCGTAGCAACTAATG  
ACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACGGCC  
ATGCAGCACCTGTGTTCTGGCTCTCTTTGAGCACTCCCAAATCTCTTCAGGATTCCAGACATG  
TCAAGGGTAGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAACCCACATCATCCACCGCTTGTGCG  
GTCCCCGCCAATTCCTTTGAGTT **AATCACTAGT**

**CLONA: K34TMOCPFEA2, pU, pGEMT-easy, CD, 25 DE ABRIL DEL 2006**

**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 511-514 + 515-520**

**GAATTCGATT**

GACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGAATTCACCGCCGTATGGCTGACCGGCGATTAC  
TAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGGAGACGGGTTTTTG  
GGTTAGCTCACCTCGCGGGATCGCGACCCTTTGTCCCGGCCATTGTAGCACGTGTG TCGC  
CCAGGGCATAAGGGGCATGATGACTTGACGTATCCTCACCTTCTCCGGCTTATCACCGGCA  
GTCTGTTCAAGGTTCCAACTCAATGGTGGCAACTAAACACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGA  
CTTAACCCAACACCTTACGGCACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTGTCCGCGTTCCC  
GAAGGCACCCCTCTCTTTCAAGAGGATTGCGGGCATGTCAAGCCCTGGTAAGGTTCTTCGCTT  
TGCATCGACTTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGCCAATTCCTTTGAGTT

**AATCACTAGT**

**CLONA: K34TMOCPSA1, pU, pGEMT-easy, CD, 25 DE ABRIL DEL 2006**

**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 542-545 + 546-551**

**GAATTCGATT**

GACGGGCGGTGTGTACATGGGCGGCGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCA  
CCGCGGCATGGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGGGGTCCGGTTGCAGACC  
CCAATCCGAAGTACGCCACCTTTTTGCGATTGCTCCCTGTTGCCAGGTCGCCTCGCTCTGT  
AGTGGGCATTGTAGCACGTGTGTCGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACCAGACGTCGTCC  
CCGCTTCTCCTGCTTTGCGAGGCAGTCCCGTTAGAGTGCCCGGCTTACCCGCTGGCAAC  
TAACGGCAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGA  
CGGCCATGCAGCACCTGTGCTAGGGCTCCCTCGCGGGGCACCCAGGCTTTCACCCAGGTT  
CCCTAGCATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAATTGAACCACATGCTCCAC  
CGCTTGAGCGGGCCCCCGCCAATTCCTTTAAGTT **AATCACTAGT**

**CLONA: K34TMOCPSA2, pU, pGEMT-easy, CD, 25 DE ABRIL DEL 2006**

**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 508-511 + 512-517**

**GAATTCGATT**

GACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACT  
AGCGATTCCAGCTTACGATAGTTCGAGTTGCAGGCTACGATCCGGACTACGATGCATTTTCTGG  
GATTGGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCTCTGTATGCACCATTGTATGACGTGTGAAGCCC  
TACCATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGT  
CTCTTAGAGTGCCCTTTCGTAGCAACTAGAGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC  
CAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCCACTTCTCTTTGAG  
CACCTAATGCATCTCTGCTTCTGTTAGTGGCATGTCAAGGGTAGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCAT  
CGAATTAATCCACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGCCAATTCCTTTAAGTT

---

**AATCACTAGT**

**CLONA: K34TMOFESA2, pU, pGEMT-easy, CD, 25 DE ABRIL DEL 2006**  
**SITIO: EcoRI, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: SpeI, AATC + ACTAGT, POSICION: 508-511 + 512-517**

**GAATTCGATT**

GACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCATGCTGATCCGCGATTACT  
AGCGATTCCAGCTTCACGTAGTCGAGTTGCAGACTACGATCCGGACTACGATGCATTTTCTGG  
GATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTATGCACCATTGTATGACGTGTGAAGCCC  
TACCCATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGT  
CTCTCTAGAGTGCCCTTTCGTAGCAACTAGAGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC  
CAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCA CCTGTGTCCACTTTCTCTTTTCGAG  
CACCTAATGCATCTCTGCTTTCGTTAGTGGCATGTCAAGGGTAGGTAAGTTTTTCGCGTTGCAT  
CGAATTAATCCACATCACCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTT**AATCACTA**  
**GT**

**CLONA: K34TMOFESA3, pU, pGEMT-easy, CD, 25 DE ABRIL DEL 2006**  
**SITIO: EcoRI, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: SpeI, AATC + ACTAGT, POSICION: 570-573 + 574-579**

**GAATTCGATT**

AACTCAAAGGAATTGGCGGGAGGGCACCACCAGGGGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCA  
ACACGGGGAAACTCACCAGGTCCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGA  
TTTTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGGTACTTGTCTGCTTAATTGCGA  
TAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATAGCCCCGATTGCTCCGGCAGTGCCTGGCTTCTTA  
GAGGGACTTTTCGGCTCAAGCCGAAGGAAGTTTGAAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGA  
TGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACGGGGTCAGCGAGTTCCTTGGCCGAAAGGCC  
GGTAATCTTGTAGCCCCCGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGA  
GGAATCCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTTATTGCTCCCTGCCCTTTGTACACAC  
CGCCCGTCACCGCCCATGTACACACCGCCCGTCACCGCCCATGTACACACCGCCCGTC

**AATCACTAGT**

**CLONA: K34TMOFESH2, pU, pGEMT-easy, CD, 25 DE ABRIL DEL 2006**  
**SITIO: EcoRI, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: SpeI, AATC + ACTAGT, POSICION: 537-540 + 541-546**

**GAATTCGATT**

GACGGGCGGTGTGTGCAACTCTCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTAT  
TCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGTAGTCGAGTTGCAGAC  
TACGATCCGGACTACGATGCATTTTCTGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTG  
TATGCACCATTGTATGACGTGTGAAGCCCTACCCATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCC  
CCACCTTCCTCCGTTTGTACCGGCAGTCTCTCTAGAGTGCCCTTCGTAGCAACTAGAGAC  
AAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCAT  
GCAGCACCTGTGTCCACTTTCTTTTCGAGCACCTAATGCATCTCTGCTTCGTTAGTGGCATGT  
CAAGGGTAGGTAAGTTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCACATCATCCACCGCTTGTGCGG  
GTCCCCGCCAATTCCTTTGAGTT **AATCACTAGT**

**CLONA: KIE CP1, pU, pU, pGEMT-easy, CD, 25 DE ABRIL DEL 2006**  
**SITIO: EcoRI, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: SpeI, AATC + ACTAGT, POSICION: 507-510 + 511-516**

**GAATTCGATT**

GACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATCCGCGATTACT  
AGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGACTGGTTTTATGG

---

GATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCAACCCTCTGTACCAGCCATTGTATGACGTGTGTAGCCC  
CACCTATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTGCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGT  
CTCATTAGAGTGCCCTTTCGTAGCAACTAATGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC  
CAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTACGGTTCTCTTTTCGAG  
CACGAAACCATCTCTGGTAACTTCCGTACATGTCAAAGGTGGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATC  
GAATTAACACATTATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGCCAATTCCTTTGAGTT

**AATCACTAGT**

**CLONA: QIE CP1, pU, pGEMT-easy, CD, 25 DE ABRIL DEL 2006**  
**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 527-530 + 531-536**

**GAATTCGATT**

AACTCAAAGGAATTGACGGGAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCA  
ACACAGGGAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTAAGGATTGACAGACTGAGAGCTCTTTCTTGA  
TTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCGTT  
AACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAACTAGCTATGCGGAGGTATCCCTTCGCGGCCAGCTTCTT  
AGAGGGACTACGGCCTTTTAGGCCGCGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTA  
GATGTTCTGGGCCGACGCGCGCTACACTGATGTATTCAACGAGCTTATAGCCTTGGCCGACA  
GGCCCCGGTAATCTTTGAAATTTTCATCGTGATGGGGATAGATCATTGCAATTGTTGGTCTTCAA  
CGAGGAATTCCTAGTAAGCGCGAGTCATCAGCTCGCGTTGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACA  
CACCGCCGTC **AATCACTAGT**

**CLONA: QIE CP2, pU, pGEMT-easy, CD, 25 DE ABRIL DEL 2006**  
**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 508-511 + 512-517**

**GAATTCGATT**

GACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACT  
AGCGATTCCAGCTTCACGTAGTCGAGTTGCAGACTACGACCTGGACTACGATGCATTTTCTGG  
GATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTATGCACCATTGTATGACGTGTGAAGCCC  
TACCATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTGCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGT  
CTCTCTAGAGTGCCCTTTCGTAGCAACTAGAGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC  
CAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCCACTTTCTCTTTTCGAG  
CACCTAATGCATCTCTGCTTCGTTAGTGGCATGTCAAAGGTAGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCAT  
CGAATTAATCCACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGCCAATTCCTTTGAGTT

**AATCACTAGT**

**CLONA: QINTMOFEAH2, pU, pGEMT-easy, CD, 25 DE ABRIL DEL 2006**  
**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**  
**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 511-514 + 515-520**

**GAATTCGATT**

AACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACCAGCAACGGGAGGAATGTGCGGTTTAATTGGATTCA  
ACGCCGAAAACCTCACCAGGAAACGACCTGTGGATGAGAGTCAACCTGACGAGTTTACTCGATA  
GCAGGAGAGGTGGTGCATGGCCGTCGTCAGCTCGTACCGTAGGGCGTTCACTTAAGTGTGAT  
AACGAGCGAGACCCACATCTCTAATTGCTAATGTATATGCGAATATGCATGCACTTTAGAGAGA  
CCGCCATCGCTAAGATGGAGGAAGGAGCGGTGACGGCAGGTCAGTACGCCCCGAATTTCCC  
GGGCTACACGCGCATTACAAAGAACGGGACAATGCGTTGCAACCTCGAAAGGGGAAGCTAAT  
CGCGAAACCCGTCCATAGCTAGGATTGAGGGCTGTAACCTGCCCTCA TGAATCTGGATTCCGT  
AGTAATCGCGGGTCAACAACCCGCGGTGAACATGCCCTGCTCCTTGCACACACCGCCCGTC

**AATCACTAGT**

**CLONA: QINTMOSAH1, pU, pGEMT-easy, CD, 25 DE ABRIL DEL 2006**  
**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

---

**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 495-498 + 499-504**

**GAATTCGATT**

GTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACT  
TCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGACTGGTTTTATGGGATTAGCTCCCC  
TCGCGGGTTGGCAACCCTCTGTACCAGCCATTGTATGACGTGTGTAGCCCCACCTATAAGGGC  
CATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCA GTCTCATTAGAGTGC  
CCTTTCGTAGCAACTAATGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGA  
CACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTACGGTTCTCTTTCGAGCACGAAACCATCT  
CTGGTAACTCCGTACATGTCAAAGGTGGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACA  
TCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTT **AATCACTAGT**

**CLONA: QINTMOSAH2, pU, pGEMT-easy, CD, 25 DE ABRIL DEL 2006**

**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 539-542 + 543-548**

**GAATTCGATT**

GACGGGCGGTGTGTGCAGGGCGGTGTGTGACGGGCGGTGTGTGCAAGGAGCAGGGGCATG  
TTCACCGCGGGTTGTTGACCCGCGATTACTACGGAATCCAGATTCATGAGGGCGAGTTACAGC  
CCTCAATCCTAACTATGGACGGGTTTCGCGATTAGCTTCCCCTTTCGAGGTTGCAACGCATTGT  
CCCGTTCTTTGTAATGCGCGTGTAGCCCGGAAATTCGGGGCGTACTGACCTGCCGTGCACC  
GCTCCTTCTCCATCTTAGCGATGGCGGTCTCTCTAAAGTGCATGTATATTCGCATATAACATTA  
GCAATTAGAGATGTGGGTCCCGCTCGTTATCACACTTAAGTGAACGCCCTACGGTACGAGCTG  
ACGACGGCCATGCACCACCTCTCCTGCTATCGAGTAACTCGTCAGGTTGACTCTCATCCACA  
GGTCGTTCCCGGTGAGTTTTCCGGCGTTGAATCCAATTAACCCGCACATTCCTCCCGTTGCGG  
TGCTCCCCCGCCAATTCCTTTAAGTT **AATCACTAGT**

**CLONA: QINTMOSAH3, pU, pGEMT-easy, CD, 25 DE ABRIL DEL 2006**

**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 590-593 + 594-599**

**GAATTCGATT**

GGGCGGTGTGTGCACCTATGCATTACCGCGGCGGTGGCACACCTATGTATTACCGCGGCGG  
CTGGCACACTGACGGGCGGTGTGTGCAAGGCTCAGGAACACATTACCGCGGCGTTGCTGAT  
CCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCGGGCGAATTGCAGCCCGCAATCCGAAGTGGG  
ACCGTTTTCGGGGTTGGCTCGGCCTCGCGGCTTGGCGTCCCTCTGTCCGGCCCCATTGTAGC  
ACGTGTGCGGGCCCCGGACATAAAGGCCATGATGACTTGACGTCGTCGCCCGCTTCTCCGGC  
TTGACGCCGGCGGTCTCCCTAGAGTCCCCGCCATGACGCGCTGGCAACTAGGGACAGGGTT  
TCGCTCGTTACGCGACTTAACGCGACACCTCACGGCACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCAC  
CTGTGCACGTTCCACCCGAAGGCGTCACTTCTTTTCGGGAAGCTAATCCGTGCATGTCAAAT  
CCGGGATAAGGTTCTTCGCGTTGCCTCGAATTAAGCCACATGCTCCACCGCTTGTGTGAGCCC  
CCGCCAATTCCTTTGAGTT **AATCACTAGT**

**CLONA: R1236TMOTMOCPEA3, pU, pGEMT-easy, CD, 25 DE ABRIL DEL 2006**

**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

**NOTA: secuencia corta y poco segura.**

**GAATTCGATT**

GACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACT  
AGCTATTCCAGCTTCACGTAGTCGAGTTGCAGACTACGATCCGGACTACGATGCATTTTT

**CLONA: R1236TMOFESA1, pU, pGEMT-easy, CD, 25 DE ABRIL DEL 2006**

**SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

**SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 500-503 + 504-509**

---

**GAATTCGATT**

GTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCG  
ACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGGCTTTAAGAGATTAGCTCG  
CCGTCACCGACTCGCAACTCGTTGTACCAACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAG  
GGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTATTACCGGCAGTCTCGCTAGAG  
TGCCCAACTGAATGATGGCAACTAACAATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACA  
TCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCGATGTACCGAAGTAACTTTC  
TATCTCTAGAAATAGCATCGGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAA  
ACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGCCAATTCCTTTGAGTT **AATCACTAGT**

**CLONA: R1236TMOFESA3, pU, pGEMT-easy, CD, 25 DE ABRIL DEL 2006**

**SITIO: EcoRI, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

**SITIO FINAL: SpeI, AATC + ACTAGT, POSICION: 507-510 + 511-516**

**GAATTCGATT**

GACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGGCAAGCTGATCCGCGATTACT  
AGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTACGATCCGGACTACGACCGGGTTTCTG  
GGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCAGCCCTCTGTCCCGGCCATTGTATGACGTGTGTAGC  
CCTACCCATAAGGGCCATGATGACCTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCA  
GTCTCATTAGAGTGCCCTTTCGTAGCAACTAATGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAA  
CCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACGGCCATGCAGCACCTGTGTTCTGGCTCTCTTTCG  
AGCACTCCCAAATCTCTTCAGGATTCCAGACATGTCAAGGGTAGGTAAGGTTTTTTCGCGTTGCA  
TCGAATTAACACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGCCAATTCCTTTGAGTT

**AATCACTAGT**

**CLONA: K34TMOFESH 1, pU, pGEMT-easy, CD, 05 DE MAYO DEL 2006**

**SITIO: EcoRI, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

**SITIO FINAL: SpeI, AATC + ACTAGT, POSICION: 520-523 + 524-529**

**GAATTCGATT**

GACGGGCGGTGTGTACAAAAGGCAGGGACGTAATCAACGCAAGCTGATGACTTGGCCTTACT  
AGGGATTCTCGTTGAAGAGCAATAATTGCAATGCTCTATCCCCAGCACGACGGGGGCTAACA  
AGATTACCCGGGCCCTTTCGGCCAAGGAAGTCTGACCCCGTCAGTGTAGCGCGCGTGC  
CCAGAACATCTAAGGGCATCACAGACCTGTTA TTGCCTCAAATTCCTTCGGCTTGAGCCGAA  
AGTCCCTTAAGAAGCCAGCGCACTGCCGGAGCAATGCGGGCTATTTAGCAGGTTAAGGTCT  
CGTTCGTTATCGCAATTAAGCAGACAAGTCACCCCACTAAGAACGGCCATGCCACCA  
CCCAAAAATCAAGAAAGAGCTCTCAATCTGTCAATCCTTATTGTGTCTGGACCTGGT  
CCCCGTGTTGAGTCAAATTAAGCCGACGGCTCCACCCTGGTGGTGCCCTCCCGTCAATTCCT  
TTGAGTT **AATCACTAGT**

**CLONA: QINTMOCPFEA 3, pU, pGEMT-easy, CD, 05 DE MAYO DEL 2006**

**SITIO: EcoRI, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10**

**SITIO FINAL: SpeI, AATC + ACTAGT, POSICION: 498-501 + 502-507**

**GAATTCGATT**

GTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAG  
CTTCACGTAGTCGAGTTGCAGACTACGATCCGGACTACGATGCATTTTCTGGGATTAGCTCCA  
CCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTATGCACCATTGTATGACGTGTGAAGCCCTACCCATAAGG  
GCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCTAGAGT  
GCCTTTTCGTAGCAACTAGAGACAAGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC  
GACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCCACTTTCTCTTTCGAGCACCTAATGCA  
TCTCTGCTTCGTTAGTGGCATGTCAAGGGTAGGTAAGGTTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAATCC  
ACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGCCAATTCCTTTGAGTT **AATCACTAGT**

**CLONA: R1236TMOFESA 2, pU, pGEMT-easy, CD, 05 DE MAYO DEL 2006**

---

SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GATT, POSICION: 1-6 + 7-10  
SITIO FINAL: *SpeI*, AATC + ACTAGT, POSICION: 579-582 + 583-588

GAATTCGATT

GGCGGTGTGTGCACTTACCGCGGCTGCTGGCACACCTACGTATTACCGCGGCGGCTGGCACA  
CTGACGGGCGGTGTGTGCAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGCGATTACT  
AGCGATTCCGACCTCATGAGGTCGAGTTGCAGACCTCAATCCGAACTGGGCCCCGGCTTTCTC  
GGATTTACTCCACCTCTCGGTCTTGCTTTTCGTCTGTACCGGCCATTGTTGCACGTGTGTGGCC  
CTGGGCATAAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCTCTCCTTCCTCCAACCTTGTGCTGGCAG  
TCCCCTCAGAGTGCCCGGCATGACCCGGTG GCAACAGAGGGCGAGGGTTGCGCTCGTTGCG  
GGACTGAACCCAACACCTCACGGCACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTTCCGCTTC  
CGGACTGAACCGGTCCGTCCTCTCGGTTTCCTACTCGCGGCATGTCAAGCCCAGGTAAGG  
TTCTTCGCGTTGCGTCGAATTAACACATGCACCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCC  
TTTGAGTT AATCACTAGT