UNIVERSIDAD VIÑA DEL MAR

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

IDENTIFICACION DE GENES MARCADORES DE MICROORGANISMOS INVOLUCRADOS EN PROCESOS DE BIOLIXIVIACION Y SU CONTEXTO GENÓMICO DENTRO DEL METABOLISMO BACTERIANO.

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA Y AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOTECNOLÓGICAS

TATIANA CABRERA PACHECO

PROFESORES GUÍAS: CECILIA DEMERGASSO

MAURICIO DIAZ

Julio, 2010

“Solo se volverá clara tu visión cuando puedes mirar tu propio corazón porque quien mira hacia afuera sueña y quien mira hacia adentro despierta”

-Carl Jung

ABREVIATURAS

BLAST: (*Basic Local Alignment Search Tool*) conjunto de herramientas informáticas que comparan secuencias de ADN o proteínas utilizando los datos que se encuentran disponibles en bases de datos de dominio público. Están diseñadas para encontrar coincidencias de porciones pequeñas de ADN o proteínas entre un conjunto de secuencias mayores. BLAST está disponible en INTERNET su dirección es: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/.

dCTP: trifosfato de desoxicitidina, referido a [α-^{32} P] dCTP.

DNA: ácido desoxirribonucleico, material hereditario de las células y algunos virus.

DNAc: es ADN complementario que es sintetizado de una plantilla de mRNA en una reacción catalizada por transcriptasa reversa.

DIDI: (*Differencial Display*).

DEPC: pirocarbonato de dietilo.

dNTP: trifosfodesoxirribonucleótidos.

EDTA: acido etilen-diamino-tetraacético.

IPTG: isopropilo-β-D-tiogalactósido.

g: fuerza gravitacional.

Housekeeping: genes involucrados en funciones básicas en la supervivencia celular.
mM: concentración milimolar.

mA: miliamperes.

nm: unidad de longitud para medir la longitud de onda de la radiación ultravioleta.

NCBI: National Center of Biotechnology Information http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

PCR: (Polymerase Chain Reaction) reacción en cadena de la polimerasa.

pb: par de base.

Random primer: partidores al azar.

RAP-PCR: RNA Arbitrarily Primed-PCR.

RNA *Later:* Tampón para prevenir la degradación del RNA y poder mantener a -20°C.

RNA: ácido ribonucleico, implicado en la síntesis de proteínas como RNA mensajero, RNA trasferencia y RNA ribosomal.

RNAm : ácido ribonucleico mensajero.

RNAr: ácido ribonucleico ribosómico.

RNAsa: ribonucleasa.

RT-PCR: Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa.

TAE: solución de Tris-acetato-EDTA.

TBE: solución de Tris-borato-EDTA.

TE: solución de Tris-EDTA.

Tris: compuesto orgánico tris (hidroximetil) aminometano. Se utiliza para preparar soluciones de tampón.

TEMED: Tetrametiletileno es un compuesto químico que se utiliza con persulfato de amonio para catalizar la polimerización de la acrilamida para la confección de geles, utilizados en técnicas de electroforesis, para la separación de proteínas o ácidos nucleicos.

U: unidad enzimática.

UV: ultravioleta.

V: unidad del Sistema Internacional de voltaje y potencial eléctrico.

W: cantidad derivada de poder del Sistema Internacional de Unidades (SI)

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido

ABSTRACT

The bioleaching in heaps is the technology that provides better projections for treating low grade copper sulfide ores. However, the knowledge of the microbial catalysis and metabolic mechanisms involved in situ is still very limited.

The visualization of the genomic environment of marker genes of *Acidithiobacillus ferrooxidans, Leptosphirilum ferriphilum* and *Ferroplasma acidarmanus,* previously isolated by differential display under industrial stress, allowed to achieve the contextualization of these in the bacterial metabolism. Operons with specific functions where investigated such as resistance to mercury, biosynthesis, energy and a lot of genes with hypothetical sequences. This provides vital knowledge about the genes involved in metabolic pathways, regulatory networks and the transcriptome of the organism involved in stress, caused by factors of pH and metal concentration among others.

To achieve an idea of how these genetic markers work in the bacterial metabolism in bioleaching heaps, a study of the genomic contexts was made on: *Acidithiobacillus ferrooxidans, Leptospirillum ferriphilum* and in the arches *Ferroplasma acidarmanus*. To achieve this different bioinformatics analysis tools were used: NCBI database and BLAST program, protein families database, Genomes display program Artemis and the platform Pathway Tools, protein secondary structure and transmembrane regions prediction program, and also export signals and localization prediction program

The differential gene expression was investigated by RAP-PCR in industrial solutions of *Acidithiomicrobium ferrooxidans sp* P2 bacteria, under culture conditions: normal and stress with NaCl and $CuSO_4$, to identify the potential marker genes for the bacterial metabolism involved in the bioleaching process. Studies with

random primers allowed cloning and sequencing of differentially expressed bands; identifying 12 DNAc fragments related to 16S RNAr.

This study provides information for the use of models that allows the understanding of the metabolic dynamics of bacteria involved in bioleaching processes.

RESUMEN

La biolixiviación en pilas es la tecnología que presenta mejores proyecciones para el tratamiento de minerales sulfurados de cobre de baja ley. Sin embargo, el conocimiento de los procesos de catálisis microbiana y los mecanismos metabólicos involucrados *in situ* es aún muy limitado.

La visualización del entorno genómico de genes marcadores de *Acidithiobacillus ferrooxidans, Leptosphirilum ferriphilum* y *Ferroplasma acidarmanus,* detectados previamente por *Differencial Display* (DIDI) bajo condiciones de estrés industrial, permitió observar una contextualización de estos en el metabolismo bacteriano. Se observaron operones con funciones específicas como: resistencia al mercurio, biosíntesis y energía, y genes anotados como hipotéticos. Esto aporta conocimiento vital sobre los genes involucrados en vías metabólicas, redes de regulación y el transcriptoma de los microorganismos que intervienen en situaciones de estrés, producidas por factores de pH y concentración de metales entre otros.

Para lograr una idea de cómo funcionan estos genes en el metabolismo bacteriano en la pila de biolixiviación, se realizó un estudio de contextos genómicos de: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferriphilum* y la arquea *Ferroplasma acidarmanus*. Para esto se realizó un análisis bioinformático utilizando herramientas como: bases de datos del NCBI y su programa BLAST, bases de datos de familias de proteínas, programa de visualización de genomas Artemis y la plataforma Pathway Tools, programas de predicción de estructura secundarias de proteínas y regiones de transmembrana, así como programa de predicción de señales de exportación y localización.

La expresión diferencial de genes fue investigada mediante RAP-PCR, de la bacteria biolixiviante *Acidithiomicrobium ferrooxidans* P2*,* sometidos a condiciones

de cultivo: normal y de estrés con NaCl y $CuSO_4$. Los estudios realizados con random primers permitieron clonar y secuenciar bandas expresadas en forma diferencial, identificando 12 fragmentos de DNAc relacionados con 16S de RNAr.

Este estudio aporta información para la generación de modelos que permiten comprender la dinámica metabólica de bacterias involucradas en procesos de biolixiviación.

HIPÓTESIS

Existen genes que permiten determinar el estado metabólico de las bacterias que participan en el proceso de biolixiviación. Por lo tanto, se los puede emplear como marcadores moleculares del estado de los microorganismos en diferentes condiciones durante el desarrollo de la biolixiviación.

OBJETIVO GENERAL

Identificar genes marcadores de vías metabólicas involucradas en el proceso de biolixiviación y estudiar su contexto genómico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar los posibles genes marcadores del metabolismo de las bacterias involucradas en la biolixiviación mediante herramientas de biología molecular.

- Determinar el entorno genómico de los genes marcadores a fin de lograr una contextualización del mismo dentro del metabolismo bacteriano mediante herramientas Bioinformáticas.

- Estudiar los niveles de expresión de los posibles genes marcadores cuando los microorganismos crecen en diferentes concentraciones de NaCl y $CuSO_4$.

INDICE

CAPITULO 1 14
ESTADO DEL ARTE 14
1.1 Biolixiviación 14
1.2 Microorganismos implicados en el proceso de biolixiviación 17
1.3 Mecanismo de acción de los microorganismos 19
CAPITULO 2 28
MATERIALES Y METODOLOGIA 28
2.1 Biología Molecular 29
CAPITULO 3 42
RESULTADOS Y DISCUSIONES 42
3.1 *Acidithiomicrobium ferrooxidans* 42
3.2 Contextos genómicos de genes obtenidos por DIDI 51
CAPITULO 4 72
CONCLUSIONES 72
CAPITULO 5 75
REFERENCIAS 75

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Imagen de pila de biolixiviación de minera Escondida……....28
Figura 2.2 Diagrama de flujo de metodología…….....29
Figura 3.1 Producto de amplificado por RT-PCR……...…43
Figura 3.2 Revelado del gel cDNA de *Acidithiomicrobium ferrooxidans*……...…45
Figura 3.3 Diferenciación de expresión de genes de *Acidithiomicrobium ferrooxidans*……..…46
Figura 3.4 PCR de bandas cortadas del gel D-Code……..…47
Figura 3.5 Placas petri con LB/Ampicilina/X-Gal/IPTG…….….48
Figura 3.6 Gel de verificación de inserto en el plásmido pGEM-T..……..…...49
Figura 4.1 Operón MER de *Acidithiobacillus ferrooxidans*……...…57
Figura 4.2 Operón de energía o fijación de nitrógeno de *Acidithiobacillus ferrooxidans*…….....58
Figura 4.3 Operón de transcripción y traducción de *Acidithiobacillus ferrooxidans*……..60
Figura 4.4 Operón replicación, biosíntesis de aminoácidos y degradación de proteínas de *Acidithiobacillus ferrooxidans*…….……...….61
Figura 4.5 Operón de regulación de *Acidithiobacillus ferrooxidans*……...….64
Figura 4.6 Operón de nucleasa/sintasa de *Acidithiobacillus ferrooxidans*……..….64
Figura 4.7 Operón de proteosoma de *Leptoespihilum ferriphilum*……...…66
Figura 4.8 Operón de biosíntesis de grupos Fe-S de *Ferroplasma acidarmanus*……67
Figura 4.9 Operón de metabolismo de lípidos/transporte/oxido reducción de *Ferroplasma acidarmanus*…….…….68
Figura 4.10 Proteína hipotética de membrana…….....69
Figura 4.11 Operón MER de *Ferroplasma acidarmanus*……..70

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Programa de PCR……34
Tabla 2.2 Reacción de componentes para la ligación……36
Tabla 3.1 Cuantificación por espectrofotometría a 260 nm de *Acidithiomicrobium ferrooxidans*……42
Tabla 4.1 Identificación de genes según su función de *Acidithiobacillus ferrooxidans*…….……..…62
Tabla 4.2 Resumen de rutas biosintética de *Acidithiobacillus ferrooxidans*…..….63

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1……19
Ecuación 2……20
Ecuación 3……...20
Ecuación 4……20

CAPITULO 1

ESTADO DEL ARTE

1.1 Biolixiviación

La Biominería es el uso de microorganismos que emplean los minerales como fuente de energía, permitiendo la liberación de los metales que se encuentran en su interior. La biominería incluye dos procesos bioquímicos llamados biolixiviación y biooxidación.

Consiste en la catálisis de microorganismos. Por lo tanto, la biolixiviación bacteriana, es la oxidación de sulfuros catalizada por microorganismos logrando la liberación del metal a una solución acuosa [Watling H.R, 2006]. Durante los últimos años se ha puesto gran atención en el desarrollo de la biolixiviación en pilas de minerales sulfurados de cobre de baja ley, convirtiéndose en una tecnología emergente [Brierley J.A y Brierley C.L, 1999].

El mineral que es desechado podría ser considerado como material para poder ser lixiviado en pilas. A pesar de la importancia económica del proceso de biolixiviación para nuestro país, la ecología microbiana en pilas a gran escala no es del todo comprendida y hasta hace sólo algunos años, se habían efectuado pocos intentos en la manipulación de los microorganismos participantes de este proceso [Brierley C, 2001]. Un mejor entendimiento de la microbiología de los procesos de biolixiviación se considera clave en el avance de las operaciones comerciales de pilas de lixiviación [Brierley C, 2001].

El uso de microorganismos como extractores de metales, se remonta al comienzo de los años 50. En 1954, Brynes y col., publicaron un trabajo donde describían experimentos donde las bacterias acidófilas del genero *Thiobacillus*

conocido ahora como *Acidithiobacillus* [Donovan P. Kelly y Wood Ann P., 2000], oxidaban pirita y sulfuros de cobre [Zhang L. y col, 2008]. Esto se produce en ambientes ácidos y son reacciones espontáneas de distintos microorganismos que actúan directamente en el proceso de lixiviación. Así, en la pila de biolixiviación, el cobre es recuperado por extracción por solventes y electro-obtención (*electrowinning*) produciendo cátodos de cobre de alta calidad [Falco L. y col, 2003].

En este proceso, los sulfuros metálicos se oxidan a iones metálicos y sulfatos en condiciones aeróbicas generando hierro ferroso, Fe (II) y compuestos de azufre reducidos (RISC). Las bacterias y arqueas actúan como catalizadores de la oxidación del Fe (II) y los RISC para regenerar hierro férrico, Fe (III) y el ácido sulfúrico para la reacción de biolixiviación [Rawlings D.E., 2002] [Johnson D.B y Hallberg K.B, 2003] [Schippers A, 2007].

Se ha generado información en cuanto a la identificación y las propiedades de microorganismos como *Acidithiobacillus spp., Sulfurisphaera, Leptospirillum spp., Ferroplasma spp.* y *Sulfobacillus* [Goebel B.M y Stackebrandt E, 1994] [Rawlings D.E, 2002] [Olson G.J y col., 2003].

La biolixiviación es un sistema dinámico, ya que existen variaciones en los diferentes tipos de microorganismos que componen la población a medida que transcurre el ciclo de lixiviación [Demergasso C. S y col, 2005].

Se conocen una serie de ventajas y desventajas para este proceso, las cuales se resumen a continuación:

- No se producen emisiones de dióxido de azufre como en los procesos químicos, con lo que evita la contaminación ambiental provocada por emisiones de este gas (lluvia ácida). Tampoco hay presencia de anhídrido sulfuroso, lo cual es frecuente en algunos procesos hidrometalúrgicos.

- Se reduce el consumo energético ya que, no se necesita secar el mineral, ni utilizar altas temperaturas.

- Bajo consumo de reactivos, ya que mediante las reacciones biológicas se regeneran tanto el agente de lixiviación (ion férrico), como el ácido sulfúrico necesario para conseguir la acidez adecuada para la pila.

- Bajos costos de instalación y operación.

La biolixiviación tiene desventajas, entre las que podemos mencionar:

- La velocidad de reacción es lenta, ya que se trabaja con microorganismos que catalizan reacciones de oxidación.

- Obtención de soluciones diluidas como para obtener directamente el metal a partir de ellas.

- No se conocen exactamente los procesos metabólicos que participan [Decker R., 1986].

El uso de la Genómica, Metagenómica y la Proteómica a gran escala para estudiar las respuestas regulatorias globales de las comunidades microbianas involucradas en los procesos de biolixiviación ha emergido en los últimos años [Valenzuela L y col., 2006]. Además, se han llevado a cabo análisis proteómicos para estudiar el transporte de electrones en la oxidación de hierro y la resistencia a metales pesados en arqueas acidófilas como *Ferroplasma acidarmanus* [Baker-

Austin C. y col., 2007] [Dopson M. y col, 2005]. Estos estudios han tenido como objeto examinar funciones metabólicas y evaluar estados fisiológicos de las comunidades de microorganismos en respuesta a limitación de nutrientes o respuesta a estrés.

1.2 Microorganismos implicados en el proceso de biolixiviación

Las bacterias son los microorganismos más adecuados que pueden ser utilizados para la extracción de metales en la biominería. Las características de las bacterias utilizadas para la bioextracción:

a) La extracción de minerales consiste en la producción de las altas temperaturas por lo que la bacteria debe ser capaz de sobrevivir al calor, por lo tanto, deben ser mesófilas y termófilas.
b) La biominería aplica el uso de ácidos fuertes, por lo tanto, las bacterias deben ser quimiolíticas.
c) Las bacterias deben producir energía a partir de compuestos inorgánicos
d) La bacteria debe ser capaz de adherirse a las superficies solidas o tiene la capacidad para formar biofilms.

Los microorganismos se caracterizan por desarrollarse en ambientes extremos, donde se presentan una cantidad elevada de elementos y compuestos metálicos. Los ambientes acuosos asociados a la pila de biolixiviación, están caracterizados por su bajo pH, por altas concentraciones de metales pesados y en algunos casos por elevadas temperaturas. En estas condiciones extremas convive un conglomerado de microorganismos que son capaces de desarrollarse y reproducirse [Rohwerder T, 2003]. A continuación se describirán los microorganismos con que se trabajó en esta investigación.

1.2.1 *Acidithiobacillus ferrooxidans*

El género *Acidithiobacillus* perteneciente a la división Proteobacteria, ha sido extensamente estudiado y es el que tiene mayor importancia económica. Fisiológicamente, es una bacteria Gram negativa, acidófila creciendo entre un pH de 2-4, mesófila, quimiolitoautótrofa y aeróbica. Puede usar Fe^{+3} como aceptor de electrones y S^0 como dador, así como otras formas de respiración anaeróbicas. Posee flagelo polar y tiene una forma de bacilo. Su fuente de energía la obtiene de la oxidación del ion ferroso o de especies reducidas de azufre. El sistema de ion ferroso está asociado con la membrana celular [Donovan P. Kelly y Wood Ann P., 2000].

1.2.2 *Leptospirrilum*

Pertenecen a la clase Nitrospira. Las células son en forma de espiral y móviles por medio de flagelo. Son bacterias Gram negativas, acidófilas creciendo en un rango de pH de 1,3-4,0; mesófilas, aeróbicas estrictas y no forman esporas. Son bacterias quimioautótrofas capaces de oxidar hierro ferroso, pero no utilizan el azufre como fuente de energía, ni oxidan sulfuros de minerales [Markosyan G., 1972] y por tanto, contribuir a la producción de ácido sulfúrico.

1.2.3 *Acidithiomicrobium ferrooxidans*

Es una Actinobacteria. Su pared celular pertenece a una Gram Positiva, es acidófila y crece en un pH 2,0; pertenecen a termófilas moderadas con un rango de temperatura entre 45-50ºC y son móviles. No forman esporas y son aeróbicas. Son bacterias quimioautótrofa y habitan en lugares ácidos y ambientes ricos en minerales sulfurados [Clum A. y col, 2009].

1.2.4 *Ferroplasma*

Es un género de microorganismo del domino Arquea. Son pleomórficas y no presentan pared celular. Las células oxidan el hierro ferroso como única fuente de energía, siendo quimiolitoautótrofa. Son acidófilas extremas creciendo entre un pH de 1,3-2,2 y son aeróbicas estrictas. No contienen flagelo y son mesófilas [Golyshina O. y col, 2000].

1.3 Mecanismo de acción de los microorganismos

Siempre ha existido una gran controversia sobre el papel que desempeñan los microorganismos en la lixiviación. Existen dos mecanismos mediante el cual los minerales son recuperados: oxidación o reducción dependiendo de la bacteria.

Las especies correspondientes al género *Acidithiobacillus* son capaces de catalizar la oxidación de compuestos reducidos de azufre (como sulfuro, azufre elemental, etc) utilizando oxígeno como aceptor de electrones y generando ácido sulfúrico como producto final, según la ecuación 1:

$$S + 3/2\ O_2 + H_2O \rightarrow H_2SO_4 \quad \text{(Ec. 1)}$$

Estas bacterias pueden utilizar la forma directa, para la recuperación de metales asociados a sulfuros. Así, si M representa a un metal asociado a sulfuros, estos microorganismos catalizan la siguiente reacción:

$$MS\ (sólido) + 2\ O_2 \rightarrow M^{+2}\ (ac) + SO_4^{-2}\ (ac) \quad (Ec.\ 2)$$

Además, *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* son capaces de catalizar la oxidación de hierro (II) en condiciones aeróbicas:

$$4Fe^{+2} + O_2 + 4\ H^{+} \rightarrow 4\ Fe^{+3} + 2\ H_2O \quad (Ec.\ 3)$$

Estas bacterias hierro oxidante, pueden contribuir a la disolución de los sulfuros metálicos por vía indirecta, ya que el Fe^{+3} generado en la reacción anterior, es un agente oxidante que puede atacar químicamente a los sulfuros:

$$MS\ (s) + 2\ Fe^{+3} \rightarrow M^{+2}\ (ac) + S + 2\ Fe^{+2}\ (Ec.\ 4)$$

Este Segundo mecanismo, denominado indirecto, es especialmente interesante dado su carácter cíclico. El Fe^{+2} obtenido en la ecuación 4 es nuevamente utilizado en la ecuación 3 [Torma A, 1977].

La biolixiviación ocurre en la membrana de la célula, los electrones pasan por la célula por un proceso bioquímico para producir energía reduciendo las moléculas de oxígeno a agua. Obteniendo la oxidación del hierro y el metal que pasa a disolución.

En el presente trabajo, se ha utilizado una estrategia para comparar patrones de expresión en diferentes condiciones de crecimiento de *Acidithiomicrobium ferrooxidans sp* P2. Se diseñaron experiencias de cultivo con

diferentes concentraciones de NaCl y $CuSO_4$, para generar una respuesta a largo plazo. Se eligieron estas sales para producir una expresión de genes diferencial ya que en operaciones mineras se encuentran frente a NaCl y $CuSO_4$. El Fe^{+2} es utilizado como fuente de electrones, por lo tanto, la tolerancia a elevadas concentraciones es esencial y son potencialmente tóxicos dependiendo de la concentración para algunos de los microorganismos [Bruins, M. R y col, 2000]. Estos metales tóxicos interactúan con los componentes esenciales de la célula a través de enlaces covalentes e iónicos [Bruins, M. R y col, 2000]. La bacteria genera una adaptación a largo plazo y una respuesta a los compuestos tóxicos activando un mecanismo bioquímico interno, esto ha sido encontrado en bacterias Gram positivas y Gram negativas de diferentes ambientes [Scott J. 1995].

El método utilizado en esta investigación para comparar los patrones de expresión, se basa en una reacción en cadena de la polimerasa con un partidor aleatorio partiendo de RNA (RAP-PCR, *RNA arbitrarily primed PCR)*. [Williams J y col, 1990] [Welsh J y col, 1992].

El método consiste en generar la extracción de RNA mensajero (RNAm), seguido de transcripción inversa para obtener DNA complementario (cDNA) y luego una amplificación por PCR de fragmentos del cDNA. Se utilizan partidores hexámeros aleatorios (random) de 10 pares de bases, no específicos donde se obtienen resultados anónimos, es decir que se desconoce a qué mRNA corresponden los fragmentos amplificados de cDNA obtenidos hasta no ser secuenciados. Sólo tenemos la información que se cultivaron en diferentes condiciones de estrés. Los productos de PCR (marcados radioactivamente) se separan mediante electroforesis por el método de *Differencial Display* [Liang G y Pardee A.B, 1992]. Se ha desarrollado esta tecnología y se ha utilizado para identificar genes funcionales y también para detectar microorganismos activos en los procesos industriales de biolixiviación [Galleguillos P y col., 2007]. Se observa

las diferencias entre las bandas que aparecen en los carriles correspondientes a las células en distintas condiciones: normal y de estrés, observándose la inducción y represión de los genes que generan los mRNA correspondientes. Posteriormente, se cortan las bandas, se clonan y se trata de identificar mediante herramientas bioinformáticas, puesto que son candidatos a formar parte del proceso de biolixiviación.

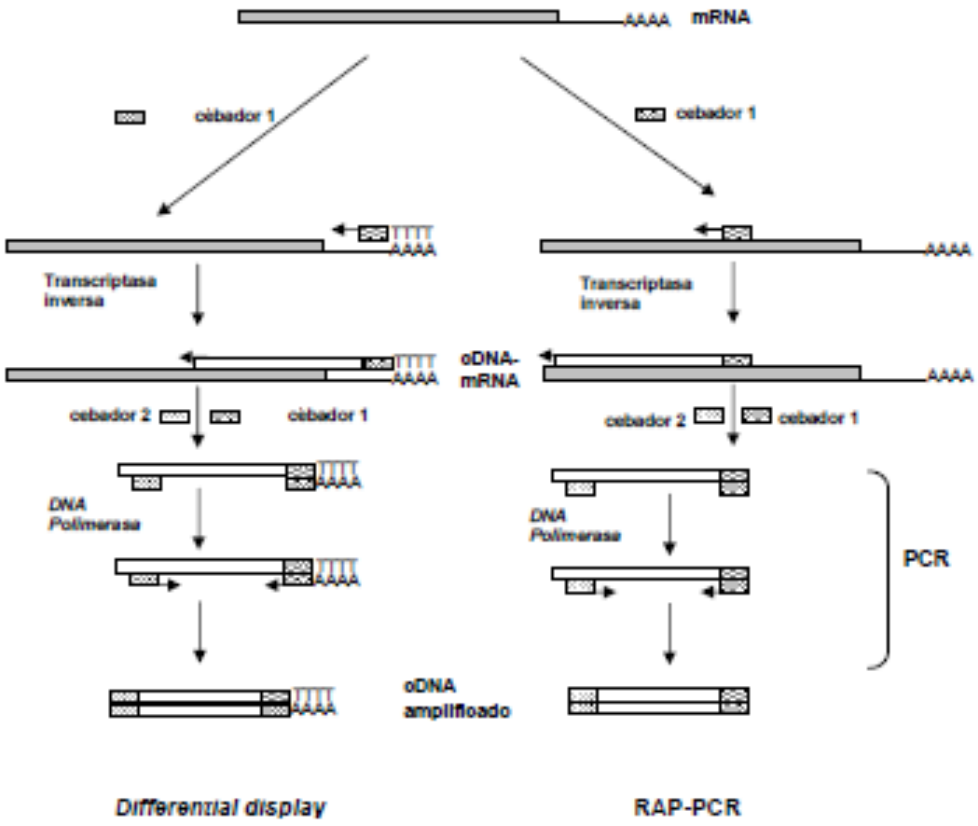


Figura 1.1: Diseño de las diferencias entre *Differential Display* (DIDI) y RAP-PCR. En la DIDI se utiliza un primer cebador con una secuencia poliT que se complementa con la cola poliA del mRNA, mientras que en RAP-PCR se emplea un cebador arbitrario. Después de obtener el cDNA por acción de la transcriptasa inversa, en ambos casos se hace una PCR con otro cebador cualquiera. [Alía P, 2004].

Existen diversas técnicas que siguen estas líneas generales. Las diferencias principales están en el uso de cebadores en la transcripción inversa (figura 1.1). En el *Differential Display* se emplea un cebador arbitrario (RAP), de forma que se obtengan cDNA, que puedan corresponderse con cualquier parte del mRNA [Welsh J y col, 1992]. Los cebadores empleados en la posterior PCR son el mismo de la RT-PCR. En realidad ambos procedimientos utilizan a lo menos un cebador arbitrario [Alía P, 2004].

Recientemente, la tecnología de microarrays o biochips se ha considerado como una alternativa revolucionaria para la identificación de genes cuyos niveles de expresión son distintos, dependiendo de cambios celulares o simplemente por la influencia del ambiente [Dunggan D.J, 1999] [Schulze A y Downward J, 2001]. Los arrays o matrices consisten en una disposición ordenada de muestras sobre un soporte (de nylon o de vidrio) para su posterior emparejamiento (hibridación) con muestras de DNA/cDNA, bien sean conocidos o desconocidos. Las principales dificultades de la tecnología de los microarrays son su fabricación y la interpretación de los resultados. Por este motivo, es crucial el diseño experimental sobre el cual se aplican [Lander ES, 1999].

Esta técnica RAP-PCR, se ha utilizado con éxito en muestras provenientes de procesos industriales de biolixiviación, en las cuales se han identificado genes funcionales y genes no funcionales como los RNA 16S que nos han señalado los microorganismos que se encuentran activos en este tipo de procesos [Galleguillos P. y col., 2007].

La regulación de la expresión génica, es un mecanismo de control génico que regulan la formación y la cantidad de enzimas de la célula, no su actividad. [Tortora G., 1993]. La represión inhibe la expresión génica y disminuye por ende la síntesis de enzimas. Suele ser una respuesta ante la presencia de un producto final de una ruta metabólica y produce un descenso en la velocidad de síntesis de las

enzimas que conducen a la formación de ese producto. Las proteínas reguladoras represoras, bloquean la capacidad de la RNA polimerasa para iniciar la transcripción de los genes reprimidos. La inducción es el proceso que activa la transcripción de un gen o unos genes. Una sustancia que induce la transcripción de un gen se conoce como inductor y las enzimas que son sintetizadas en presencia de inductores son enzimas inducibles. [Tortora G, 1993].

La bioinformática es una herramienta muy útil para lograr acercarse a la biología y como funciona un organismo no caracterizable de otro modo. Este es el caso de los microorganismos biolixiviantes, donde es difícil de implementar las herramientas genéticas convencionales [Quatrini R y col, 2007]. El estudio de los genomas y las vías metabólicas y regulatorias predichas de estas bacterias biolixiviantes ha permitido acercarnos al metabolismo de estos microorganismos y como ellos podrían llegar a actuar sinérgicamente en operaciones de biolixiviación en la pila para promover la recuperación de metales [Quatrini R y col, 2007].

Paralelamente se estudiaron los contextos genómicos de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferriphilum* y la arquea *Ferroplasma acidarmanus*. Para lograr una idea de cómo funcionan estos genes marcadores en el metabolismo bacteriano en la pila de biolixiviación. Se utilizaron herramientas bioinformáticas como: bases de datos del NCBI y su programa BLAST, bases de datos de familias de proteínas, el programa de visualización de genomas Artemis y la plataforma Pathway Tools, programas de predicción de estructuras secundarias de proteínas y regiones de transmembrana, así como programas de predicción de señales de exportación y localización.

La comparación de genomas bacterianos completos ha demostrado la casi nula conservación del orden de los genes, más allá del nivel de operón (grupo de genes adyacentes, coexpresados y coregulados que codifican proteínas de

funciones relacionadas) incluso entre especies muy cercanas [Wolf Y y Col, 2010]. La similitud del orden de los genes entre genomas procarióticos es mantenida, a través de la transferencia horizontal de operones, incluso entre especies distantes [Itoh T y col, 1999]. La transferencia de operones es favorecida por la selección, por sobre la de los gens individuales, dado que en el primer caso, la coexpresión y coregulación génica es mantenida [Lawrence J, 1999].

Los métodos de contexto genómico han sido utilizados para predecir redes de proteínas funcionalmente relacionadas, sin la necesidad de depender de la homología de secuencia de funciones conocidas. Los métodos de contexto genómico infieren que dos genes están funcionalmente relacionados sobre la evidencia de patrones conservados de muchos genomas [Galperin M y Koonin E, 2000; Huynen M y Snel B, 2000]. Evidencias muestran que la mayoría, sino todos, los tramos génicos que son conservados en procariotas taxonómicamente diferentes, son en verdad operones, en vez de reminiscencias de genes ancestrales. Por ende los genes encontrados en estos tramos, en múltiples genomas, pueden asumirse de estar funcionalmente relacionados, por lo que el clustering de genes puede ser utilizado para la predicción funcional [Wolf Y y Col, 2010]. Existen evidencias de la aplicación de los métodos de contexto genómico para la predicción funcional en el campo de las bacterias biolixiviantes como *A. ferroxidans* [Ramirez P y Col, 2004; Valenzuela L y Col, 2006].

El estudio de genes marcadores puede tener aplicaciones muy diversas, que pueden ir por el lado de la manipulación genética como también para el seguimiento de los parámetros metabólicos de las bacterias biolixiviantes.

Para poder manipular genéticamente los microorganismos, es necesario su genética [Rawlings D.E y Kusano T, 1994]. Esto incluye plásmidos que puedan replicarse en las bacterias biolixiviantes y marcadores genéticos que son expresados en estas bacterias y métodos para colocar nuevo material genético a los

microorganismos. Las bacterias biolixiviantes, como *A. ferrooxidans* han demostrado ser muy difíciles de manipular genéticamente [Rawlings D.E y Kusano T, 1994]. Las condiciones de cultivo de estos microorganismos limitan las opciones de potenciales marcadores genéticos, muchos antibióticos son inestables a bajos pH y altas concentraciones de iones metálicos [Moses V y Col, 1999], razón por lo que existe una búsqueda enérgica de marcadores de laboratorio con esta finalidad. Reportes de estos marcadores son los genes de resistencia a mercurio o arsénico [Rawlings D.E y Col, 1984].

Son necesarios estudios moleculares para investigar la expresión y regulación del metabolismo de los microorganismos biolixiviantes, especialmente los que tienen aplicación directa en el proceso. Los mecanismos involucrados en la oxidación de fierro y azufre serán importantes para cualquier futura manipulación del microorganismo, dado que la producción energética puede ser uno de los factores limitantes en la tasa de crecimiento y oxidación de los metales [Rawlings D.E y Woods T, 1995]. Existen evidencias de expresión diferencial mediada por estrés o diferentes condiciones de cultivos, en estudios de *A. ferrooxidans* en presencia de fierro o azufre [Mjoli N y Kulpa C.R, 1988] o diferentes fuentes energéticas [Bouchal P y col 2006].

Estos genes marcadores pueden ser del tipo grupo-, género- o especie-específicos permitiendo estudiar las dinámicas de las comunidades que dependen del tiempo de operación en la pila [Remonsellez F y Col, 2007] o marcadores funcionales del metabolismo afectados por las variaciones en los parámetros fisicoquímicos, mineralógicos y factores de estrés [Galleguillos P y Col, 2007]. El poder identificar los genes que controlan el proceso de biolixiviación del cobre, así como el poder determinar los niveles de expresión de esos genes, entrega la posibilidad de poder monitorear las poblaciones microbianas *"in situ"* en pilas o reactores industriales de biolixiviación.

En otros estudios se han identificado genes *housekeeping* que suelen ser elegidos como genes referenciales en células eucariotas [Zhong H. y col, 1999] o procariotas [Theis T. y col, 2007] porque: son esenciales, ubicuos, no están influenciados por algún procedimiento experimental y se expresan en niveles similares en las distintas condiciones celulares [Nieto P., 2009]. Sin embargo es cada vez más claro que algunos genes comúnmente elegidos varían considerablemente entre los distintos tipos celulares a través del tiempo o debido a alguna experiencia en laboratorio [Sturzenbaum SR y Kille P, 2001]. Esto puede explicarse, en parte, por el hecho de que algunas proteínas participan en otras funciones y así como también en el metabolismo basal de la célula [Petersen BH y col, 1990] [Ishitani R y col, 1996].

El proyecto de título está enmarcado en el proyecto INNOVA 08–CM01–03 llamado: "Desarrollo de arreglos de ADN especializados para el monitoreo de transcriptomas industriales de biolixiviación".

En este proyecto se utilizarán nuevos enfoques de tipo global como la secuenciación de los genomas de algunos de los microorganismos de interés. El análisis bioinformático de diversos aspectos de su fisiología y la utilización de técnicas de biología molecular como el RAP-PCR. De esta manera se realizará un análisis de los perfiles de expresión de uno de los microorganismos modelos en biolixiviación. Esta investigación va a permitir ahondar en numerosos aspectos del metabolismo de las bacterias de biominería en cultivo y explorar sus complejas redes de regulación. El objetivo del proyecto INNOVA es monitorear la composición microbiana y sus actividades durante el proceso dinámico de biolixiviación con el fin de mejorar en el corto plazo el conocimiento del proceso, y optimizar en el largo plazo la cinética y rendimiento de recuperación de cobre. Se prevé que el producto final facilite el monitoreo en las pilas de lixiviación favoreciendo la toma de decisiones operacionales durante el proceso de biolixiviación.

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOLOGIA

Las muestras para esta investigación fueron directamente proporcionadas por minera Escondida donde se opera una pila de biolixiviación**.** La pila de biolixiviación se encuentra ubicada a 170 km al sureste de Antofagasta (figura 1.1). La pila fue construida en el año 2006 y el mineral que lo compone es: sulfuro, calcosina, covelina y calcopirita. El percolado de la pila es rico en cobre y se denomina PLS (pregnant leaching solution) el que es procesado con solventes orgánicos para la extracción del cobre, dando como resultado una solución rica en cobre y otra pobre (el refino). El refino es utilizado para irrigar la pila. La pila se divide en franjas que son aireadas e irrigadas independientemente donde se extrae el percolado (PLS) y llega a una solución común.

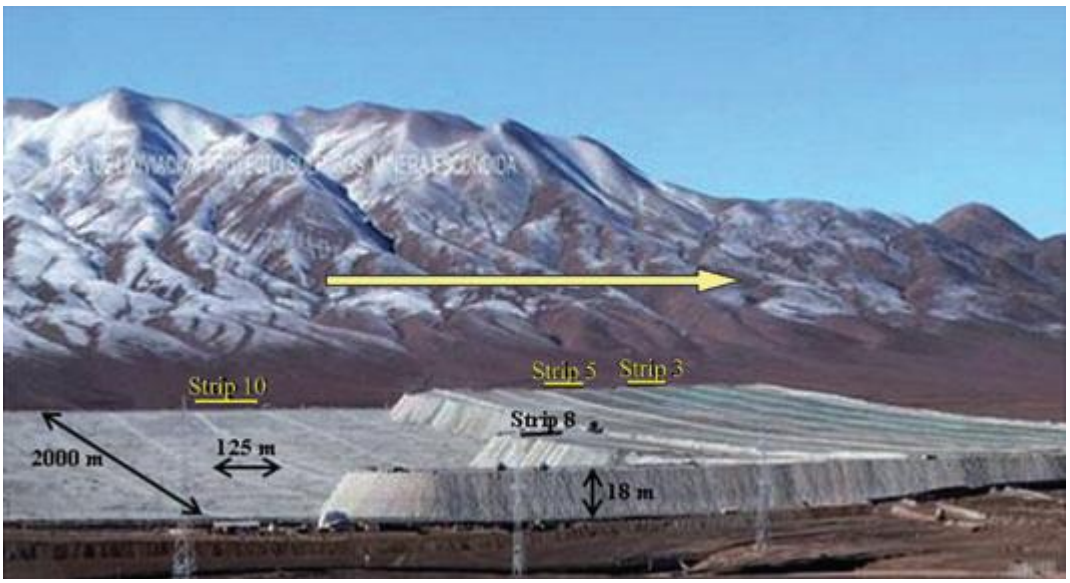


Figura 2.1: Imagen de la mina Escondida donde muestra las extensiones en metros. [Remonsellez F y col, 2009].

2.1 Biología Molecular

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizó la cepa *Acidithiomicrobium ferrooxidans*. La metodología usada se describe a continuación (figura 2.2).

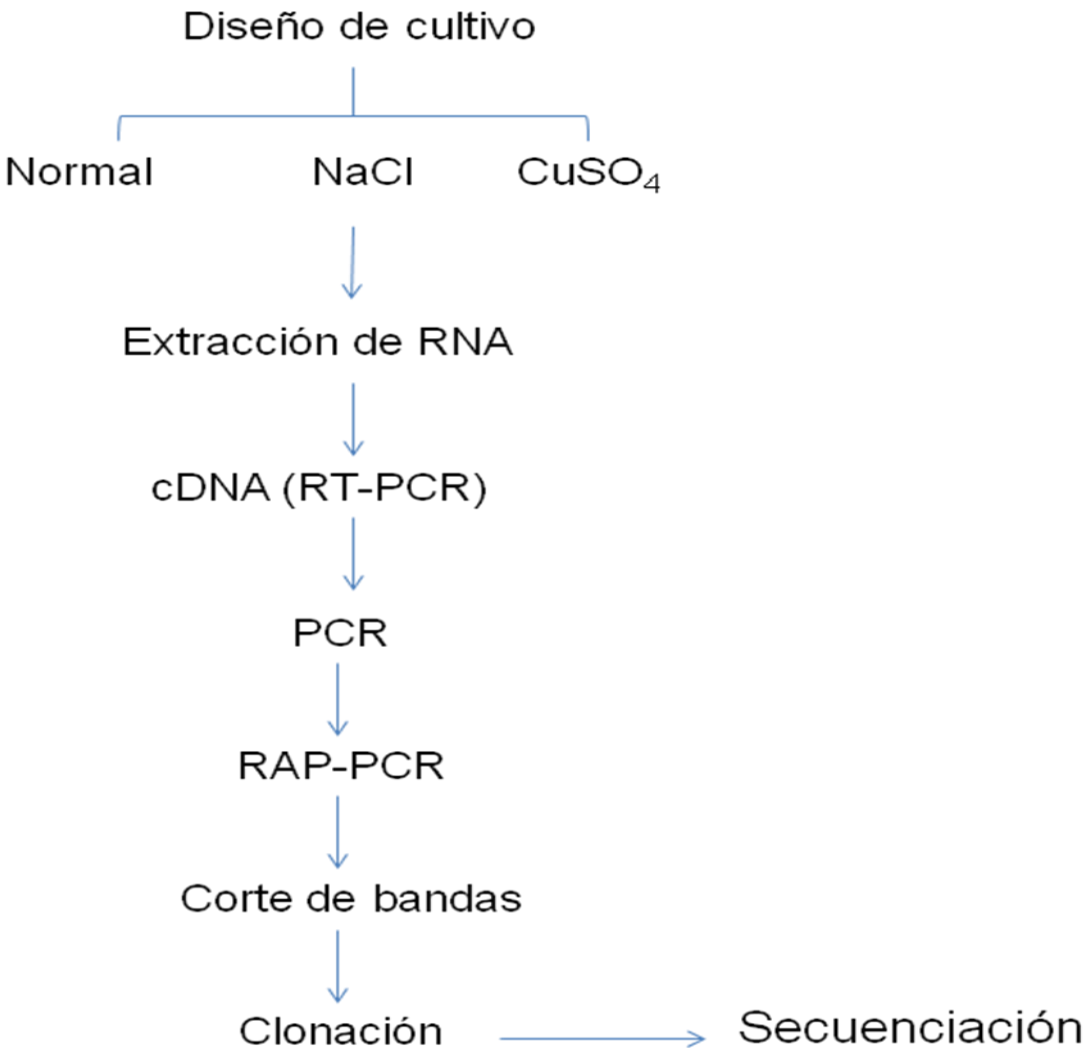


Figura 2.2: Diagrama de flujo de la metodología utilizada para el análisis de la expresión diferencial de genes en *Acidithiomicrobium ferrooxidans*.

2.1.1 Microorganismo

Se utilizó la cepa de *Acidithiomicrobium ferrooxidans*.

2.1.2 Medio de cultivo

El microorganismo se creció en medio de cultivo Simple Fuerza (SS) consistente en: 0,4 g/L $MgSO_4$ x $7H_2O$; 0,2 g/L $(NH_4)_2SO_4$; 0,1 g/L K_2HPO_4, ajustado a pH 1,7 con H_2SO_4. Se esterilizó por autoclave (121ºC por 15 min). Se ensayó la respuesta a dos concentraciones de: NaCl 50 mM y $CuSO_4$ 25 mM.

La condición normal de crecimiento consistió en el medio SS, sin agente de estrés. En los cultivos de bacterias en condiciones de estrés, se controló el crecimiento mediante conteo celular mediante microscopía óptica en contraste de fase en cámaras de conteo Neubauer (profundidad 0,001 mm).

Se consideró que las células estaban adaptadas, si el número de células en etapa exponencial tardía, llegaba al mismo orden de magnitud que las células en condiciones normales durante 3 cultivos consecutivos. Luego los cultivos adaptados se escalaron hasta 250 mL para la extracción de RNA total.

2.1.3 Colección de células

Una vez que el cultivo alcanzó la etapa exponencial tardía (densidad de células 10^8 cel/mL, aproximadamente), se procedió a colectar las células por centrifugación, con el siguiente protocolo:

1.- Las células se colectaron por centrifugación en tubos de 50 mL a 18.500 x *g* por 50 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante.

2.- Las células obtenidas se resuspendieron y se transfirieron a tubos de 1,5 mL y se centrifugó por 15 minutos a 13.226 x *g* a 4°C.

3.- Se lavaron las células 3 veces con 500 µL de medio mineral SS. Se desechó el sobrenadante.

4.- Las células se resuspendieron en tampón citrato y se centrifugaron a 13.226 x *g* a 4ºC por 15 min. Se desechó el sobrenadante. Se repitió el procedimiento 3 veces.

5.- Se resuspendieron las células en 500 µL de medio mineral SS y 500 µL de "RNA later", se rotuló y se guardó a -20°C.

2.1.4 Extracción de RNA

Se realizó la extracción de RNA con el Kit RNeasy® Bacteria Reagent de QIAGEN, utilizando la colección de células obtenidas en la etapa anterior siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.- Se centrifugaron las muestras conservadas en SS y RNA later a 5000 x *g* por 15 min. Se descartó el sobrenadante.

2.- Se agregó un volumen de 200 µL tampón TE (30mM Tris-CL, 1mM EDTA, pH 8,0), 20 µL de Lisozima15 mg/mL, más 20 µL de Proteinasa K 20 mg/mL. Con cuidado se resuspendieron las células con la pipeta. Se incubó a temperatura ambiente por 10 min y se mezcló cada 2 min.

3.- Se agregó 700 µL el tampón RTL que contiene 10 µL de β-mercaptoetanol y se mezcló con 10 µL de la muestra. Se centrifugó y se utilizó el sobrenadante.

4.- Se agregó 500 µL de etanol 100% y se mezcló.

5.- Se transfirieron 700 µL del lisado a las columnas de extracción. Se centrifugó por 15 segundos a 8000 x *g*. Se descartó el filtrado.

6.- Se adicionó 700 µL del tampón RW1 a las columnas, luego se centrifugó por 15 segundos a 8000 x *g*. Se descartó el filtrado.

7.- Se reemplazó el tubo colector por otro nuevo, se agregó 500 µL del buffer RPE en la columna. Se centrifugó por 15 segundos a 8000 x *g*. Se descartó el filtrado.

8.- Se adicionó 500 µL de tampón RPE. Se centrifugó por 2 min a 8000 x *g*.

9.- Se cambió el tubo colector por uno de 1,5 mL con tapa y se adicionó 50 µL de agua libre de RNAsa a la columna y se centrífugó 1 min a 8000 x *g*, para eluir el RNA.

10.- Se cuantificó la concentración de RNA midiendo la absorbancia a 260 nm.

2.1.5 RT-PCR

La manipulación del RNA se realizó bajo campana de flujo laminar, la cual se limpió previamente con una solución comercial de hipoclorito de sodio. Las pipetas, puntas, gradillas utilizadas se irradiaron con UV por 15 min.

1.- Se utilizó el Kit RQ1 DNAsa RNAsa libre (Promega) para eliminar el DNA contaminante. Se agregó tampón de reacción 1x, DNAsa RQ1 0,5 U, adicionalmente se agregó 10 U de RNAsin, un inhibidor de RNAsas y agua libre de nucleasa. A continuación se incubó la mezcla a 37ºC durante 30 min y al término de la incubación se adicionó 4 µl de RQ1 DNAsa solución de stop (Promega).

2.- Se preparó la mezcla de reacción que contiene: RNA total (50 ng), el partidor OPC-5 (GATGACCGCC) 10 mM y se agregó tampón RT 1x, dNTPs 10 Mm; RNAasa inhibidor 10 U, Sensiscrip transcriptasa reversa 1,0 µl. Se incubó la reacción a 37ºC por 30 min.

3.- Para generar la síntesis de cDNA se utilizaron 50 ng de RNA total y se siguieron las instrucciones del kit Sensiscrip RT (QIAGEN).

4.- El cDNA obtenido de la etapa anterior se amplificó por PCR. La mezcla de reacción fue de 20 µL volumen final. Se utilizó PCR Master Mix de Promega. Se adicionó 1µL de cDNA y 1µL del partidor OPC-5 (10 mM). La amplificación se inició con la desnaturalización a 94ºC por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94ºC por 30 s, 60ºC por 30 s y 72ºC por 1,5 min, con la extensión final de 72ºC por 5 min.

5.- Los productos de la reacción de PCR se separan mediante electroforesis en gel de agarosa (1% de agarosa, TAE 1X (242 g de Tris base, 57,1 mL de Ácido Acético Glacial y 100mL de EDTA 0,5 M) y 2,5 µL de bromuro de etidio 5 mg/mL). La electroforesis se corrió rutinariamente a 100 V por 45 min. Los geles se visualizaron exponiéndolos a luz UV en un transiluminador.

2.1.7 RAP-PCR

Para determinar la expresión diferencial de genes se realizó la transcripción reversa con el partidor random OPC-5.

1.- Obtenido el cDNA se preparó la mezcla de reacción para el PCR donde se utilizó el partidor OPC-5 y se marco con un nucleótido radioactivo [α-^{32} P] dCTP.

2.- El programa de PCR utilizado es el siguiente:

Tabla 2.1: PCR

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94ºC	2 min	
95ºC 30ºC 72ºC	2 min 2 min 1 min	5 ciclos
95ºC 35ºC 72ºC	30 s 2 min 1 min	15 ciclos
95ºC 40ºC 72ºC	30 s 2 min 1 min	20 ciclos
72ºC	5 min	

El producto de PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa.

Preparación de gel de poliacrilamida

3.- Se combinaron 75 g de Urea, 15 mL de tampón TBE 10x (Tris 108 g/L, Borato 55 g/L, 40 mL de EDTA 0,5 M) y 25 mL de solución de Acrilamida/bis acrilamida 30%.

4.- Una vez disuelto la urea se llevó a 150 mL de volumen final con agua destilada.

5.- Se filtró la solución con una membrana de 0,22 micrones de poro. Luego se desgasificó aplicando vació por 15 minutos.

6.- Se adicionó 150 µL de Persulfato de Amonio 25% a la solución y TEMED.

7.- Se cargó la cámara de electroforesis siguiendo las instrucciones del fabricante Sequi-Gen GT (Bio-Rad) para electroforesis de ácidos nucleicos.

8.- La solución de acrilamida 10% y urea 50% se cargó en una jeringa y se depositó en la cámara con cuidado de no formar burbujas.

9.- La solución de acrilamida se dejó gelificar toda la noche a temperatura ambiente. Luego se procedió a cargar las muestras.

10.- Cada 4 muestras cargadas en los carriles, se realizó una breve corrida de la muestra para evitar su difusión a los carriles vecinos.

11.- El gel se corrió a 80 W y 50 mA por 5 horas a 50ºC.

12.- Una vez finalizada la corrida electroforética, se desarmó la cámara de electroforesis y se cortó la sección del gel donde se realizó la corrida de las muestras. La sección del gel que contiene las muestras se transfirió a un papel filtro y se cubrió con papel aluza. Se colocaron marcas de referencia para identificar la orientación del gel. Después se realizó el secado del gel y se expuso en un film.

13.- El film de exposición utilizado es Phosphor Screen (Perkin-Elmer) y se visualizó en el equipo Cyclone (Perkin-Elmer).

NOTA: Se utilizó este mismo protocolo sin marcación radioactiva y el equipo de electroforesis en gel D-Code.

2.1.8 Clonamiento y Secuenciación

Las bandas obtenidas de la expresión diferencial fueron seleccionadas para clonar y secuenciar. Se realizó un nuevo PCR y el producto fue purificado para su clonación.

Las muestras fueron clonadas en pGEM-T Easy vector (Promega), de acuerdo a las especificaciones del fabricante, con mínimas modificaciones en los tiempos de incubación.

1.- Se mezcló por pipeteo suave los componentes de la reacción según se indica en la Tabla 2.1.

2.- Se incubó la reacción por 48 horas a 4ºC.

Tabla 2.2: Tabla de reacción de componentes para la ligación.

Componentes de la reacción	Reacción estándar	Control positivo
2X buffer de ligación rápida, T4 DNA ligasa	2,5 µL	2,5 µL
pGEM®-T Easy Vector (50ng)	0,5 µL	0,5 µL
Product de PCR	1 µL	-
Inserto control de DNA	-	1 µL
T4 ligasa DNA	0,5 µL	0,5 µL
Agua libre de nucleasa volumen final	5 µL	5 µL

3.- Se centrifugaron los tubos que contenían la reacción de ligación y se transfirió 2 µL a tubos de 1,5 mL y se colocó en hielo.

4.- Se transfirió 50 µL de células competentes *E. coli* JM109 en el tubo que se preparó en el paso 1.

5.- Se mezcló el tubo con un golpe y se dejó en hielo por 30 min.

6.- La mezcla de transformación se colocó en un baño con agua a 42ºC por 45 s.

7.- Posteriormente los tubos con la mezcla de transformación se colocaron en hielo por 2 min.

8.- Se adicionaron 950 µL de medio SOC (sección 2.12) a temperatura ambiente a los tubos con mezcla de trasformación.

9.- Se incubó por 1 hora y 30 min a 37ºC en agitación (150 rpm).

10.- Se inoculó 100 µL de cultivo de transformación en las placas de LB/ampicilina/IPTG/X-Gal.

11.- Las placas se incubaron a 37ºC toda la noche (20 hrs aproximadamente).

Luego de la incubación de las placas se desarrollaron colonias de color: azul que no presentan inserto y colonias blancas que contienen el inserto.

1.- Se picaron las colonias y se resuspendieron en 40 µL de tampón "*One Step*". El tampón *One Step* consiste en: sacarosa 6%, Tris 40 mM.

2.- Se usó como control negativo de transformación las colonias azules, que no contienen el inserto.

3.- Se adicionó 14 µL de fenol-cloroformo básico.

4.- Se realizó un vortex de 10 s a máxima velocidad.

5.- Se centrifugó a 11269 x *g* por 2 minutos. Se provocó una separación de fases, se utilizó la fase acuosa.

6.- Las muestras obtenidas se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa para confirmar si contenían el inserto. Se cargó en cada pocillo de 20 µL de muestra.

2.11 Protocolo para purificar DNA plasmidial

Para purificar los plásmidos con los insertos de interés se utilizó el kit QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN.

1.- Se seleccionaron las colonias con inserto y se crecieron en medio LB/ Ampicilina 100 µg/mL. Los cultivos se crecieron toda la noche en agitación y temperatura a 37ºC.

2.- Se colectaron las células por centrifugación por 2 min a 18.500 x *g*. Y se desechó el sobrenadante.

3.- Se resuspendieron las bacterias obtenidas en la centrifugación en 250 µL de tampón P1.

4.- Se adicionó 250 µL de tampón P2 y se mezcló por inversión el tubo 4-6 veces.

5.- Se adicionó 350 µL de tampón N3 y se mezcló cuidadosamente por inversión el tubo 4-6 veces.

6.- Se centrifugó por 10 min a 17.900 x *g*. El sobrenadante se transfirió a una columna y se adicionó 500 µL de tampón PB y se centrifugó 30-60 s. Se descartó el filtrado.

7.- Se adicionó 750 µL de tampón PE y se centrifugó por 30-60 s.

8.- Se descartó el sobrenadante y se centrifugó 1 min para remover el tampón de lavado.

9.- Se trasladó la columna a tubos de 1,5 mL para eluir el DNA con 50 µl de tampón EB (10 mM Tris-HCl a pH 8,5). Se dejó reposar por 1 min y luego se centrifugó 1 min a 17.900 x *g.*

10.- Se cuantificó la concentración de DNA midiendo la absorbancia a 260 nm.

11.- Se verificó la calidad del DNA obtenido corriendo las muestras en gel de agarosa. Los tubos se rotularon y se enviaron 150 µg de muestra para secuenciación. Las muestras restantes se guardaron a -20ºC. Las muestras de interés se enviaron a Macrogen donde se someten al método enzimático de Sanger para así obtener la secuencia nucleotídica.

2.1.12 Composición de tampones, soluciones y medios de cultivos

Medio LB

Se preparó el medio LB, con los siguientes componentes: Triptona 5 g, Extracto de Levadura 2,5 g, NaCl 5 g y Agar 8 g. Se disolvió con NaOH y se llevó a 500 mL con agua destilada y se ajustó pH a 7,5. Se esterilizó en autoclave (121ºC por 15 minutos). Luego, se fundió en microondas hasta que quedara totalmente homogéneo. Cuando el medio se enfrió, aproximadamente 50ºC, se agregó la ampicilina hasta una concentración final 100 µg/mL y se procedió a verter el medio en placas de Petri estériles. Se dejó gelificar a temperatura ambiente y se guardaron a 4ºC.

2.1.13 Placas de LB con ampicilina/ITPG/X-Gal

Se distribuyó por la superficie de las placas de LB con ampicilina, 100 µL IPTG 100 mM y 20 µL X-Gal 50 mg/mL y se dejaron por 30 minutos a 37ºC.

IPTG solución de stock (0,1 M)

1,2 g Isopropiol-β-D-tiogalactósido (IPTG). Se adiciona agua volumen final 50 mL. Se esterilizó por filtración y se guardó a -20ºC.

X-Gal (2 mL)

100 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-d-galactosidasa. Se disolvió en 2 mL de N, N'-dimetil-formamida. Cubrir con aluminio y guardar a -20º C.

Medio SOC (100 mL)

Se preparo el medio SOC, con los siguientes componentes: 2,0 g Triptona; 0,5 g Extracto de levadura, 1 mL NaCl 1M; 0,25 mL KCl 1 M. Se agregó la triptona, el extracto de levadura, NaCl y KCl a 97 mL de agua destilada. Se disolvió y esterilizó por autoclave y se guardó en frío. Se adicionó 1mL Mg^{+2} 2 M y 1mL de glucosa 2 M, esta a concentración final 20 mM. Finalmente, se ajusto el pH 7,0 y se llevó a 100 mL de volumen final con agua destilada.

2M de Mg^{+2} de stock (2 M)

20,33 g $MgCl_2$ x $6H_2O$

24,65 g $MgSO_4$ x $7H_2O$

Se adicionó agua destilada y se esterilizó por filtración.

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 *Acidithiomicrobium ferrooxidans*

3.1.1 Extracción de RNA

De la extracción de RNA total se obtuvo la siguiente cuantificación por el método de espectrofotometría a 260 nm (Tabla 3.1)

Tabla 3.1: Cuantificación por espectrofotometría a 260 nm de *A. ferrooxidans*

	Condiciones	µg/mL
Acidithiomicrobium ferrooxidans	Normal	78,3
	NaCl	9,0
	$CuSO_4$	17,1

3.1.2 RT-PCR y Síntesis de cDNA

El RNA extraído y tratado con DNAasa I obtenido de las condiciones de cultivos señalados, se utilizó para realizar el RT-PCR para generar la síntesis de cDNA. Las muestras fueron amplificadas utilizando el partidor OPC-5, y el resultado se muestra en la Figura 3.1.

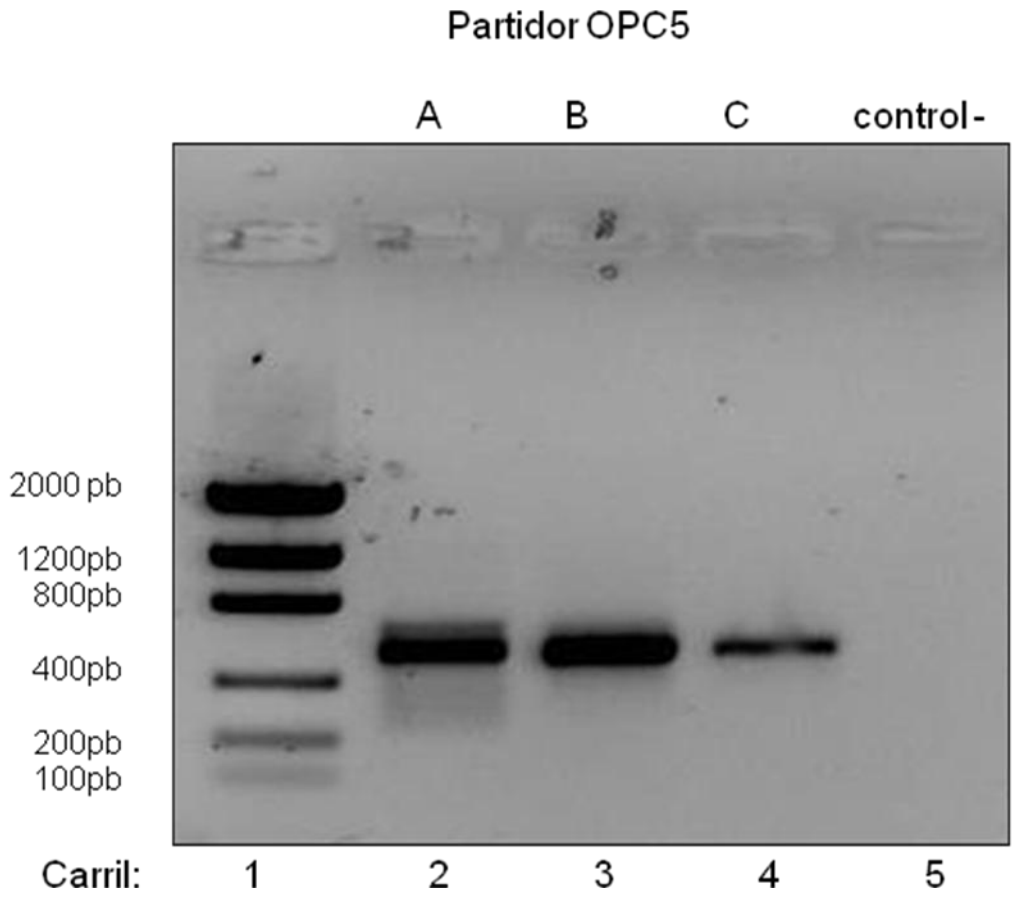


Figura 3.1: Producto de amplificación por RT-PCR de los cDNA de las condiciones: normal (A), 50 mM de cloruro de sodio (B), 25 mM de sulfato de cobre (C), con el partidor OPC5. Electroforesis en gel al 1% de agarosa corrido a 100 V por 45 minutos. El marcador de peso molecular está presente en el carril 1.

Se realizó un experimento preliminar para determinar el o los partidores adecuados para amplificar el RNA de *A. ferrooxidans*, donde fueron utilizados los partidores OPC (1-20) y DNA genómico como templado. Los resultados de los amplificados por PCR mostraron que OPC-5 podría ser utilizado en la generación de cDNA y posterior PCR.

No se posee ninguna información del tamaño del amplicón. Los obtenidos son aproximadamente de 400 a 800 pb. La falta de amplificado en el carril del control negativo indica que las muestras no estaban contaminadas con DNA genómico.

3.1.3 Experimentos de Expresión Diferencial de genes RAP-PCR

Para determinar la expresión diferencial de genes y entender el funcionamiento del metabolismo en las distintas condiciones de crecimiento, se realizó la marcación radioactiva del amplificado de PCR del cDNA con [α-^{32} P] dCTP.

En la Figura 3.2 (A, B y C) se muestra el revelado de los geles con el cDNA marcado de la muestra de *Acidithiomicrobium ferrooxidans*. Se observa que la marcación radioactiva es más sensible que sin marcación radioactiva (imagen B).

La imagen A de la Figura 3.2, es el revelado utilizando en el equipo Sequi-Gen GT (Bio-Rad) en cambio en la imagen B se observa el revelado con la misma composición del gel en el equipo de D Code (Bio-Rad). La diferencia es el marcado radioactivo entre los dos geles, donde la marcación radioactiva es más sensible (imagen A). Se observan distintas intensidades en las bandas obtenidas, porque la técnica RAP-PCR es sensible para una cantidad pequeña de DNA marcado. Se cortaron 33 bandas de los resultados obtenidos en la Figura 3.2 imagen B. Los genes inducidos o reprimidos representados en el gel son desconocidos.

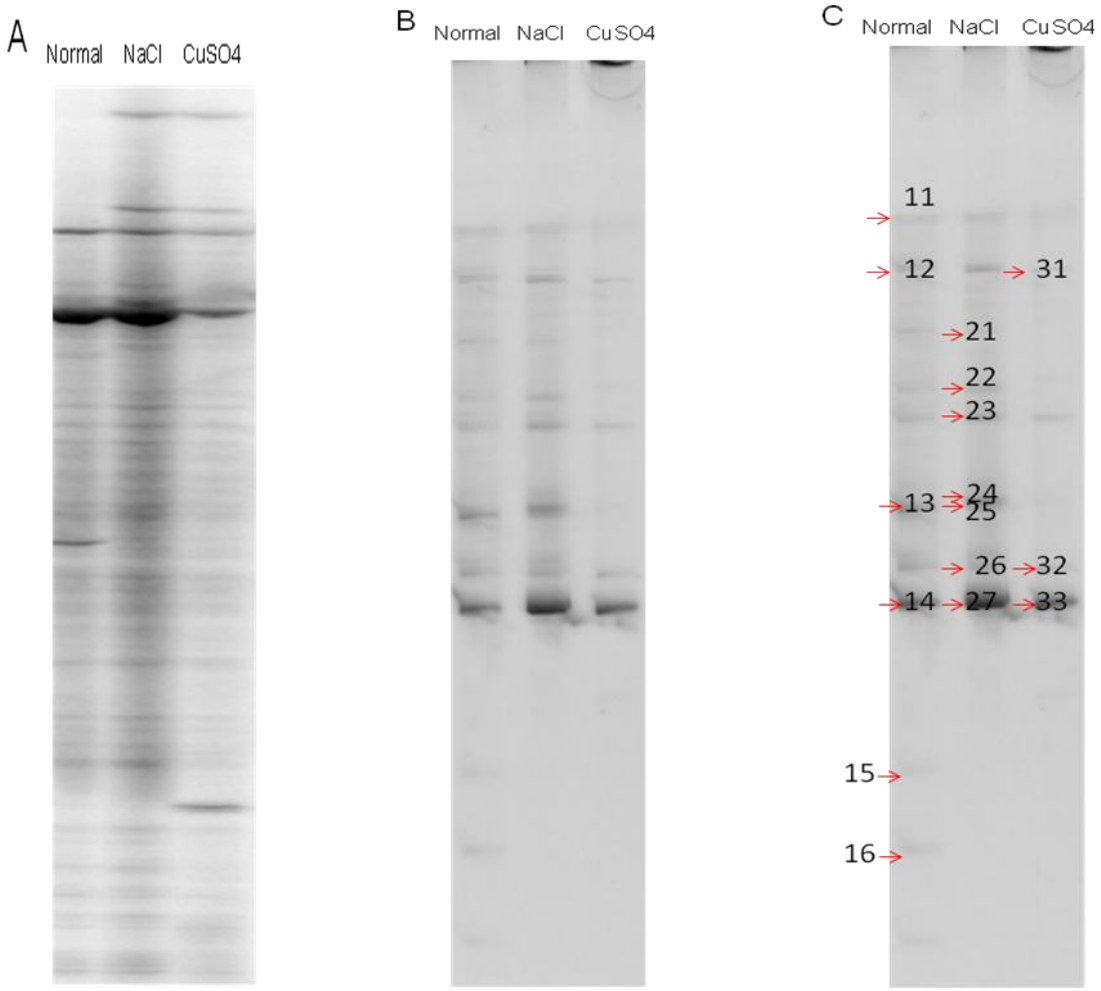


Figura 3.2: Revelado del gel cDNA de *A. ferrooxidans*. A: gel revelado de RAP-PCR, con las muestras marcadas con radioactividad. B: revelado del gel en el equipo de D Code sin marcado radioactivo. Las flechas indican la represión o inducción de los productos de RAP-PCR. C: se muestran los cortes de bandas que se realizaron en el gel (equipo de D Code). Condiciones: normal, 50 mM de cloruro de sodio, 25 mM de sulfato de cobre.

Se cortaron las bandas más significativas del gel B (Figura 3.2, imagen C) para realizar un PCR de reamplificación con OPC-5 (Figura 3.4). En la figura 3.2, imagen C se enumeran las bandas cortadas donde se obtuvo reamplificado con OPC-5. De este PCR se obtuvieron 13 amplificados de las 33 bandas cortadas (Figura 3.4). Una vez purificado el DNA se clonaron y secuenciaron.

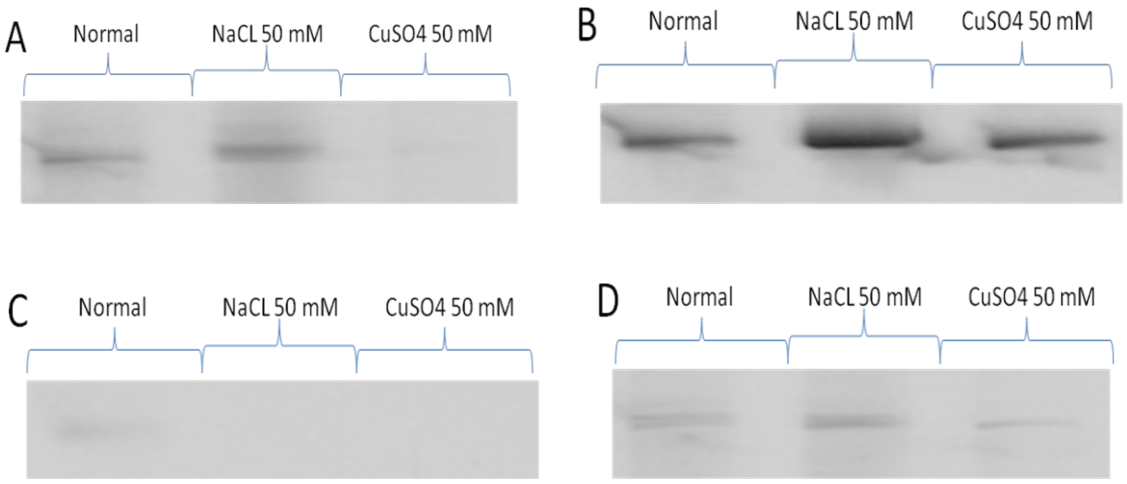


Figura 3.3: Diferenciación de expresión de genes en condición de cultivo: normal, NaCl y $CuSO_4$.

En la figura 3.3 se señalan como ejemplo genes que se expresan diferencialmente bajo la condición: normal, NaCl y $CuSO_4$. En la condición normal el microorganismo está en un cultivo donde su fuente de energía es el $FeSO_4$ [Clum A. y col, 2009]. Esto se obtuvo del equipo D Code sin marcado radioactivo. En la Figura 3.3 se muestra genes diferenciados elegidos como los más representativos de la Figura 3.2 imagen B. En la imagen A de la Figura 3.3, se muestra que con $CuSO_4$ no hay expresión del gen, lo que indica que la bacteria está sometida a un nivel de estrés comparado con el de cultivo normal y con NaCl. En la imagen B y D de la Figura 3.3, se expresan por igual los genes en las tres condiciones de cultivo, la diferencia es que la intensidad de la banda es débil en la imagen D de la Figura 3.3. Esto indicaría que son genes importantes, que siempre se expresan, independientemente de la condición de ensayo en que se presente la bacteria.

En la imagen C de la figura 3.3 se observa que en la condición normal se expresa un gen diferenciado, dada la presencia de mRNA en el medio de cultivo de $FeSO_4$ que es una condición normal del cultivo. En cambio, en las condiciones con NaCl y $CuSO_4$ no se observa amplificado lo que indica que no hay presencia del mRNA. Por lo tanto este gen se reprime en las condiciones de estrés ensayadas.

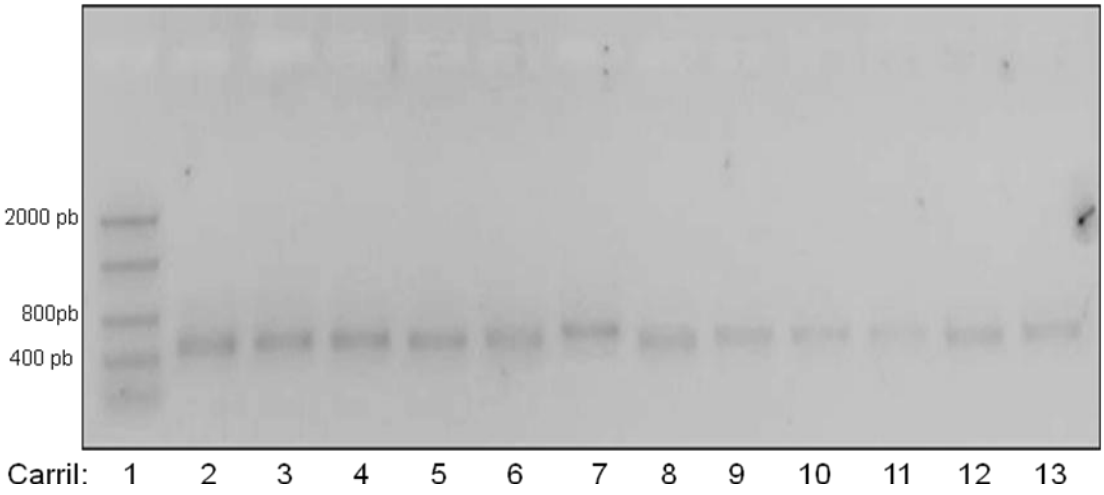


Figura 3.4: PCR de bandas cortadas del gel de la D Code para clonación. El carril 1 presenta el peso molecular.

3.1.4 Clonación

Las bandas de PCR recortadas fueron utilizadas para clonar en pGEM-T, los cuales a su vez se usaron para transformar células quimiocompetentes de *E.coli*. Después de 18 hrs, en las placas incubadas a 37ºC se obtuvieron colonias. Estas se eligieron en base al color de las colonias por la eficiencia en la transformación. El color blanco es debido a que han recibido el plásmido con el inserto, dado que tienen interrumpido el gen *lacZ* y no brindan color azul en presencia de X-Gal e IPTG. Las colonias azules son el resultado de haber sido transformadas con

plásmido sin inserto (Figura 3.5). No se sabe que fragmento de DNA se clonó en los plásmidos y tampoco se sabe que se clonó.

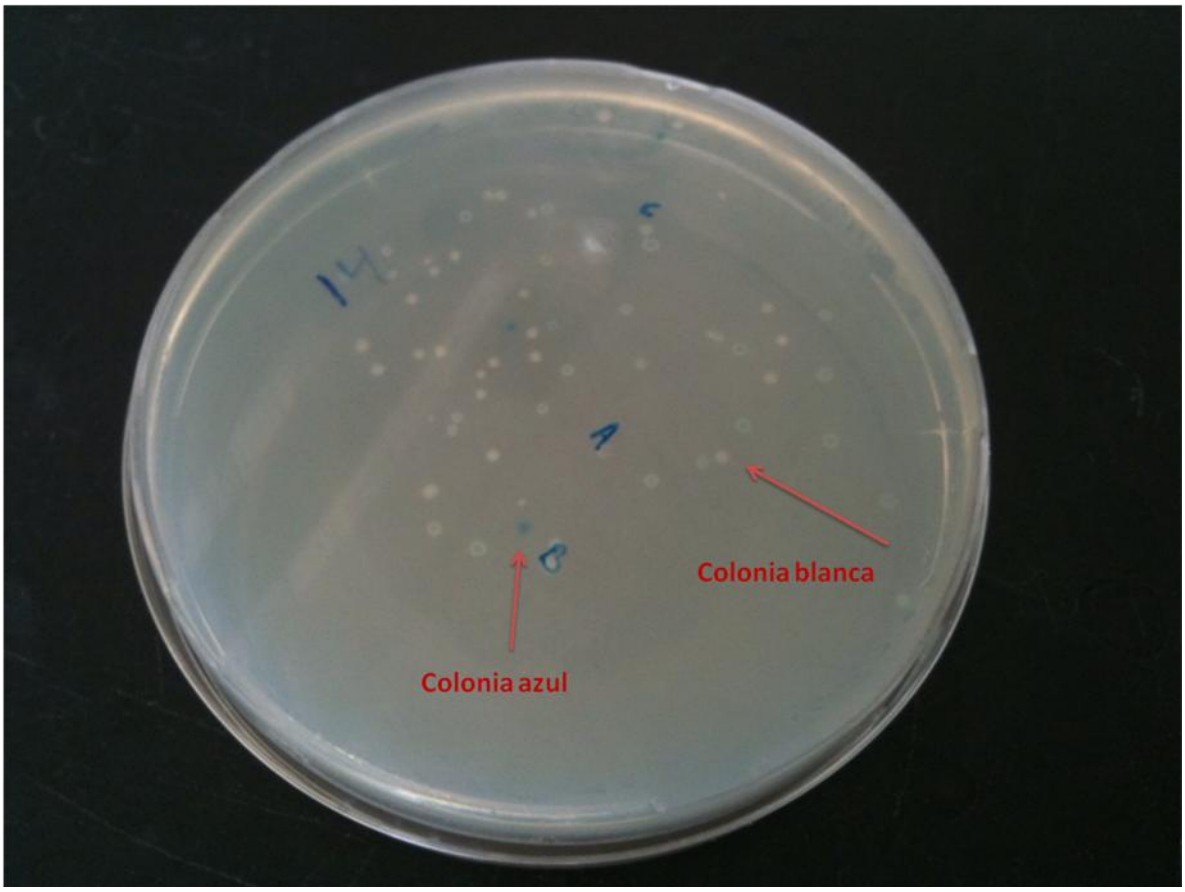


Figura 3.5: Placas de petri con LB/Ampicilina/X-Gal/IPTG, en el cual se desarrollaron colonias: azules y blancas.

Se eligieron 3 colonias azules (señalado en la Figura 3.5 como A, B y C) por cada placa que pertenecía a una banda específica. Se realizó la verificación del inserto por el protocolo "*One Step*" en el gel de agarosa. El resultado se muestra en la Figura 3.6, donde se obtuvieron 32 colonias positivas de las 35 colonias seleccionadas. En el carril 1 del gel se observó el producto de una colonia azul utilizada como control negativo. Se observó una leve diferencia en el

desplazamiento de la muestra proveniente del control negativo correspondientes a las colonias azules con respecto a las colonias blancas.

En la Figura 3.6 se observaron bandas que pertenecen a 23S y 16S, estos se obtienen por la utilización de un sistema crudo de extracción que separa los ácidos nucleicos (DNA genómico, plásmidos, rRNA y mRNA) en la fase acuosa mientras que las proteínas y la membrana va a la orgánica. Se utilizó la fase acuosa para observar por gel de agarosa si contenía el inserto o no. Se pudo observar el DNA plasmidial con el inserto como la banda de mayor tamaño al compararla con el control de menor tamaño que sólo tiene el DNA plasmidial.

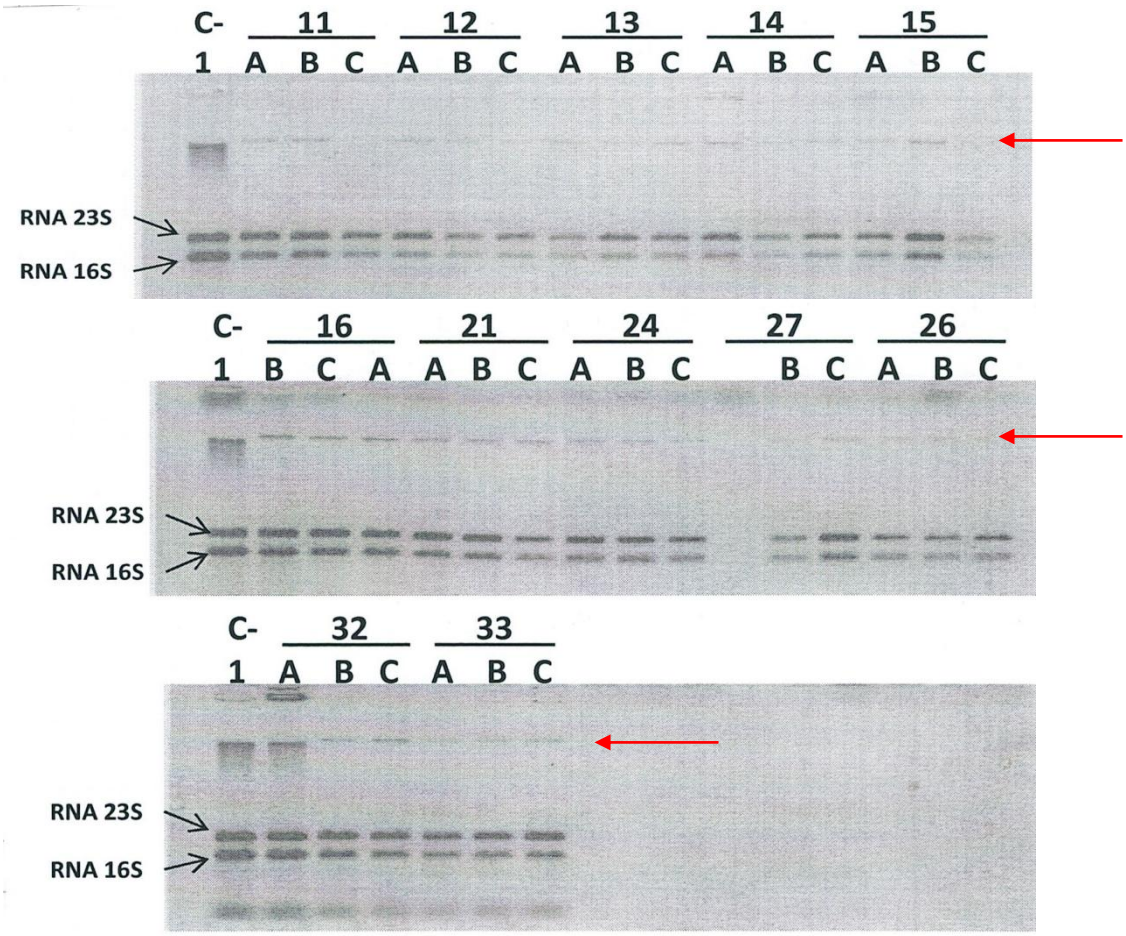


Figura 3.6: Se realizó el protocolo de "*One Step*" para la verificación del inserto. Los números son las bandas obtenidas en RAP-PCR. A, B y C indican las tres colonias elegidas de cada placa de petri donde se desarrollaron las colonias blancas y azules. El carril 1 es control negativo que usa como templado una colonia azul. Revelado en gel de agarosa 1%. La flecha roja indica el plásmido que contiene el inserto. Los números señalados en la parte superior son los mismos designados en la Figura 3.2 imagen C.

Se eligió una muestra para purificar el plásmido y luego se envió a secuenciar a Macrogen por el método de Sanger.

Al obtener la secuencia y hacer el análisis con el programa BLAST de la NCBI http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ sólo se obtuvieron secuencias con homología al gen de la subunidad menor del ribosoma 16S. Esto significa que el partidor OPC-5 se alineó a los sitios conservados del 16S. Se verificó que pertenecían a *Acidithiomicrobium ferrooxidans sp*. P2 (GenBank: GQ225721.1, NCBI) por herramientas bioinformáticas.

3.2 Contextos genómicos de genes obtenidos por DIDI

Las secuencias obtenidas de las bandas extraídas del gel de DIDI de soluciones de pilas industriales de lixiviación con diferente tiempo de operación corresponde a tres especies de microorganismos dos bacterias y una arquea: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferriphilum* y *Ferroplasma sp*.

a) Mercurio reductasa ***merA*** (Hg^{+2} reductasa) [*A. ferrooxidans*]

b) Subunidad I del tipo bd ubiquinol oxidasa ***cydA*** [*A. ferrooxidans*]

c) DNA-directed RNA polimerasa, subunidad beta ***rpoC*** [*A. ferrooxidans* ATCC 53993]

d) DNA girasa, A subunidad ***gyrA*** [*A. ferrooxidans* ATCC 53993]

e) Metionina aminopeptidasa, tipo I ***map*** [*A. ferrooxidans* ATCC 53993]

f) Endonucleasa III ***nth*** [*A. ferrooxidans* ATCC 53993]

g) Componente putativo del proteosoma ***pup2*** [*Leptospirillum sp.* Grupo II UBA]

h) Proteína hipotética Faci_03000178 ***hyp***[*F. acidarmanus* fer1]

i) Proteína hipotética Faci_03001025 ***cydA***[*F. acidarmanus* fer1]

j) Proteína hipotética Faci_03001596 ***merA*** [*F. acidarmanus* fer1]

Se investigó el contexto genómico de los genes obtenidos dentro del metabolismo bacteriano, utilizando la información disponible en diferentes bases de datos.

Se consultó el genoma de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en página web pública [*A. ferrooxidans* ATCC53993]. El genoma de *Leptospirillum ferriphilum* se consultó en una base de datos propia del Centro de Biotecnología Alberto Ruiz.

La arquea identificada como *Ferroplasma sp* no es un microorganismo aislado y caracterizado. Debido a esto se empleo el genoma mas cercano disponible y que corresponde a *Ferroplasma acidarmanus* fer1.

DISCUSION

3.3 Patrones de expresión de *Acidithiomicrobium ferrooxidans* en condiciones de estrés

Acidithiomicrobium ferrooxidans P2 (GenBank: GQ225721.1, NCBI) al ser sometida a diferentes concentraciones de NaCl y $CuSO_4$ y ser comparado con la condición normal. Evidencia respuestas en la expresión génica de la bacteria a las condiciones de estrés sometida (Figuras 3.2 y 3.3). Hay evidencias que los microorganismos expresan o reprimen ciertos genes cuando se ve en una situación de estrés [Bruins M. R y col, 2000], produciendo proteínas para generar respuestas en cascada para compensar el estrés que se genera al interior de la célula [Scott J., 1995]. Existen reportes de que bacterias son capaces de tolerar la concentración de NaCl o $CuSO_4$ por varias generaciones de cultivo [Scott J., 1995]. En la investigación realizada por Campos L. y col, 2002 se observó la expresión diferencial de genes en respuesta al cobre en *Acidithiobacillus ferrooxidans*. El cultivo fue sometido a 200 mn de $CuSO_4$ usando RAP-PCR [Welsh J y col, 1992] y mRNA *Differential Display* [Liang G y Pardee A.B, 1992]. En ese estudio se obtuvo productos con altos niveles de inducción y represión en presencia y ausencia de sulfato de cobre. Los genes inducidos o reprimidos con este metal aún se desconocen [Campos L. y col, 2000]. En este trabajo bajo ciertas condiciones de estrés no hubo amplificado en los genes expresados en forma diferencial, posiblemente indicando que no hay RNA o la cantidad transcrita de RNA era muy pequeña para ser amplificable. Esto podría estar relacionado con una escasa o inexistente actividad metabólica de *Acidithiomicrobium ferrooxidans* P2 que no tolera concentraciones superiores a 25 mM de $CuSO_4$ y 50 mM de NaCl.

En la técnica RAP-PCR se observan distintas bandas correspondientes al amplificado del cDNA por PCR que muestran un mismo patrón, aunque en distintas

intensidades y esto es por la expresión de genes (Figura 3.2). Por tanto, es una disposición (*display*) en que las bandas que se comparan se encuentran alineadas, lo que permite determinar con relativa facilidad la existencia de diferencias de intensidad [Liang G y Pardee A.B, 1992] como se muestra ocurre en la Figura 3.2. Cada banda corresponde a un cDNA que procede de un RNA, y se asume que existe una relación entre la intensidad de una banda y la cantidad correspondiente de RNA de cada muestra problema [Liang G y Pardee A.B, 1992]. Entonces, se puede asumir que la diferencia en la intensidad de las bandas representa una diferencia en la expresión de un determinado gen.

La técnica de RAP-PCR es eficiente por el alto número de productos aislados y alto porcentaje de genes expresados diferencialmente confirmados. Estos genes son muchas veces responsables de alguna respuesta metabólica. En esta experiencia no fue posible obtener el aislamiento de los genes expresados en forma diferencial esperados, dado que sólo se pudo obtener el gen 16S rRNA, que se considera un gen estable y constitutivo que se expresa en cualquier condición que la bacteria esté presente [Quintero Y. y col, 2006].

En la Figura 3.3 (B y D), se podría especular que muestran genes *housekepping*, por expresarse en las tres condiciones de cultivo que se sometió la bacteria. Los genes *housekeeping,* se expresan en forma constitutiva y están presentes en eucariotas [Zhong H. y col, 1999] y procariotas [Theis T. y col, 2007]. En estudios de expresión génica se recomienda utilizar este tipo de genes [Quintero Y. y col, 2006] preferentemente genes *housekeeping*, rRNA o cuantificar con precisión el RNA total [Nielsen KK y Boye M, 2005] para obtener un resultado óptimo. Los genes *housekeeping* son esenciales, no están regulados o influenciados por algún procedimiento experimental y se expresa en niveles similares en diferentes tipos de células [Nieto P. y col, 2009]. Esto se podría explicar por el hecho que los genes *housekeeping* participan en funciones como en el metabolismo basal de la célula. Esto podría ser posible para los genes aislados en este trabajo, pero aún no se puede confirmar dicha información arrojada por la RAP-

PCR. Para confirmar esta hipótesis el próximo paso sería comprobar por medio de una cuantificación por qPCR [Remonsellez F y col, 2007] o Northen Blott si realmente son genes *housekepping*. Para utilizarlos en algún estudio en particular es recomendable utilizar más de un gen *housekepping* [Vandecasteele SJ y col, 2001]. En esta investigación no se realizó este análisis, pero si se podrían considerar los genes encontrados de 16S como genes esenciales dentro de la célula.

Hubo dificultades en la interpretación de las diferencias de cultivo de crecimiento: normal y estrés analizadas en el gel de RAP-PCR. Esto se debe a que en la corrida del gel existe una separación de los cDNA amplificados basado en el tamaño, por lo que cuando se recorta una banda es posible que se seleccione más de un cDNA. Cuando se procedió a clonar el supuesto producto único en un plásmido y se obtuvieron una serie de colonias que incorporaron el inserto, en realidad lo que se tiene una representación real de todos los insertos posibles.

Si al realizar una RT-PCR se utiliza RNA total, existe una elevada probabilidad de aparición de bandas de cDNA procedentes de RNA ribosómico (rRNA), puesto que esta fracción representa más del 90% del total de RNA, en cambio el mRNA es sólo 3% a 5% del RNA total [Jiménez L. F, 2003]. En este trabajo, se empleó RNA total, la especificidad de la extracción no nos aseguró obtener un RNA limpio y siempre quedó una proporción alta de rRNA en la muestra, como se observó en la secuenciación [Nagel A. y col, 2001].

En investigaciones anteriores, cuando es utilizado el RNA de procariotas, hasta el 40% de las bandas de expresión diferencial identificadas son de origen ribosomal [Nagel A. y col, 2001]. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo mediante el uso de partidores aleatorios seleccionados demuestran que el método no fue eficaz, ya que el análisis mediante herramientas bioinformáticas entregó que el 100% de los genes diferencialmente clonados pertenecían al 16S rRNA. Esto se pudo deber a la alta proporción de rRNA comparado con la de RNAm

del RNA total. Adicionalmente la transcripción de los procariotas no contiene la cola de poli A por que la transcripción y traducción es simultánea y el mRNA se fragmenta rápidamente y es inestable [Nakazato H. y col., 1957]. Debido a que el RNA es inestable, la separación del mRNA del RNA total es difícil [Botero L.M y col, 2005]. El partidor utilizado puede haber reconocido al rRNA, que constituye la mayor fracción de RNA en las muestras, evitando así la conversión eficiente de la pequeña porción de mRNA en el DNA [Frias-Lopez J y col, 2004]. La falta de éxito para encontrar otros genes expresados diferencialmente, además del 16S rRNA, puede deberse también por la elección del partidor al azar OPC5 y que este se alineó justamente con el gen 16S y no con otros posibles blancos.

Existen reportes recientes que los niveles transcripcionales del gen rRNA 16S de *Acidithiomicrobium ferrooxidans* es un indicador de la actividad fisiológica [Parro y col, 2007]. Reportes de diferencias en la actividad metabólica se ha visto reflejado en los variaciones de los niveles de rRNA [Galleguillos P y Col, 2008]. Un antecedente de esto es que los niveles transcripcionales de rRNA 16S son más elevados en muestras afectadas entre otros factores, con una elevada actividad de oxidación de fierro [Galleguillos P y Col, 2008]. Existen, así mismo, evidencias de la expresión diferencial del gen 16S rRNA bajo condiciones tóxicas para el organismo en estudio [Arukwe, 2006]. Estos reportes podrían dar otra explicación posible para la expresión diferencial del gen 16S rRNA obtenidas mediante RAP-PCR.

3.4 Contextos genómicos

Obtenidos los resultados de las herramientas bioinformáticas con las secuencias obtenidas en la DIDI, se puede visualizar la secuencia del gen que está involucrado en una unidad transcripcional. Esto no significa que el operón tenga una función única y complementaria con los genes presentes. Ya que en algunos casos estos genes codifican proteínas que no interactúan entre sí.

Organización genética propuesta de los genes funcionales aislados.

Flechas de las figuras diseñadas indican el sentido de la transcripción propuesta de los operones de los genomas de *Acidithiobacillus ferrooxidans, Leptospirillum ferriphilum* y *Ferroplasma acidarmanus*.

Operón de Resistencia a Mercurio (*Acidithiobacillus ferrooxidans*)

Figura 4.1: Operón denominado MER de *A. ferrooxidans.*

En la figura 4.1, se muestra el operón MER formado por los genes que están relacionadas con resistencia, transporte y reducción de mercurio. La enzima MerC es una proteína transmembrana que están presente en bacterias Gram negativas. La función de MerC es tomar los iones de Hg^{+2} del interior al exterior de la célula mediante un mecanismo desconocido. La proteína producida por el gen *merA,* está presente en el citoplasma, utiliza NADPH donando electrones, para la reducción de mercurio. MerD reprime la transcripción del operón MER. El producto

del gen *cga* está involucrado en rutas metabólicas de la sacarosa, el almidón y biosíntesis de NADPH. Se podría especular que está relacionado con la biosíntesis de NADPH requerido por MerC.

El operon MER es un sistema de resistencia estudiado ampliamente. Estos genes regulan el mecanismo de desintoxicación por el que las bacterias reducen enzimáticamente el Hg^{+2} a mercurio metálico volátil [Komura I y Izaki K, 1971] [Summers A.O, 1986] [Misra T.K, 1992] [Osborn A.M y col, 1997].

Se ha estudiado más a fondo el operón MER en *E.coli* donde se encuentran más genes en la unidad transcripcional, con diferentes funciones dando así una respuesta en cascada para la resistencia a mercurio [Hobman J. y col 2005]. En cambio, en *A. ferrooxidans* ciertos genes no están, pero el sistema funciona cumpliendo el objetivo de expulsar el mercurio reducido por difusión directa hacia el exterior de la célula [Barreto M. y col 2003].

Contexto del gen *cydA* de Energía o Fijación de nitrógeno (*A. ferrooxidans*)

Figura 4.2: Entorno de genes de *cydA* de *A. ferrooxidans.*

En la Figura 4.2 los genes presentes están relacionados con trasportadores de electrones, específicamente citocromos y proteínas transmembrana.

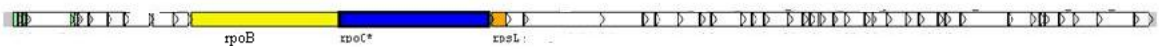
Los siguientes genes *cydA* y *cydB* codifican para citocromos subunidad I y subunidad II. Son proteínas de producción y conversión de energía y están acompañados por un gen hipotético que codificaría para una proteína con péptido

señal (*hyp*) [Kolker E. y col, 2004]. En estudios realizados a *A. ferrooxidans* se ha observado que la fuente de energía y las condiciones de estrés regulan la expresión de los citocromos. [Paulino L.C y col, 2002] [Loiseau S. y col, 2003] [Brierley C.L, 2001]. Los genes que codifican para las proteínas de transporte de electrones podrían representar buenos candidatos para supervisar la actividad de la oxidación y condiciones de estrés en el proceso de biolixiviación [Galleguillos P. y col, 2008].

El gen *gloB* codificaría a una metalo-proteína de la familia de las β-lactamasas, que participa en la formación de glutatión [Carfi A y col, 1995] [Neuwald A F y col, 1997]. No hay relación conocida directa entre éste y los demás genes.

Operón de Transcripción y Traducción (*A. ferrooxidans*)

A



B

Figura 4.3: A, operón de traducción y transcripción. B, genes analizados.

En la Figura B, se presenta *rpoB*, es un gen altamente conservado y que codifica para una proteína que pertenece a la subunidad beta de la RNA polimerasa. Aguas arriba se encuentra *rpoC* que pertenece a la subunidad beta prima de la RNA polimerasa (información proporcionada por NCBI) y aguas abajo de *rpoC* está el gen *rpsL* que codifica para la proteína ribosomal S12.

Las investigaciones realizadas en este operón, muestran que posee una expresión estable [Nieto P. y col, 2009]. Se podría decir que son genes candidatos a *housekeeping.* Porque este operón no varía: ni en el tiempo ni por las condiciones de crecimiento [Nieto P. y col, 2009]. El operón contiene varios genes como se muestra en la figura A. Sólo se analizaron 3 genes: *rpoB*, *rpoC* y *rpsL*, figura B.

Operón de Replicación, Biosíntesis de Aminoácidos y Degradación de Proteínas (*A. ferrooxidans*)

Este operón se compone de 25 genes como se muestra en la Figura 4.4 obtenida del programa de visualización de genoma Artemis [Rutherford K, 2000]. Los genes se clasificaron por función.

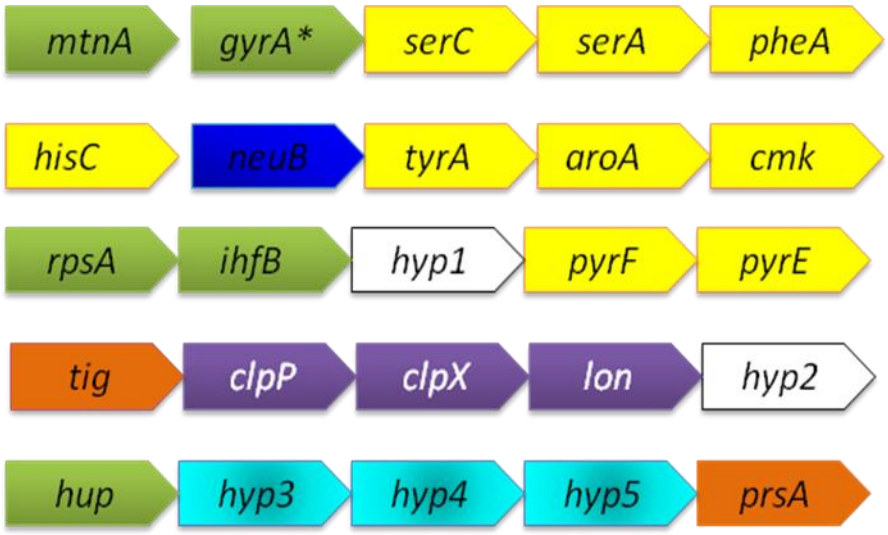


Figura 4.4: Operón *gyrA* de *Acidithiobacillus ferrooxidans.*

Tabla 4.1: Identificación de genes según su función denominadas por un color

Color	Función
Amarillo	Síntesis de aminoácidos (ver tabla 4.2)
Verde	Proteínas implicadas en la traducción y replicación de la célula
Azul	Proteína implicada en respuesta de estrés
Calipso	Proteínas hipotéticas con péptido señal tipo Sec
Naranja	Proteína chaperona
Blanco	Proteínas hipotéticas
Morado	Degradación de proteínas

Tabla 4.2: Resumen de rutas biosintética de aminoácidos donde participarían los genes del operón gyrA.

Gen	Gly	Cis	Ser	Thr	Phe	Tyr	His	Trp	Pirimidinas
serC	✓	✓							
serA	✓		✓	✓					
pheA					✓	✓			
hisC				✓	✓	✓	✓	✓	
tyrA					✓	✓		✓	
aroA					✓	✓		✓	
cmk									✓
pyrF									✓
pyrE									✓

El operón completo se divide en diferentes funciones específicas pero la información que disponemos no permite determinar si algunos de los productos del operón interactúan entre sí, o bien independientemente en vías metabólicas diferentes como se observa en las tablas 4.1 y 4.2.

Operón de Regulación (*A. ferrooxidans*)

Se denominó operón de regulación por que sus unidades transcripcionales participan en la regulación transcripcional. Por lo tanto, *glnD* (Figura 4.5) codifica para una proteína reguladora, cuando se halla exceso de nitrógeno en el entorno

[Bueno R, 1985]. Está muy relacionada con la proteína *GlnD*, esta es una enzima que participa en tres vías metabólicas: síntesis de glutamato, porfrinas y la biosíntesis de aminoacil-tRNA. Siguiendo con el gen *map*, que codifica para una proteína que pertenece a la familia metionil aminopeptidasa del tipo I y es responsable de la eliminación de los aminos terminales (iniciador) metionina de las proteínas nacientes citoplasmáticas, se considera un gen candidato referencial [Nieto P y col 2009]. El producto del gen *sfsA* está relacionada a la fermentación de azúcares, maltosa. No se conoce la relación de los genes que trabajen en conjunto.

Figura 4.5: Operón de regulación de *A. ferrooxidans.*

Operón Nucleasa/Sintasa (*A. ferrooxidans*)

La endonucleasa III denominada Nth corta de 5-8 bases antes y después de la secuencia que reconocen. Necesitan ATP para moverse a través de la molécula de DNA, desde el lugar de reconocimiento hasta el sitio del corte. Tienen actividad de restricción y metilan el DNA (Figura 4.6).

Figura 4.6: Operón de nucleasas/sintasa de *A. ferrooxidans*

El operón se compone también de un gen codificador para una exonucleasa que tiene como estructura una beta lactamasa, nombrada YSH1. Esta proteína participa en el procesamiento del RNA, se presume que participa en la traducción o en la biogénesis de los ribosomas. [Ullah JH y col, 1998] [Chen J y Moore C., 1992]

El primer gen designado *glgA* codificada para una sintasa, es donante del almidón del tipo glucosa ADP en el metabolismo del almidón y la sacarosa (información obtenida en la NCBI). Además, en el centro del operón está posicionado un gen que codificaría para una proteína hipotética, *hyp* [Kolker E. y col, 2004]. Nuevamente, no hay una relación en conjunto de los productos génicos presentes en este operón.

Operón Proteosoma (*Leptospirillum ferriphilum*)

Se detectaron las primeras proteínas como componentes del proteosoma presentando la primera evidencia del sistema proteolítico en una bacteria Gram negativa [De Mot. R, 2007]. *L. ferriphilum* pertenece al grupo II según árboles filogenéticos basados en 16S rRNA [Aliaga D. y col, 2009].

La función principal del proteosoma es degradar proteínas dañadas o no necesarias, mediante proteólisis. Este mecanismo se activa cuando hay un desequilibrio causado por estrés oxidativo, regulación de la expresión génica o ciclo celular. Hay que destacar, que hace pocos años atrás se descubrió la existencia de proteosoma en procariotas. El mecanismo de cómo actúa, no se conoce del todo.

El proteosoma se compone por 2 complejos estructurales distintos que a su vez se subdividen en múltiples subunidades proteicas. El núcleo 20S consiste en 4 anillos heptagonales apilados, compuestos por dos subunidades, α de función

estructural y β de función catalítica. Los dos anillos exteriores están compuestos de subunidades α, que sirven de anclaje a las partículas reguladoras y sirven de acceso evitando la entrada arbitraria de proteínas a la cavidad interior. Los dos anillos internos, compuestos de subunidades β, albergan los sitios activos de las proteasas que realizan las reacciones catalíticas dejando un extremo amino con una tirosina reactiva hacia el interior, que es el residuo que lleva a cabo la degradación de proteínas. El tamaño de los proteosoma es relativamente conservado y suele ser de 150 a 115 Å. La cámara interior es de 53 Å de ancho, aunque la entrada puede ser de casi 13 Å, dando a suponer que los substratos proteínicos deben ser desdoblados para poder entrar [Peters JM, 1994].

En esta unidad transcripcional, todos sus genes componen diferentes partes del proteosoma, como PrcA y PrcB forman parte del proteosoma 20S subunidad α y β respectivamente [De Mot. R, 2007]. Tienen funciones estructural y catalítica. Los otros genes en el entorno son componentes putativos del proteosoma como *pup1* y *pup2* y un gen hipotético que codificaría para una proteína sin función conocida denominada *hyp2* [Kolker E. y col, 2004].

El operón comienza con una proteína hipotética *hyp1* [Kolker E. y col, 2004]. En el final del operón se presenta un gen que codifica para una proteína que aporta energía al sistema en forma de ATP, llamado *rpt*. Pertenece a la familia de ATPasa [De Mot. R, 2007]. La hidrólisis de ATP es necesaria para cumplir con la degradación de proteínas plegadas.

Figura 4.7: Entorno de genes de pup2 de *L. ferriphilum* spc1.

Operón de Biosíntesis de Grupos Hierro-Azufre bajo Estrés Oxidativo (*Ferroplasma acidarmanus*)

Figura 4.8: Operón de biosíntesis de grupos Fe-S de *F. acidarmanus.*

Estas proteínas contienen un grupo prostético Fe-S (figura 4.8) que se cree que actúa en circunstancias de estrés oxidativo uniéndose los genes *sufB* y *sufD*. El grupo Fe-S no se forma espontáneamente en la célula [Wada Kei y col, 2009]. Existen tres sistemas responsables de la biosíntesis de grupos Fe-S: NIF (nifSU), ISC (iscSUA-hscBA-fdx) y SUF (sufABCDSE) que pertenecen a operones en bacterias y arqueas. [Johnson D.C y col 2005] [Fontecave M. y Ollagnier-de-Choudens S, 2008]

El sistema SUF se activa en circunstancias adversas como estrés oxidativo y ausencia Fe [Tokumoto U y col 2004] [Nachin L y col 2003]. SUF está formado por 6 proteínas: *SufC*, ubicada en el citosol, es una ATPasa soluble que presenta una gran similitud estructural a las subunidades de ATPasa de los transportadores ABC (ABC-ATPasa) [Kitaoka S. y col, 2006] [Watanabe S., A. Kita y Miki K. 2005] y además forma un complejo con *SufB* y *SufD* para formar un complejo ternario: SufBCD [Nachin L. 2003] [Layer G. y col, 2007]. Este sistema, produce cambios conformacionales durante la biosíntesis del grupo Fe-S, gastando ATP. La conformación del sitio activo de *SufC* es desfavorable para la actividad de la ATPasa y parece presentar una forma inactiva para impedir la hidrólisis de ATP [Wada Kei y col, 2009]. *SufA* actúa como una proteína andamio para el montaje Fe-S y distribuye el grupo prostético a otras proteínas. [Loiseau y col, 2003]. *SufS* contiene una cisteína desulfurada que aporta los átomos de azufre requeridos para

la formación del grupo Fe-S [MiharaH. y N. Esaki, 2002] y *SufE* no tiene una función definida.

Algunos autores han propuesto que este mecanismo de trasferencia de azufre puede ser importante para limitar la liberación de sulfuro en condiciones de estrés oxidativo [Outten F.W y col, 2003]. Se podría proponer como gen indicador en condiciones de estrés en los procesos de biolixiviación.

Al comenzar el operón se presenta el gen *potE* que codifica una proteína relacionada con el transporte de aminoácidos y su metabolismo [Evans. D y col 1991].

Operón metabolismo de lípidos/transporte/oxido-reducción (*F. acidarmanus*)

El gen *cydA* (figura 4.9), codifica para una proteína que pertenece a las familias de citocromos de tipo bd ubiquinol oxidasa subunidad I. Su función principal es transporte de electrones o eliminación de O_2 para la fijación de nitrógeno.

Figura 4.9: Unidad transcripcional relacionado con metabolismo de *F. acidarmanus*.

El gen *cydA*, en otros operones está acompañado de *cydB* cuyo producto sería la subunidad II y forman un complejo, en este caso no se encuentra este gen. Los genes que codifican para este sistema de tres componentes no siempre se encuentran relacionados funcionalmente, entonces resulta complejo determinar la interacción entre los genes presentes. *CydA* está acompañada del gen *hyp3* [Kolker

E. y col, 2004] (figura 4.10), que codifica para una proteína de membrana, que presenta en su estructura regiones transmembranales según se visualizó en el programa TMHMM en la página web de CBS Prediction.

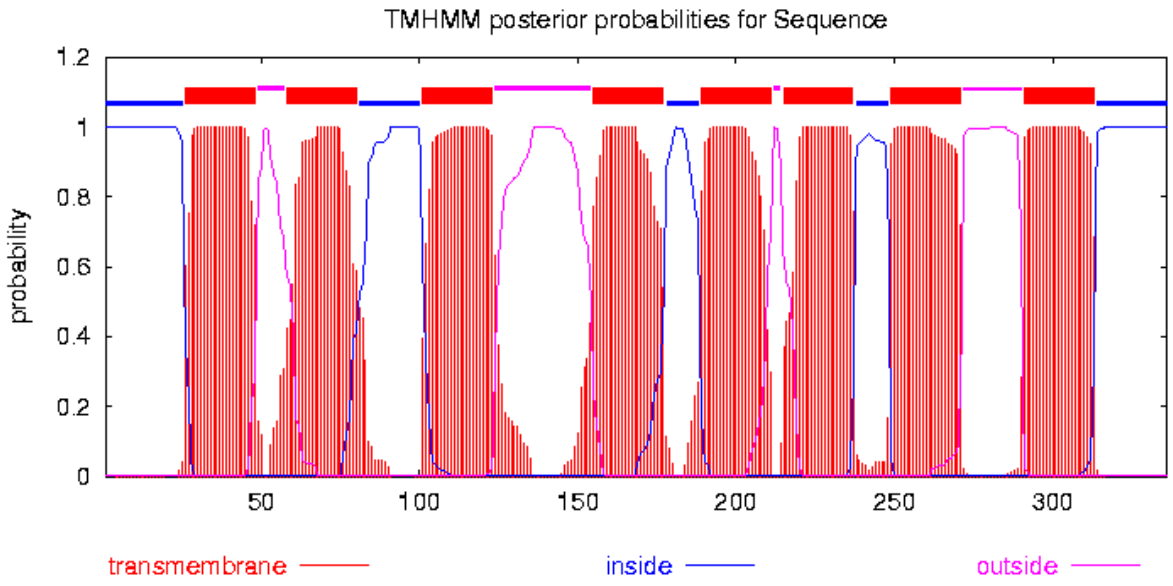


Figura 4.10: Se presenta que la proteína hipotética de membrana (Hyp3), contiene en su estructura regiones transmembranales, visualizado en CBS Prediction.

Los microorganismos tienen mecanismos eficientes de adaptación que les ayudan a sobrevivir a ciertas condiciones desfavorables como el estrés nutricional. En estos casos se activan ciertos genes para restablecer el sistema interno de la célula. En el operón se encuentra el gen *fabH* que pertenece a la vía FABH de biosíntesis de ácidos grasos. Se ha demostrado que fabH es esencial para el crecimiento celular [Revill W.P y col, 2001] [Heath R.J, 2002]. FabH es un regulador transcripcional responsable de la transcripción de los genes *fabH*, *fabD* y *fabG* que codifican la biosíntesis de enzimas. Este gen se reprime, en ausencia de ácidos grasos y como resultado se inhibe la transcripción de la biosíntesis de lípidos.

Podría estar involucrado el gen que está aguas abajo de *fabH,* en este caso *paaJ,* no existe evidencia de su interacción directa entre la proteína.

Río abajo de *paaJ* se encuentran dos genes hipotéticos: *hyp1*, cuyo producto génico está involucrado con la predicción de ácido nucleicos que tiene unida una proteína Zn e *hyp2*, se predice que se compone en el espacio periplásmico. No se conoce qué función podría tener esta proteína. No se puede establecer una vinculación funcional entre las proteínas codificadas *paaJ* y *fabH.*

Operón merA producción de ácidos grasos (*F. acidarmanus*)

Los genes que se encuentran en el contexto del gen *merA* (figura 4.11) estarían involucrados en el sistema de resistencia a mercurio, es una flavoproteína que contiene FAD y reduce Hg (II) a Hg (0) usando NADPH. Es sólo un componente del operón MER en *Ferroplasma*. Este sólo se expresa en condiciones de presencia de mercurio en la célula. Ha sido estudiado en diferentes bacterias Gram positivas y Gram negativas, pero los mecanismos responsables de la resistencia del mercurio en el dominio arquea sigue siendo desconocida. [Silver S y Pheng L.T, 1996].

Figura 4.11: Operón MER que pertenece a *Ferroplasma acidarmanus*

Río abajo del gen *merA* se encuentra *uppS*, orientado en la misma dirección codificaría para una proteína que participaría de la biosíntesis del peptidoglucano de la pared celular, una undecaprenil pirofosfato sintasa. Posiblemente, el gen *uppS* no

forma parte de una unidad transcripcional junto a los genes hipotéticos *hyp1* y *hyp2*. El gen hipotético *hyp2,* posiblemente codifica para una proteína de unión al DNA. No se conoce qué función podría tener esta proteína en el operón. Seguidamente se presenta *hyp1* [Kolker E. y col, 2004] que podría codificar para una quinasa putativa.

CAPITULO 4

CONCLUSIONES

La lixiviación de bacterias de sulfuros metálicos a partir de minerales sulfurados de baja ley es un proceso efectivo para la recuperación de metales, entre estos para la recuperación de cobre. Se demuestra ventajosa por la baja contaminación comparada con los procesos químicos utilizados actualmente, desde el punto de vista ambiental y económico, además no necesita un alto consumo de energía y también por las bajas emisiones de gases contaminantes. El uso de microorganismos ha comenzado a aplicarse en distintos países del mundo. Estas metodologías son aplicables a muchas explotaciones mineras en nuestro país.

La principal ventaja de la expresión diferencial es que permite comparar simultáneamente varias condiciones celulares, observando diferencias de los genes inducidos o reprimidos en las condiciones: normal y de estrés. La técnica de RAP-PCR es eficiente por el alto número de productos aislados y alto porcentaje de genes expresados diferenciados confirmados. En este trabajo la técnica de RAP-PCR permitió observar varias bandas de cDNA, obtenido a partir de RNA. El método con partidores aleatorios permitió así la detección de RNAs anónimos correspondientes a genes que se expresan diferencialmente bajo diferentes condiciones de estrés, pero que comparten una genética común. El papel de estos genes en el mecanismo de resistencia, sin embargo es aún incierto, ya que, el partidor alineo directamente con el gen 16S rRNA, donde las secuencias aisladas mostraron 98-100% de similitud con el gen de 16S de *Acidithiomicrobium ferrooxidans*. Por ende los pasos a seguir debieran contemplar el nuevo diseño de partidores que no alinen con genes del rRNA.

El microorganismo se sometió a cultivos de estrés con NaCl y $CuSO_4$ creando una reacción de alarma, por lo cual algunas funciones metabólicas se alteran, provocando una respuesta. Posteriormente vendrá la fase de resistencia en la cual el microorganismo se adaptará al factor que ocasione el estrés, retornando a la normalidad. Si este factor de estrés continúa por un largo periodo, la bacteria llegará a un estado de agotamiento donde puede afectar funciones celulares, dañar membrana celular, alterar las funciones celulares y dañar su DNA en el cual su comportamiento puede modificarse nuevamente o conduciría a la muerte celular.

Con la secuencia 16S obtenida de *Acidithiomicrobium ferrooxidans* se podría concluir que no es un buen candidato para utilizarlo como genes *housekeeping* para condiciones de estrés de NaCl y $CuSO_4$. Esto se debe que a pesar de mostrar expresión en todas las condiciones, la expresión mostrada por el gen 16S rRNA fue diferencial y no estable bajo el efecto del estrés aplicado, por los resultados mostrados mediante RAP-PCR.

Se pretende continuar desarrollando otras investigaciones más avanzadas, cuantificación por qPCR para obtener resultados más concluyentes y la construcción de un microarreglo de DNA, para poder entender la transcriptoma metabólica de los microorganismos que participan directamente en los procesos de biolixiviación. Para disminuir los tiempos de respuesta frente a los problemas operacionales que puedan ocurrir. Se pretende desarrollar nuevas tecnologías, más rápidas y menos costosas, que puedan medir y evaluar la actividad microbiana en sistemas de biolixiviación industrial.

La utilización de las herramientas bioinformáticas permitieron obtener la organización genómica para los genes aislados en forma diferencial de *Acidithiobacillus ferrooxidans, Leptospirillum ferriphilum* y *Ferroplasma acidarmanus* lo cual es de vital importancia para ampliar las anotaciones genómicas desde un contexto metabólico, además de brindar una perspectiva fisiológica sobre los organismos analizados.

El trabajo bioinformático aporta una parte de la información que servirá para realizar estudios más avanzados, como la elección de genes marcadores importantes para la fabricación de un arreglo de DNA. Así como, para extraer datos e información útil para solucionar o investigar problemas a mayor escala.

Se pudo obtener la contextualización de genes que potencialmente pueden ser mejores marcadores, como por ejemplo *CydA* que esta relacionado con transportadores de electrones y citocromos. Otro ejemplo el caso de *pup2* componente putativo del sistema proteosomal. Estos genes podrían así ser buenos indicadores de algún tipo de estrés a la que están sometidas las bacterias.

Se podría proponer el gen *map* para incorporarlo a la cuantificación por RT-PCR. Este gen por bibliografía se considera un gen candidato referencial, por estar involucrado en la regulación. Este trabajo permitió aislar genes que se podrían cuantificar simultáneamente como control, por ejemplo aquellos genes se expresan juntos en una sola unidad transcripcional, esto para tener un control que señale que todo el operón está expresándose.

La culminación de este trabajo permitirá avanzar en la identificación de genes marcadores y el conocimiento de las rutas metabólicas en las que están incluidas las proteínas diferencialmente expresadas y disponer de más elementos para la compresión de los mecanismos de respuesta al estrés que se someten las bacterias que conviven en la pila de biolixiviación. Esto permitirá, que en el futuro, tener un control y pronosticar soluciones en corto plazo.

CAPITULO 5

REFERENCIAS

[Alía P, 2004] Alía R Pedro (2004) **Identificación de genes implicados en la adquisición del fenotipo metastásico en modelos experimentales de cáncer de mama**. http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-1114108-103112/par1de1.pdf Barcelona, pag.194

[Aliaga G Daniela, 2009] Aliaga G Daniela, Denef Vicent J, Singer Steven W, VerBerkmoes Nathan C, Lefsrud Mark, Mueller Ryan S, Dick Gregory J, Sun Chistine L, Wheeler Korin E, Zemla Adam, Baker Brett J, Hauser Loren, Land Miriam, Shah Manesh B, Thelen Michael P, Hettich Robert L y Banfield Jillian F. (2009) **Community Genomic and Proteomic Analyses of Chemoautotrophic Iron-Oxidizing "*Leptospirillumrubarum*" (Group II) and "*Leptospirillum ferrodiazotrophum*" (Group III) Bacteria in Acid Mine Drainage Biofilms** Applied and Environmental Microbiology p. 4599-4615

[Arukwe, 2006] **Toxicological Housekeeping Genes:Do They Really Keep the House?** Environ. Sci. Technol. 40: 7944-7949

[Baker-Austin C y col, 2007] Baker-Austin C, Dopson M., Wexler M., Sawers R.G., Stemmler A., Rosen B.P. y Bond P.L. (2007) **Extreme arsenic resistance by the acidophilic archaeon *'Ferroplasma acidarmanus*' Fer1**. Extremophiles. 11: 425-34.

[Barreto M y col 2003] Barreto Marlen, Quatrini Raquel, Bueno Susan, Arriagada Claudia, Valdes Jorge, Silver Simon, Jedlicki Eugenia, Holmes David S. (2003) **Aspects of the predicted physiology of Acidithiobacillus ferrooxidans deduced from an analysis of its partial genome sequence** Hydrometallurgy 71 97-105.

[Botero L.M. y col, 2005] Botero L.M, D`Imperio S, Burr M, McDermott T.R, Young M, Hassett D.J (2005) **Poly(A) polymerase modification and reverse trasncriptase PCR amplification of environmental RNA** Appl. Environ. Microbiol 71, 1267-1275.

[Bouchal, P y col. 2006] Bouchal, P., Zdráhal, Z., Helánová, S., Janiczek, O., Hallberg, K.B., Mandl, M. (2006).**Proteomic and bioinformatic analysis of iron- and sulfur-oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans* using immobilized pH gradients and mass spectrometry**. Proteomics 6, 4278–4285.

[Brierley J.A. y Brierley C.L., 1999] Brierley J.A y Brierley C.L (1999) **Present and future commercial applications of biohydrometallurgy** Biohydrometallurgy. IBS99: 81-89.

[Brierley C.L, 2001] C.L Brierley (2001) **Bacterial succession in bioheap leaching** Hydrometallurgy 59 pp. 249–255.

[Bueno R., 1985] Bueno Raphael, Pahel Greg, Magasanik Boris (1985) **Role of glnB and glnD gene products in regulation of the glnALG operon of Escherichia coli.** J Bacteriol. November; 164(2)**:** 816–822.

[Campos L. y col, 2002] Paulino Luciana Campos; de Mello Maricilda P; Ottoboni Laura M M (2002) **Differential gene expression in response to copper in Acidithiobacillus ferrooxidans analyzed by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction** Electrophoresis 23(4):520-7.

[Carfi A y col, 1995] Carfi A, Pares S, Duée E, Galleni M, Duez C, Frère JM, Dideberg O (1995) **The 3-D structure of a zinc metallo-beta-lactamase from Bacillus cereus reveals a new type of protein fold**. EMBO J 16;**14**(20):4914–4921.

[Chen J y Moore C., 1992] Chen J, Moore C. (1992) **Separation of factors required for cleavage and polyadenylation of yeast pre-mRNA** Mol Cell Biol. 12(8):3470-81.

[Clum A. y col, 2009] Clum Alicia, Nolan Matt, Lang Elke, Glavina Del Rio Tijana, Tice Hope, Copeland Alex, Cheng Jan-Fang, Lucas Susan, Chen Feng, Bruce David, Goodwin Lynne, Pitluck Sam, Ivanova Natalia, Mavromatis Konstantinos, Mikhailova Natalia, Pati Amrita, Chen Amy, Palaniappan Krishna, Göker Markus, Spring Stefan, Land Miriam, Hauser Loren, Chang Yun-Juan, Jeffries Cynthia C., Chain Patrick, Bristow Jim, Eisen Jonathan A., Markowitz Victor, Hugenholtz Philip, Kyrpides Nikos C., Klenk Hans-Peter, and Lapidus Alla. (2009) **Complete genome sequence of Acidimicrobium ferrooxidans type strain (ICPT)** Standards in Genomic Sciences 1: 38-45.

[Decker R., 1986] Decker R. F (1986), Met. Trans. 17A: 5-29.

[De Mot R, 2007] De Mot René (2007). **Actinomycete-like proteasomes in a Gram-negative bacterium** Trends in Microbiology Vol. 15 No. 8.

[Demergasso C.S y col, 2005] Demergasso C.S., Galleguillos P.A., Escudero L.V., Zepeda V.J., Castillo D. y Casamayor E.O. (2005) **Molecular characterization of microbial populations in a low-grade copper ore bioleaching test heap.** Hydrometallurgy. 80: 241-253.

[Donovan P. Kelly y Wood Ann P., 2000] Donovan P. Kelly y Wood Ann P. (2000) **Reclassification of some species of Thiobacillus to the newly designated genera Acidithiobacillus gen. nov., Halothiobacillus gen. nov. and Thermithiobacillus gen. nov** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50, 511-516.

[Dopson M. y col, 2005] Dopson, M., Baker-Austin, C. y Bond, P.L. (2005) **Analysis of differential protein expression during growth states of Ferroplasma strains and insights into electron transport for iron oxidation** Microbiology. 151: 4127–4137.

[Duggan DJ, 1999] Duggan DJ **Expression profiling using cDNA microarrays** Nature Genetics 21: 10-4.

[Evans. D y col 1991] Evans, D. J, Jones, R., Woodley, P. R, Wilborn, J R y Robson, R L (1991) **Nucleotide sequence and genetic analysis of the Azotobacter chroococcum *nifFUSVWZM* gene cluster, including a new gene (*nifP*) which encodes a serine acetyltranferase** J. Bacteriol 173: 5457-5469.

[Falco L y col, 2003] Falco L., Pogliani C., Curutchet G. and Donati E. (2003) **A comparison of bioleaching of covellite using pure cultures of Acidithiobacillus ferrooxidans and Acidithiobacillus thiooxidans or a mixed culture of Leptospirillum ferrooxidans and Acidithiobacillus thiooxidans**. Hydrometallurgy 71, 31-36.

[Fontecave M. y Ollagnier-de-Choudens S, 2008] M. Fontecave and S. Ollagnier-de-Choudens, (2008) **Iron–sulfur cluster biosynthesis in bacteria: mechanisms of cluster assembly and transfer**, Arch. Biochem. Biophys. 474, pp. 226–237.

[Frias-Lopez J y col, 2004] Frias-Lopez Jorge, Bonheyo George T y Fouke Bruce W. (2004) **Identification of Differential Gene Expression in Bacteria Associated with Coral Black Band Disease by Using RNA-Arbitrarily Primed PCR** Appl Environ Microbiol. 70(6): 3687–3694.

[Galleguillos P. y col, 2007] Galleguillos, P., Zepeda, V., Galleguillos, F., Castillo, D., Guiliani, N., Remonsellez, F., Ortiz, E. y Demergasso, C. (2007). **Differential genetic expression in heap bioleaching of low-grade copper**

sulphide ore at Escondida Mine, Chile Advanced Materials Research Vols. 20-21: 435-438.

[Galperin M y Koonin E, 2000] Galperin M y Koonin E (2000) **Who´s your neighbor? New computational approaches for functional genomics**. Nat. Biotechnol. 18: 609-613.

[Galleguillos P. y col, 2008] Galleguillos Pedro, Remonsellez Francisco, Galleguillos Felipe, Guiliani Nicolás, Castillo Danny y Demergasso Cecilia (2008) **Identification of differentially expressed genes in an industrial bioleaching heap processing low-grade copper sulphide ore elucidated by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction** Hydrometallurgy Volume 94, Issues 1-4, 148-154.

[Goebel B.M. y Stackebrandt E., 1994] Goebel B.M. y Stackebrandt E. (1994) **Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments**. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1614–1621.

[Golyshina O. y col, 2000] Golyshina Olga, Pivovarova Tatiana, Karaviako Grigory, Kondrat'eva Tamara, Moore Edward, Abraham Wolf-Rainer, Lünsdorf Heinrich, Timmis Kenneth, Yakimov Michail and Golyshin Peter (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.

[Heath R.J, 2002] R.J. Heath, S.W. White and C.O. Rock (2002) **Inhibitors of fatty acid synthesis as antimicrobial chemotherapeutics**, Appl. Microbiol. Biotechnol. 58, pp. 695–703.

[Hobman J. y col 2005] Hobman Jon.L, Wilkie John, Brown Nigel L. (2005). **A design for life: prokaryotic metal-binding MerR family regulators**. BioMetals 18, 429-436.

[Huynen M y Snel B, 2000] Huynen M y Snel B (2000) **Gene and context: Integrative approaches to genome analysis**. Adv. Prot. Chem. 54: 345-379.

[Ishitani R y col, 1996] Ishitani R, Sunaga K, Hirano A, Saunders P, Katsube N, Chuang DM (1996) **Evidence that glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in age-induced apoptosis in mature cerebellar neurons in culture.** J Neurochem 66:928-935.

[Itoh T y Col, 1999] Itoh T, Takemoto K, Mori H, Gojobori T (1999) **Evolutionary instability of operon structures disclosed by sequence comparisons of complete microbial genomes**. Mol. Biol. Evol. 16: 332-346.

[Jiménez L. F, 2003] Jiménez Luis Felipe y Merchant Horacio, 2003 Acido Ribonucleico, ARN. **Biología Celular y Molecular**. México: Editorial PEARSON, pag: 23-42.

[Johnson D.B y Hallberg K.B, 2003] Johnson, D.B., Hallberg, K.B. (2003) **The microbiology of acidic mine waters**. Res Microbiol 154: 466–473.

[Johnson D.C y col 2005] D.C. Johnson, D.R. Dean, A.D. Smith and M.K. Johnson (2005) **Structure, function, and formation of biological iron–sulfur clusters** Annu. Rev. Biochem. 74, pp. 247–281.

[Kitaoka S y col, 2006] S. Kitaoka, K. Wada, Y. Hasegawa, Y. Minami, K. Fukuyama and Y. Takahashi, (2006) **Crystal structure of *Escherichia coli* SufC, an ABC-type ATPase component of the SUF iron–sulfur cluster assembly machinery**, FEBS Lett. 580, pp. 137–143.

[Kolker E. y col, 2004] Eugene Kolker, Kira S. Makarova, Svetlana Shabalina, Alex F. Picone, Samuel Purvine, Ted Holzman, Tim Cherny, David Armbruster, Robert S. Munson, Jr, Grigory Kolesov, Dmitrij Frishman and Michael Y. Galperin (2004) **Identification and functional analysis of 'hypothetical' genes expressed in *Haemophilus influenza*** Nucleic Acids Research, Vol. 32, No. 8 2353-2361.

[Komura I y Izaki K, 1971] Komura, I. and Izaki, K. (1971) **Mechanism of mercuric chloride resistance in microorganisms. I. Vaporization of a mercury compound from mercuric chloride by multiple drug resistance strain of *Escherichia coli***. J. Biochem. 70: 885-893.

[Lander ES, 1999] Lander ES **Array of hope** Nat Gnet 21: 3-4.

[Layer G. y col, 2007] G. Layer, S.A. Gaddam, C.N. Ayala-Castro, S. Ollagnier-de Choudens, D. Lascoux, M. Fontecave and F.W. Outten (2007) **SufE transfers sulfur from SufS to SufB for iron–sulfur cluster assembly**, J. Biol. Chem. 282: 13342-13350.

[Lawrence J, 1999] Lawrence J (1999) **Selfish operons: The evolutionary impact of gene clustering in prokaryotes and eukaryotes**. Curr. Opin. Genet. Dev. 9: 642-648.

[Liang G y Pardee A.B, 1992] Liang P. & A.B. Pardee (1992) **Differential display of eukariotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction** Science. 257: 967-971.

[Loiseau S. y col, 2003] L. Loiseau, S. Ollagnier-de-Choudens, L. Nachin, M. Fontecave and F. Barras (2003) **Biogenesis of Fe–S cluster by the bacterial Suf system. SufS and SufE form a new type of cysteine desulfurase**, Journal of Biological Chemistry 278: 38352-38359.

[Markosyan G., 1972] Markosyan, G. E. (1972). **A new iron-oxidizing bacterium - *Leptospirillum ferrooxidans* nov. gen. nov. sp**. Biol J Armenia 25, 26-29.

[MiharaH. y N. Esaki] H. Mihara y N. Esaki, (2002) **Bacterial cysteine desulfurases: their function and mechanisms**, Appl. Microbiol. Biotechnol. 60: 12–23.

[Misra T.K, 1992] Misra T.K. (1992) **Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials.** Plasmid 25: 4-16.

[Mjoli N y Kulpa C.R, 1988] Mjoli, N., Kulpa C.R. (1988) **The identification of a unique outer membrane protein required for iron oxidation in *Thiobacillus ferrooxidans***. Biohydrometallurgy ed P.R. Norris and D.P. Kelly, pp 89-102.

[Moses V y col. 1999] Moses V., Springham, D.G., Cape, R.E. (1999) **Biochnology: The science and the business** 2nd edition. Harwood academic publishers.

[Nachin L. y col 2003] L. Nachin, L. Loiseau, D. Expert y F. Barras (2003) **SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe–S] biogenesis under oxidative stress**, EMBO J. 22: 427–437.

[Nagel A. y col, 1999] Nagel, A., J. T. Fleming, y G. S. Sayler (1999) **Reduction of false positives in prokaryotic mRNA differential display**. BioTechniques 26: 641-643.

[Nagel A. y col, 2001] Nagel, A. C., J. T. Fleming, G. S. Sayler, y K. L. Beattie (2001) **Screening for ribosomal-based false positives following prokaryotic mRNA differential display**. BioTechniques 30: 988-990.

[Nakazato H. y col, 1975] Nakazato Hiroshi., Venkatesan S., Edmonds M., (1975) **Polyadenylic acid sequences in E.coli messenger RNA**. Nature 256: 144-146.

[Neuwald A F y col, 1997] Neuwald A F, Liu J S, Lipman D J, y Lawrence CE (1997) **Extracting protein alignment models from the sequence database.** Nucleic Acids Res. 1; 25(9): 1665–1677.

[Nielsen KK y Boye M, 2005] Nielsen KK, Boye M (2005) **Real-time quantitative reverse transcription-PCR analysis of expression stability of Actinobacillus pleuropneumoniae housekeeping genes during in vitro growth under iron-depleted conditions** Appl Environ Microbiol, 71(6)**:**2949-2954

[Nieto P., 2009] Nieto Pamela A, Covarrubias Paulo C, Jedlicki Eugenia, Holmes David S, Quatrini Raquel (2009) **Selection and evaluation of reference genes for improved interrogation of microbial transcriptomes: case study with the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*** BMC Molecular Biology, 10: 63.

[Olson, G.J. y col, 2003] Olson, G.J., Brierley, J.A. y Brierley, C.L. (2003) **Bioleaching review part B: progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries**. Appl. Microbiol. Biotechnol. 63: 249–257.

[Osborn A.M y col, 1997] Osborn, A.M., Bruce, K.D., Strike, P. y Ritchie, D.A. (1997) **Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon**. FEMS Microbiol Rev. 19: 239-262.

[Outten F.W y col, 2003] F.W. Outten, M.J. Wood, F.M. Muñoz y G. Storz (2003) **The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulphur transfer pathway for Fe–S cluster assembly in *Escherichia coli***, Journal of Biological Chemistry 40, pp. 31024–31029.

[Parro V y col, 2007] Parro V., Moreno-Paz, M., González-Toril, E. (2007) **Analysis of environmental transcriptomes by DNA microarrays**. Environmental Microbiology 9, 453–464.

[Paulino L.C y col, 2002] L.C. Paulino, M.P. de Mello y L. Ottoboni (2002) **Differential gene expression in response to copper in *Acidithiobacillus ferrooxidans* analyzed by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction,** Electrophoresis 23, pp. 520–527.

[Peters JM, 1994] Peters JM, Franke WW, Kleinschmidt JA (1994) **Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm** J Biol Chem. Vol. 269 nº 10. pp. 7709-18.

[Petersen BH y col, 1990] Petersen BH, Rapaport R, Henry DP, Huseman C, Moore WV (1990) **Effect of treatment with biosynthetic human growth hormone (GH) on peripheral blood lymphocyte populations and function in growth hormone-deficient children.** J Clin Endocrinol Metab, 70:1756-1760

[Quatrini R y col, 2007] Quatrini R., Valdès, J., Jedlicki, E., Holmes, D.S. (2007). **The Use of Bioinformatics and Genome Biology to Advance Our Understanding of Bioleaching Microorganisms**. Microbial Processing of Metal Sílfides ed Edgardo R. Donati and Wolfgang Sand pp 221-239.

[Quintero Y y col, 2006] Quintero Silva Yunuen, Poblet Icart Montserrat, Mas Barón Albert, Guillamón Navarro José Manuel (2006) **Aplicación de la PCR cuantitativa para cuantificar la expresión de la alcohol deshidrogenasa en bacterias acéticas: Segundas Jornadas de I+ D+I en la Elaboración de Vinagres** Second Symposium on R+ D+I for Vinegar Production: Córdoba, coord. por Isidoro García García, ISBN 84-7801-816-6 , pags. 67-75.

[Ramirez P y Col, 2004] Ramirez P, Giuliani N, Valenzuela L, Beard S, Jerez CA. (2004) **Differential Protein Expression during Growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on Ferrous Iron, Sulfur Compounds, or Metal Sulfides**. Applied and Environmental Microbiology. 70(8): 4491-4498.

[Rawlings D.E. y col. 1984] Rawlings, D.E., Pretorius, I., Woods, D.R. (1984). **Expression of a Thiobacillus ferrooxidans Origin of Replication in *Escherichia coli*.** Journal of Bacteriology 158(2): 737-738.

[Rawlings D.E. y Kusano T, 1994] Rawlings, D.E., Kusano, T. (1994) **Molecular Genetics of *Thiobacillus ferrooxidans***. Microbiological Reviews 58(1): 39-55.

[Rawlings D.E.y Woods D.R 1995] Rawlings, D.E., Woods, D.R. (1995). **Development of improved biomining bacteria.** Bioextraction and biodeterioration of metals ed Christine C. Gaylarde, Héctor A. Videla, pp 63-84.

[Rawlings D.E., 2002] Rawlings D.E (2002) **Heavy metal mining using microbes** Annu. Rev. Microbiol. 56:65-91.

[Remonsellez F y col, 2007] Remonsellez, F., Galleguillos, F., Janse van Rensburg, S., Rautenbach, G.F., Galleguillos, P., Castillo, D. y Demergasso, C. (2007) **Monitoring the microbial community inhabiting a low-grade copper sulphide ore by Quantitative real-time PCR analysis of 16S rRNA genes**. Adv. Mater. Res. 20-21: 539-542.

[Remonsellez F y col, 2009] Remonsellez, F., Galleguillos, F., Moreno-Paz Mercedes, Parro Victor Acosta Mauricio y Demergasso, C. (2009) **Dynamic of active microorganisms inhabiting a bioleaching industrial heap of low-grade copper sulfide ore monitored by real-time PCR and oligonucleotide prokaryotic acidophile microarray** Microbial Biotechnology. 1751-7915.

[Rohwerder T, 2003] Rohwerder T., Gehrke T., Kinzler K. and Sand W. (2003) **Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation**. Appl. Microbiol. Biotechnol. 63, 239-248.

[Rutherford K., 2000] Rutherford Kim, Parkhill Julian, Crook James, Horsnell Terry, Rice Peter, Rajandream Marie-Adèle, Barrell Bart (2000) **Artemis: sequence visualization and annotation**. Bioinformatics 16:944-5. [Revill W.P y col, 2001] W.P. Revill, M.J. Bibb, A.K. Scheu, H.J. Kieser and D.A. Hopwood, (2001) **Beta-ketoacyl acyl carrier protein synthase III (FabH) is essential for fatty acid biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2)**, J. Bacteriol. 183, pp. 3526–3530.

[Schippers A. 2007] Schippers A. (2007) **Microorganisms involved in bioleaching and nucleic acid-based molecular methods for their identification and quantification** In Microbial Processing of Metal Sulfides. Donati, R.E., and Sand,W., eds. The Netherlands: Springer, pp. 3–33.

[Schulze A y Downward J, 2001] Schulze A y Downward J **Navigating gene expression using microarrays—a technology review** Nature Cell Biol 3:E190-5.

[Scott J. 1995] Scott Julie (1995) **The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress**. Florida Entomologist 78(3) 400-414.

[Silver M y col, 1978] Silver, M. Lawrence, E., Murr, E., Torma, A. and Brierley, J. (eds). (1978) **Metabolic mechanisms of ion-oxidizing *Thiobacillus***. In Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena. Academic Press. New York, pp 427-439.

[Silver S. y Pheng L.T, 1996] S. Silver and L.T. Pheng (1996)**, Bacterial heavy metal resistance: new surprises,** Annual Review of Microbiology 50, pp. 753–789.

[Smith D y col 2006] Smith, D.M. y col. (2006) **Proteasomes and their associated ATPases: a destructive combination**. J. Struct. Biol. 156, 72–83.

[Sturzenbaum SR y Kille P, 2001] Sturzenbaum SR, Kille P (2001) **Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance.** Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 130:281-289.

[Summers A.O, 1986] Summers A.O (1986) **Organization expression and evolution of genes for mercury resistance** Annu. Rev. Microbiol. 40: 607-634.

[Theis T. y col, 2007] Theis T, Skurray RA, Brown MH (2007) **Identification of suitable internal controls to study expressions of a *Staphylococcus aureus* multidrug resistance system by quantitative real time PCR**. J Microbial Methods, 70: 355-362.

[Tokumoto U y col 2004] U. Tokumoto, S. Kitamura, K. Fukuyama y Y. Takahashi, (2004) **Interchangeability and distinct properties of bacterial Fe–S cluster assembly systems: functional replacement of the *isc* and *suf* operons in *Escherichia coli* with the *nifSU*-like operon from *Helicobacter pylori***, J. Biochem. (Tokyo) 136, pp. 199–209.

[Torma A, 1977] Torma, A. (1977) **The role of *Thiobacillus ferrooxidans* in hydrometallurgical process**. Advances in Biochemical and Engineering, 6: 2-37.

[Tortora G., 1993] Tortora Gerard J., Funke Berdell R., Case Christine L. (1993) **Introducción a la Microbiología** Editorial ACRIBIA, S.A Zaragoza España.

[Ullah JH y col, 1998] Ullah JH, Walsh TR, Taylor IA, Emery DC, Verma CS, Gamblin SJ, Spencer J (1998) **The crystal structure of the L1 metallo-beta-lactamase from Stenotrophomonas maltophilia at 1.7 A resolution** J Mol Biol. 284:125-36.

[Valenzuela L. y col. 2006] Valenzuela L, Chi A, Beard S, Orell A, Guliani N, Shabanowitz J, Hunt DF, Jerez CA. (2006) **Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms.** Biotech. Adv. 24: 197-211.

[Vandecasteele SJ y col, 2001] Vandecasteele SJ, Peetermans WE, Merckx R, Van Eldere J (2001) **Quantification of expression of Staphylococcus epidermidis housekeeping genes with Taqman quantitative PCR during in vitro growth and under different conditions.** Journal of Bacteriology, **183:**7094-7101.

[Wada Kei y col, 2009] Kei Wada, Norika Sumi, Rina Nagai, Kenji Iwasaki, Takayuki Sato, Kei Suzuki, Yuko Hasegawa, Shintaro Kitaoka, Yoshiko Minami, F. Wayne Outten, Yasuhiro Takahashi y Keiichi Fukuyama (2009) **Molecular Dynamism of Fe–S Cluster Biosynthesis Implicated by the Structure of the $SufC_2$–$SufD_2$ Complex** Journal of Molecular Biology Volume 387, Pages 245-258.

[Watanabe S. Kita A .y Miki K. 2005] S. Watanabe, A. Kita y K. Miki, (2005) **Crystal structure of atypical cytoplasmic ABC-ATPase SufC from *Thermus thermophilus* HB8**, J. Mol. Biol. 353, pp. 1043–1054.

[Watling H.R, 2006] Watling, H.R., (2006). **The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides -** A review. Hydrometallurgy 84, 81–108.

[Welsh J y col, 1992] Welsh J, Chada K, Dalal S, Cheng R, Ralph D, McClelland M. (1992) **Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA**. Nucleic Acids Res. 20:4965-4970.

[Williams J y col, 1990] Williams John G.K, Kubelik Anne R,. Livak Kenneth J, Rafalski J.Antoni, Tingey Scott V (1990) **DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers** Nucleic Acids Research, Vol. 18, No 22 Pp. 6531-6535.

[Wolf Y y Col, 2010] Wolf Y, Rogozin I, Kondrashow A, Koonin E (2010) **Genome Alignment, Evolution of Procaryotic Genome Organization, and Prediction of Gene Function Using Genomic Context**. Genome Research. 11: 356-372

[Zhang L y col, 2008] Zhang Lin, Qiu Guan-zhou, Hu Yue-hua, Sun Xiao-jun, Li Jian-hua y Gu Guo-Hua (2008) **Bioleaching of pyrite by *A.ferrooxidans* and *L. ferriphilum*** Trans. Nonferrous Met. Soc. China 18: 1415-1420.

[Zhong H. y col, 1999] Zhong H, Simons JW (1999) **Direct comparison of GAPDH, betaactin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia.** Biochem Biophys Res Commun, 259: 523-526.