

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

**Caracterización molecular de plásmidos de
Acidithiobacillus sp. aislados de zonas mineras del Perú**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga
Parasitóloga

AUTOR

Anika Guadalupe Eca Avila

ASESOR

Pablo Ramírez Roca

Lima - Perú

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PLÁSMIDOS DE
Acidithiobacillus sp. AISLADOS DE ZONAS MINERAS DEL PERÚ**

Tesis para optar al Título Profesional de Bióloga Microbióloga
Parasitóloga

Bach. Anika Guadalupe Eca Avila

Lima - Perú

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PLÁSMIDOS DE
Acidithiobacillus sp. AISLADOS DE ZONAS MINERAS DEL PERÚ**

Tesis para optar al Título Profesional de Bióloga Microbióloga
Parasitóloga

Bach. Anika Guadalupe Eca Avila

Asesor: Dr. Pablo Ramírez Roca

Lima - Perú

2016

2

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo para la Innovación, Ciencia y Tecnología (FINCyT), por el financiamiento de esta tesis con el contrato N° 188-IB-FINCyT-2013, y al Estudio de Investigación CON/CON 2015 N° 151001241 del Vicerrectorado de Investigación de la UNMSM.

Al PhD. Pablo Ramirez Roca, mi asesor, por su apoyo tanto en mi formación académica como en la realización de mi tesis, por sus consejos y sobretodo su paciencia y su motivación.

A la MSc. Ruth García de la Guarda por ser la primera guía que tuve en el camino de la ciencia, siempre apoyándome y depositando su confianza en mí.

A mis estimados amigos Abraham Espinoza y Fernando De La Cruz por enseñarme con mucha dedicación y desinterés a trabajar en un laboratorio y valorar la importancia de la investigación en el desarrollo de la ciencia.

Al PhD. Michel Abanto por su apoyo en la parte técnica del análisis bioinformático.

A Robert Corahua, Gregory Guerra y Jordan Bernaldo, mis compañeros en el proyecto, por darme su apoyo, sus consejos y por crear un excelente ambiente de trabajo y compañerismo durante la tesis.

A Vanessa Gonzales, mi compañera en todo camino y mejor amiga, por darme ánimos para seguir en todo momento.

Y el agradecimiento más importante, a mi madre, padre y hermanos, por ser mi impulso en la vida, el motivo por el que doy cada paso en ella y por creer en mí y amarme como lo hacen.

ÍNDICE

	<u>Pág.</u>
ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	V
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Generalidades	2
2.2 Fisiología de <i>At. ferrooxidans</i> .	3
2.3 Plásmidos de <i>Acidithiobacillus</i> sp.	4
3. HIPÓTESIS	8
4. OBJETIVOS	8
5. MATERIALES Y MÉTODOS	9
5.1 Obtención de las muestras	9
5.2 Aislamiento de <i>Acidithiobacillus</i> sp.	9
5.3 Extracción de DNA genómico	10
5.4 Amplificación y secuenciación del gen rRNA 16S	11
5.5 Electroforesis de DNA en geles de agarosa	11
5.6 Aislamiento de plásmidos de <i>Acidithiobacillus</i> sp.	12
5.7 Preparación de DNA plasmídico para secuenciamiento	13
5.8 Ensamblamiento y anotación de los plásmidos	
pAF-PQ32 y pAF-PQ31 de <i>At. ferrivorans</i>	13
6. RESULTADOS	15
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	28

8. CONCLUSIONES	36
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
10. ANEXOS	43

ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>Pág.</u>
Figura 1: Coloración Gram de la muestras	15
Figura 2: Colonias típicas del género <i>Acidithiobacillus</i>	16
Figura 3: Plásmidos de cepas aisladas de Puno	18
Figura 4: Plásmidos de cepas aisladas de Huancavelica	19
Figura 5: Plásmidos de cepas aisladas de Cerro de Pasco	20
Figura 6. Plásmido pAF-PQ31.	22
Figura 7. Plásmido pAF-PQ32.	23
Figura 8. Alineamiento del plásmido pAF-PQ31 y el origen de replicación putativo del plásmido pTF91 de <i>At. ferrooxidans</i> .	26
Figura 9. Diagrama de GCskew muestra el posible origen de replicación del plásmido pAF-PQ32	27

ÍNDICE DE TABLAS

	<u>Pág.</u>
Tabla 1: Plásmidos de cepas aisladas de Puno	17
Tabla 2: Plásmidos de cepas aisladas de Huancavelica	19
Tabla 3: Plásmidos de cepas aisladas de Cerro de Pasco	20
Tabla 4. Características generales de los plásmidos de <i>At. ferrivorans</i>	21
Tabla 5. ORF's identificados en el plásmido pAfPQ33-2 de <i>At. ferrivorans</i>	24
Tabla 6. ORF's identificados en el plásmido pAfPQ33-1 de <i>At. ferrivorans</i>	25
Tabla 7. ORF's identificados en el plásmido pAfPQ33-2 de <i>At. ferrivorans</i>	44
Tabla 8. ORF's identificados en el plásmido pAfPQ33-1 de <i>At. ferrivorans</i>	45

RESUMEN

Los plásmidos en cepas de *Acidithiobacillus* sp. aislados de aguas ácidas de mina son recursos genéticos que aún no han sido reportado en nuestro país, que podrían usarse en la construcción de vectores y el mejoramiento de cepas bacterianas para su aplicación en biorremediación y biolixiviación. Por ello, el objetivo de esta tesis fue determinar la presencia de plásmidos de *Acidithiobacillus* aislados de aguas ácidas de zonas mineras, y analizar *in silico* genes putativos identificados a partir del secuenciamiento y anotación de dos plásmidos de la cepa *At. ferrivorans* PQ33.

Para la extracción de plásmidos se utilizó el protocolo de PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen™). Los plásmidos de *At. ferrivorans* PQ33 fueron secuenciados por síntesis química en sistema HiSeq 200 de Illumina. El software Velveth, versión 1.1, fue empleado para el ensamblamiento *de novo* de las secuencias. Los plásmidos circularizados fueron anotados usando las herramientas Prokka y ORFfinder, las búsquedas de similitud se realizaron empleando BlastX contra la base de datos del GenBank. Blastn y el software Artemis fueron usados para identificar los orígenes de replicación. De 24 cepas de *Acidithiobacillus* (10 de Puno, 6 de Huancavelica y 8 de Cerro de Pasco), 17 (70.83%) presentaron plásmidos. El análisis *in silico* reveló la presencia de genes implicados en la conjugación (TraD, MobA, proteínas de exclusión de entrada y XerD), sistemas toxina-anti toxina (HicA y HicB), proteínas de replicación (RepA y proteínas de unión a DNA), reguladores de transcripción y post traducción (CopG y la chaperona DnaJ), así como la destacable presencia de una proteína de virulencia (VapD), además de dos proteínas (Porina fosfato selectiva O y diguanilato ciclasa), implicadas en la resistencia a la falta de nutrientes y producción de biofilm, respectivamente.

Es la primera vez que se reporta plásmidos caracterizados de un cepa psicotolerante de *Acidithiobacillus ferrivorans*, con capacidad de transferencia horizontal y sistemas de regulación implicados tanto en el mantenimiento del plásmido como en la adherencia a sustratos, característica importante de esta especie para su aplicación en biominería.

Palabras Claves: *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Acidithiobacillus ferrivorans*, bacterias psicotolerantes, Puno, Huancavelica, Cerro de Pasco, plásmidos, anotación.

ABSTRACT

Plasmids of bioleaching psychrotolerant bacteria *Acidithiobacillus ferrivorans* have not been reported although their presence may be involved in the adaptation of this bacterium to cold environments. Moreover, these plasmids have potential applications in the construction of vectors and genetic improvement of strains for bioremediation bioleaching processes. The aim of this thesis was to characterize plasmids of *Acidithiobacillus ferrivorans* by sequencing and gene annotation.

For plasmid isolation the protocol PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen™) was used. Two plasmids (12 kb and 10 kb) from *At. ferrivorans* strain (LN650696) were isolated by standard miniprep protocol. The genomes were sequenced by Illumina HiSeq system. In the de novo assembly, Velvet 1.1 package was used. Plasmids were annotated using Prokka and ORFfinder and similarity analysis was performed using BlastX against the GenBank database. The origins of replication were identified by Artemis software and BlastN. It was isolated 24 *Acidithiobacillus* strains (10 from Puno, 6 from Huancavelica and 8 from Cerro de Pasco). 17 (70.83%) of them had plasmids. For analysis, T10, RA1 and PQ33 strains plasmids were selected, which ones were from Puno, Huancavelica and Cerro de Pasco, respectively. *In silico* analysis predicted the presence of CDS for proteins involved in conjugation (TraD, MobA, excluding entry and XerD), toxin-anti-toxin systems (HicA and HicB), replication proteins (RepA and DNA binding protein), transcription regulator (CopG), a DnaJ chaperone, a gene of protein virulence (vapD) and seven hypothetical proteins. Furthermore, a phosphate selective porin O and P involved in phosphate starvation adaptation, and a diguanylate cyclase-3-phosphodiesterase protein, related to biofilm production signaling was found. This is the first report of plasmid genomes of a psychrotolerant *At. ferrivorans* strain genes encoding horizontal transfer, regulation systems of plasmid

maintenance and adhesion to substrates, an important feature of this species in its adaptation to the environment during biomining process.

Keywords: *Acidithiobacillus ferrivorans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, psychrotolerant bacteria, Puno, Huancavelica, Cerro de Pasco, plasmid, annotation.

1. INTRODUCCIÓN

La biolixiviación de minerales se usa en faenas mineras. En Chile y Estados Unidos aproximadamente el 18% del cobre total se recupera mediante este proceso, dado que los microorganismos biolixivantes como *Acidithiobacillus* sp., presentan elevados niveles de resistencia a metales como mercurio, arsénico, uranio, entre otros (Mao *et al.*, 1980). Existe un número limitado de estudios enfocados en plásmidos de *Acidithiobacillus* sp. (Rawlings *et al.*, 1984; Chisholm *et al.*, 1998; Holmes y Yates, 1990) debido a que muchos de éstos suelen ser de naturaleza críptica, por ello, es importante caracterizar molecularmente estos elementos génicos pues poseen un valor práctico en biotecnología.

Hallberg *et al.*, 2010 reportó a la especie *At. ferrivorans* con capacidad de crecimiento a bajas temperatura, que comparte características fisiológicas con *At. ferrooxidans*, por lo que el interés en esta nueva especie ha crecido en los últimos cinco años. Sin embargo, no se han reportado en el mundo investigaciones que involucren el estudio de plásmidos presentes en esta especie a pesar de su importancia tanto en el mejoramiento de cepas con potencial uso en biominería y su implicancia en la adaptación de esta especie a ambientes fríos, que la convierte en una cepa idónea en procesos de lixiviación. De este modo, los plásmidos encontrados naturalmente en cepas de *Acidithiobacillus* sp. en fuentes como aguas ácidas de mina son un posible recurso genético que aún no ha sido reportado ni explorado en nuestro país, teniendo en cuenta que la industria minera se ha convertido rápidamente en una de las más importantes fuentes de ingreso para el Perú.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades

Un considerable interés se ha mostrado en *Acidithiobacillus* sp. debido a su uso en el procesamiento de minerales industriales y su fisiología inusual. La principal contribución de estas bacterias en la extracción de metales es su capacidad para atacar minerales azufrados y convertir los sulfuros insolubles en iones tales como cobre, plomo, zinc, níquel y sulfatos. Los tres metales recuperados en mayores cantidades mediante reacción bacteriana directa o indirecta son cobre, uranio y oro.

Los procesos de biolixiviación industrial no se llevan a cabo en condiciones de esterilidad, y como resultado *Acidithiobacillus* sp. rara vez o nunca crece como un cultivo puro. La mayoría de las operaciones comerciales de biolixiviación se llevan a cabo con un consorcio de bacterias acidófilas, quimiolitotróficas que pueden incluir *At. ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y bacterias heterótrofas acidófilas que pertenecen al género *Acidiphilium*. Aunque *At. ferrooxidans* se considera el miembro más importante del consorcio, los cultivos mixtos de bacterias son a menudo más eficientes en la descomposición de mineral que *At. ferrooxidans* sola. Las bacterias mencionadas son mesófilas, y como resultado, cuando el control es posible la biooxidación industrial de los minerales se lleva a cabo a temperaturas por debajo de 45°C. Sin embargo, para una aplicación efectiva de estas tecnologías en minas de ambientes fríos, el cual es el ambiente de la minería de gran altitud en el Perú, son necesarias cepas adaptadas al frío para este tipo de procesos, con la finalidad de optimizar las tasas de lixiviación y mejorar la viabilidad de las operaciones de lixiviación a baja temperatura. Hallberg *et al.*, 2010 reporta una nueva especie de este género como *Acidithiobacillus ferrivorans*, que comparte características con *At. ferrooxidans*, pero tiene la cualidad de crecer a bajas temperaturas (4°C). Durante los

últimos años su genoma ha sido estudiado, pese a ello, todavía existe una necesidad de caracterizar mejor las cepas de esta especie y sus mecanismos de adaptación a ambientes fríos, ya que son los mediadores de la oxidación biológica del hierro y la lixiviación de metales en los ambientes mineros de bajas temperaturas.

2.2 Fisiología de *Acidithiobacillus* sp.

At. ferrooxidans es un bacilo Gram negativo, que tiene una fisiología bien adaptada al crecimiento en un ambiente minero inorgánico y fija dióxido de carbono atmosférico por lo que es autótrofa (Kelly y Harrison, 1989).

La energía la obtiene por la oxidación del ion ferroso a ion férrico o compuestos de azufre reducido generando ácido sulfúrico. La bacteria es acidófila con un pH óptimo dentro del rango 1.5 a 2.5. Crece mejor en un ambiente aeróbico con oxígeno como aceptor de electrones (Corbet y Ingledew, 1987)

At. ferrooxidans es ubicuo en el medio ambiente, puede ser fácilmente aislado a partir de muestras de suelo recogidas de yacimientos de minerales de piríta o de los sitios de drenaje ácido de minas, que están frecuentemente asociados con los residuos de carbón o de vertederos de minas. Además de su fisiología única, *At. ferrooxidans* tiene otras características que lo hacen adecuado para su uso en operaciones de biominería. Una de ellas es su resistencia inherente a altas concentraciones de iones metálicos y otros. Se ha reportado que la bacteria es capaz de crecer en medios que contienen Zn^{+2} (120 g/L), Ni^{+2} (72 g/L), Co^{+2} (30 g /L), Cu^{+2} (55 g /L), U_3O_8 (12 g/L) y Fe^{+2} (160 g /L) (Torma, 1977).

2.3 Plásmidos de *Acidithiobacillus* sp.

Se han hecho una serie de estudios sobre la existencia de plásmidos naturales en las cepas de *Acidithiobacillus* aisladas en diferentes partes del mundo. Martin *et al.* (1981) informaron que 11 de 15 cepas originarias en su mayoría de Estados Unidos y Bulgaria albergaban desde cuatro a nueve plásmidos por cepa, que tenían un tamaño de 7.4 a 75 Kb. Shiratori *et al.* (1991) en un estudio de más de 100 cepas obtenidas de seis minas japonesas reportaron que el 73% llevaban uno o más plásmidos que variaban en tamaño desde 2.0 a 30 Kb. Los plásmidos también se han reportado en cepas de Sudáfrica, Italia, México, Chile y Canadá. Plásmidos de 18,6 a 65 Kb fueron detectados en nueve cepas de *At. ferrooxidans* aisladas a partir de una mina de uranio, al norte de Ontario, y se intentó correlacionar la presencia de un plásmido de un tamaño particular, con el aumento de la resistencia a uranio, mostrando que todas las cepas con más alta resistencia al óxido de uranio (UO₂) contenían un plásmido particular de 20 Kb. En una cepa la desaparición del plásmido de 20 Kb era compatible con una reducción en la resistencia de uranio. Sin embargo, esta evidencia fue insuficiente para demostrar una relación causal (Martin *et al.*, 1983).

Se han hecho otros intentos para correlacionar la presencia de plásmidos de origen natural con la resistencia a metales (Chisholm *et al.*, 1998), pero éstos no han tenido éxito. Parte del problema es que sin un marcador seleccionable, curar cepas de sus plásmidos es muy difícil y ningún procedimiento ha resultado exitoso.

Varios plásmidos *At. ferrooxidans* se han clonado en *Escherichia coli* (Shiratori *et al.*, 1989; Chisholm *et al.*, 1998; Rawling *et al.*, 1984). Estos incluyen dos plásmidos de resistencia a uranio pertenecientes a la cepa ATCC 33020 de *At. ferrooxidans*; una cepa resistente a arsénico con un plásmido de 20 Kb que se ha encontrado en cepas de *At. ferrooxidans*

aisladas de diferentes partes del Italia, Cerdeña y Bulgaria, y cuatro plásmidos de cepas de *At. ferrooxidans* aislados en Japón.

Rawling *et al.* (1984) trabajaron con cuatro plásmidos recombinantes de *At. ferrooxidans* los cuales fueron transformados en *E. coli*. Se determinó la resistencia de los transformantes a Ag^+ , As^{+3} , Cd^{+2} , Co^{+2} , Cr^{+6} , Cu^{+2} , Hg^+ , Li^+ , Mo^{+6} , Ni^{+2} , Sb^{+3} , Te^{+4} , U^{+6} , Zn^{+2} , y ocho antibióticos. Los plásmidos recombinantes no afectaron la tolerancia de los transformantes a los iones metálicos ni conferían resistencia a cualquiera de los antibióticos utilizados.

Algunas funciones de los plásmidos *At. ferrooxidans* se han expresado en *E. coli*. Rawlings *et al.* (1984) informó que un plásmido aislado de *At. ferrooxidans* era capaz de replicarse en *E. coli* y que tres de los cuatro plásmidos recombinantes se movilizaron entre las cepas de *E. coli*.

2.3.1 Plásmido PTF1

Holmes *et al.*, (1984) trabajaron con el plásmido movilizable PTF1 de 6.7 kb de *At. ferrooxidans*, éste fue clonado en pBR322 y localizaron una región de 2.8 Kb que es requerido para la movilización. Ésta región fue secuenciada por Drolet *et al.*, (1992), los cuales determinaron que las proteínas MobL de 42.6 kDa y 11.4 kDa eran esenciales para la movilización y adicionalmente, se identificó la posición exacta del sitio de corte dentro de la región *oriT*.

2.3.2 Plásmido PTF- FC2

Rawlings y Dorrington (1993) reportaron el aislamiento en Sudáfrica de una cepa de *At. ferrooxidans* con la presencia del plásmido PTF- FC2 de 12.2 kb, éste es altamente movilizable y además presentaba resistencia a arsénico. Esta cepa era dominante en un

cultivo bacteriano mixto que se utiliza industrialmente en la biooxidación de un arsenopirita. El plásmido PTF- FC2 completo fue secuenciado y se compone de tres regiones: una región de replicación, una de movilización, y un elemento de transposición. El replicón consta de cinco o seis genes y una región *oriV* que se encuentra en *cis*, la cual está claramente relacionada con el *oriV* de los plásmidos IncQ de amplia gama de huéspedes. Rawlings (2005) comparó las regiones de ambos plásmidos y encontraron una homología de DNA de 60%, además un 75% de homología entre los 115 pb de DNA inmediatamente adyacente a las secuencias repetidas de PTF-FC2 y los plásmidos IncQ.

La región de la movilización de PTF-FC2 se encuentra en un fragmento de DNA de 3.5 kb y se compone de un *oriT* y cinco genes *mob* dispuestos en dos operones a ambos lados de la *oriT*. Los dos operones divergentes se transcriben a partir de dos promotores situados dentro de la región *oriT*, *mobA* y *mobB* en una dirección, y *mobC*, *mobD*, y *mobE* en la otra. Tres de las proteínas Mob (MobA, MobC y MobD) son esenciales para la movilización. Un hallazgo inesperado fue que la región de movilización de PTF- FC2 era claramente homóloga a la región *traI* de los plásmidos conjugativos IncP RP4 y R751. Cuatro de las proteínas tenían una significativa homología en la secuencia de sus aminoácidos (26 a 33% de identidad; 44 a 51% similitud) con cuatro de las proteínas de la región *traI* de los plásmidos IncP.

La tercera región del plásmido PTF-FC2 es un elemento de transposición. Esta región está flanqueada por dos secuencias idénticas invertidas y un transposón de resistencia a mercurio, dentro de este se encontraron varios ORF's, uno con similitud a la proteína reguladora MerR del operón de la mercurio reductasa y otro con similitud al gen *cmIA* (resistencia a cloranfenicol). Ninguna secuencia equivalente al gen *merA* que codifica la

mercurio reductasa se encontró en la secuencia del DNA, ni tampoco la presencia del elemento transponible era capaz de aumentar la resistencia a cloranfenicol en *E. coli*.

3. HIPÓTESIS

Existen plásmidos en cepas de *Acidithiobacillus ferrivorans* aisladas de aguas ácidas de zonas mineras del Perú.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar molecularmente los plásmidos de *Acidithiobacillus ferrivorans* aislados de aguas ácidas de zonas mineras del Perú.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificación molecular de cepas de *Acidithiobacillus* sp.
- Anotar los genes de los plásmidos de *At. ferrivorans*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Obtención de las muestras:

Las muestras fueron colectadas en Puno: Relave de minas Sillustani y El Cofre, aguas ácidas del río Paratía, lagunas La Gringa y Choquene, y puntos alrededor de las minas; asimismo, las muestras colectadas en la región Huancavelica, provinieron de las minas Acchilla, Palea y Recuperada, ubicadas en el distrito de Ccochaccasa. Finalmente las cepas restantes se obtuvieron del muestreo en Cerro de Pasco, aislados de relaves mineros de la mina Volcán, aguas ácidas de la mina Huarón y de la laguna Yanamate. Todos los lugares de muestreo estuvieron sobre los 3500 m.s.n.m. de altitud.

5.2 Aislamiento de *Acidithiobacillus* sp.

De las muestras obtenidas se tomaron alícuotas de 10 mL y se trasladaron a un matraz de 250 mL conteniendo 90 mL de medio líquido 9K modificado (Orrantia, 1997) que contiene (g/L): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 33.3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1; y $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.04. El medio fue ajustado a un pH 1,6 e incubado a 25°C en agitación constante de 200 rpm. A partir de este pre-enriquecimiento se realizó un enriquecimiento más, en el mismo medio y las mismas condiciones, con el objetivo de eliminar el material de donde fue obtenida la muestra.

Para la obtención de colonias, las muestras se sembraron en medio FeO modificado (Abanto, 2008) y la identificación presuntiva de *Acidithiobacillus* sp, se realizó tomando en consideración la morfología celular, oxidación de ion ferroso y la morfología de las colonias, que en el caso de este género son rugosas y de color rojizo, además se tomó en cuenta la presencia de un halo blanco de precipitación alrededor de algunas colonias, típico de la especie *At. ferrivorans*.

Las colonias aisladas fueron inoculadas en 5 mL de medio 9K y una vez observado el crecimiento, se inoculó todo el contenido en 100 mL de medio 9K para el mantenimiento de la cepa aislada. Las cepas que evidenciaban la presencia de hongos y/o levaduras fueron inoculadas en medio Base (g/L): $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1; y $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$, 0.04; pH 2,5 suplementado con CuS al 0,5%.

5.3 Extracción de DNA genómico

Para la extracción del DNA genómico de las cepas de *Acidithiobacillus* sp, éstas se cultivaron en 100 mL de medio 9K y se utilizó el kit Miniprep de Wizard Genomic Purification (Promega®), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Previamente, se hicieron 3 lavados de las células bacterianas con agua ácida, para eliminar restos de medio de cultivo, centrifugando a 13000 rpm por 8 minutos y descartando el sobrenadante. Al *pellet* bacteriano se adicionó 600 μL de la solución de lisis nuclear y se incubó a 80°C por 5 minutos, luego se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos para adicionar 3 μL de RNasa (4mg/ml) y se incubó a 37°C por 1 hora. Se agregaron 200 μL de solución de precipitación de proteínas al lisado tratado con RNasa, se homogeneizó vigorosamente por 20 segundos y se incubó por 5 minutos en hielo. Se centrifugó a 13000 rpm por 3 minutos colocando el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL.

Al tubo de microcentrifuga con el sobrenadante, se adicionó 600 μL de isopropanol absoluto mezclando suavemente por inversión, hasta formar una masa visible de DNA, para luego centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos, eliminando el sobrenadante cuidadosamente y escurriendo el tubo en papel absorbente limpio. Al tubo que contenía el sedimento de DNA se adicionaron 600 μL de etanol al 70%, invirtiendo suavemente el tubo varias veces para

lavar el sedimento, luego se centrifugó a 13000 rpm por 2 minutos eliminando el sobrenadante cuidadosamente y dejando secar el tubo de 10 a 15 minutos.

El DNA fue rehidratado con 100 µL de solución de rehidratación de DNA por incubación a 65°C por 1 hora, periódicamente se golpeaba el tubo suavemente para mezclar la solución. Finalmente se guardó a -20°C hasta su uso.

5.4 Amplificación y secuenciación del gen rRNA 16S

El DNA aislado fue amplificado con los iniciadores procarióticos universales para el gen rRNA 16S: 27F y 536R (Edwards *et al.*, 1989; Karavaiko *et al.*, 2003). Las reacciones de PCR se realizaron según las instrucciones provistas para la *Taq* polimerasa comercial y el número de ciclos, la temperatura de incubación de cada paso se ajustaron según los pares de iniciadores utilizados y el tamaño esperado del fragmento a amplificar. El programa de PCR consistió en un ciclo de desnaturalización del DNA a 94°C durante 3 min, re-asociación del cebador a 50°C durante 3 min y síntesis de DNA a 72°C durante 3 min, cinco ciclos de 94°C durante 30 s, 50°C durante 2 minutos y 72°C durante 30 s, 30 ciclos de 94°C durante 30 s, 40°C durante 30 s y 72°C durante 30 s, y una incubación final a 72°C durante 7 minutos (Karavaiko *et al.*, 2003).

5.5 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Para visualizar el DNA extraído y el producto de PCR se utilizaron geles de agarosa. Los geles se prepararon en amortiguador TAE 0.5X con 1% de agarosa ultra pura. Las muestras de DNA se mezclaron con solución de carga y como marcador de tamaño molecular se utilizó 1 kb DNA *Ladder* (Promega®). Luego de la electroforesis los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/mL), por 45 segundos, para visualizarlos con un

fotodocumentador. Los amplificadores que visualizaron en las condiciones requeridas se prepararon para el secuenciamiento, realizado por la Empresa MacroGen Korea.

5.6 Aislamiento de plásmidos de *Acidithiobacillus* sp.

Para el aislamiento de los plásmidos se sembró 10 mL de cada una de las cepas con 3 semanas de crecimiento en 50 mL de medio 9K a pH 1.65, para la obtención de células jóvenes. Luego se inoculó 20 mL del cultivo obtenido en 250 mL de 9K para la obtención de suficiente biomasa para la extracción (Chisholm *et al.*, 1998).

El cultivo fue centrifugado a 7000 rpm por 10 min y a una temperatura de 10°C. La extracción de plásmidos se llevó a cabo utilizando el PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit de Invitrogen y siguiendo las indicaciones del fabricante: Se lavaron tres veces las células bacterianas con agua ácida, para eliminar restos de hierro, centrifugando a 13000 rpm por 8 minutos y descartando el sobrenadante.

Al sedimento bacteriano se adicionó 250 µL de la solución de resuspensión la cual contiene RNAsa, se realizó un pipeteo suave hasta obtener la resuspensión total del pellet. Luego se adicionó 250µL de solución de Lisis, la cual contiene además una solución de precipitación de proteínas, inmediatamente el tubo se agitó cuidadosamente por inversión de tres a cuatro veces hasta que se observe una mezcla homogénea y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, sin exceder este tiempo. Luego de la incubación se añadió 350 µL de solución de neutralización e inmediatamente se agitó el tubo vigorosamente hasta que el contenido se observe homogéneo. Luego se centrifugó a 13000 rpm por 8 minutos colocando el sobrenadante en la columna de sílica, centrifugando a 13000 rpm por 1 minuto, inmediatamente se adicionó 500 µL de solución de lavado, la cual contiene etanol, y permite eliminar contaminantes del DNA plásmídico inmerso en la columna, se centrifugó 13000 rpm por 1 minuto, este paso se repitió dos veces descartando

siempre la solución de lavado que pasa a través de la columna. Luego se realizó una centrifugación adicional a 13000 rpm por 30 segundos para eliminar por completo la solución de lavado.

La columna se colocó en el tubo de recuperación y se adicionó 75 μ L de *buffer* TE, este paso se realizó con mucho cuidado de modo que el *buffer* se colocara en el centro de la columna y sin dañarla. Finalmente se incubó por 4 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13000 rpm por 2 minutos. El *buffer* que pasa a través de la columna y se queda en el tubo de recuperación que contiene el plásmido e inmediatamente se almacenaron a -20°C para su uso posterior.

5.7 Preparación de DNA plasmídico para secuenciamiento

La cepa seleccionada para el secuenciamiento total de plásmidos fue la PQ-33. Se preparó un cultivo joven de 800 ml y se extrajo DNA plasmídico. El DNA fue cuantificado y verificada su pureza usando un Nanodrop de ThermoScientific, para ello, se alicuotó 5 μ L de DNA en tubos eppendorf y también 5 μ L de *buffer* TE, el que se utilizó como blanco. Finalmente se cuantificó por duplicado una misma muestra, cargando 2 μ L sobre el lector del Nanodrop por cada una de las repeticiones. La muestra de DNA que cumplió con los requerimientos especificados (Concentración: $>1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$; pureza: $>1,7$) se envió a la Empresa MacroGen Korea para su secuenciamiento.

5.8 Ensamblamiento y anotación de los plásmidos aislados de *At. ferrivorans*

Los plásmidos de *At. ferrivorans* PQ33 fueron secuenciados por síntesis química en HiSeq 2000 de Illumina®. El paquete Velveth versión 1.1 (Zerbino, 2010) fue empleado para el ensamblamiento *de novo* de los *reads* obtenidos, utilizando un valor de K-mer de 63 y los parámetros de *cut-off* y cobertura sugeridos por el programa. Los *contigs* resultantes se

ensamblaron con el software CAP2 (Huang, 1996) para la obtención final de los plásmidos ensamblados, cuyos tamaños se compararon con los observados previamente en el gel de electroforesis.

Los plásmidos fueron circularizados alineándolos con *contigs* provenientes del ensamblamiento del cromosoma de *At. ferrivorans* PQ33, obtenido con el mismo método. Una vez circularizados fueron anotados usando el software Prokka (Seemann, 2014) y el ORFfinder (Rombel *et al.*, 2002), las búsquedas de similitud se realizaron empleando BlastX contra la base de datos del GenBank, tomando en cuenta los ORF's que presentaban un porcentaje de identidad mayor al 30% y un E-value menor a e^{-05} .

Para encontrar posibles secuencias pertenecientes al origen de replicación del plásmido se utilizó el BlastN contra la base de datos del GenBank. En caso de no hallar coincidencias se predijo un posible origen analizando el software Artemis (Rutherford *et al.*, 2000) para la obtención de los patrones de CGskew tomando el valor mínimo en la gráfica como el origen de replicación plasmídico. El mapa circular de los plásmidos pAfPQ33-2 y pAfPQ33-1 fue creado usando la herramienta CGview (Stothard y Wishart, 2005).

6. RESULTADOS

6.1 Aislamiento de *Acidithiobacillus* sp. de Cerro de Pasco.

Se obtuvo cultivos jóvenes de tres muestras provenientes de Cerro de Pasco (PQ1, Psb1 y PH1), todas crecieron en un periodo de 5 a 6 días a 10°C en medio líquido. Se observó motilidad de las células en el microscopio y la coloración Gram evidenció la presencia de bacilos Gram negativos pequeños (Figura 1). Luego de 8 a 12 días de la siembra en placas, se evidenció un cambio en el color del medio a naranja oscuro, típico para el crecimiento de *Acidithiobacillus* sp. Luego de una semana se observaron las primeras colonias aisladas típicas del género *Acidithiobacillus* (Figura 2).



Figura 1. Coloración Gram de las muestras.

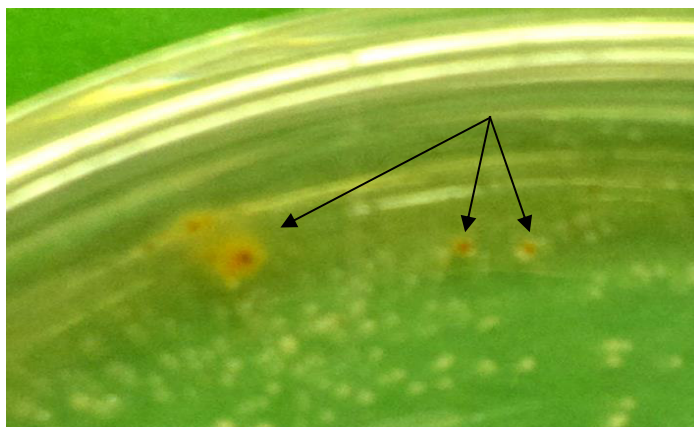


Figura 2. Colonias típicas del género *Acidithiobacillus*.

6.2 Secuenciamiento del rRNA 16S e identificación de *Acidithiobacillus* sp.

Las cepas PQ510 y PQ33, aisladas de Cerro de Pasco, fueron identificadas como *Acidithiobacillus ferrivorans*, las demás cepas provenientes también de esta región fueron identificadas como *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Todas las secuencias fueron enviadas a la base de datos del EMBL (The European Bioinformatics Institute) (<http://www.ebi.ac.uk/ena>).

6.3 Aislamiento de plásmidos de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Sólo las cepas T9 y BB3 provenientes de Puno no presentaron plásmidos, las ocho cepas restantes albergaron un plásmido como máximo, los cuales mostraban un tamaño aproximado de 12 Kb (Tabla 1). Todos los plásmidos aislados de Puno se observaron en sus tres conformaciones en la lectura del gel de agarosa (Figura 3). Las cepas RA1 y RA2 provenientes de Huancavelica fueron las únicas en presentar un solo plásmido de 8 Kb (Tabla 2) de tamaño molecular y mostraron un sola banda compacta en el gel (Figura 4). Por otro lado, de un total de ocho cepas provenientes de Cerro de Pasco, siete mostraban

al menos un plásmido y como máximo tres (Figura 5), cuyos tamaños oscilaron entre 3,5 Kb y ~12 kbp. Solo la cepa PQ36 no presentó plásmidos (Tabla 3).

Tabla 1. Plásmidos de cepas aisladas de Puno. De 10 cepas se obtuvo 8 plásmidos.

Aislado	Nº de plásmidos	(~)Tamaño (Kb)
T7 <i>At. ferrooxidans</i>	1	12
T8 <i>At. ferrooxidans</i>	1	12
T9 <i>At. ferrooxidans</i>	0	-
T10 <i>At. ferrooxidans</i>	1	12
T11 <i>At. ferrooxidans</i>	1	12
T12 <i>At. ferrooxidans</i>	1	12
T13 <i>At. ferrooxidans</i>	1	12
T9B5 <i>At. ferrooxidans</i>	1	12
T9D2 <i>At. ferrooxidans</i>	1	12
BB3 <i>At. ferrooxidans</i>	0	-

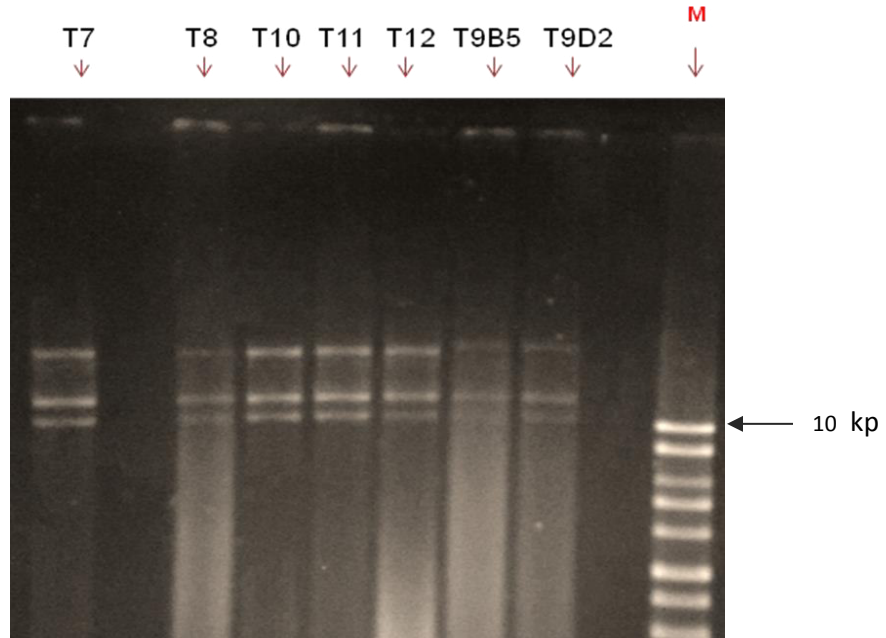


Figura 3: Plásmidos de cepas aisladas de Puno. Se muestra la presencia de plásmidos de aproximadamente 12 Kb y vistos en sus tres conformaciones. M: Marcador 1 kb DNA Ladder (Promega®). Gel de agarosa 0.7%.

Tabla 2. Plásmidos de cepas aisladas de Huancavelica.

De 6 cepas se obtuvo 2 plásmidos.

Aislado	Nº de plásmidos	(~)Tamaño (Kb)
RA1 <i>At. ferrooxidans</i>	1	8
IP1 <i>At. ferrooxidans</i>	0	-
RA2 <i>At. ferrooxidans</i>	1	8
AC11 <i>At. ferrooxidans</i>	0	-
AC22 <i>At. ferrooxidans</i>	0	-
IP2 <i>At. ferrooxidans</i>	0	-

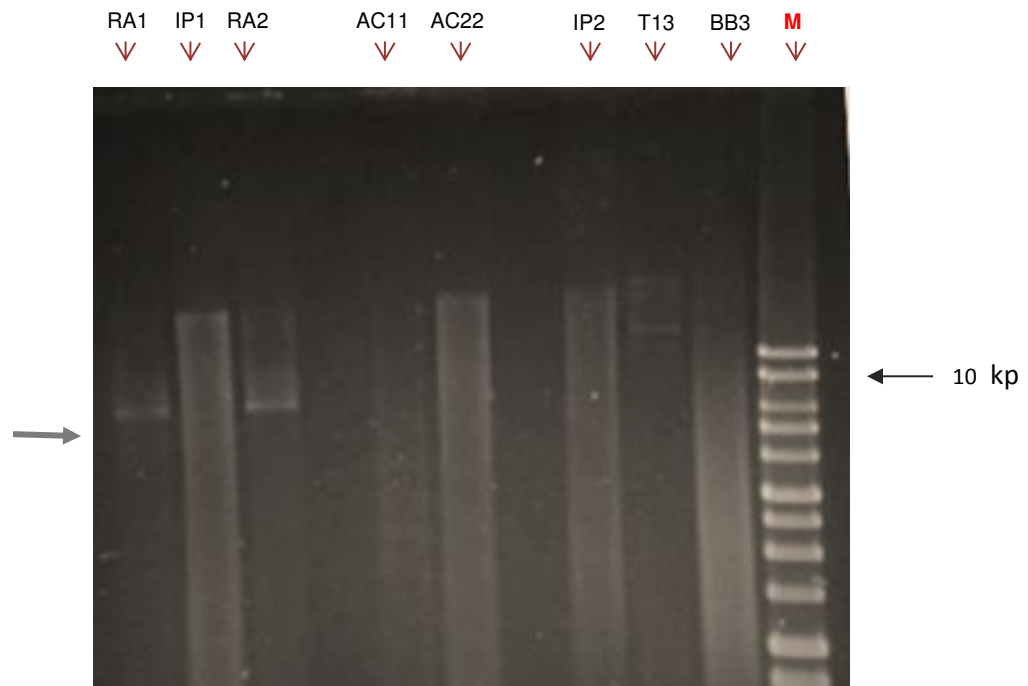


Figura 4. Plásmidos de cepas aisladas de Huancavelica.

Se observa una sola banda bien definida. M: Marcador 1 kb DNA Ladder (Promega®). Gel de agarosa 0.7%.

Tabla 3. Plásmidos de cepas aisladas de Cerro de Pasco.

De 8 cepas se obtuvo 12 plásmidos

Aislado	Nº de plásmidos	(~)Tamaño (Kb)
PQ506 <i>At. ferrooxidans</i>	1	12
PQ509 <i>At. ferrooxidans</i>	2	12, 5
PQ510 <i>At. ferrivorans</i>	3	12, 9.5, 3.5
PQ516 <i>At. ferrooxidans</i>	1	12
PQ33 <i>At. ferrivorans</i>	2	12, 9.5
PQ36 <i>At. ferrooxidans</i>	0	-
PsbA <i>At. ferrooxidans</i>	2	12, 10
PQ16 <i>At. ferrooxidans</i>	1	12

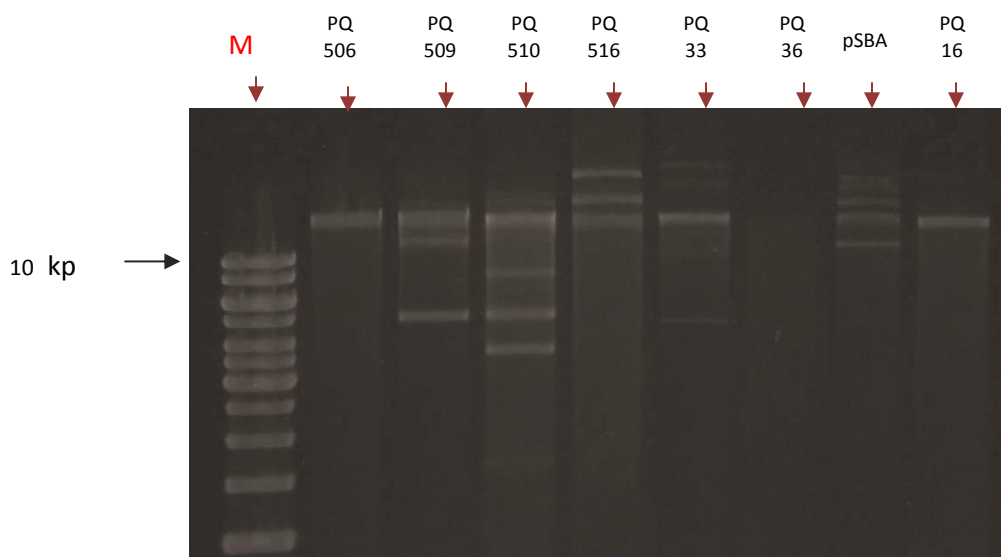


Figura 5. Plásmidos de cepas aisladas de Cerro de Pasco. M: Marcador 1 kb DNA Ladder (Promega®). Gel de agarosa 0.7%.

6.4 Anotación de los plásmidos pAfPQ33-2 y pAfPQ33-1 de *At. ferrivorans*.

A partir del ensamblamiento de los contigs se obtuvieron los plásmidos pAfPQ33-1 (Figura 6) y pAfPQ33-2 (Figura 7), con un tamaño de 10 218 pb y 12 094 pb, respectivamente (Anexo 3 y Anexo 4). Las características generales de ambos plásmidos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Características generales de los plásmidos de *At. ferrivorans*.

pAfPQ33-1	
Tamaño	10 218 pb
Contenido de G-C	60.3%
Genes codificantes de proteínas	10
Proteínas con función asignada	8
Proteínas hipotéticas conservadas	2
pAfPQ33-2	
Tamaño	12 094 pb
Contenido de G-C	57%
Genes codificantes de proteínas	12
Proteínas con función asignada	8
Proteínas hipotéticas conservadas	2
Proteínas hipotéticas	2

En pAfPQ33-2, usando los predictores PROKKA y ORFfinder, de un total de 12 ORF's identificados como codificantes para proteínas putativas, 96% tuvieron función asignada, 24% eran proteínas hipotéticas conservadas, 24% proteínas hipotéticas. Por otro lado, en el plásmido pAfPQ33-1, 11 ORF's fueron identificados 10, de los cuales el 80% tuvieron una función asignada mientras que 20% fueron proteínas hipotéticas conservadas (Tabla 5 y Tabla 6). Sólo se tomaron en consideración los ORF's con un porcentaje de identidad mayor a 35 % y un E-value menor a e^{-05} (Anexo 1 y Anexo 2).

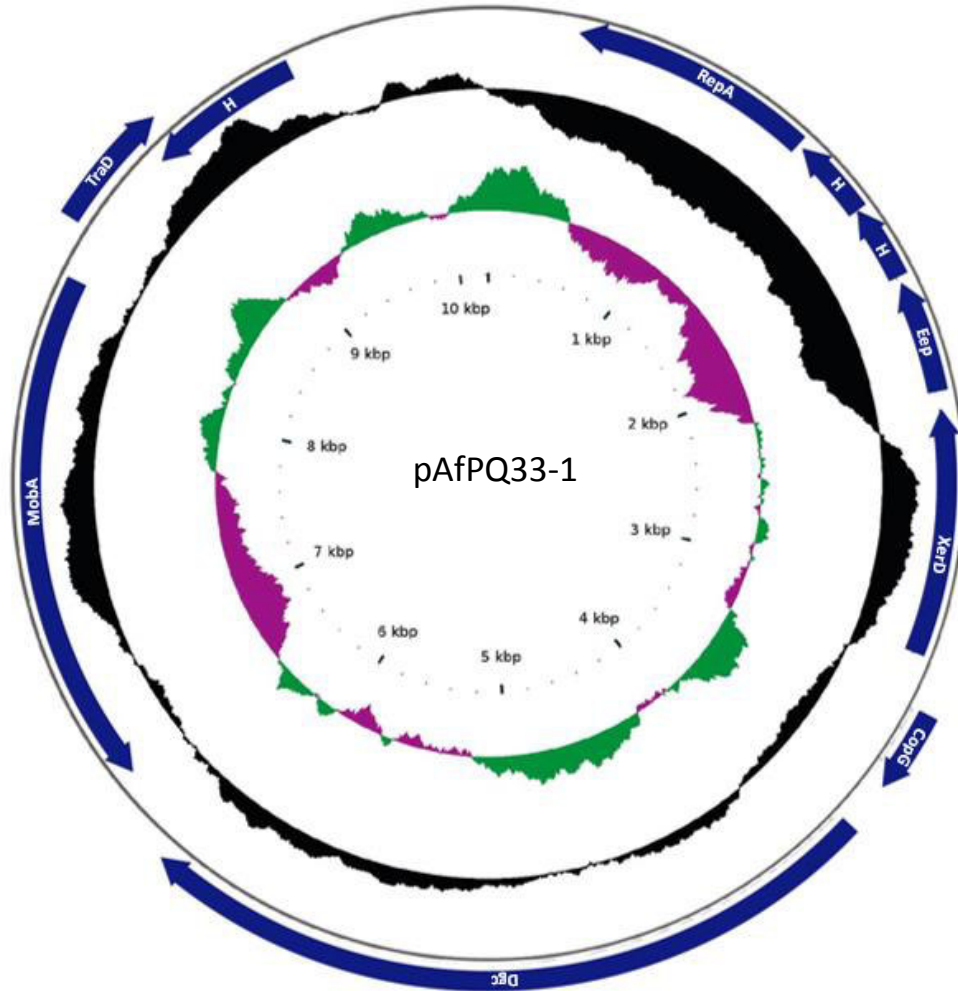


Figura 6. Plásmido pAfPQ33-1. Los genes putativos (ORF) se indican con flechas azules. El sombreado negro indica el contenido de GC. El contenido de GC *skew* se indica de verde y violeta. El sombreado verde indica un contenido de GC más alto que el promedio de la secuencia plasmídica, mientras que el sombreado púrpura indica un contenido más bajo del promedio.

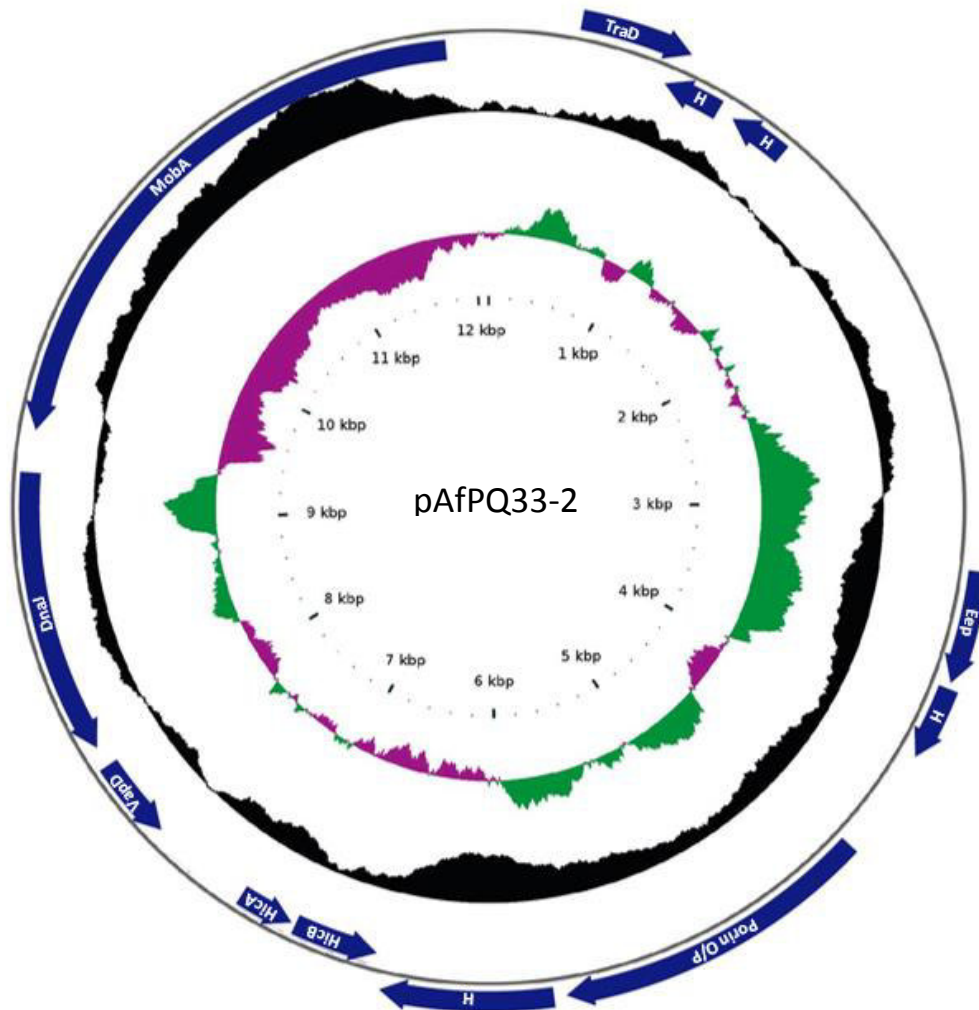


Figura 7. Plásmido pAfPQ33-2. Los genes putativos (ORF) se representan con flechas azules. El sombreado negro indica el contenido de GC. El contenido de GC skew se indica de verde y violeta. El sombreado verde indica un contenido de GC más alto que el promedio de la secuencia plasmídica, mientras que el sombreado púrpura indica un contenido más bajo del promedio.

Tabla 5. ORF's identificados en el plásmido pAfPQ33-2 de *At. ferrivorans*

Designación del ORF	Ubicación	Descripción del Producto	Organismo más cercano
TraD	367-777	Proteína de transferencia en conjugación TraD	<i>Burkholderia cepacia</i>
Porina O/P	(4471-5724) ^c	Proteína fosfato selectiva O y P de membrana externa	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>
Proteína hipotética	(781-1008) ^c	Proteína hipotética	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>
Exclusión de entrada	3272-3706	Proteína de exclusión de entrada	<i>Providencia rustigianii</i>
Proteína hipotética	5779-6456	Proteína hipotética	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
Proteína hipotética	3750-4022	Proteína hipotética	<i>Ferrovium myxofaciens</i>
Proteína hipotética	(1085-1327) ^c	Proteína hipotética	<i>Thioalkalivibrio</i>
HicB	(6542-6901) ^c	Proteína de la familia HicB con dominio nucleasa de la RNAsa H	<i>Desulfovibrio fructosivorans</i>
VapD	(7580-7918) ^c	Endonucleasa VapD asociada a virulencia	<i>Pseudomonas</i> sp.
HicA	(6904-7131) ^c	Proteína de la familia HicA	<i>Geobacter</i> sp
DnaJ	(8026-9213) ^c	Chaperona DnaJ	<i>Alicyclophilus denitrificans</i>
MobA	(9415-11913) ^c	Proteína de movilización A	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>

^(c) : Cadena complementaria

Tabla 6. ORF's identificados en el plásmido pAfPQ33-1 de *At. ferrivorans*

Designación del ORF	Ubicación	Descripción del Producto	Organismo más cercano
TraD	8582-8989	Proteína de transferencia en conjugación TraD	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>
Dgc-cmz	3785-6429	Diguanilato Ciclasa-Fosfodiesterasa con dominio quimiorreceptor de unión a zinc	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>
CopG	3345-3599	Regulador transcripcional de la familia CopG.	<i>Fischerella muscicola</i>
Hipotética	(8928-9491) ^c	Proteína hipotética con región N-terminal de unión al DNA en la replicación plasmídica	<i>Acidithiobacillus caldus</i>
RepA	324-1211	Proteína de replicación plasmídica A	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
Hipotética	(1527-1805) ^c	Proteína hipotética	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
Exclusión de entrada	(1824-2228) ^c	Proteína de exclusión de entrada	<i>Providencia rustigianii</i>
MobA	(6560-8401) ^c	Proteína de movilización A	<i>Acidithiobacillus caldus</i>
Hipotética	(1226-1549) ^c	Proteína hipotética	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
XerD	(2281-3171) ^c	Tirosina recombinasa XerD.	<i>Acidithiobacillus caldus</i>

^(c): Cadena complementaria

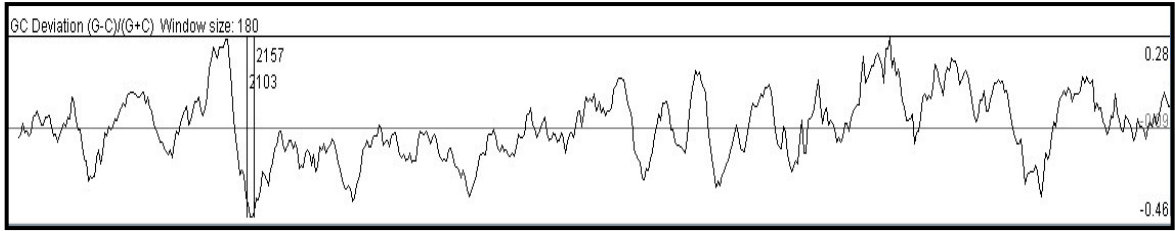


Figura 9. Diagrama de GCskew muestra el posible origen de replicación del plásmido pAfPQ33-2 de *At. ferrivorans* ubicado entre los valores mínimos de $(G-C)/(G+C)$ como se indica entre barras.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Diecisiete de un total de 24 aislados de *Acidithiobacillus* sp albergaron un plásmido, lo que equivale a un 70,8%. Martin et. al. (1981) obtuvo 11 de 15 cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* que albergaban plásmidos (73,2%). Shiratori et al. (1991), reportaron 95 cepas portadoras de plásmidos de un total de 131 aislados analizados (72,5%). Ambas cifras de referencia concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio. Ocho de los plásmidos reportados provenían de cepas aisladas en Puno y fueron identificadas como *At. ferrooxidans*. Al presentar un peso molecular similar, se puede sostener que posiblemente albergan el mismo tipo de plásmido y que estos además podrían ser transferibles entre cepas de *At. ferrooxidans* debido a su elevada frecuencia de aparición. Adicionalmente el tamaño de estos plásmidos (12 Kb) fue similar al obtenido por Rawling et al. (1984) para el plásmido pTF-FC2. Asimismo, las cepas aisladas de Huancavelica fueron identificadas como *At. ferrooxidans*, en este caso se aislaron plásmidos de aproximadamente 8 kb, más pequeños que los encontrados en Puno, pero cuya frecuencia es baja, lo que podría significar la presencia de plásmidos naturales de *At. ferrooxidans*.

Siete de un total de ocho cepas aisladas de Cerro de Pasco presentaron al menos un plásmido. Cinco de estas cepas fueron previamente identificadas como *At. ferrooxidans*, y dos de ellas como *At. ferrivorans* (PQ33 y PQ510). Los plásmidos aislados de las cepas provenientes de Cerro de Pasco presentaron una mayor variedad de tamaños moleculares y un mayor número de plásmidos presentes por aislado, a diferencia de las otras dos zonas estudiadas, esto se observó en ambas cepas de *At. ferrivorans*. La diversidad encontrada de plásmidos se debió a que todas las cepas evaluadas provenían de aislados obtenidos a 4 °C y el aislamiento de las mismas se realizó en el momento en que llegaron las muestras a Lima, de modo que la diversidad bacteriana no se vio disminuida. Los plásmidos aislados

de *At. ferrivorans*, fueron seis en total, dos de ellos presentaron un tamaño similar (~12 Kb) a pesar de provenir de cepas diferentes.

La cepa PQ33 presentó algunas dificultades durante la extracción de plásmidos ya que las células mostraban una gran capacidad de adherencia al hierro, lo que se evidenciaba en el color rojizo de las células luego de varios lavados con agua ácida. Por ello, las soluciones de lisis y precipitación de proteínas no actuaban eficientemente durante la extracción, ya que entre otras cosas como la aparición de proteínas en la muestra, el hierro presente en el precipitado celular inhibía la acción del EDTA, impidiendo que actúe correctamente sobre las DNAsa presentes. Es así que la cantidad de lavados se aumentó a ocho y adicionalmente la cepa se hizo crecer en medio 9K a pH de 1,6, para disminuir la rápida formación de jarosita y la disminución notable de la biomasa que la acompañaba. El DNA plasmídico probablemente sufrió algún daño durante la extracción debido a la cantidad de lavados necesarios para la eliminación del hierro, lo que podría explicar la aparición continua de las tres conformaciones plasmídicas en el gel de electroforesis

El objetivo principal de los proyectos de secuenciación de DNA es adquirir conocimientos acerca de los procesos acontecidos en un organismo. La comprensión de cómo se desarrolla un organismo, sobrevive y se adapta a diferentes condiciones ambientales nos ayudan a comprender las vías de regulación existentes. Un paso importante en la obtención de esta información valiosa es la anotación, que principalmente consiste en la identificación de los genes, la predicción de su función y lo más importante sus relaciones funcionales. Por esta razón, las herramientas utilizadas para este proceso, deben ser en conjunto, lo suficientemente robustas, ya que los genes anotados de manera inadecuada, podrían ser utilizados erróneamente como referencia para el reconocimiento de nuevos genes. Así, la anotación de los plásmidos pAfPQ33-1 y pAfPQ33-2 se realizó utilizando el software

PROKKA que utiliza una base de datos curada, y adicionalmente se realizó una anotación manual usando ORFfinder contra la base de datos del GenBank.

Proteínas Conjugativas

Entre los genes que codifican proteínas participantes en el proceso de conjugación tenemos a *traD*, además presente en ambos plásmidos con una identidad mayor al 40% frente a la proteína del organismo más cercano, *At ferrooxidans*. La proteína codificada por *traD* pertenece al sistema de secreción tipo IV en la membrana interna de las bacterias Gram-negativas y está directamente involucrada en la transferencia del DNA en bacterias portadoras de plásmidos F⁺ (Panicker y Minkley, 1992); adicionalmente encontramos al gen de la proteína de exclusión de entrada, esencial en la maquinaria conjugativa ya que actúa como una barrera en la transferencia de DNA entre bacterias que comparten el mismo o cercanamente relacionado factor F⁺ (Garcillán y De La Cruz, 2008); el gen *mobA*, presente también en ambos plásmidos con una identidad mayor a 40%, cuya proteína está posiblemente implicada en la función relaxasa de movilización del plásmido desde la célula donadora hacia el complejo del pili para su transporte a la célula receptora. Ésta última proteína ha sido reportada en plásmidos movilizables no conjugativos de *At. ferrooxidans*, como parte de su maquinaria de movilización (Rohrer y Rowling, 1992).

Adicionalmente se encontró el gen de la proteína tirosina recombinasa XerD presente sólo en el plásmido pAfPQ33-1 con un porcentaje de identidad mayor al 70%, esta proteína tiene la función principal de separar dímeros cromosómicos luego de la replicación bacteriana, pero también actúa resolviendo formas multiméricas originadas de la recombinación homóloga en una variedad de plásmidos multicopia (Hallet *et al.*, 1999).

Dado el tamaño de estos dos plásmidos 10 Kb y 12 Kb, es probable que sean plásmidos movilizables, debido a que no se ha identificado la maquinaria completa de genes de

transferencia, presentes en un plásmido conjugativo, sin embargo, ya que no se han hecho ensayos de conjugación con cepas de *At. ferrivorans* que no presenten dichos plásmidos, no podemos descartar su capacidad de conjugación.

Sistema Toxina-Antitoxina

Los sistemas toxina-antitoxina (TAS) son abundantes, diversos y están presentes en una variedad de elementos de transferencia horizontal que presenten genes implicados en mecanismos de resistencia al estrés en bacterias ambientales. El sistema toxina-antitoxina HicAB fue descrito por primera vez en un plásmido, está codificado en un operón conformando por dos genes que codifican proteínas relativamente pequeñas. La proteína HicB, a menudo contiene un dominio *helix-turn-helix* de unión a DNA y una RNasa H, ambas típicas en el sistema toxina-antitoxina. Por otro lado, la proteína HicA, perteneciente a la familia YcfA, actúa como un mRNA de interferencia, típico en las toxinas (Makarova *et al.*, 2009). En algunos casos la proteína HicB se encuentra sola, mientras que HicA se encuentra siempre que, al menos un gen *hicB* esté presente. Generalmente el gen *hicA* se encuentra adyacente al gen *hicB* en la misma cadena codificante, pero algunas veces está posicionada en la región *upstream* de *hicB* en la cadena no codificante (Makarova *et al.*, 2006).

En el plásmido pAfPQ33-2 se identificó el gen que codifica la proteína HicB (antitoxina), mientras que en la cadena complementaria, se encontró un gen que codifica a una proteína de la familia YcfA, por el contexto genómico, se podría asumir que se trata de un homólogo de la proteína HicA (toxina).

Replicación y Regulación de la Replicación

El gen de la proteína RepA helicasa encontrada en el plásmido pAfPQ33-1 tiene un alto porcentaje de identidad con la helicasa de replicación del plásmido de *Acidithiobacillus thiooxidans* (98%).

Por otro lado, cabe resaltar que si bien no se encontraron genes de replicación en el plásmido pAfPQ33-2, se reporta un proteína chaperona putativa DnaJ, que no solo se ha reportado asociada a la función de re-plegamiento de proteínas bajo condiciones de shock térmico o estrés (Xiao, 2007), sino también se ha demostrado su asociación con la proteína RepA de inicio de la replicación en plásmidos, de modo que forman un complejo dimérico que permite la unión de RepA al origen de replicación (Wickner *et al.*, 1991).

Origen de Replicación

El BlastN realizado contra la base de datos del GenBank usando la secuencia de pAfPQ33-1, nos permitió identificar un posible origen putativo de replicación similar al plásmido de *Acidithiobacillus thiooxidans*, con una identidad de (86%), desde 1 al 456 pb.

No se encontró un posible origen de replicación para el plásmido pAfPQ33-2 usando el BlastN, sin embargo, al analizar los valores de GC skew, obtenidos con el programa Artemis, se observó un patrón de caída de estos valores que según análisis realizados en bacterias extremófilas y arqueobacterias corresponde al origen de replicación.

PROTEÍNAS DE ADAPTACIÓN AL AMBIENTE

Endorribonucleasa VapD Putativa

La proteína VapD ha sido estudiada como un factor de virulencia asociado con el género *Pseudomonas*, esta es un endorribonucleasa de la familia CAS2 que juega un rol importante como proteína de protección a la invasión de elementos genéticos extracelulares. Ya que muchas de las proteínas de la familia CAS2 han sido relacionadas a la degradación de mRNA de interferencia, se sugiere que VapD podría representar un nuevo grupo de endorribonucleasa específica de mRNA (Beloglazova *et al.*, 2008).

El plásmido pAfPQ33-2 presentó un gen que posiblemente codifique una proteína putativa VapD, cuyo porcentaje de identidad con la endonucleasa reportada para *Pseudomonas* sp. es elevado (65%), y probablemente tenga una función importante en *At. ferrivorans* por lo que su capacidad de transferencia horizontal se ha convertido en una ventaja para esta especie.

Porina Fosfato-Selectiva O y P Putativa

Durante los procesos de biolixiviación diversas condiciones pueden afectar a las bacterias involucradas, entre ellas está la falta de nutrientes como el fosfato inorgánico que es esencial para el metabolismo de estos microorganismos. Así, la privación de fosfato genera la activación de genes que codifican proteínas que permiten la recuperación de fosfato ambiental (Bobadilla y Parada, 2009), una de ellas es la Porina fosfato-selectiva O y P, la cual tiene un sitio de unión específico al fosfato/ ortofosfato y se encuentra sobre-expresada en condiciones de inanición (Poole *et al.*, 1986).

El plásmido pAfPQ33-2, presenta el gen putativo de la porina fosfato selectiva con un porcentaje de identidad de 73% con la porina presente en el cromosoma de *At. ferrivorans*

y una longitud de 417 aminoácidos, que coincide con otras porinas fosfato encontradas en bacterias del género *Acidithiobacillus*. La presencia de un gen de una proteína implicada en la adaptación a condiciones de estrés ambiental en un plásmido se explicaría por la rápida adaptación de esta especie al frío y su condición de psicrotolerante, evidenciada por su capacidad de crecimiento *in vitro* en comparación con cepas de la especie *At. ferrooxidans*.

Diguanilato Ciclasa-Fofodiesterasa (C-di-GMP) con Dominio Quimiorreceptor de Unión a Zinc

El C-di-GMP ha sido identificado como un importante segundo mensajero involucrado en la regulación de varios procesos fisiológicos y juega un papel esencial en el ataque a superficies mediante la formación de biofilms, controlado por la producción de exopolisacáridos (EPS). El C-di-GMP es sintetizado por la diguanilato ciclasa (DGC), la cual presenta el dominio GGDEF, y es degradado por la enzima fosfodiesterasa (PDE), que presenta el dominio EAL (Ruiz *et al.*, 2011).

Recientemente se está estudiando la vía del C-di-GMP en bacterias del género *Acidithiobacillus*, involucradas en procesos de biominería, debido a que la adherencia a las superficies sulfuradas es una característica esencial para mejorar la eficiencia en la biolixiviación. En *At. caldus* y *At. ferrooxidans* se ha reportado la expresión de la enzima DGC; para la primera especie se encontró alrededor de dieciocho ORF's funcionales y se demostró que las cepas mutantes del gen que codifica esta proteína perdían su capacidad de adherencia a superficies de azufre (Castro *et al.*, 2015).

El genoma *draft* de *At. ferrivorans* reporta aproximadamente 16 genes putativos para la codificación de la enzima DGC, muchas de ellas presentan los dominios GGDEF y EAL presentes, así como una serie de dominios sensores, entre ellos el dominio quimiorreceptor de unión al zinc (CZB). Estudios realizados en *E. coli* demostraron que la formación de

biofilm era dependiente de la actividad DGC-CZB o comúnmente denominada DgcZ, que estuvo modulada por la disponibilidad de zinc, ya que la mutación en los aminoácidos que coordinan este ion generaba una disminución en la formación de exopolisacáridos en las cepas estudiadas (Zahringer *et al.*, 2013).

El plásmido pAfPQ33-1 presenta un ORF que codifica la proteína DGC con la presencia de los dominios GGDEF, EAL y CZB. Los dos primeros dominios presentan un porcentaje de identidad de 78% con los dominios GGDEF/ EAL de *At. ferrivorans* SS3, mientras que el dominio CZB es similar (63%) al presente en *At. caldus*. La expresión del gen de la diguanilato ciclasa representaría una vez más un claro ejemplo de la capacidad adaptativa de esta especie, ya que la eficiencia de oxidación de diversos sustratos metálicos aumenta con el incremento de su capacidad de adherencia, hecho que se evidencia en su cinética de crecimiento y además en la adherencia a hierro y cobre observada en los lavados celulares durante la extracción de DNA plasmídico.

8. CONCLUSIONES

- Diecisiete de un total de 24 aislados de *Acidithiobacillus* sp. albergaron al menos un plásmido. Once de estas cepas fueron identificadas como *Acidithiobacillus ferrooxidans* y dos de ellas: PQ33 y PQ510 como *Acidithiobacillus ferrivorans*.
- Se reporta por primera vez plásmidos caracterizados molecularmente de un cepa nativa psicrotolerante de *Acidithiobacillus ferrivorans*, con posible capacidad de transferencia horizontal y sistemas de regulación implicados en el mantenimiento del plásmido.
- El plásmido pAfPQ33-2 de *At. ferrivorans* presenta el gen putativo de la porina fosfato selectiva, hasta ahora reportado sólo en el cromosoma, cuya función es la recuperación de fosfato y posiblemente esté involucrada en la adaptación de esta especie durante condiciones de estrés ambiental.
- El gen de la proteína diguanilato ciclasa, reportado en el plásmido pAfPQ33-1, presenta un dominio regulador dependiente de zinc y dos dominios involucrados en la síntesis y degradación de C-di-GMP, mensajero que media la formación de biopelículas, importante para la adherencia de *At. ferrivorans* a sustratos sulfurados y su aplicación en biominería.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abanto, M. F. 2008. Diversidad de bacterias oxidadoras de hierro aisladas de drenajes ácidos de minas del Perú. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
2. Beloglazova N., Brown G., Zimmerman M. *et al.*, 2008. A Novel Family of Sequence-specific Endoribonucleases Associated with the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. *The Journal of Biological Chemistry*. 283 (29): 20361–20371.
3. Bobadilla R. y Parada P. 2009. Analysis of sulfur metasecretome in mixed cultures of *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Advanced Materials Research*. (71-73):151-154.
4. Castro Matías., Deane S., Ruiz L. 2015. Diguanylate Cyclase Null Mutant Reveals that C-Di-GMP Pathway Regulates the Motility and Adherence of the Extremophile Bacterium *Acidithiobacillus caldus*. *Plos One*. 10(2).
5. Chisholm I.A., L.G. Leduc y G.D. Ferroni. 1998. Metal resistance and plasmid DNA in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73: 245–254.
6. Corbet, C., y Ingledew W. 1987. Is Fe³⁺→Fe²⁺ cycling an intermediate in sulphur oxidation by Fe²⁺-grown *Thiobacillus ferrooxidans*? *FEMS Microbiol*. 41:1-6.
7. Drolet M., Zanga P. y Lau P. 1992. The mobilization and origin of transfer regions of a *Thiobacillus ferrooxidans* plasmid: relatedness to plasmids RSF1010 and pSC101. *Molecular Microbiology*. 4(8): 1381–1391.

8. Edwards U., Rogall T., Blocker H., Emde M. y Bottger, E.1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. *Nucleic Acids Research*. 17: 7843–7853.
9. Garcillán M. y De la Cruz F. 2008. Why is entry exclusion an essential feature of conjugative plasmids? *Plasmid*. 60:1-18.
10. Hallberg K., González E., Johnson D. 2010. *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. *Extremophiles*. 14: 9–19.
11. Hallet B., Arciszewska L. y Sherratt D. 1999. Reciprocal Control of Catalysis by the Tyrosine Recombinases XerC and XerD: An Enzymatic Switch in Site-Specific Recombination. *Molecular Cell*. 4: 949–959.
12. Holmes D.S., Lobos J.H. y Bopp L. H. 1984. Cloning of a *Thiobacillus ferrooxidans* plasmid in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 157(1): 324-326.
13. Holmes D. y Yates J. 1990. Basic principles of genetic manipulation of *Thiobacillus ferrooxidans* for biohydrometallurgical applications. *Microbial Mineral Recovery*. New York, McGraw-Hill: 29–54.
14. Huang, X. (1996). An Improved Sequence Assembly Program. *Genomics* 33:21–31.
15. Karavaiko G., Turova T., Kondrat'eva T., Lysenko A., Kolganova T., et al. 2003. Phylogenetic heterogeneity of the species *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53:113–119.

16. Kelly, D., y Harrison A. 1989. Genus *Thiobacillus* Beijerinck, p. 1842-1858. In J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 3. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
17. Lopez, P., Philippe, H., Myllykallio, H., and Forterre, P. 1999. Identification of putative chromosomal origins of replication in Archaea. *Mol. Microbiol.* 32, 883–886.
18. Makarova K., Grishin N. y Koonin V. 2006. The HicAB cassette, a putative novel, RNA-targeting toxin-antitoxin system in archaea and bacteria. *Bioinformatics Discovery Notes.* 22(21): 2581–2584.
19. Makarova K., Wolf Y. y Koonin E. 2009. Comprehensive comparative-genomic analysis of Type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. *Biology Direct.* 4:19.
20. Mao M.H., Dugan P. R., Phyllis A.W. 1980. Plasmid DNA in chemoorganotrophic *Thiobacillus ferrooxidans* and *T. acidophilus*. *Microbiology Letters.* 8 (3): 121-125.
21. Martin P.W., Dugan P. R. y Tuovinen O. H. 1981. Plasmid DNA in acidophilic, chemolithotrophic thiobacilli. *Journal of Microbiology.* 27(8): 850-853.
22. Martin P.W., Dugan P. R. y Tuovinen O. H. 1983. Uranium Resistance of *Thiobacillus ferrooxidans*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology.* 18: 392-395.
23. Orrantia, B. E. 1997. Aislamiento y caracterización de cepas de *Thiobacillus ferrooxidans* con alta resistencia a arsénico y su utilización en la recuperación de oro a partir de concentrados de pirita y arsenopirita. Tesis de Doctorado en Ciencias

con especialización en Biotecnología. Universidad Autónoma de Nuevo León, Mexico.

24. Panicker M. y Minkley E. 1992. Purification and Properties of the F Sex Factor TraD Protein, an Inner Membrane Conjugal Transfer Protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 267(18): 12761-12766.
25. Poole K., Parr T. y Hancock W. 1986. Phosphate-selective porins from the outer membranes of fluorescent *Pseudomonas* sp. *Canadian Journal of Microbiology*. 33: 63- 69.
26. Rawlings D. E., Pretorius I. y Woods D. R. 1984. Expression of a *Thiobacillus ferrooxidans* Origin of Replication in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 158(2): 737-738.
27. Rawlings, D. E., Dorrington, J. 1993. A molecular analysis of the replication and mobilization regions of a broad-host-range plasmid isolated from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*. 174(19):6230 -6237.
28. Rawlings D. E. y Kusano T. 1994. Molecular Genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiological Reviews*. 58(1):39-55.
29. Rawlings D. E. 2005. The evolution of pTF-FC2 and pTC-F14, two related plasmids of the IncQ-family. *Plasmid* 53 (2): 137–147.
30. Rohrer J. y Rawlings D. 1992. Sequence Analysis and Characterization of the Mobilization Region of a Broad-Host-Range Plasmid, pTF-FC2, Isolated from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*. 174(19): 6230-6237.

31. Rombel, I.T., Sykes, K.F., Rayner, S., and Johnston, S.A. 2002. ORF-FINDER: a vector for high-throughput gene identification. *Gene* 282, 33–41.
32. Ruiz L., Castro M., Barriga A. 2011. The extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* possesses a c-di-GMP signalling pathway that could play a significant role during bioleaching of minerals. *Letters in Applied Microbiology*. 54: 133–139
33. Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.-A., and Barrell, B. (2000). Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16, 944–945.
34. Shiratori T., Inoue C., Sugawara K. 1989. Cloning and expression of *Thiobacillus ferrooxidans* mercury ion resistance genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 171(6):3458-3464.
35. Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069.
36. Shiratori T., Inoue., Numata M. 1991. Characterization and Cloning of Plasmids from the Iron-Oxidizing Bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Current Microbiology*. 23 (6):321-326.
37. Stothard, P., and Wishart, D.S. 2005. Circular genome visualization and exploration using CGView. *Bioinformatics* 21, 537–539
38. Torma, A. 1977. The role of *Thiobacillus ferrooxidans* in hydrometallurgical processes. *Advances in Biochemical Engineering*. 6:1-38.
39. Wickner S., Hoskins J. y McKenney K. 1991. Function of DnaJ and DnaK as chaperones in origin-specific DNA binding by RepA. *Nature*. 350: 165-167.

40. Xiao S. 2007. Real-time PCR Analysis of the Heat-Shock Response of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270. National Natural Science Foundation of China. 55: 1-6.
41. Zahringer F., Lacanna E., Jenal U. 2013. Structure and Signaling Mechanism of a Zinc-Sensory Diguanylate Cyclase. *Structure*. 21: 1149–1157.
42. Zerbino, D.R. 2010. Using the Velvet de novo Assembler for Short-Read Sequencing Technologies. In *Current Protocols in Bioinformatics*, A.D. Baxevanis, D.B. Davison, R.D.M. Page, G.A. Petsko, L.D. Stein, and G.D. Stormo, eds. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley y Sons, Inc.).

ANEXOS

Anexo 1.

Table 7. ORFs identificados en el plásmido pAfPQ33-2 de *At. ferrivorans*

ORF's	Localización	Tamaño del producto	% Covertura	E-Value	% Identidad	Description del ORF	Organismo Relacionado
TraD	367-777	135	53	1e ⁻¹⁰	51	Proteína de transferencia en conjugación TraD	<i>Burkholderia cepacia</i>
Porina O/P	(4471-5724) ^c	423	99	6e ⁻¹⁵²	68	Proteína fosfato selectiva O y P de membrana externa	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>
H	(781-1008) ^c	76	98	7e ⁻⁴²	92	Proteína hipotética	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>
Eep	3272-3706	143	96	9e ⁻¹⁴	31	Proteína de exclusión de entrada	<i>Providencia rustigianii</i>
H	5779-6456	228	91	2e ⁻⁰⁹	25	Proteína hipotética	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
H	3750-4022	91	70	5e ⁻³³	94	Proteína hipotética	<i>Ferrovium myxofaciens</i>
H	(1085-1327) ^c	82	95	3e ⁻⁰⁵	41	Proteína hipotética	<i>Thioalkalivibrio</i>
HicB	(6542-6901) ^c	120	95	3e ⁻³²	50	Proteína de la familia HicB con dominio nucleasa de la RNAsa H	<i>Desulfovibrio fructosivorans</i>
VapD	(7580-7918) ^c	113	83	1e ⁻³⁶	65	Endonucleasa VapD asociada a virulencia	<i>Pseudomonas</i> sp.
HicA	(6904-7131) ^c	76	94	4e ⁻¹⁰	42	Proteína de la familia YcfA	<i>Geobacter</i> sp
DnaJ	(8026-9213) ^c	401	86	7e ⁻³⁵	34	Chaperona DnaJ	<i>Alicyclophilus denitrificans</i>
MobA	(9415-11913) ^c	845	47	8e ⁻⁶⁴	44	Proteína de movilización A	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>

^(c) : Cadena complementaria

Anexo 2.

Table 8. ORFs identificados en el plásmido pAfPQ33-1 de *At. ferrivorans*

ORF's	Localización	Tamaño del producto	% Covertura	E-Value	% Identidad	Description del ORF	Organismo Relacionado
TraD	8582-8989	137	53	2e ⁻⁰⁵	41	Proteína de transferencia en conjugación TraD	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>
Dgc	3785-6429	837	99	0.0	78	Diguanilato Ciclasa-Fosfodiesterasa con dominio quimiorreceptor de unión a zinc	<i>Acidithiobacillus caldus</i>
CopG	3345-3599	85	80	8e ⁻¹⁷	54	Regulador transcripcional de la familia CopG.	<i>Fischerella muscicola</i>
H	(8928-9491) ^c	191	90	9e ⁻¹³	47	Proteína Hipotética con región N-terminal de unión al DNA en la replicación plasmídica	<i>Acidithiobacillus caldus</i>
RepA	324-1211	299	94	0.0	98	Proteína de replicación plasmídica A	<i>Acidithiobacillus thioxidans</i>
H	(1527-1805) ^c	93	98	2e ⁻⁵⁶	96	Proteína hipotética	<i>Acidithiobacillus thioxidans</i>
Eep	(1824-2228) ^c	136	99	4e ⁻⁷⁸	88	Proteína de exclusión de entrada	<i>Providencia rustigianii</i>
MobA	(6560-8401) ^c	623	80	2e ⁻⁵⁶	47	Proteína de movilización A	<i>Acidithiobacillus caldus</i>
H	(1226-1549) ^c	108	88	1e ⁻⁵⁴	89	Proteína hipotética	<i>Acidithiobacillus thioxidans</i>
XerD	(2281-3171) ^c	300	70	1e ⁻⁹¹	71	Tirosina recombinasa XerD.	<i>Acidithiobacillus caldus</i>

^(c) : Cadena complementaria

Anexo 3.

SECUENCIA DEL PLÁSMIDO pAfPQ33-1

ORIGIN

```
1  cggcgaggcg aagccgagga cagggggacc agcaggggtcc ccgccagaga
tctttgcgcc
61  cggcgccgaa ggcggcaagt gggcgctcct tctttcttcc gctgtggggg
tatccaccgc
121 cggaggcggt aaaagctttt cttaaagtta aaaacgcgcg cgcgcgttac
ggtttctgga
181 ggccttatgg atattggcct gcgggtatgt ccgtgtgggt aaaggtacgt
aattggtgtg
241 ggtaaaggta cgtgtctatc cacagaaacg cgtgtgtgaa agtacgtgcc
tatccacagg
301 ctggcgtaga ttatccaccg ctgtcatgct tgtttcgtag ctttcttctt
cattcgcgct
361 ggtttcttta gcatgtcccg gatctgcgcc attgagccgg ctctgccgtt
tttttgtag
421 aaggtgacta catctgcgtc atgatcaaac acgacttgat agccaggcaa
ctcattagaa
481 tctgacaacc cttaaatgag cctccgaaac tctcgcaaag tagccgaact
gccactcttc
541 tcatgcaggg tggcagtggt cgcccgccat cgtggctgga tgccgcaatg
tttcttagct
601 atctcatata tacgcctgtc taacggcttg cgtagtogaa agtaatcccc
atccagagtt
661 agcacgtggc gggccttaac cgatctaaac aaccaatctg ggagcgtgac
ctctaccgct
721 gtcattcggg tgtcttttcc cctctcgaca accttccagg catcaattag
gccaaatcct
781 gcacgctcac gttttccatc tgtttctatg ttggtctcaa tacgtgtccc
gcttaatcta
841 cgcaacgcgt cagccatccg atcataacca actccagcaa ctggacgatt
cgttgtaacg
901 agaaaatcat aggcgacaaa tctgaccggt cgacttatat catctctgcc
tcgattgaca
961 gcctccataa gttgacttat gcagtaaadc caaacgtctt tatcatgaat
tgttgcacag
1021 ccatatggcc caggctgtat ctcaacctta taattcccac gttcgttaagt
acgaaccgac
1081 ctgtctccgg cacgtaaagc aaaaagagga tgctccatgc ttgccgtatc
gtctttcggg
1141 gccgcatcca aatgtcagc aatgaaaaag tctcgctgga tatgcctgtc
tgggcgtagg
1201 tggctacca tatcgatgac agcgcctacc tactctgtcc atgcttctcc
agattctcca
1261 tgtattgacg cagaacctgg ttcacaaaga cttggtagcg cccaccgcgg
gacttgaacc
1321 atgtgatgac gtcttgatcg actcttatgg ttatcggttt ttagcgcgcc
tgatctagaa
1381 cttttgcttc tttccagaaa tcggcactca gctcgggcac atcactataa
tcgatgtcat
```

1441 catcacccaa cgcgtccaga cgattccagt ccgtttggga tattgcctga
ttatcaacc
1501 ctacagcacg cgtaatcact gcaggcttat tcatttggtg cgttttcata
agatcgagtc
1561 tcccggctgt tagccttccg caatgagatg atccggacga ggtttgcgct
cctggttggtg
1621 tacacaacga ccatcacct tccctctatg cgaccagtcc caacatagcg
ggattcacca
1681 tattctcgcc tggcatcctc tgccacaatc atgatcccat cccacatttt
tgacgcatcc
1741 acaaaatcaa ccccgtgttt ttcaagggtg ataaggcgct ttgcttcatc
ccattcaaaa
1801 atcatatgta caataatata tacttaccat ggccaccacc aatgctttcc
ttgcgccact
1861 ccaaagccat ccttctgggtg agttagcagt gctgtgggtt tgccgacctg
ctcacgaagc
1921 caagccactt cctgttcctt ggccctaaga tattcacgca gcacttcggt
ttcagactgc
1981 aacgcgctaa ttacactgtc tttatggcgg cttttatcat gtccttgact
gtcccatact
2041 gtgtcctttg tgttgctgcc acaaaccaa tccccgaaga cccttatcag
ctctgaagtg
2101 tcaataacct ttcgcccttc acggtctggt tctactgtta tagcaccagt
atztatgtac
2161 ttttcgtaaa gatgcatcgc gctctttccg accagccttg cagcttctga
tatggtgacc
2221 ttagccatgt acgcacctgt actttagtgt tgtcgtcagt gttatagctc
caaatcgcca
2281 tcaccgccac agtttctcga agcgcgccgg gttggtggcc gtgtagcgca
ccgtatgctg
2341 gatggtccgg tgtcccagat agtcctgaat gagccgggtg tccgcgcctc
ggtcggccag
2401 cgogaagccg caggcatgcc ggagcatgtg gggatggggc ggcagggaca
gccccgccag
2461 cgccccatag cggcgcagca gcgccagaa ggttttgccc gacagcggcc
tcccccgctc
2521 actcaaaaac agcgcctggc gatccagggc cgccccgggtg cctccttctt
tcctgcgcca
2581 ctgccgcagc cagcgtccc gctcggccat ccagcctttc agcaggcgga
tctcctccgt
2641 ccgcagcggc tgggtggtgg acagcccgc cttgagccgc tggacctgga
taatcctgct
2701 ctccaggtcc acctggtcca tccgcatggc acaggcctcc gtcaccgcga
gtccgtggcg
2761 gaacatcagg aggatcaggc agcggctcgc cagaccggtc cggggattgt
ctttcgtggc
2821 caccagcagg cgatccacct ccagtgtggt gagatgcttt ctttcgccct
ccgaggccgc
2881 ccggcgcttt tggggggtgg ctaccgctgc ggataacaga tcctgtcctg
cggacggcga
2941 ctctgcggac ggcgactctg cggacggcgg ccctgcaggc gaccgcgctg
cgggtggcaa
3001 atcaggggac gatacggcag gcccgacgc gaccggagcg ggtgcatctg
tcaactgtgac

3061 cgcttccgct ggcattcccc cgaacaattc ccctgaccg ggcacgaccg
gaaccacggt
3121 ctccgcctcg atccccctct tccgtttccg cccggtttcc ccgteccacca
tcgccaataaa
3181 tctccgcccgt gatcgtaatg tcccatgata gcccttatg gagcttgccc
ggtagcagca
3241 gaatcagtac attaagactt cgccggccgc aggccacgag acagaatggc
gcataaggctc
3301 ttgatgggtca taccccaacc ctacgcccgc caggagatgg caccatgagc
gcgttgaccg
3361 ttcgactacc ggatgacaaa catcgcccgc tgaaggagct ttccaggcag
cgcaaagtaa
3421 gcgtcagcag gcttatcgac gagatgacca ccctcatgct ggcggatttc
gatgcagaaa
3481 ccagattcca gttaaggga agtcgcgggc aagggaaggc gtctcgcggg
cttgagctgc
3541 tgggcaaggc ggtagatggg gtacacgaca gccagatggt cggggcgga
acggaatgat
3601 gaaaaacccc gtccgaatct atcgccccgt ccagaaggca ctttgectac
tttcggacag
3661 gggctgaggt ggggtgtccga aaggaccgg ttttgacag ttagtagctg
ttgtctcacc
3721 ccctgaaat ttgcaaggaa gcggaagcca tgaaaaacat cgaatcagca
cggtecccga
3781 acggatgaaa cactacagg ggagttacct cccggatttt ttgggcctac
gggaccggga
3841 ctttcagatc atcgatcggg accgggcat tctcgatgcg gaagcaccgg
ccctggctcg
3901 gactttctac gactacctgc tttcctacc ggccaccgcc gccgtctttc
gggactttga
3961 ccctcagcgc ctggatgccc tgatcgagaa acagaccgat catgcccgc
agcttcttgc
4021 tagccacctg gacacgtcct ggcgggagtc catgcgcaaa gtcggcgcgt
tacaccatcg
4081 tctgggtatc gcgccttct gggtcgcccgc agcctatgct ctctactggc
gtcattggca
4141 gaagatactc caggagcagg tccccgcgag cgaccagaag gtgttgccgg
acgccttgtt
4201 ccgcctactg atcggcgacc tgatgacca gctcgacggc tacgcccgcg
cctccagaga
4261 gaccgatgcc gaaaggctgg ccttgttcga cgtgttgctg aatgtgcttg
ccgttccccg
4321 cgacgagtcc ccgcgcccgc aggcgttgct ccagcaaatac tgcgaagcct
tgccgcgcaa
4381 gagctccagt gttcgcctgg cgggttatgt cgtgactggc ggcattgggg
atgtgcttac
4441 gctggaatgc atagccgggc ttcctctgce agacctgcag ataccgaagc
atgcccggaga
4501 tccctgctgg gaagccctgg aaagcggaca ggcggtcatt cagtccgtgg
aagaccggc
4561 cgcgcccgaa tggatcaaag ccttgccgaa ccgcgcttgag gaactcggga
ttttccctt
4621 cggggcgag gatctgcgag gtgtagtctt gattggagtg cgcgaaaagg
gctacttcca

4681 ccgggtcgga tcagcg tact tcgacgcctt tgcgcatctg ggccaattgg
tattgctgct
4741 gcgcaaccaa tccttgcgcg acccctgac cggctctacc aatcgcgccc
tctttcgga
4801 tcgcctggaa ctcgcgataa aacagaccct gcggaccgat cgcttgctgg
gggtggcggt
4861 cctggacctg gacggattca aggcagtaaa cgaccgacta ggccatggcg
tcggagacca
4921 attactgcaa actctgggcc aacggctgca ggcgagttg cgaccggggg
acaccctcgc
4981 ccgcatgggg ggtgatgagt ttggcctgat acttccgaat ctggagagcg
tggaacaattt
5041 cgaggggatc ggcgagcgac tgctggccac catccgcacc ccgatggaaa
tctatggcga
5101 atccgtcagt gtctccggca gcctgggggt gaccctctat cctctggacg
acagcgatgc
5161 cgacacgctg atacggcacg ccgacatggc gctctatgcc gccaaaggatg
ccggccggga
5221 ccagtttcat ctgcataccc tggccctgga cgatgcgta cagaccacag
cgtccatgcg
5281 cacgctactg gaacaggcac tgaacgacca ccgctgctt ctgcactatc
agcccacgt
5341 ctccagtgcc ggttcggtct cgagcgtgga agcctcatc cgctgcagc
atccggagca
5401 gggactgctt gcgcctgcgg cctttttctc cgccctggat catcctcgcc
tcgcgcgtcc
5461 catcggccgc ttcgtcctgg aaacggcctt gcgccaaggg gagatctggc
aaagggaggg
5521 attgccgttg cgcctgtcgg tgaacatcag cacgcgtcat ctgctcgatg
cccgttttct
5581 ggaagacctg cgggaagcgc tggccaggca tccgggcttg cccccggaac
aggtagagat
5641 cgagatcacc gagtcggccc ccttgctcga cctccaaggc gcgcaggaaa
tcttgcactc
5701 ctgccgccgc ctgggggtac gcgtggccct cgacgacttc ggcaccggca
acgcttccct
5761 gacctacctc cagcaactcc ccgcccatta catcaaaatc gatcagagct
tcgtgcgcaa
5821 catgatcaat gatccaaagg ctctcgccat cgtcgcagcg gtgatcaccg
ccagccgat
5881 gctgggcctg gacgtgattg ccgagggggg gaaacggca gatcacgccg
ccttgctggt
5941 caagatgggc tgcagtcac tgcgaaggta tctcttctcc aagccgctcc
cggccgagga
6001 catccccggc tggctcgccc gttttcgccc ggctccccgg ctgggggatg
ccttgcccc
6061 ccccatggac atcctgccgc caatcctgga agcgcacatc ctgcgtgtgc
cgacgttctc
6121 cgcgccctgc gccaaagaaa tccattcccc gccacgtcc tggaagagga
tgccgaggag
6181 tattgccata tggggcggtg gctgcggggg gaagccgcgc tcctatattg
gcagtcaccg
6241 ggtttctctc gcctcctgac ccgtcatgaa cggctgcac aactcgcccc
cgcggccaag

6301 cgtctcctgg acgcaggaga taaggagggt gccttggctc agggagcgct
gctggaagaa
6361 gaaaaccgct tgctgttgga acaagtgcaa gccatgacga cggagcggcg
gacagtacac
6421 acaccgtaac gccccgcata tatccaccaa acgaccgttt gatggacacg
cccgccgagg
6481 cctgcgcggc cagtgtttcc gcagtgccga ttggcgtttc tggacaaaac
gccccagagt
6541 tgagttggtg gacacatcat catccaggtc ccagtcgtc accgggaccc
ttgctgcggg
6601 ccgtgccttt ggtcggctgc ttctttcgta aaagttcctg ctgacgctgc
cggttcgcgg
6661 cctgccgctc cgcctcgatc tgttgccatg cacttttctc aagcacttta
tcggagacgc
6721 tgaaccccgc ttgtaacgcg gctgacgccg ccgccaaccg aaaaccgtcc
gtcccctcga
6781 tcattaactc cgtccagccc ttggctttcg ccaactccag catcaacgga
atatcgttta
6841 tccccctggg attctccgct ttcacaatgg cgcccgtatc gatgatctcc
ctgcccctgat
6901 tatccctgac attcagtcca cccaggtcag gacgcatccg aatataccaa
ttctgctcaa
6961 cggccccgctc tgcggttgcc atcccatagc gctctgccag cgttttttcc
cgccacgcct
7021 gccacggcgt ttttttctcc ccccgaccg ctacagcgtc cgctaccatg
ggtgccccag
7081 gttccgtggt acgccaggag cgctgtgcgg catcgacgtc attcgcctcc
cgccgctcct
7141 gcagcgcggc tttgaccgcc gcctgcgctt ccggcagatc attcggcggg
tagaccaga
7201 tccggcgacc gtactctcct ccctgacat ccggggacgcg gcgctcgacc
tgttcatatc
7261 ctgottggcg gtaggectga cccacatcca agtcggtttg ggtccgcaac
tgctcggcca
7321 atgccaataa ccccctctgg cgggccttcc tggcggcatc ggcggcctga
cgctctcgct
7381 ccagccgcag atcccgcgcc gcctgtatcc gcaaaagacg cgcacgggcc
tcccggagac
7441 gggtttcccg ccgggcaatc tccgccgctt cccgctccgc tgcccgcggg
gcttcaatga
7501 cggcctggcg ctcggccttg gccgcctcga aatccaccac catctccgcc
cgctccggtg
7561 cattctctga cccggcatgg gtcagcacc gccctttctt cggctccggg
ggacggtcga
7621 gggcgtcagc tttatccgcg aactgccgcg cccagatcgg atctttctcc
tccaccgtgg
7681 cggacatatc cagatatgct tcgctgtgcg cttccagcgt gcgatggctc
atccgggcat
7741 cgatgcccgc ctgctccagc gcttcgttgg ccagcccctc ccagagagga
cgcacacggt
7801 cgggtccagggt ggatgcgggc accacctggt catcaacgtc tttgtggccg
ggtatcggca
7861 ggcgctcgcg ggtctttcgc gctccgggca ccttggcatt gggctgcttg
aacagcgtct

7921 cggcatcacg ctccacgcca tccatgatgc ggtcggatag caggatatga
acgtgccgat
7981 gctcgggggtg ggcggcgtcc tgctgggtgga tcgccagcgt gtacggcgtg
accccgccat
8041 ccaccgtggc gacttctga gcaaaaaccc gcgccagcgc tatttgctgc
tcttgggaca
8101 attcttcggg aagggtgccc tcgacctctc gatagggtgca gccgttcgcc
cgctcgtggg
8161 cgtecgctggc gtcccagaaa cgggcgggggt ccgctacggc ccaggcgggc
aaattgccgg
8221 attcggcatg aacgagctcg gcgcgcttgt cgatgacgat ctcccgtacc
gtgaccccat
8281 cctgcacctg ctcccggacc ttcgtgtatg acccttcccg cagcaaataa
cgcgcctttc
8341 caccagcgc tttgccgctg ctcttgctgc cactgctgac gtgcaggtga
taaatcgcca
8401 tacgctctcc ggggtgcagg ggcgcagccc ttgccgtgct catgtccgta
ggacatgatt
8461 aagcgcgcct gctttgcagg atacggcatg gcggctcctt gtataggcat
atcatatcgt
8521 ctagcatggg gcaacagga atcgcgtgga tgatcgtatg acaaaggctg
tcgaggaaca
8581 catggcccgc ctggctgcac agaaagaggc ggctctggaa aaggccaagg
ccgccgatgc
8641 gcaattacgc aaactccggg cggaacagga ccgcctggcg cgaatctccg
cccgaagga
8701 gcgcaacaag gcgctgattc aggcgggcct cctggtggag atgacgagcc
tctgtccct
8761 ggaccgggga accctcctgg gcgggttget ggccctggtc aggagcggc
aggggaacc
8821 cgagaaaacg gcaactatgga aacaggcggg cgacgcggag atcaccggc
gggaaacaga
8881 gaaggcctaa aaaaagacag aaccgaagga accgcgctg gacggattca
gtccggctcc
8941 gctgggcgct gcccctccga cgacaacatc ccgcgcaatc gcgccatgac
cgcctccagc
9001 gcctgccgct ctcccggcat gaccgcccgt tctgaacca gggcttcttc
cgcctctttg
9061 gcccgtgctt ccgccgctg cgcacgggt tccgtgcaat ccacctgctc
cgccatttca
9121 gccagatcgg agagcgcctg ctccagacc tcggccaggg tccggctctc
cgtcgagaac
9181 tgcgccaaca gcgcggcgtg tctccgctcg gccatcgccc aggccgcca
ccagaccgccc
9241 tggaaggccc ctgtcaggtc gctgggcatg gcgggggac tctccaggtc
ctccggcatc
9301 gccggcgcgc tctcggcgtc ccgatggcc tgcagggtgct tctgaatggt
cgccaggctc
9361 ccccgctccga tccgggcgcg aatcgcccgc gcgttgggtg ggttcggggc
gccgagggcc
9421 tcgaccgccc accggacgtc atcggcgggtg atgggaccgg cgggaaccgg
cggtagcatg
9481 gcctcgtcca tgattgtctc ctctaccatg taatttacta tgtaaacgta
ttatatgtaa

9541 attacagata gaagtaaaat atttttacac agtgcccgcc gaccttggcg
gacatccaga
9601 ggggtcggcg gcgttgagga cggagcgccc cttcccttgc agaggcccag
acgctaggac
9661 tgctggtgga gatcgggaga cggcaggggc tcgcaatgcg tgtcgaacac
gttcggaatg
9721 aataaccgcc aaaccgccct ggtgacacgg gtacaccgc cagccgctca
ggaaagcccc
9781 gccaaaggcc caaatctgcc ctacagcgca cacaatgggc attggtggta
gggttcccta
9841 cccaagcgc cggaaaggcg atttacgcgc ccgcaatgcc cattcaatcg
cgacggcgcc
9901 gcacagacc cgaaggagtg cccgcttgc acgccttcgg agtgcccgtt
tgccacgcct
9961 tcggcgtgcc gggcacggat tgctttccgg ccatgcaaac cctcgcgtag
tactccgtag
10021 caggcattcc gccctctggg cggttgcggt agcgtcgaac gatttgcaag
caaatcgccc
10081 gccactcctc gctgttcttt gcgcctgcgg cgctagagca aaagctcttt
tcaaaaaaag
10141 cctgattcac tgctaaaccg aaagggggga gccgatgccg gaggcattgg
gggacggcgt
10201 ccccaaaggg ggtcgatc
//

Anexo 4.

SECUENCIA DEL PLÁSMIDO pAfPQ33-2

ORIGIN

```
1 taaagcactt cgctggatcg attgatccgc acccgctcaa tcaactgcgcc
gttcacctgc
61 tctacggtct tttgtgcata ggcgccttca cgcagaatat accgcacatg
cccgcctgcg
121 ccttttccgg caccgcgact gtgggtcttt gcgtgtaggt ggtattccgc
cattcggggc
181 cctccttctt tcttcttgcc gtctgcaaga ctggccgccc cgcagtggcc
gcgcgtttct
241 cgaagagaaa cattaagcgc cgctgcctt acctgacggt gcgtctggaa
actcgattgc
301 tgtgcaacta tagagtccgt gtatgggtcca aagttccacg cgtgccgcat
ggctcaggag
361 gggatcatgg tttccaaggc agaacgacta cagcaacagt acgagatcaa
caaagcccgc
421 gccgatgcfg ctaaagccgc cctggctgag ttacgccgca tccagaatca
gaaggccaaa
481 aaagaggccc gcaagaaacg gaatcatgcg ctgtttgaat ccgccggatt
gatgatcctc
541 gcggatctcg tegtgtcggg atccggtctg cccgctgtgg accggggcgc
cctgctcggg
601 ggattgatgg cggtggtctaa aacgctggaa cacggaccgg aatcgacccg
ctttcaggag
661 tggaaaagcg ccggagatgc cctgctggcc gaacgcgaag ccgcccgga
atcaccaccg
721 gccaaaaacc ccgcgacggc accagaccag acaccagcgc aatccttcat
tacgtaagca
781 tcacactatc catccataac gccgcccga ggttcccag gcccgctgtg
cggcgtgatc
841 ctgatgcgca cttttaccag caccgccat cagtgccagc agcgcccgg
cgggggcatc
901 ctctccgca ccgatggcct cgatagtggc ccgcttgtcg cgttgatact
gcgccttctt
961 gcgctgcgct gcggtcatcg gatgatcgtg gataggcttc ctgggcatgg
cgggtcctct
1021 ctgtaagcgt gatactcaca atatagcata aagtgagtat cacataaacc
gctttttgtg
1081 agactcacac caccgcaac tcggccacc cgcagccctg cgccttcagc
cagcgggcca
1141 ggctatccaa actcgcccag gtgcggactt cgggtgcgggc cgacttgata
gtggcctcat
1201 ccatgccgag cttgagcacc acggcccagc gctctttgcc gttccagggt
gcgggctgga
1261 gggtgathtt acggacggac ccggcattga cgaggatgcg gaaggtttct
tcggtgatgc
1321 gctgcatgaa cggactcact ttttgaagcg acgaaaaggc caaagtgtag
ccccgttccc
1381 gtctgcatc acccgctgcc tgcgtaaata acccccgaaa acttcacata
acggcccatt
```

1441 ccacgcagtc ccatttgcca gcgccgtgcc gcttcctaa aatttccgac
atgataaaac
1501 tcaacagcca agatcgagac cgtgttctgc aatgcctaca ggatgggtccg
aaaaccgtcc
1561 atgaaatggc ctttctgttg cgtcttagtc agccccgtat cagctcactc
ctccccgaac
1621 tgaaccgaag aggtcttata cacgcgcccc ggtgtaagggt gggaccacaga
ggcaacaccg
1681 tgaatctctg ggatctaccc attccgcagg aaacccccgc atgaaagcca
aattcaaaga
1741 cgccacagtc ggcgccaccc tctggatcaa ggatcacggg gaatggaaag
ccgtcaccgt
1801 gacggaagtg cgtaaaggcg gcaaaggaca caaggttgct tggaccgatg
ccgatgggaa
1861 ccccggtaaa agcgcgctgg acaccatgta cgcgcaacc aaagactgaa
aacaggttta
1921 tccccaaaat ctgtggggca ccctgtgggc aatgtggaca aaaccctgac
cgggatatgg
1981 aaagcagcac ggcggaaaaa gcggcgccct ctccccagac ccctcaccca
gctcgtgcag
2041 gccacacccg cgcactccg tagcaggcac tccgcgtcgc catgctcctt
ggttgcggtg
2101 gcgtcgggcg atccgcaagc gaatcacccg cactcctcg ctcttctttc
cgctacgcgg
2161 tcctgagcaa aagctcttta tcggccttcg gcctgtatcg acttcccttt
atcttctttc
2221 ttcgttcaac cagcccggag ggagtaaggg agggagccag ggcgaaagtc
tcctaatcc
2281 acccgactg cccttttcag acagcggggt ggattaggac tttcgcctg
atcgatctac
2341 tgccgggtcca gcccgctcgt cggtcggtcg gtcggccact caaggtggcg
ggcggcgtgt
2401 actcggaatc agcacacaca acacggctca agagattcct ctccccgtgc
ctgtccgtat
2461 cgcctttgag ggcctatcca acgtaagcc tgcacgcagg cccttgccgt
gaataaacgc
2521 cctaggctgt ctctaggccc cggatatgag cagttcccat cctctccggg
cagtttccat
2581 acggcgggat cgggcctcat ccccagcgc agcaagtaag attcacaccg
ggggcttctt
2641 gggacgcttg caccgcatgg gcaaaacatc tctgaaaacc ctacggcgga
gcgcgagaca
2701 ggccgggacg atggcaaagc cgcccgcgaa gggcgcagaa aggcctgca
aggcgcggca
2761 aacgtgccag tgggtgatag atagcggaaa gggagaaaga gaggctagag
gccacttgcc
2821 acccccgcaa cgtggctcat acagggcgt cgatgcgctc ggctacgtc
gggggatggg
2881 ggggctgcag ttgcagccag gtagaaagat tttgcttgct ggtaaaaagt
cgctacactg
2941 tgcatgtttc ttgccctggt tgagagggtt aaggaccac ggcaacagcc
tggggagggc
3001 tgttgtcacg gcgtatgggt ttatcctagc gccatttgta aaaaattcct
acctgccagg

3061 cggcggcagg atgccagggg cctcgatccg aaaggatcgg ggcctttgtg
cgccccgagc
3121 caacatctca ccaaagccac aacattcgcc ttaaccaacc ttatctgtgc
aaggaaacct
3181 gctgtagtcg tcaaactctgg ttgagaattt ggcgtgtgct tcaccatgaa
cacgttatcg
3241 ttcacaatga aactataaac acgttcacag aatggggcgg acagtggcta
tattgagcat
3301 tacagaagct gcgcgactct ttgggaagag ccgaacaaca ctatacaaat
acaacaagtc
3361 tggggctctg agctttgttc caggggacga tggcaagcct gccgttgata
tgtctgagat
3421 gcttagagta tttggcagcg ttcacggtgg taccgttcat aatagccaaa
atgaacaagg
3481 caacacgtcc aaattagaca atgaacacgg cctgttagca gaaaaagttg
ccgcattgca
3541 ggaggttgtc aggcgacagg acgagttact gagaaaggca gatgaccgag
aaaaatggtt
3601 gcaggagcgg ctagaacgat ctcaacaaca gatacaagca ctgatccatc
aaccgccgga
3661 gcagcctgaa gcacttcaaa aaagaaaaaa gtggtggccg tggtgacaga
caaaagggcg
3721 gcgcctttta gtaatccatt aaaccgccta tgcttggcag aacagactca
tacgggccta
3781 ccgcaatgga aaacatcgaa aacctagttt tggaaactt gcgccatatac
cgaggacgcg
3841 tggatcaaat cgctgaggat atgggcgacc tgaaacaccg catgtctggc
ctggaacaag
3901 ctatgaatct ggtgaaacgt gagatcaacc tgagtgagga aaccgatgcc
aggcagcaga
3961 tcacgttgga caagctggcc gagcgcacatcg gacgcattga gcgccgtctc
gaactatcct
4021 gacaggacgt aaaatggggcg gcctcatcgt tttgtctcaa aacagccagt
caccggcacc
4081 cagagaacct agcaaaatca ggccatccgc ccgtcctgtc cgagcaccca
caagacagaa
4141 tgatgcattc tgtctaatacg ctaagcgtgt gacgccgtgc tgatctttcg
gagcgcaccac
4201 tacaatccc acaccctcc ttgcatctcc acctgtgctg gcttagatta
aatacgaacc
4261 tagttacttc atgactgggc tcctcccgc atgagccaag tacctcaacg
gtacttggct
4321 tttggctttt ttacaccca cacctcaagt ttcttgcatc ttctgacac
tgttgtatac
4381 tttccacagg gataggcaaa aagtatacgc caaaggacca tctggccagc
gccgttatcc
4441 ctgagactga tttgaggagg agtacctaata atgaagaaga atctcgtagc
actagccgctc
4501 gcggcggtt ttggtgttcc tggcgttgct tttgccacaa caagtagcaa
cgctgatacc
4561 ggtccggttg tttacggcta tgcgcaaate actggcgccc agcagtttgg
gacatctacc
4621 aatggttcat ctcaaggcag cagcggtttg gtatttggtg cgaaccgtat
ccgcttaggc

4681 ttcaagggcg aggctgttcc cgggtgtgacc tataatatga tggctggctg
ggataacgct
4741 gctatccgca ggggctatgg caacctgttg aacaacggtc ttggtaacaa
tggtaacgca
4801 tccatccttg atgcatgggtt aaactacgcg ccctaccct ttgctcagct
tgaagtcggc
4861 aagttcaagc ttcccgttgg taacgacgcg aaaggcaatg agttgccctt
tgtattacgc
4921 agcatggccc agtccctact tccagggcgc tctgcaggtg ccatggttca
tggcaaatac
4981 gtattgaacg gtcggactgg taccgctcta ggttatgcag ctggcattgc
cgactccacc
5041 tcaactggatt cctacaacgc ttatagcgcc ttcacgtccg gaaatggaac
gatcccattt
5101 ggtgctggac agagcgctc cctcaacggc agcggcacct atttggtttt
tgcccggtta
5161 cactatgacc tcatggggcc tacactgaaa gctgaaatta gtggctcaga
tatgaagctg
5221 cattctcttc cttatgcacc tgcagcatcc gtctatacat ggaacgcgcg
catccacggc
5281 aaaatcatgg gcattctcta tgcagcggcg tatacccagt taaagagtgg
tcgcagcttt
5341 ggaacccta acggttataa tggttctaata gggatgtctg ccacagattg
gtatgctcaa
5401 gctgggctca atctctatca ggcgggctta acgccgctgg atatcgaacc
agcagttcgt
5461 ttcgactcgt ataccatcaa cgatcataac ggtactgatg cgaagatcga
taacaccaca
5521 ctcggactga actacttcgt caaccctaac aacccttatg cggcagaggt
tcagctgaac
5581 tacatcattc cttctgcgcg tcaaggaaag ttcggttacc agccgaatgg
tggcttcaat
5641 ggtggcgcgat ttggagcgaa tcaggctcca atcgatgggtg tcgcgtataa
tactctgatg
5701 ttgcagttcc aggccggctt ctaattagct gataatggag aaaggccgct
atcgaagat
5761 ggcggccttt tgcatttaat ggcatacacc aagcaaagta ttcacgatga
tgaccagctc
5821 cgattggcgg caaaatcgct cattgtacta cgcaatgaaa aattggcagg
aatcgccaag
5881 gccttgcaat ttgaccagc cggtatatct ggctggctgg gcggaacccc
aaacagaatg
5941 tctttagaaa aaaaggaatt tttttccacc tatctaggat tggaaatcgc
gcacatttct
6001 ccaaaaattg ttcaccgctg gtcaacaaat gcggaagacg ttagaacctt
tcttctctc
6061 gtaattaacc atgaaatgct tcatcgtata cgcatcagtc aggtttcttc
tgacactatc
6121 ccggctcggat gcatttacca ttcagccata ggtaatacaa tacttattgc
cttatgcaaa
6181 ccacaaaata aagcatttcc tatgccaatc gtcaccccaa aagatagtgg
ctggggaaag
6241 ctattaccac ctatagatgt ggccaagagt acttgggaatt catggtggac
agatcaaac

6301 accaccccag aagaaatcgc cgcatacctt tccatttctc aaaaaacgac
aatcatagc
6361 tctctggaat cgtgggcatt attggttgcg gagttgatcc aacgcggcgc
ggatatcgac
6421 agcgctcgcc aatgcctaga aaccaagggtt ttgtgacact ccggtttttg
gacactttca
6481 gggctgaaaa tggcctcgaa agtgtccatc aaccctgcta ctttttagcg
tccggtaaac
6541 ctcatccac ccgcgttccc tgaccagcc cttggcgat gagcgtcaaa
accatcgcat
6601 tgagcgatac tccctcatt ctggcccgcg cagcaagttg ggcatggatg
gattttggta
6661 ctctggcaat gaatttgccg gaagccacgc cccaccatt cggtgccggt
accggcatcc
6721 cctgctcctg caaagcctct ataacagcat tcaaggcttc ccggccattc
tgtaacgctt
6781 cttccagcgt ttcgccatcc gcaatgcatt ctgtgaaatc cggataggaa
atcagaaatc
6841 caccaccttc tgaaggcttc agcggacgca tctcgaacgg gtaatcttcc
aaggcataca
6901 tggtcattct cctgccacca ggcgcaaaaa ctttttgatg tagaccggct
tgatcggctg
6961 atgggcgggc actggcagcg tccgtccatc gggccgata aatacgcaat
gactgccgcc
7021 atcgtgtcgc caggtgattc cgtgctgacg ggcaaccacc tgaagatcat
caatctgcca
7081 ccccatgggg tggtttttca tagcctcacg cagtttgatc gctttattca
tcaacgaatg
7141 atactacttg taacatcggt tagcatcata gacgacctct caaaaccgac
cgtttttgag
7201 aggctctcaa cgtctgtcac agtgacacgc tgaatcagtc cttaccggt
ctcaaaatca
7261 gctcttgaaa tgtgtttctt gattcggccc tgaatgaacg ggttttgaga
ttgtcactgt
7321 gaccagcget gcccatctct tacctgggca tccccagatg gatcagaatg
gtggtctcca
7381 cggcggtcat atccgccagc aaggcattgc accatgcctg tgcttcagcc
tcacgctcct
7441 gatcagcggc catcgccgtg tagccgtcat ccagggcggg atcagacaca
tgcggcctga
7501 gcaaatcctc actcaatgaa ttggttcattg tgccgcctgc caatggttcg
gttcagccct
7561 gtctgctaaa cgtctctggt caggccgcct ttaggtcggc gctgtggagt
ctttttttta
7621 gatcgtgcc ccgttccacg gcgggcatca gatcgttggt atcctcgatc
cgcagcatcc
7681 gaatgtcacg caccgaagaa gcaaaccagt cgaaccgtgc ggtgatgtcc
tgaacggcca
7741 gaacgcagga cacggcatcc acggtatccc caccaaaata gacgctgccc
tgttgccagt
7801 tgaatccgta gtcctctacc agaatacgac gaatatccga gtaggcggtta
ccgtaagact
7861 cattgtgata ggcatacctc agggtttgcg tatccagatc aaaggtgatg
gcgtacatgg

7921 caactctcca aagattcggc gttttcatta gtataggggt gaatccagcc
aacaccaaaa
7981 cccgcttcac cgcgccttc ttcgccgtcc cgggtctttg cggtttcagt
agtcctcatc
8041 cacgccccag aacatttccg tatccccgatc catctgctgc tgccttcgta
tctcccggcg
8101 ttgcatctgc agccaggctt taagtgtcgt cggctcctgg agggccacca
tctcctgctg
8161 gatcccggcc gtggcccgtc gcatttcccg gagcgtatcc tcaaaatccc
ggataaagcc
8221 ctttgctgag cgtggggcaa aaaacggccc ccccatgccg gcagcagcgc
gctgctgaat
8281 atcctgaacg cgcgccttga ggctgtccag atgttccttg agcgcctgat
tataggtttt
8341 gaggtgatcc accgccaag cgctgagcgc ttccggatct atctgtccga
gatcctgctg
8401 cagagcgagt agttgcagca ggtctttccc ggcataggcc tggttggcac
gttgcatcag
8461 tgcggttttc tgttcccgcc gttctggatc ggtttctcgg tcgggatgca
ccatactgac
8521 cagttgccgg taaatcgtgc gcaaggcctg ccggatattt tcagcctgcg
cggcctggtg
8581 ggtatcccgt gctttttgcg cgcccgtacg cgggcgttct ggcgcttcat
cgaccggctc
8641 cgcagccgcg cgcgcgctt cccgccgttc ccgccgaag gtttccatct
gtgccgcaa
8701 cgggtctttt atcagccgct ccatgaagtc cgtgaaagac tccggacccg
tggctgtctc
8761 ctcgacttct tccgcagcat cgccggagcg gaaatcaaaa aagtccgcca
gagattcaat
8821 gtccatgact tcagccccgc catggcgctg gtgaatctcc cgaaggggtg
tatcgtccgg
8881 ataactccata atcagttctg cggcgagctg cacgatgacc tgtgacaggg
tctctcgggc
8941 gacattgcc agtttgatcg cctgactgct accatccagc tgctgcagca
actggatgcg
9001 caacgccaga tattgctgct gtgccgggag aagatcgggtg ataaccggtt
gttgggtatc
9061 ggccattgcc cgctcccagt cctgtaagtc ccgttccgtg ttggcaatct
gctggctcag
9121 gcggttgaag gttctttgcg gtgcggacag gggggctttg ggcgcggcgg
gggcaatagt
9181 cagggcaagg gggcggcact ttggatcaga catgcgtgca ggtaacctct
gtaatttata
9241 ggcgagacca gaaaaaacac actggccacc gtgtggattc agacatccat
ggtggctagt
9301 aaaagtggat gcatgctgaa aagtaagtc gtcaccccaa aaagacaagg
ccatcaccct
9361 ctctgatacc atcaacctca tcaccgtacg caccaaaaca gagcaccac
cacatcaccg
9421 cttcatccct tgactgttcg aaagcacctt ttctgacgg tatgcctcac
gaccgcctg
9481 cacagatttg gacagcgcct tttcattcac gcccaatcca accccacgct
gcaccagttc

9541 cacaaattcc cgctgtatct cggtttgctt cccggcgтта ctgcccactt
 tctcagcccg
 9601 acggcccagc ttatgggcgg cagcccgaag gactttgoga tcttgttcca
 actgcgcttc
 9661 ccgctcctgc ctggcccagc ccatcccctg tttgtaagcc gtgttcgcca
 tgccccttgag
 9721 cgacgggtcg tcttgatct cctgcgcgag acgctggtgt tccgggtccg
 ctttacgctg
 9781 ttccgggctc cattgtccgc tttccagtcg ataaccacg ctttccgccc
 gcttttgaat
 9841 atccgcctcc gtgtccttcc gctgggcagc ggccagcgcg tcccaggccg
 cccgcactcc
 9901 cggcagatca gggctctggat aggcatagaa cccatcttta tctccacaa
 aaccgcttc
 9961 cagaaagtgt ttccctgagt tcccagagcc atgacgctcc agatgcaaga
 ccagcgcac
 10021 gagtttcttg acccgatccg cacgaatccg cgctgcctct tcccgtttcc
 gctgggcccg
 10081 cttctgctcc aggtccagtg tgtaccagaa ctgctgctgc ccgtccggt
 catgggtgtt
 10141 cagacgctcc cgcgcctgat cgagcgcggt ccggtccccg gctttctcca
 agggcagcgc
 10201 atccagcggc accgactgcc gcagcaagtг ttccagcacc aaaacctttt
 tcgtgatact
 10261 cacatcacca ccaaagtca ccgtcacacc gcgatccacc ccggcccgtt
 gccgacgctc
 10321 acgcaaagcc cccgcataac gctcgaccga ctcccgcggt accgccccg
 atatggtcca
 10381 cgcgatgccc ggaccttccg gcgcatcctt tctactttc aacgtcagac
 cgccctgcgc
 10441 ccaggcggtt aatgccgctt cccgtccagc ggccgcccgc tgtgctttta
 acgggtcggg
 10501 atctttggag agcgcctgcc gttctgcccgt ttctccgtag cggcccacg
 tccaggcctc
 10561 tgccgcttcc cacaaagccg gacgctgcag aaccgaccga tccagtcctg
 ccggacacaa
 10621 cagcgggatc tggccgcccg ccagacgctg tgctgtgcc tgtttcggat
 gcgcccgcac
 10681 ccattccgcc aagactgggg ccgcttccag atctttgacc cgctgtgctt
 cgggtgccct
 10741 ctctgctgg gccgcaatcc ggacggccag atttccatcg gtcagtgtga
 atcccgcgc
 10801 cagcggcccг gctcccgcc gcactgaaa gtctccgctc cctgtcaccg
 tcagggtttt
 10861 ccagccttcc gcgcccgcga tcttcagcat ggcttcgac tcttgggcct
 tcccgcccgg
 10921 gctggatgcc gctgcaagg ccaccagccg gtcgccataa tcggtgatgt
 ccatcacttt
 10981 attgtggata tgcaggctgg gcgcccctgcc aagggtccgg ctgcccagat
 cccgttcgac
 11041 ccgcaccag cggcccaggг cctgaccgac gtccgctccg taggcctccg
 tcagtaccgg
 11101 ctcccгatac accgcccagg cagggcgctc cggattgccg ggcaccgccc
 ccgagcccg

11161 gaaccggttg cgcgtctccg ccagcgtctc ggcgtccagg acccgatcca
cccgcgcctg
11221 ctgccgtttc cgccagcgct cacgaatgcg catcttgtcg aaagggtcac
gcagcccctg
11281 gcgcgcccgc gccgccgaca acaccgcttg cgctgctcc accgcctgcc
ggteccgatc
11341 cgccaccgct tccgccaaac gccggacttc caccgcctgc gccgcgcg
ccctggccgc
11401 ttcaaaatcc accaccatcg ccgcccgcc cggcgccttc tccggccccg
cgtgggtcag
11461 taccgcctt ttcttcggct ccgggggacg atctaacgct tctgcgcttc
gggcgtgctg
11521 caaggccgct atttcgtgat gatcacacat cgctgcgcg gccaaaggctt
cctgctccat
11581 ccgcgcgct tccaggctcc ggtgatcgat ccgcgcgtct acttccgcat
gggccagcgc
11641 gtcgttcgcc agtcgcgccc agagggggcg caccacgtcc cccagccact
cctggccgat
11701 ccgcgcctgc gtcttcgggtg cgctccccg tgccgggtct ttccccggat
tcgctgcccc
11761 ccgaaaccac aacgccacat cgcgttcgat gccatcattc actttgtcgg
agagcatcag
11821 atgacagtgc agcaacatcg gtttttttc gctgcgatgt attgccagcg
tgtacggcgt
11881 cgtccaacc atgccgggtg ctaaccccg cacggcggca agttcctctg
caaagaacg
11941 tgccagttcg atggtctcgt tgtcggataa ctcttcggc agcgcaaatt
cgatctccc
12001 atagaccgtg ccgttcgccc gctcgtactg atctgcagca tcccagtagt
ctgcgggagt
12061 ctgcgcccag acgggcagat ggccggattc cgca
//