



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE MISANTLA

DETECCIÓN DE REGIONES CONSERVADAS EN GENES BACTERIANOS RESPONSABLES DE LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS.

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO AMBIENTAL

P R E S E N T A

JOSÉ DANIEL JAÉN LANDA

DIRECTOR: M. Bt. GUADALUPE CORELLY SALAZAR SALAZAR

CO-DIRECTOR: M. Sc. ELIZABETH SALAZAR HERNÁNDEZ



**INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE MISANTLA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

FECHA: 19 de Septiembre del 2022.

ASUNTO: **AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN
DE Tesis Profesional.**

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente hago constar que el (la) C:

JOSÉ DANIEL JAÉN LANDA

pasante de la carrera de INGENIERIA AMBIENTAL con No. de Control 142T0415 ha cumplido satisfactoriamente con lo estipulado por el **Manual de Procedimientos para la Obtención del Título Profesional de Licenciatura** bajo la **opción Titulación Integral (Tesis Profesional)**

Por tal motivo se **Autoriza** la impresión del **Tema** titulado:

**“DETECCIÓN DE REGIONES CONSERVADAS EN GENES BACTERIANOS
RESPONSABLES DE LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS”**

Dándose un plazo no mayor de un mes de la expedición de la presente a la solicitud del Acto de Recepción para la obtención del Título Profesional.

ATENTAMENTE

MI. GRACIELA GUADALUPE AGUILERA ÁLVAREZ
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES



Archivo.

Agradecimientos

A mi madre por todo su esfuerzo y apoyo que me ha dado en el transcurso de estos años para que yo pudiera concluir con esta pequeña meta de mi vida.

A mis amigos/compañeros que estuvieron en mis peores y mejores momentos de todo este proceso.

A mi grupo de amigos virtuales (DG) que con sus pláticas nocturnas hicieron más amena la realización de este trabajo.

A las personas que están y estuvieron en algún punto de mi vida mientras realizaba este trabajo y que de alguna forma me dieron su apoyo de forma directa e indirecta.

A cada uno de los maestros/asesores que me impartieron clases y que fueron parte fundamental de mi formación profesional.

A la M. Bt. Correlly por que a pesar de todo siempre estuvo disponible apoyándome, guiándome y regalándome un poco de su tiempo para que pudiera concluir este trabajo.

T.

-¿T de Troy?

-No, T de Termine la Tesis.

RESUMEN

Mediante diversos estudios se han podido conocer varios géneros bacterianos que poseen un caracterizado poder degradativo y de remediación de zonas contaminadas por hidrocarburos, sin embargo, algunas especies bacterianas por su género se encuentran con un restringido uso en ciertos ambientes, debido a que suelen ser patógenas tanto en humanos como en flora o fauna; impidiendo así su aplicación en trabajos de biorremediación. A pesar de estar distanciados filogenéticamente la mayoría de los microorganismos, poseen secuencias similares para una reacción enzimática. En este trabajo se identificaron las regiones conservadas codificantes en diferentes taxas bacterianos con actividad catalítica para una gama de hidrocarburos, generando así, una primera base molecular en la construcción o diseño de un organismo genéticamente modificado viable. En primer lugar, se realizó la búsqueda exhaustiva y el compilado (FASTA) de secuencias parciales y completas de genes que estén involucrados en la degradación de hidrocarburos en la base de datos del Centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI). Se obtuvieron un total de 512 secuencias nucleotídicas distribuidas entre 54 genes encontrados, para los hidrocarburos alcanos, naftaleno, bifenilo, etilbenceno, fenantreno, pireno, tolueno y xileno, se archivaron para generar una base de datos personal. Posteriormente, con el uso de la herramienta de Búsqueda para Alineamiento Básico Local (BLAST) se ejecutó un primer alineamiento para descartar aquellos genes duplicados o secuencias clonadas bajo otro nombre, en esta etapa se descartaron aproximadamente el 67% de las secuencias. Para la detección de regiones objetivo con extensión de conservación superior a las 50 pb se realizó un segundo alineamiento empleando el software Bioedit. Hasta el momento, el hidrocarburo Naftaleno, se encuentra más caracterizado (12 genes), la secuencia de pares de bases más larga es de 4,355 pb y la más corta de 204 pb. En este proyecto se encontraron un total de 67 regiones conservadas que comprenden extensiones de 50 – 627 pb. Estableciendo un dato bioinformático que a futuro servirá en la construcción de un organismo genéticamente modificado para la degradación de ambientes contaminados con hidrocarburos.

CAPÍTULO I. GENERALIDADES	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Planteamiento del problema	2
1.3 Justificación.....	3
1.4 Objetivos	4
1.4.1 General.....	4
1.4.2 Específicos	4
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Hidrocarburos.....	5
2.1.1 Generalidades	5
2.1.2 Clasificación	5
2.1.3 Usos y derivados	8
2.1.4 Repercusiones al ambiente.....	10
2.1.4.1 Toxicidad.....	11
2.2 Genes.....	13
2.2.1 Aspectos generales	13
2.2.2 Genes conservados.....	14
2.2.3 Transferencias de genes	14
2.2.2.1 Conjugación	15
2.2.2.2 Transducción	15
2.2.2.3 Transposición.....	16
2.2.4 Genes relacionados con la degradación de hidrocarburos.....	17
2.3 Organismos genéticamente modificados (OGM).....	18
2.3.1 Definición	18
2.3.2 Diseño y construcción	18
2.3.3 Usos y aplicaciones.....	21
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1 Búsqueda de genes de interés en diferentes buscadores web	22
3.1.1 Listado de hidrocarburos susceptibles a degradación	22
3.1.2 Búsqueda de nombres claves	23
3.1.2.1 Listado de enzimas.....	23
3.1.2.2 Búsqueda de genes codificados	23
3.2 Descarga de secuencias de nucleótidos	23
3.2.1 Organización de base de datos de secuencias de genes obtenidos.....	24
3.3 Alineamiento para la eliminación de secuencias duplicadas	24
3.4 Alineamiento, análisis y detección de regiones conservadas por hidrocarburo	25

3.4.1	Reporte de secuencias conservadas	29
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		30
4.1	Hidrocarburos, enzimas y genes reportados en base de datos	30
4.1.1	Hidrocarburos con registro de degradación	30
4.1.2	Obtención del compilado de enzimas descritas para cada hidrocarburo	32
4.1.3	Nomenclatura de genes responsables	36
4.2	Recolección de secuencias y construcción	39
4.2.1	Obtención de secuencias en formato FASTA	39
4.2.2	Ordenamiento de secuencias obtenidas	40
4.3	Descarte de secuencias duplicadas y reconstrucción de librería personal	41
4.4	Detección de regiones conservadas	42
4.4.1	Regiones conservadas para alcanos	45
4.4.2	Regiones conservadas para bifenilo	46
4.4.3	Regiones conservadas para naftaleno	46
4.4.4	Regiones conservadas para pireno	46
4.4.5	Regiones conservadas para fenantreno	46
4.4.6	Regiones conservadas para tolueno	47
4.4.7	Regiones conservadas entre hidrocarburos	47
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES		48
PERSPECTIVAS		49
CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA		50
ANEXOS	63
GLOSARIO	72

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los hidrocarburos según su tipo de enlace	6
Tabla 2. Clasificación de los hidrocarburos de acuerdo a su peligrosidad al ambiente	7
Tabla 3. Clasificación de hidrocarburos en función de su producto contaminante	8
Tabla 4. Principales productos con hidrocarburos y sus usos	9
Tabla 5. Principales productos con hidrocarburos y usos en Colombia	10
Tabla 6. Lista de microorganismos degradadores de hidrocarburos.....	17
Tabla 7. Lista de hidrocarburos de interés.....	22
Tabla 8. Hidrocarburos seleccionados.....	31
Tabla 9. Enzimas responsables de la degradación de hidrocarburo.....	35
Tabla 10. Lista de hidrocarburos y enzimas finales	38
Tabla 11. Base de datos personal	41
Tabla 12. Número de regiones conservadas por hidrocarburo	44
Tabla 13. Región conservada con mayor extensión para el gen <i>alkB</i>	45
Tabla 14. Regiones conservadas en la cepa <i>Sphingomonas</i> sp.....	47

LISTADO DE IMÁGENES

Imagen 1. Representación gráfica de la localización de un gen	13
Imagen 2. Representación del proceso de conjugación bacteriana	15
Imagen 3. Raíz de planta infectada con <i>Agrobacterium</i> sp.....	16
Imagen 4. Mecanismos de transposición.....	16
Imagen 5. Construcción de un OGM en células de animales y plantas	19
Imagen 6. Inserción de gen foráneo en vectores de clonación	20
Imagen 7. Método de electroporación aplicado en bacterias	21
Imagen 8. Página de inicio Búsqueda para Alineamiento Básico Local (BLAST)	24
Imagen 9. Ejemplo de llenado de campos.....	25
Imagen 10. Ventana principal del programa Bioedit	26
Imagen 11. Editor de secuencias de Bioedit.....	26
Imagen 12. Presentación de la secuencia en el programa	27
Imagen 13. Opciones de trabajo de ClustalW.....	27
Imagen 14. Alineamiento presentado por el programa Bioedit	28
Imagen 15. Región altamente conservada de 70 pb.....	28
Imagen 16. Despliegado de la lista de compuestos de la página de EAWAG	30
Imagen 17. Rutas metabólicas del benzopireno por diferentes microorganismos.....	33
Imagen 18. Diferentes rutas metabólicas del benzopireno	34
Imagen 19. Ruta metabólica del bifenilo.....	34
Imagen 20. Ejemplo de resultados obtenidos aplicando el buscador "Nucleotide".....	36
Imagen 21. Cantidad de genes degradantes encontrados hasta el 08/04/18	37
Imagen 22. Fichas técnicas de las bases de datos: A) ENA/NCBI y B) DDBJ	39
Imagen 23. Formato FASTA del gen <i>bphA1</i>	40
Imagen 24. Organización de base de datos personal.....	40
Imagen 25. Resultado obtenido en BLAST señalando el porcentaje de similitud.....	41
Imagen 26. Alineamiento de secuencias del hidrocarburo xileno.....	42
Imagen 27. Alineamiento de secuencias de pertenecientes a alcanos	43
Imagen 28. Alineamiento de secuencias pertenecientes a fenantreno	43
Imagen 29. Alineamiento de secuencias pertenecientes a pireno	43

CAPÍTULO I. GENERALIDADES

1.1 Introducción

En la naturaleza existe una gran variedad de organismos que poseen características muy diversas, pero con ciertos aspectos comunes entre ellos (CONABIO, 2020). Estas similitudes o diferencias que presentan los organismos se deben a que los mismos pueden compartir un ancestro común del que han heredado tales características y a partir del cual han evolucionado diferentes formas de vida, y que, a partir del análisis filogenético se ha podido descubrir si tienen o no parecido genético alguno (Karp, 2014).

Partiendo de esto y debido a la necesidad del hombre por entender la vida, en la actualidad pueden llevarse a cabo análisis genéticos en la mayoría de los organismos, esto para obtener algún beneficio en las diferentes ramas de la ciencia, un ejemplo claro de esto es que mediante estos análisis genéticos se han podido descubrir microorganismos que poseen cierta capacidad benéfica para el ambiente como es la remoción de los hidrocarburos (Valderrama Blanco, 2002) debido a que estos compuestos persistentes y de difícil degradación son causa de algunos de los principales problemas de contaminación ambiental (Agency for Toxic Substances and Disease Registry "ATSDR", 1995).

Debido a los aumentos de la contaminación provocados por los hidrocarburos, se ha optado por utilizar tecnologías como la biorremediación, que es, en pocas palabras, utilizar y explotar a microorganismos y su capacidad degradativa de contaminantes (Ron & Rosenberg, 2002). Sin embargo, el uso de esta tecnología se ve limitada debido a que ciertos organismos al ser utilizados en ambientes ajenos al suyo pueden convertirse en patógenos en cuanto a flora y fauna. Por lo anterior, el ser humano ha optado por el diseño de OGM para disminuir los efectos negativos y tener una mejor remoción de contaminantes, que muchos de ellos pueden resultar cancerígenos.

Este trabajo tiene como principal objetivo investigar secuencias genéticas que se encargan de la degradación de hidrocarburos para detectar estas mismas secuencias que se han conservado evolutivamente en las diferentes taxas bacterianas, la detección de estas secuencias pueden ser la base o fundamento molecular para el diseño o construcción de un OGM que cuente con una alta tasa de degradación de hidrocarburos y que no presente restricciones al ambiente donde se aplique.

1.2 Planteamiento del problema

Existen microorganismos bacterianos que gracias a su capacidad metabólica conferida por su secuencia genética son capaces de utilizarse en procesos biotecnológicos, agrícolas, biomédicos y ecológicos.

Por ejemplo, existen diversos estudios que han permitido hoy en día establecer una lista de 160 géneros bacterianos que degradan hidrocarburos (Price et al., 1999), entre las especies más usadas podemos encontrar *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Acinetobacter* sp. entre otras (Benavides López de Mesa et al., 2006).

Sin embargo, algunas especies por su género poseen restricción de uso, debido a que suelen ser patógenas tanto en humanos como en flora o fauna; impidiendo la aplicación benéfica de su capacidad metabólica, por ejemplo, el género bacteriano *Acinetobacter* sp. posee la capacidad de degradar alcanos (García-Cruz & Aguirre-Macedo, 2014) pero suele causar enfermedades al ser humano como infecciones respiratorias como bronquiolitis y traqueobronquitis (Rada Cuentas, 2016).

Los microorganismos, a pesar de estar distanciados filogenéticamente, poseen secuencias similares para una reacción en común, pero se desconoce el patrón genético que estos microorganismos comparten.

De existir la posibilidad de encontrar estos patrones genéticos, podrían integrarse en los microorganismos que no sean patógenos de plantas, animales o nativos del suelo y ser base para la generación de un OGM con potenciales benéficos a la recuperación del medio ambiente.

1.3 Justificación

En la actualidad, gracias a los avances de la biotecnología se ha podido conocer el potencial metabólico de los microorganismos mediante estrategias de mutagénesis, clonación de uno o varios genes y secuenciación nucleotídica, permitiendo diseñar por medio de la ingeniería genética organismos genéticamente modificados (OGM) con el fin de producir proteínas de interés industrial o bien mejorar ciertas características de organismos; por ejemplo, la degradación de los hidrocarburos.

Existen bacterias con una caracterizada capacidad de degradación y remediación de suelos contaminados, sin embargo, para el caso de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), estos microorganismos están restringidos a ciertos ambientes. Por ello, se requiere la construcción de OGM libres de aplicación, para la remoción de estos contaminantes cancerígenos y persistentes.

El propósito de este trabajo es buscar la clave genética para la degradación bacteriana de determinados HAP, se propone encontrar las regiones conservadas evolutivamente en diferentes taxas bacterianas para una gama de hidrocarburos, generando así, la base molecular en la construcción o diseño de una OGM viable.

1.4 Objetivos

1.4.1 General

- Identificar regiones conservadas en genes responsables a la degradación.

1.4.2 Específicos

- Encontrar y seleccionar los genes bacterianos reportados para la degradación de hidrocarburos.
- Obtener secuencias de nucleótidos a partir de genes seleccionados.
- Detectar regiones conservadas en diferentes especies bacterianas.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Hidrocarburos

2.1.1 Generalidades

Los hidrocarburos y sus derivados son compuestos utilizados en la mayoría de productos y servicios de uso cotidiano. Por ejemplo, son materia prima de gasolina, aceite lubricante, soluciones de pintura, solventes, cemento de caucho, aceites de motor, propelentes, etc. (Levine & Gresham, 2017). En resumen, están presentes en productos derivados de petróleo y gas natural (Camacho & Ariosa, 2000).

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos combinados de hidrógeno y carbono y pueden considerarse, químicamente, como los esqueletos fundamentales de las moléculas orgánicas, con todas sus valencias libres unidas al hidrógeno.

La abundancia de estos en la naturaleza es dada a que cualquier compuesto orgánico podría provenir de un hidrocarburo con la sustitución de un ion de hidrógeno a cambio de algún grupo funcional (Primo, 1996).

Algunos de los procesos que originan a ciertos hidrocarburos pueden clasificarse dependiendo de su origen (Ortiz et al., 2007):

- Biogénico
- Diagénico
- Petrogénico
- Pirogénico

2.1.2 Clasificación

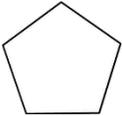
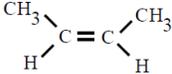
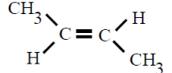
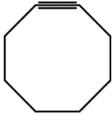
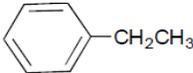
Para saber cómo están constituidos los hidrocarburos, es preferible establecer una clasificación previa ya sea por los tipos de enlaces que contiene, composición físico – química, o incluso por su grado de peligrosidad, entre otros, para lograr identificarlos de manera más eficiente.

Según el autor Wade (2011) propone clasificar a los hidrocarburos en cuatro categorías básicas, dadas por el tipo de enlace que presentan es decir sencillo, doble, triple y la aparición de 1 o varios anillos bencénicos, las cuales son:

- Alcanos
- Alquenos
- Alquinos
- Aromáticos

En la siguiente Tabla 1 se muestran las particularidades de cada una de las categorías, así como un ejemplo gráfico de ello.

Tabla 1. Clasificación de los hidrocarburos según su tipo de enlace

Tipo de compuesto	Tipo de enlace	Sufijo	Ejemplo	Representación	Forma especial	Ejemplo
Alcano	Sencillo	-ano	Propano	CH ₃ -CH ₂ -CH ₃	Cicloalcano	Ciclopentano 
Alquenos	Doble	-eno	Propeno	CH ₂ =CH-CH ₃	Isómeros cis-trans Cicloalqueno	Cis-but-2-eno  Trans-but-2-eno  Ciclopenteno 
Alquinos	Triple	-ino	Propino	H-C≡C-CH ₃	Cicloalquinos (sólo > 8 átomos)	Ciclooctino 
Aromáticos (arenos)	Anillo bencénico		Etilbenceno			

Otra clasificación enunciada en el libro *Tratados de Emergencias Médicas* menciona que los hidrocarburos se pueden dividir en cuatro grupos que diferencian sus propiedades físico-

químicas, en este caso por su volatilidad y viscosidad. Estas propiedades se exponen a continuación con ejemplo de algunos hidrocarburos (Carrasco & Paz, 2000):

- Alta volatilidad y mínima viscosidad: gases simples (metano, butano), benceno, hidrocarburos clorados.
- Volatilidad intermedia y baja viscosidad: gasolina, turpentina, nafta.
- Baja volatilidad y baja viscosidad: espíritu de petróleo, queroseno, aceites minerales.
- Volatilidad mínima y alta viscosidad: aceites lubricantes, aceites minerales, asfalto.

Conforme a la Environment Agency (Marlowe et al., 1995), la volatilidad de cada hidrocarburo también permite una subclasificación contemplando el grado de peligrosidad y la repercusión al ambiente. Esta división contempla 3 grupos que se mencionan y desglosan en la siguiente Tabla 2:

Tabla 2. Clasificación de los hidrocarburos de acuerdo a su peligrosidad al ambiente

Extremadamente peligrosos para la salud <ul style="list-style-type: none">• Benceno• Cloruro de vinilo• 1,2 dicloroetano
Compuestos de clase A (pueden causar daños significativos al medio ambiente) <ul style="list-style-type: none">• Acetaldehído• Anilina• Bencil cloruro• Carbono tetracloruro• Clorofluorocarbonos (CFC's)• Acrilato de etilo• Halones• Anhídrido maleico• 1,1,1-tricloroetano• Tricloroetileno• Triclorotolueno
Compuestos de clase B (con menor impacto en el medio ambiente) <ul style="list-style-type: none">• Acetona• Etanol

La Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS (2005) que lleva por título límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelo y las especificaciones para su caracterización y remediación, determina la clasificación de 15 hidrocarburos en función de productos contaminantes de cada uno en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3. Clasificación de hidrocarburos en función de su producto contaminante

Producto contaminante	HIDROCARBUROS					
	Fracción pesadas	HAP's	Fracción media	HAP's	Fracción ligera	BTEX
Mezclas	x	x	x		x	x
Petróleo crudo	x	x	x		x	x
Combustóleo	x	x				
Parafinas	x	x				
Petrolatos	x	x				
Aceites	x	x				
Gasóleo			x	x		
Diésel			x	x		
Turbosina			x	x		
Queroseno			x	x		
Creosota			x	x		
Gasavión					x	x
Gasolvente					x	x
Gasolinas					x	x
Gasnafta					x	x

2.1.3 Usos y derivados

Los hidrocarburos son la fuente principal de materia prima en la industria petrolera, la mayoría de los hidrocarburos provienen de fuentes como el petróleo, el gas y el carbón. Una de las principales utilidades de los hidrocarburos es su aplicación como combustible y materia prima química. A través del procesamiento del petróleo podemos obtener gran variedad de productos químicos que son utilizados tanto en la industria como en la sociedad. Como ejemplos, se puede obtener etileno, propileno, benceno, tolueno y otras materias primas industriales; también podemos obtener estireno, etanol, acetona y otros productos químicos, al reutilizarlos se pueden fabricar gran variedad de plásticos, caucho sintético, y fibras sintéticas. Cabe mencionar que del refinado de petróleo también se pueden obtener gran variedad de combustibles como lo son la gasolina, queroseno, diésel, entre otros (ChemicalBook Inc., 2016).

A continuación, se presenta la siguiente Tabla 4 indicando los principales productos y usos que la empresa PEMEX (2014) dispone en su página.

Tabla 4. Principales productos con hidrocarburos y sus usos

Producto	Usos
Aceite cíclico ligero	Se utiliza en los lodos de perforación de pozos, y como combustible para calderas y hornos.
Aceites lubricantes básicos	Se utilizan en la elaboración de aceites lubricantes terminados para diferentes aplicaciones: lubricantes automotrices, para dirección y transmisión hidráulica, de engranes, turbinas, dieléctricos, transformadores, de corte de metales, aceites blancos, etc.
Benceno	Etilbenceno (para monómero de estireno), fenol, ciclohexano (para nylon), dicloro difenil tricloroetano (DDT), solvente, resinas, desinfectantes, removedores de pintura.
Diésel automotriz	Combustible utilizado en motores de combustión interna para vehículos de carga y transportes de pasajeros y para la generación de energía eléctrica.
Diésel marino	Se utiliza en procesos de combustión para la propulsión de las embarcaciones dedicadas a las actividades de la marina mercante (de altura y/o para cruceros turísticos).
Gas licuado del petróleo (LP)	Principalmente como combustible doméstico para la cocción de alimentos y calentamiento de agua, combustible en hornos, secadores y calderas de diferentes tipos de industrias, en motores de combustión interna y en turbinas de gas para generación de energía eléctrica.
Gas natural	En el sector industrial se utiliza en la generación de vapor, generación eléctrica, secado, industria de alimentos, fundición de metales, hornos, tratamientos térmicos, temple y recocido de metales y producción de petroquímicos entre muchos otros. En el sector comercial y doméstico se utiliza para la calefacción, aire acondicionado, preparación de alimentos, agua caliente y como combustible vehicular.
Gasóleo doméstico	Principalmente como combustible de uso doméstico en calefacción y en motores diésel.
Pemex Diésel	Combustible utilizado en motores de combustión interna para vehículos de carga y transporte de pasajeros y para la generación de energía eléctrica.
Pemex Magna	Combustible automotriz.
Pemex Premium	Combustible automotriz.
Tolueno	Gasolina de aviación y para mezclas de alto octano; benceno, fenol y caprolactama, solvente de pinturas y recubrimientos, gomas, resinas, la mayoría de aceites, hule, vinil, organosoles; diluyente y tñer en lacas de nitrocelulosa; intermedio químico (ácido benzoico, sacarina, medicinas, perfumes); fuente de tolueno de diisocianato (resinas de poliuretano); explosivos (TNT), toluensulfonato (detergentes).
Xileno	Elaboración de cosméticos y secantes, esmaltes y lacas, síntesis de químicos orgánicos, solventes de resinas alquídicas, solventes en general.

Los usos de los derivados del petróleo no difieren en comparación a otros países, el autor Trujillo (2010) en su libro *Hidrocarburos: manejo especial* hace presentación de un catálogo de productos y usos que la industria petrolera en Colombia genera, la información recabada se muestra a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5. Principales productos con hidrocarburos y usos en Colombia

Producto	Usos
Gasolina motor regular	Únicamente como combustible en los motores de combustión interna.
Gasolina motor extra	Combustible en los motores de gasolina de alta relación de compresión.
Gasolina aviación 100-300	Únicamente como combustible en los motores de aviones de combustión interna.
Turbosina jet A	Utilizado especialmente en las turbinas de avión a propulsión Jets.
Gas natural	Se utiliza como combustible industrial y doméstico, también usado en motores de combustión interna.
Gas licuado del petróleo GLP	Utilizado únicamente como combustible doméstico y en algunos procesos industriales.
Queroseno	Uso adecuado para equipos industriales, tractores y máquinas del tipo de servicio agrícola.
Bencina industrial	Utilizado como materia prima para la manufactura de disolventes alifáticos.
Aceite combustible para motores (ACPM) o diésel	Utilizado principalmente para motores diésel.
Combustóleo	Exclusivamente como combustible industrial en hornos y calderas.
Disolventes alifáticos: hexano	Elaboración de aceites, pinturas y resinas, pegantes y adhesivos, elaboración de tiner, combustibles de galletería e industrias alimentarias.
Benceno	Sirve para la fabricación de ciclohexano, estireno, clorobenceno, fenol, nitrobenzono, anhídrido maleico, materia prima para la obtención de tiner, solvente, pegante, betunes.

2.1.4 Repercusiones al ambiente

Los principales problemas ambientales que se presentan por los hidrocarburos son a causa de su liberación ya sea accidental o intencionada. La contaminación generada por estos es de gran distribución geográfica y de carácter mundial, la mayoría de los hidrocarburos tienen como destino final los mares y océanos, independientemente de la zona que haya sido afectada (Narváez-Florez, Gómez, & Martínez, 2008).

Cuando los hidrocarburos son derramados en suelos suelen dañar generalmente las propiedades físicas, químicas, microbiológicas del mismo impidiendo así el crecimiento de vegetación (García, 2016) y el intercambio gaseoso con la atmósfera; dependiendo del tipo y concentración del hidrocarburo que se haya vertido en el suelo, así como las condiciones

abióticas del lugar; estas influirán en la toxicidad que tendrá, ya sea en el suelo o en los microorganismos presentes (López et al., 2006).

En la mayoría de los casos los derrames de hidrocarburos suelen terminar en cuerpos de agua subterráneos por causa de los procesos de filtración; cuando los derrames de hidrocarburos ocurren en el medio marino, su afectación suele ser grave produciendo la anulación del intercambio de gases entre el mar y la atmósfera y como resultado se producirá un daño a la flora y fauna marina (Arana, 2016).

Durante un derrame la primera población en ser afectada es el plancton, seguido de los macroinvertebrados y por último los bentos que viven en fondo de los ríos o ciénegas (López et al., 2006), también suelen verse afectadas las aves marinas ya que les impide volar, nadar o alimentarse; la intensidad del impacto que tenga el hidrocarburo en el medio depende normalmente de la cantidad y tipo que se encuentre derramado, así como las condiciones ambientales, la sensibilidad de los organismos y sus hábitats (The International Tanker Owners Pollution Federation, 2011).

Los derrames por hidrocarburos aparte de generar problemas ambientales, también causan graves perjuicios económicos y estéticos en la zona afectada, ya que su coste en promedio por limpieza va desde los 40 hasta los 400 dólares por litro de hidrocarburo derramado (Fingas, 2013). Además de que podrían tornarse en efectos cancerígenos para el humano y el resto de especies. Estos compuestos poseen la característica de ser resistentes a las aplicaciones de técnicas de biodegradación (Atlas & Bartha, 2002).

2.1.4.1 Toxicidad

Los hidrocarburos como el petróleo o cualquier derivado, pueden ser letales tanto para la naturaleza como para los seres vivos, esto se debe a que la tasa de degradación suele ser muy baja a través del tiempo y por el contrario el nivel de exposición, es decir, a tener contacto directo y/o contaminarse es altamente persistente. A continuación, se mencionan algunos hidrocarburos y la afectación que generan tanto en humanos como en algunos seres vivos:

- Productos y dispersantes de petróleo crudo: pueden generar amplia gama de efectos negativos sobre la salud humana y vida silvestre; en el humano puede dañar el sistema nervioso, sistema respiratorio, sistema inmunológico, sistema

sensorial, además de tener efectos negativos en el hígado, riñón, etc. Los más susceptibles a recibir estos efectos son bebés, niños y mujeres embarazadas (Shukla & Singh Cameotra, 2012).

- HAP's: son un grupo de sustancias alarmantes tanto para humanos como para organismos ambientales ya que la mayoría de estos compuestos son cancerígenos, mutagénicos y/o tóxicos, algunos HAP's persisten en el ambiente y se bioacumulan en los organismos, dañando plantas, animales y por último al ser humano (Brandt & Einhenkel-Arle, 2016).
- Metano, CFC, aldehídos, hidrocarburos aromáticos, petróleo: el metano se oxida en CO₂ produciendo gases de efecto invernadero; el uso de los CFC reduce la capa de ozono; los aldehídos producen irritación ocular y pulmonar, posibles causadores de cáncer, inhiben la fotosíntesis en plantas; los hidrocarburos aromáticos producen cáncer en mamíferos y provocan daños en la médula ósea; el petróleo inhibe las funciones respiratorias y envenena a los animales que lo ingieren (Schab, 2017).
- Hidrocarburos de petróleo: provoca daños sobre plántulas y árboles de mangle asfixiándolos y provocándoles la muerte, muerte de raíces en árboles, afectan la respiración de peces ya que se adhieren en su branquia, también se adhieren y destruyen las algas y el fitoplancton afectando la alimentación y reproducción de la vida acuática en general (Olguín, Hernández, & Sánchez-Galván, 2007).
- Fracciones de hidrocarburos totales de petróleo (TPH): en el ser humano suelen afectar la sangre, sistema inmunitario, hígado, bazo, riñones, pulmones, producen irritación de la piel y ojos, en animales afecta los pulmones, sistema nervioso central, hígado, riñones, sistema reproductivo después de haber sido inhalado o ingerido (Agency for Toxic Substances, Disease Registry "ATSDR", 1999).

2.2 Genes

2.2.1 Aspectos generales

Un gen es conocido como una unidad física y básica de las funciones de la genética (U.S. Department of Health and Human Services "HHS", 2017), los genes son moléculas de ADN consideradas como una unidad de herencia y almacenamiento de información (Ruiz et al., 2010). Presentes en cada organismo, los genes los podemos encontrar en los cromosomas de la mayoría de las células para ser más exactos en su núcleo (Esteban, 2014), como se puede visualizar en la Imagen 1.

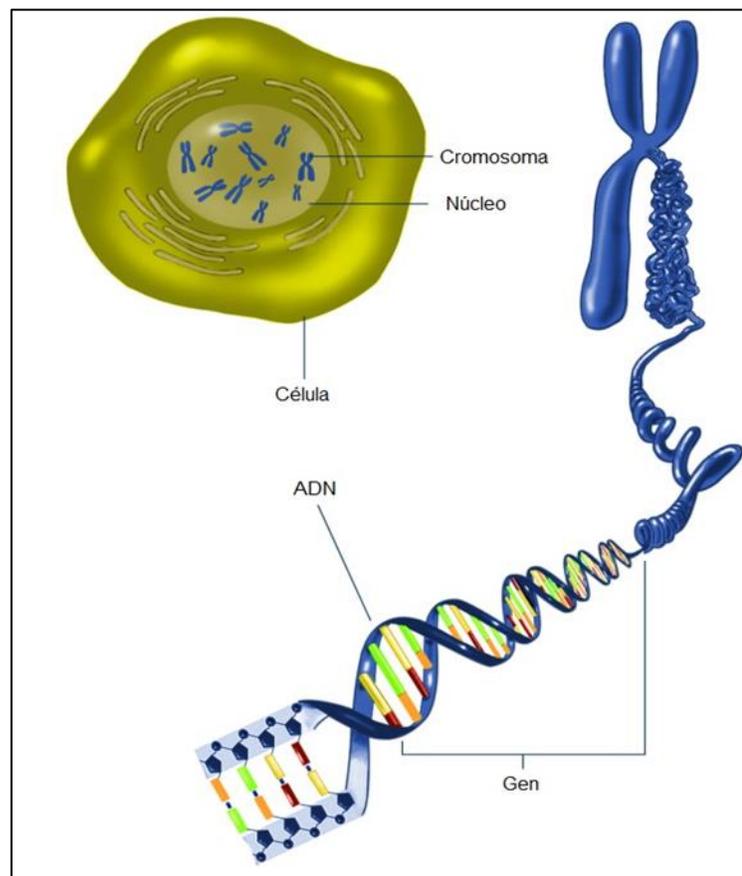


Imagen 1. Representación gráfica de la localización de un gen (Tomado de NIGMS, 2021)

Cada gen presente en los cromosomas ocupará una posición determinada, que dependiendo del contenido de este servirá como instrucción para poder controlar la síntesis de moléculas llamadas proteínas, aunque en algunos casos no codificarán a ninguna proteína o solamente no tendrán una función dentro de la célula (Slack, 2014).

Debido a los avances de la tecnología, los genes han sido base fundamental para las tecnologías que se encargan de producir productos farmacéuticos, así como de pruebas de paternidad y la creación de organismos transgénicos.

2.2.2 Genes conservados

A lo largo del paso del tiempo algunos genes han ido resistiendo a la presión de los procesos de selección y recombinación que la naturaleza les ha exigido (Zheng et al., 2005), es por eso que se le conocen como genes conservados a aquellos genes que se han mantenido iguales a lo largo del tiempo de evolución y que cambian más lentamente en comparación a otros (Pineda, 2005).

La conservación de un gen indica que este será único y esencial, y que la presencia de un cambio drástico en este podría ser letal para el organismo (Davis, 2016), por lo general los genes se pueden encontrar de forma agrupada y pueden ser intercambiables entre las especies.

Una de las características que se ha podido encontrar en este tipo de genes, es que tienen la capacidad de poder ganar más y perder menos intrones en comparación a un gen que ha evolucionado de forma constante (Carmel et al., 2007).

2.2.3 Transferencias de genes

La transferencia genética es la capacidad de incorporar material genético de una célula a otra de forma artificial, esto debiéndose a que los genes tienen la capacidad de moverse entre los cromosomas como si estos saltaran (Argüelles & Hernández-Zamora, 2007).

Existen diferentes maneras por las que se lleva a cabo este mecanismo de transferencia de información, entre los que se encuentra:

- La conjugación o transferencia directa de ADN de una bacteria a otra.
- La transducción de material genético infectado de una célula a otra.
- La transposición de genes dentro del cromosoma de una misma célula.

2.2.2.1 Conjugación

La conjugación es un proceso por el cual se transfiere material genético de una célula hacia otra por medio del contacto directo dando la apariencia de que se están apareando (Curtis et al., 2006), esto se puede ver en la siguiente Imagen 2 representado.

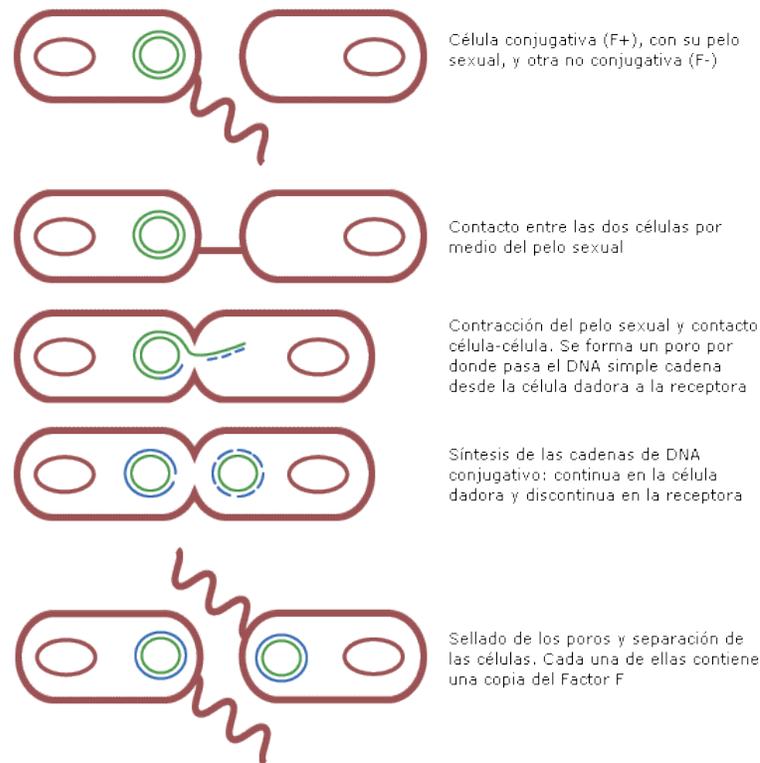


Imagen 2. Representación del proceso de conjugación bacteriana (Tomado de OEI, 2010)

2.2.2.2 Transducción

La transducción es otro mecanismo de transferencia en la que el ADN de una célula infectada se transferirá a otras mediante la acción de un virus o por la incorporación de del ácido nucleico de un genoma viral en células procariotas o eucariotas (Tortora, Funke, & Case, 2007). Un ejemplo claro es la afectación de las células vegetales por las bacterias *Agrobacterium* sp. las cuales causan el crecimiento de tumores en la zona afectada de la planta como se puede observar en la Imagen 3.



Imagen 3. Raíz de planta infectada con *Agrobacterium* sp. (Tomado de Schalau, 2018)

2.2.2.3 Transposición

La transposición es un proceso en el cual fragmentos de ADN que reciben el nombre de transposones pasan de un cromosoma a otro sin existencia aparente, su función principal es duplicarse dentro del cromosoma de la célula y son los causantes de posibles mutaciones (Curtis et al., 2008). En la Imagen 4 se pueden apreciar los dos tipos de mecanismos en los que puede ocurrir la transposición.

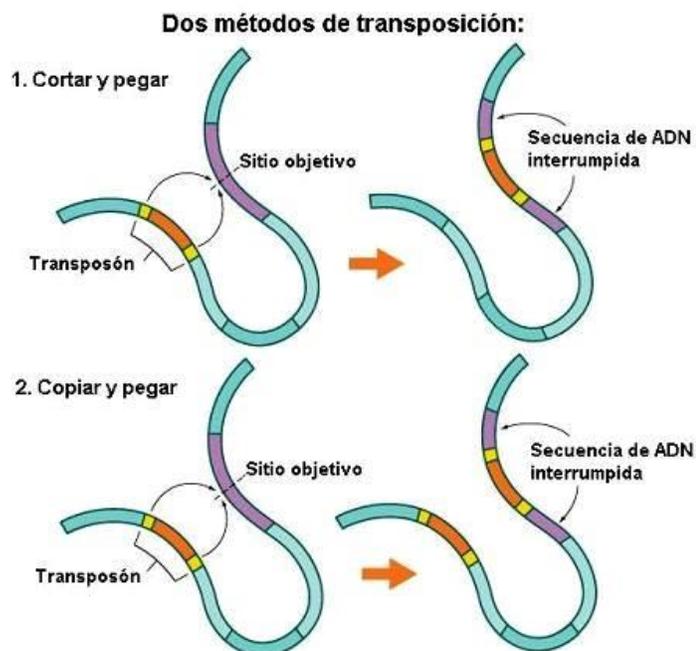


Imagen 4. Mecanismos de transposición (Tomado de Solomon, 2015)

2.2.4 Genes relacionados con la degradación de hidrocarburos

Debido a la contaminación ocasionada por los hidrocarburos una de las acciones a la que se ha tenido que recurrir para remediar estos contaminantes es por medio de técnicas que permitan al constante aislamiento de microorganismos para comprobar su capacidad degradadora, que por medio de técnicas como la PCR se han podido identificar aquellos genes que codifican enzimas causantes de la degradación de estos compuestos a unos menos contaminantes; estos avances han permitido comprobado que las bacterias más comunes en degradar los hidrocarburos pertenecen al género *Pseudomonas* sp. teniendo varias especies capaces de degradar distintos tipos de hidrocarburos contando con un listado de especies; algunas de ellas se desglosan en la Tabla 6.

Tabla 6. Lista de microorganismos degradadores de hidrocarburos

Gen	Organismo	Hidrocarburo	Referencia
<i>tod</i> & <i>xyl</i>	<i>Deinococcus radiodurans</i>	Tolueno	(Brim et al., 2006)
<i>alkB</i> & <i>alkM</i>	<i>Pseudomonas oleovorans</i> <i>Acinetobacter</i> sp.	Alcanos	(Smits et al., 1999; Ratajczak, Geibdörfer, & Hillen, 1998)
<i>pheA</i> & <i>todC1C2BA</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	Fenol Tolueno	(Heinaru et al., 2000; Zylstra & Gibson, 1989)
<i>bbsA</i> & <i>bcrCBA</i>	<i>Thauera aromatica</i>	Tolueno	(Leuthner et al., 1998; Song & Ward, 2005)
<i>bss</i> & <i>bcr</i>	<i>Magnetospirillum</i> sp.	Tolueno Fenol	(Shinoda et al., 2005)
<i>tod</i> & <i>bss</i>	<i>Thauera</i> sp.	Tolueno	(Shinoda et al., 2004)
<i>ebdABC</i>	<i>Azoarcus</i> sp.	Etilbenceno	(Johnson, Pelletier, & Spormann, 2001; Rabus et al., 2002)
<i>cumDH</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Cumeno (isopropilbenceno)	(Habe et al., 1996)
<i>phd</i>	<i>Comamonas</i> sp.	Naftaleno	(Zylstra, Kim, & Goyal, 1997)
<i>nah</i> , <i>xyl</i> , <i>bph</i> & <i>tod</i>	<i>Sphingomonas</i> sp.	Naftaleno Xileno Tolueno Bifenilo	(Zylstra, Kim, & Goyal, 1997)
<i>nah</i> & <i>pah</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Naftaleno Fenantreno	(Zylstra, Kim, & Goyal, 1997)
<i>bad</i> & <i>badFEDG</i>	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Benceno Tolueno	(Egland et al., 1997; Song & Ward, 2005)
<i>nid</i>	<i>Mycobacterium</i> sp.	Pireno	(Sho, Hamel, & Greer, 2004)
<i>phnAc</i> & <i>nag</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	Fenantreno Naftaleno	(Lloyd-Jones et al., 1999; Chowdhury et al., 2014)
<i>ebdABC</i>	<i>Azoarcus</i> sp.	Etilbenceno Propilbenceno	(Kube et al., 2004)

2.3 Organismos genéticamente modificados (OGM)

2.3.1 Definición

Se le conoce como organismos genéticamente modificados (OGM) a cualquier organismo exceptuando a los seres humanos (Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, 2005), que mediante el uso de la ingeniería genética se han modificado insertando una característica específica que altere su material genético (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, 2016), ofreciéndoles ventajas que aumentaran su diversidad molecular y selectividad química (Han, 2004).

Estos organismos también llamados organismos vivos modificados (OVM); u organismos modificados por ingeniería genética (MIG), son ocupados principalmente en la producción de alimentos, salud pública y biorremediación. Los cuales los cuatro países principales en generar el 99% de estos organismos son Estados Unidos, Argentina, Canadá, China (Fuente & Goñi, 2005); cabe mencionar que en México existe una delegación llamada Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM) la cual se encarga de establecer políticas relacionadas con la seguridad del uso de los OGM en el país.

2.3.2 Diseño y construcción

Debido a los avances que ha tenido la ingeniería genética con el paso del tiempo, hoy en día se pueden crear organismos con las características específicas que uno desee, para lo cual se utiliza un mecanismo que lleva por nombre transgénesis, el cual simplemente consiste en el traspaso de un gen específico hacia otro organismo mediante diferentes tipos de técnicas; este mecanismo se ha aplicado a microorganismos desde el año de 1973, a animales desde 1982 y a plantas desde 1983 (Conaré & Le Goulven, 2000).

Para poder construir un OGM se requiere de una serie de pasos los cuales se mencionan a continuación y se pueden observar en la Imagen 5 (Bolívar, 2011):

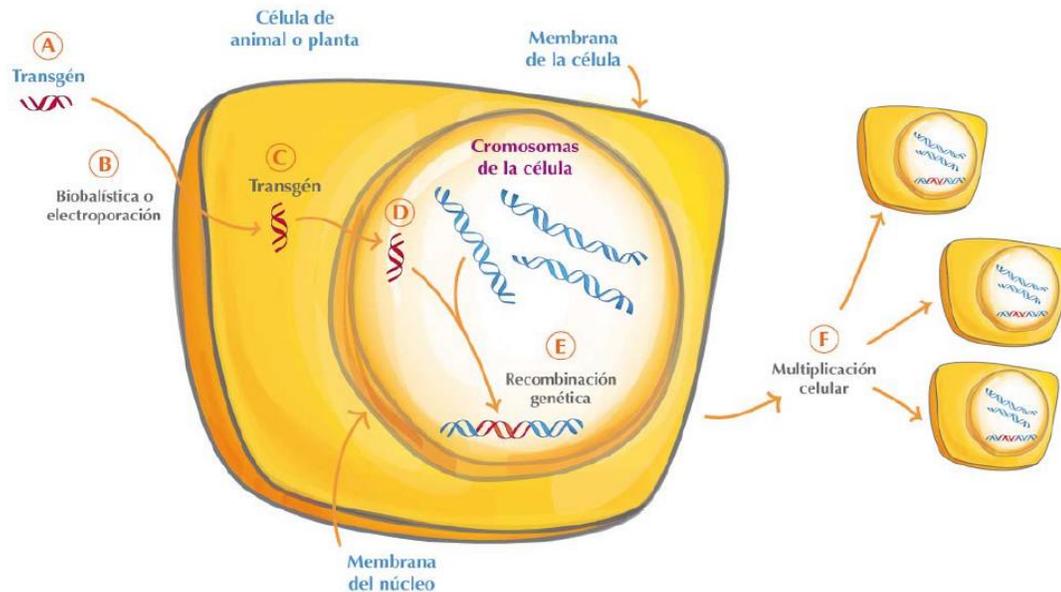


Imagen 5. Construcción de un OGM en células de animales y plantas

- A. El primer paso consiste en aislar el gen que se desea utilizar para la construcción del OGM.
- B. Por medio de procesos como la biolística y la electroporación, se introduce el fragmento del gen.
- C. El gen es transportado hacia el organelo objetivo de la célula receptora por medio de su membrana.
- D/E. Una vez dentro del núcleo, el gen introducido se incorpora al material genético por medio de recombinación genética.
- F. Posteriormente mediante los procesos de multiplicación celular las nuevas células originadas ya contendrán el nuevo material genético.

A continuación se detallan los procesos más comunes utilizados para la construcción de un OGM (Díaz & Chaparro-Giraldo, 2012):

- **Biolística:** método que fue desarrollado y mejorado durante la década de los 80's, se basa en inyectar mediante una pistola, microproyectiles de tungsteno que contendrán el ADN a transferir a la célula receptora a una velocidad de 425 m/s penetrando así la pared celular para posteriormente ser integrado al genoma de la célula. Cabe mencionar que este es el único método que permite la modificación de

los organelos de la célula, y que se requiere de la construcción de vectores con el gen de interés que serán resguardados en una célula bacteriana, dicho proceso se esquematiza en la Imagen 6.

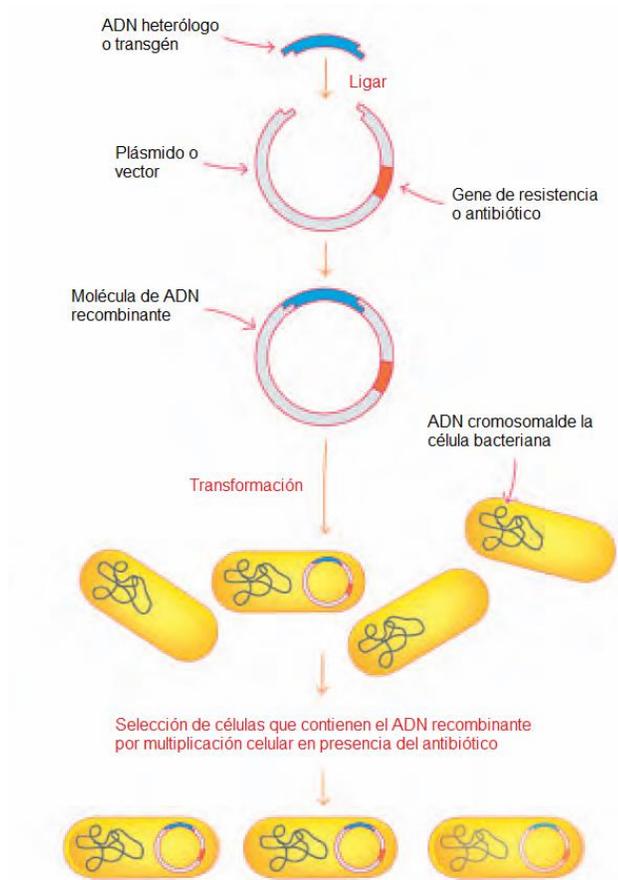


Imagen 6. Inserción de gen foráneo en vectores de clonación (Tomado de Bolívar, 2011)

- **Electroporación:** este método se basa en la aplicación de corta duración de impulsos de alto voltaje que permitirán la permeabilidad de la membrana celular inducida por los impulsos eléctricos, al ocurrir esto se crearán pequeños hoyos transitorios los cuales permitirán la mayor absorción del ADN entrante a la célula, así como el paso de macromoléculas, este proceso se puede ver visualizado en la Imagen 7.

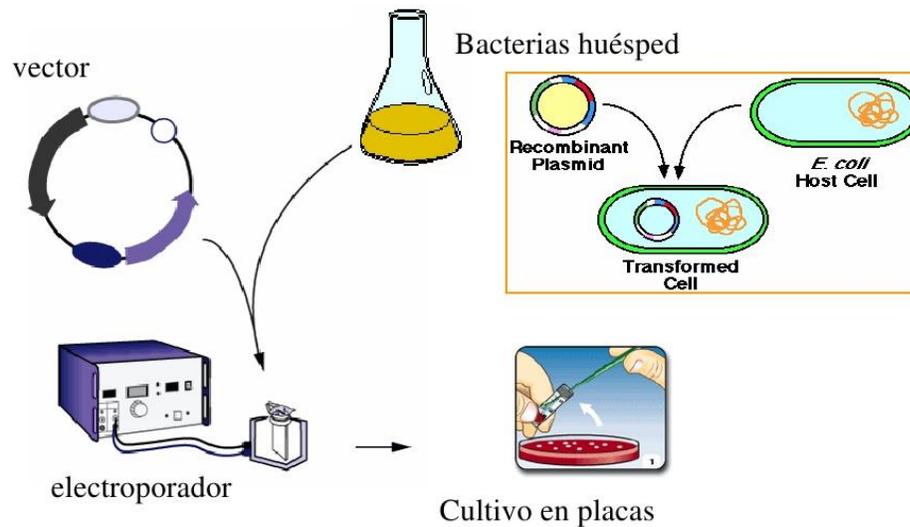


Imagen 7. Método de electroporación aplicado en bacterias (Tomado de Magni, 2012)

2.3.3 Usos y aplicaciones

Debido a las propiedades de mejora que tienen los OGM, estos han sido utilizados de varias formas con el pasar del tiempo, uno de los campos en los que más reside su utilización son los de la investigación ya que a partir de las investigaciones que se obtengan aquí se podrán exportar a diferentes ramas de la ciencia.

Otro de los principales usos de los OGM recae en la producción de alimentos debido a que estos pueden crecer, adaptarse y madurar más rápido que su contraparte natural (Alexander, 2015); siendo la agricultura la fuente de obtención de alimentos que más utiliza a los OGM, esto se debe a que se adaptan los cultivos para que sean más resistentes a las plagas y a las enfermedades a las que están expuestos (Conaré & Le Goulven, 2000), también estos cultivos se ven mejorados ya que aumentan su rendimiento, su prolongación de vida útil y la adición de nutrientes que en su en su versión natural sería difícil de obtener (Buiatti, Christou, & Pastore, 2013).

Una rama en la que también suelen ser utilizados los OGM es en la medicina, ya que aquí se utilizan para la producción de vacunas, así como la creación de animales que servirán para la evaluación de enfermedades en humanos y sus posibles tratamientos impidiendo así el uso de animales "naturales", en la rama ambiental se emplea para la creación de árboles que tengan la capacidad de captar mayores cantidades de carbono, así como la generación de microorganismos que servirán para biorremediación (Young, 2004).

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

Para auxiliar en el entendimiento de la metodología se diseñó un diagrama de flujo que resume los procesos que se siguieron en cada objetivo particular (Ver Anexo 1).

3.1 Búsqueda de genes de interés en diferentes buscadores web

3.1.1 Listado de hidrocarburos susceptibles a degradación

Se realizó una búsqueda de los hidrocarburos que presentarán un registro de degradación bacteriana, para ello se utilizaron cuatro exploradores: a) La base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) – Pubmed (pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/), b) EAWAG Biocatalysis/Biodegradation Database (<http://eawag-bbd.ethz.ch>), c) Google Académico (<http://scholar.google.com>) y por último, un buscador de acceso abierto d) Scientific Electronic Library Online - SciELO (<http://www.scielo.org/php/index.php?lang=es>). Para facilitar la búsqueda se tomó como referencia la Tabla 7, contiene un listado de hidrocarburos y derivados de interés.

Tabla 7. Lista de hidrocarburos de interés

HIDROCARBURO	CARACTERÍSTICA PRINCIPAL
2-metilnaftaleno y Benceno	Compuestos pertenecientes a los hidrocarburos aromáticos, constituyente de petróleo
Acenaftileno, Antraceno, Benzoantraceno, Criseno, Fluoreno y Fluoranteno	Compuesto perteneciente a los hidrocarburos aromáticos policíclicos
Alcanos	Compuestos constituyentes del petróleo
Benzopireno, Fenantreno y Pireno	Compuesto perteneciente a los hidrocarburos aromáticos policíclicos, constituyente de petróleo
Bifenilo	Compuestos pertenecientes a los hidrocarburos aromáticos, utilizado para la producción de bifenilos policlorados (PCB)
Etilbenceno, Isopropilbenceno y Propilbenceno	Compuestos pertenecientes a los hidrocarburos aromáticos
Hexano	Hidrocarburo de cadena corta (C ₆ -C ₁₁), componente principal de la gasolina
Naftaleno	Compuesto perteneciente a los hidrocarburos aromáticos policíclicos componente principal de la gasolina y petróleo
Tolueno y Xileno	Compuestos pertenecientes a los hidrocarburos aromáticos, componente principal de la gasolina

3.1.2 Búsqueda de nombres claves

3.1.2.1 Listado de enzimas

Teniendo la lista de hidrocarburos final, se prosiguió a la búsqueda de su ruta metabólica con el fin de conocer aquellas enzimas que actúan al inicio de la degradación de estos compuestos, las páginas consultadas fueron Google Académico y EAWAG, esta estrategia sirvió como punto inicial para obtener la palabra clave de los genes que codificarán estas enzimas.

La realización de esta búsqueda contuvo las siguientes 3 palabras clave en idioma inglés:

“Nombre del hidrocarburo” + “degradación” + “ruta”

Con los datos obtenidos se realizó una tabla que tuvo los parámetros de “Hidrocarburo” + “Enzima”.

3.1.2.2 Búsqueda de genes codificados

Ocupando como palabra clave las enzimas obtenidas con anterioridad, se utilizó la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para encontrar el nombre de los genes que estuvieran asociadas a estas utilizando los filtros que fuesen necesarios (Nucleotide, Gene, Protein).

Con la información recabada se realizó una tabla donde se especificaba el nombre del gen encontrado (escrito en minúscula y cursiva), el nombre de la enzima a la que pertenecía y el hidrocarburo reportado.

3.2 Descarga de secuencias de nucleótidos

A partir del NCBI, Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y Reference Sequence - Refseq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>), y como cotejo las bases de European Nucleotide Archive – ENA (<http://www.ebi.ac.uk/ena>) y DNA Data Bank of Japan – (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>), se obtuvieron las secuencias de nucleótidos en formato FASTA de bacterias que se relacionan con la degradación de los hidrocarburos enlistados.

3.2.1 Organización de base de datos de secuencias de genes obtenidos

Con los archivos FASTA se creó una biblioteca digital en donde se archivaron las secuencias descargadas.

Para realizar esta biblioteca se contempló separar las secuencias obtenidas en carpetas de acuerdo al hidrocarburo que la bacteria pudiera degradar. Los archivos se guardaron con una clave de identificación que arrojaba la base de datos. Por último, se organizaron los datos con el nombre del gen escrito en notación genética, nombre de la enzima, el organismo (nombre científico), hidrocarburo y tamaño del gen.

3.3 Alineamiento para la eliminación de secuencias duplicadas

Se realizó un primer alineamiento (*screening*) con el fin de descartar aquellas secuencias que estuvieran duplicadas, este alineamiento se realizó para cada hidrocarburo.

Para identificar los archivos que se excluirían, se utilizó como base la secuencia (SB) de mayor extensión nucleotídica. Para considerar que una secuencia era repetida se verificó que tuviera una similitud >99%, además, que deberían de pertenecer al mismo microorganismo.

Este análisis se realizó utilizando la herramienta de Búsqueda para Alineamiento Básico Local (BLAST) y utilizando el tipo de búsqueda BLASTn (Imagen 8).

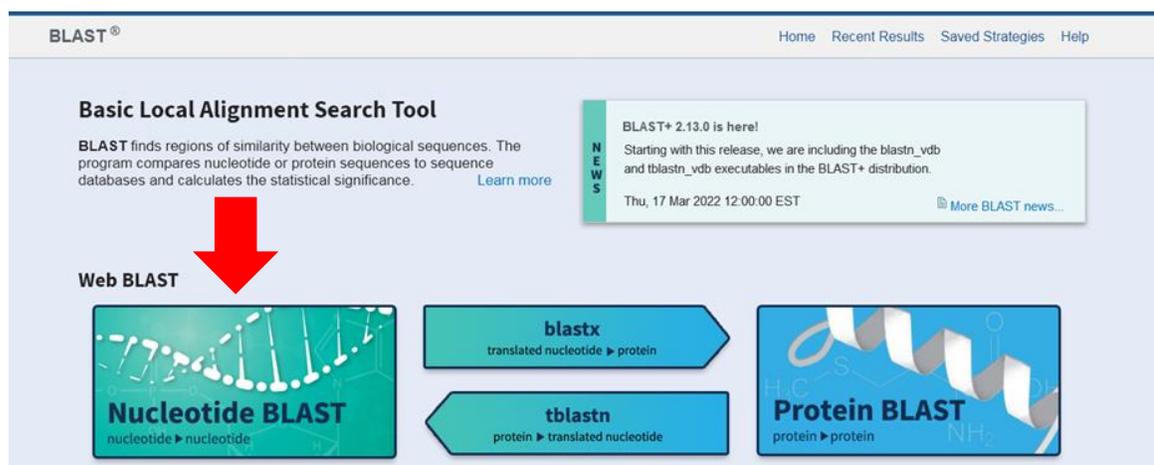


Imagen 8. Página de inicio Búsqueda para Alineamiento Básico Local (BLAST)

Al iniciar este programa se despliega el formulario en donde se identificó un menú con dos áreas básicas de llenado; en el primer recuadro se escribió la SB problema, después en el segundo recuadro se escribieron las secuencias que fueron comparadas; finalmente, (Imagen 9) se ejecuta el BLAST.

The image shows the NCBI BLAST web interface. At the top, there are tabs for 'blastn', 'blastp', 'blastx', 'tblastn', and 'tblastx'. The main heading is 'Align Sequences Nucleotide BLAST'. Below this, there are three main sections: 'Enter Query Sequence', 'Enter Subject Sequence', and 'Program Selection'. The 'Enter Query Sequence' section has a text box with 'AB472198.1', a 'Clear' button, and a 'Query subrange' section with 'From' and 'To' input fields. Below this is an 'Or, upload file' section with a file selection button and a 'Job Title' text box containing 'AB472198:Uncultured bacterium xylM gene for...'. There is also a checkbox for 'Align two or more sequences'. The 'Enter Subject Sequence' section has a text box with a list of accession numbers: 'AB472199.1', 'AB472200.1', 'AB472201.1', and 'AB472202.1'. It also has a 'Clear' button and a 'Subject subrange' section with 'From' and 'To' input fields. Below this is another 'Or, upload file' section. The 'Program Selection' section has three radio buttons: 'Highly similar sequences (megablast)' (selected), 'More dissimilar sequences (discontiguous megablast)', and 'Somewhat similar sequences (blastn)'. There is a 'Choose a BLAST algorithm' link. At the bottom, there is a 'BLAST' button and a checkbox for 'Show results in a new window'.

Imagen 9. Ejemplo de llenado de campos

Se realizó un segundo set de alineamientos, pero analizando las secuencias de manera individual y por el gen reportado en cada una de estas. Descartando aquellas que tuvieran una similitud >90% y fueran reportadas por el mismo autor.

Con los resultados obtenidos en la etapa anterior se actualizó la biblioteca (base de datos) en donde se archivaron las secuencias finales.

3.4 Alineamiento, análisis y detección de regiones conservadas por hidrocarburo

A continuación, se muestra brevemente cómo se realiza un alineamiento en el software de Bioedit.

Al iniciar el software, el programa muestra una ventana como la siguiente (Imagen 10) en donde, para ejecutar un análisis, primero se tiene que abrir la pestaña de “File” y seleccionar “New Alignment”.

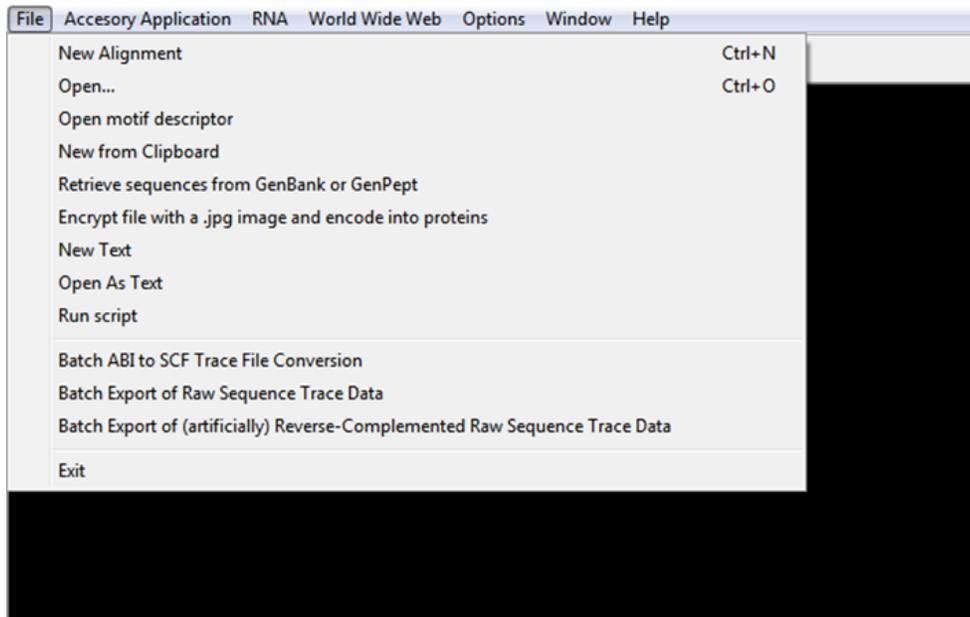


Imagen 10. Ventana principal del programa Bioedit

Seguido de esto se seleccionó en el menú “sequence” la opción “New sequence”, se abrió una ventana como la siguiente (Imagen 11) en donde se escribió el nombre de la secuencia, el tipo de secuencia que se analizará y por último la secuencia de nucleótidos que se trabajó.

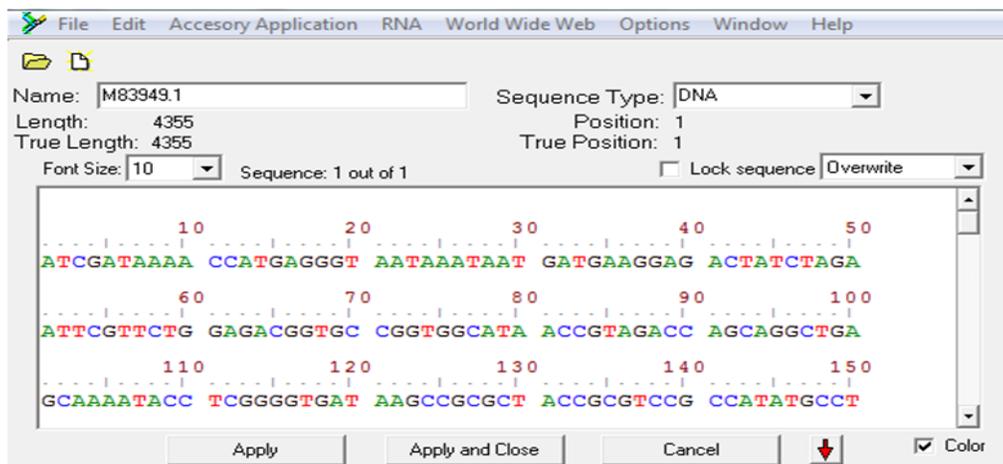


Imagen 11. Editor de secuencias de Bioedit

Al finalizar se le hizo clic en “apply and close” y se desglosó el siguiente resultado (Imagen 12):

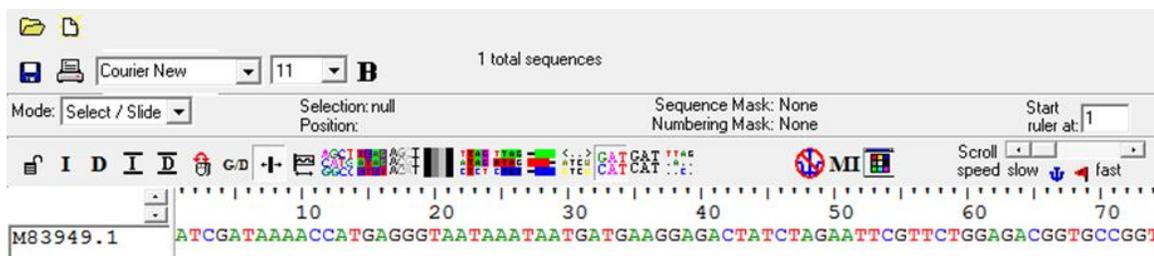


Imagen 12. Presentación de la secuencia en el programa

Una vez teniendo todas las secuencias en resultados se seleccionó el menú “Accesorio Application” y se eligió la función “ClustalW Multiple alignment”. Donde se seleccionó la opción de “Run ClustalW” y luego “Ok”. Dependiendo de la cantidad de secuencias introducidas para su análisis este proceso puede tardar de algunos segundos a varios minutos. Esta función aparece un menú como la siguiente (Imagen 13):

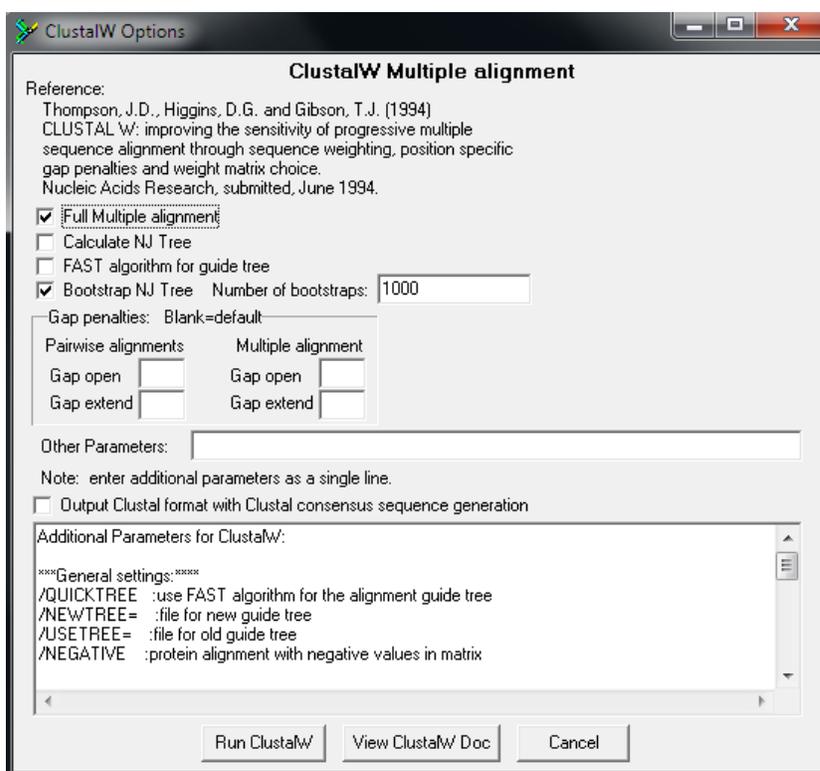


Imagen 13. Opciones de trabajo de ClustalW

Una vez terminado el análisis, el programa desglosa una ventana como la siguiente Imagen 14, en donde se comparan y muestran las secuencias alineadas convirtiendo en 'dots' (puntos) las pares de bases que son iguales.

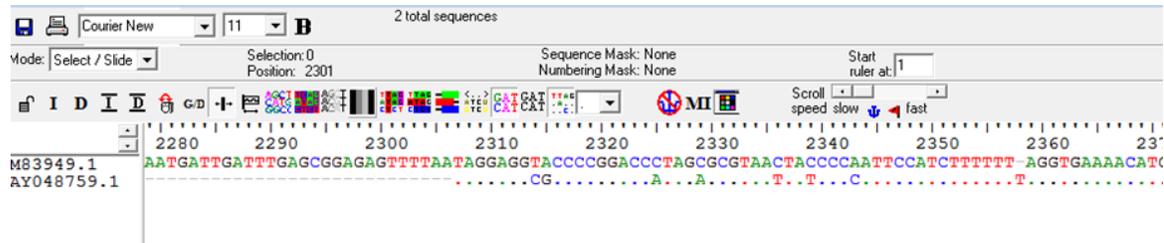


Imagen 14. Alineamiento presentado por el programa Bioedit

Previamente a la detección de las regiones conservadas concluyentes y mediante la ejecución del software Bioedit, se realizaron las primeras alineaciones por hidrocarburo.

Una vez realizado los respectivos alineamientos, las regiones conservadas fueron detectadas manera visual y se consideró como región conservada aquellas regiones que tuvieran un rango mayor a 50 pb iguales (Imagen 15 encerrado en el cuadro rojo), asegurando que el resultado de las secuencias no presentará más de 2 pb diferentes o no alineados.

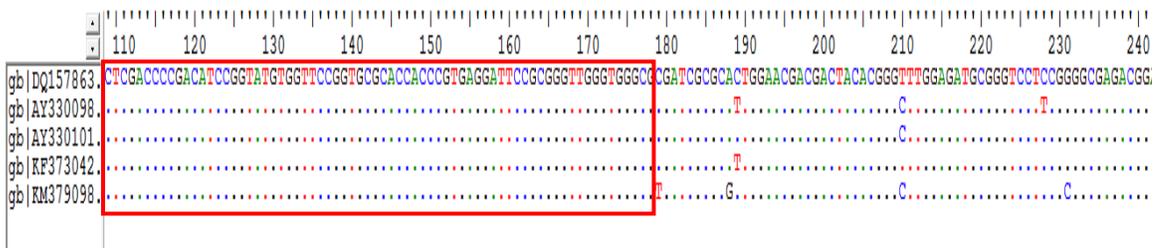


Imagen 15. Región altamente conservada de 70 pb

Por último, se realizó otra corrida de alineamientos en el cual se decidió analizar entre las secuencias de todos los hidrocarburos aquellas que no presentaron regiones conservadas en el ensayo anterior. Los parámetros para considerar la región conservada fue la misma que en el primer análisis.

3.4.1 Reporte de secuencias conservadas

Al finalizar la etapa de detección de secuencias alineadas conservadas, se elaboró en hojas de cálculo una biblioteca reportando los conjuntos de regiones conservadas. Se construyó con los siguientes parámetros:

- ID de Secuencia
- Gen
- Microorganismo
- Hidrocarburo
- Extensión (pb)
- Nucleótidos

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Hidrocarburos, enzimas y genes reportados en base de datos

4.1.1 Hidrocarburos con registro de degradación

En la página de EAWAG Biocatalysis/Biodegradation Database (EAWAG), se interactuó con la lista principal de compuestos que se despliega dentro de la plataforma (Imagen 16), este portal está constituido por numerosos contaminantes, los compuestos seleccionados como Hidrocarburos, se confirmaba mediante cotejando la clasificación reportada en el marco teórico.

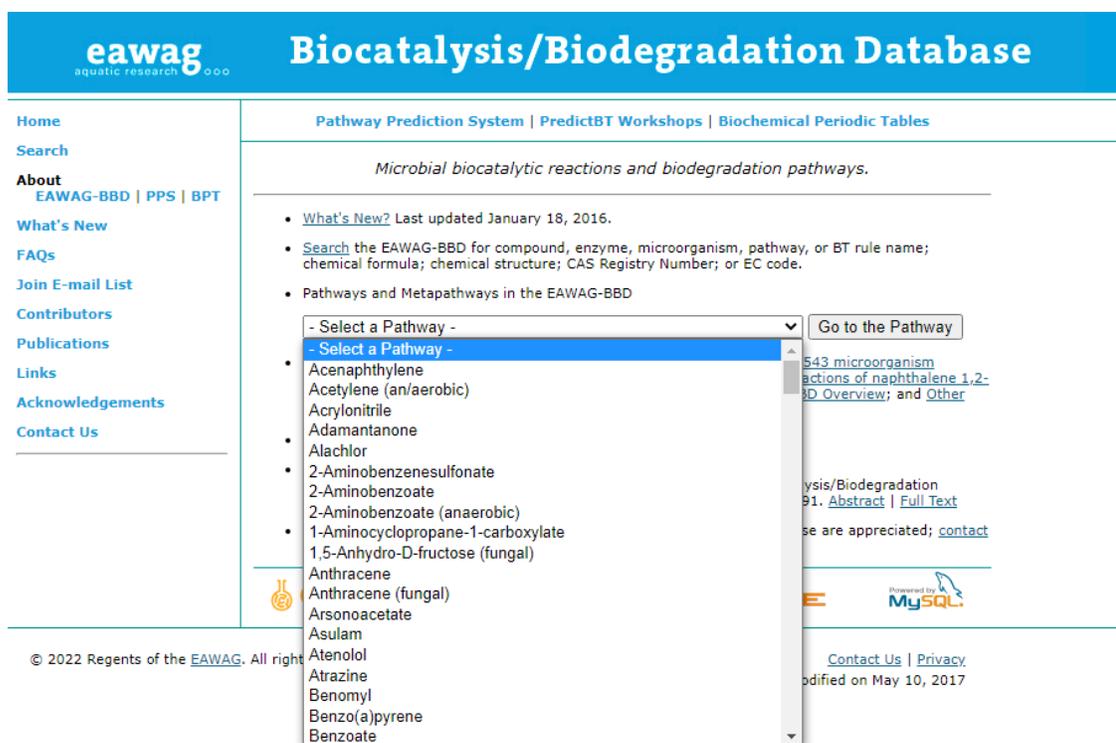


Imagen 16. Desplegado de la lista de compuestos de la página de EAWAG

Todos los hidrocarburos seleccionados fueron considerados al obtenerse de una base de datos que ofrece evidencia de su reporte e interactivamente su ruta de degradación, además de sus intermediarios metabólicos, las enzimas y microorganismos que han sido reportados.

Se visualizaron un total de 19 hidrocarburos que se encuentran desglosados en la Tabla 8, se agrupan en dos clasificaciones generales: hidrocarburos alifáticos/aromáticos (HAA) e hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAP's); ambos se encuentran presentes en productos como gasolina o diésel. El reporte de estos compuestos fue actualizado el 15 de febrero del 2018.

Tabla 8. Hidrocarburos seleccionados

Hidrocarburos alifáticos/aromáticos	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
Etilbenceno	Bifenilo
Alcanos	Acenaftileno
Benceno	Antraceno
Ciclohexano	Fluoreno
Cresol	1-metilnaftaleno
Hexano	2-metilnaftaleno
Octano	Benzopireno
Tolueno	Fenantreno
Xileno	Naftaleno
	Pireno

La clasificación de HAP's está integrada por 10 sustancias entre las que encuentran el naftaleno, pireno y fenantreno, dichos compuestos son los más difíciles de degradar debido a su elevado peso molecular, sin embargo se han reportado diversos grupos taxonómicos con capacidades de eliminación o disminución de estos elementos, tal es el caso de investigaciones hechas por Koukkou y Vandera (2011), ellos reportan que ciertos hidrocarburos como el naftaleno, fenantreno, antraceno y pireno son usados como fuente de carbono y energía por ciertos géneros bacterianos como *Arthrobacter* sp., *Burkholderia* sp., *Mycobacterium* sp., *Sphingomonas* sp., etc. Por otra parte, también se han caracterizado algunas velocidades de degradación, Petit, K. et al. (2013), señala que hongos pertenecientes al género *Aspergillus* pueden ser usados para biorremediar suelos contaminados con hidrocarburos como el pireno y antraceno, los ensayos realizados a una concentración de 500 mg/kg confirman que después de tres meses de pruebas se logra un 23.6% y 5.0% de degradación respectivamente.

Por otra parte, se registraron un total de nueve HAA, compuestos como el benceno, tolueno, hexano se pueden encontrar en hidrocarburos totales de petróleo (TPH) debido a que pueden ser originados a partir del petróleo crudo. Existen reportes sobre su degradación tal es el caso de un estudio hecho por Al-Hiti, Al-Joubori, & Abd Al-Razaq (2007) en donde encontraron que los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Trichoderma harzianum* efectuaban una degradación de 205 ppm por día de TPH. A pesar de estar constituidos por un anillo aromático existen grupos microbianos que son capaces de reconocer y degradar solo algunos de estos compuestos, por ejemplo, pruebas realizadas por Otenio et al. (2005) menciona que el género *Pseudomonas putida* es capaz de metabolizar tolueno y xileno pero no benceno.

Es importante señalar que dentro de los resultados se encuentran hidrocarburos que son utilizados como insumos en la industria química. Estos compuestos también son reportados por la afectación que ejercen hacia la salud animal y humana como agentes (Igwe & Ukaogo, 2015), daño al ecosistema y a la biodiversidad.

Cabe mencionar, que los demás exploradores contemplados en la metodología sí fueron consultados, pero no se contemplaron para obtener el listado de hidrocarburos debido a que la información que se obtenía en EAWAG redireccionaban a estos buscadores, sin embargo, sí fueron utilizados para la obtención de información detallada en la discusión de este trabajo.

4.1.2 Obtención del compilado de enzimas descritas para cada hidrocarburo

La mayoría de las rutas metabólicas consultadas fueron a partir del trabajo recopilado por Gao, Ellis & Wackett (2010) que se encuentra disponible en la base de datos de la EAWAG. Para el caso de la ruta metabólica de los alcanos (Alcano 1-monooxigenasa y Alcano hidroxilasa) se consultaron las investigaciones realizadas por van Beilen et al. (2003) y Rojo (2009) respectivamente, debido a que en estos trabajos se describe de una forma completa la diversidad de la degradación de este compuesto en el ambiente y porque el compuesto antes mencionado no se encontraba disponible en la base de datos.

Se observó que para benzopireno existe más de una ruta de degradación reportada en diferentes microorganismos (Imagen 17) como *Mycobacterium* sp. RJGII-135 (Schneider et al., 1996), *S. yanoikuyae* B8/36 (Gibson, 1999) y *M. vanbaalenii* PYR-1 (Moody et al., 2004), cada una de estas con diferentes intermediarios metabólicos.

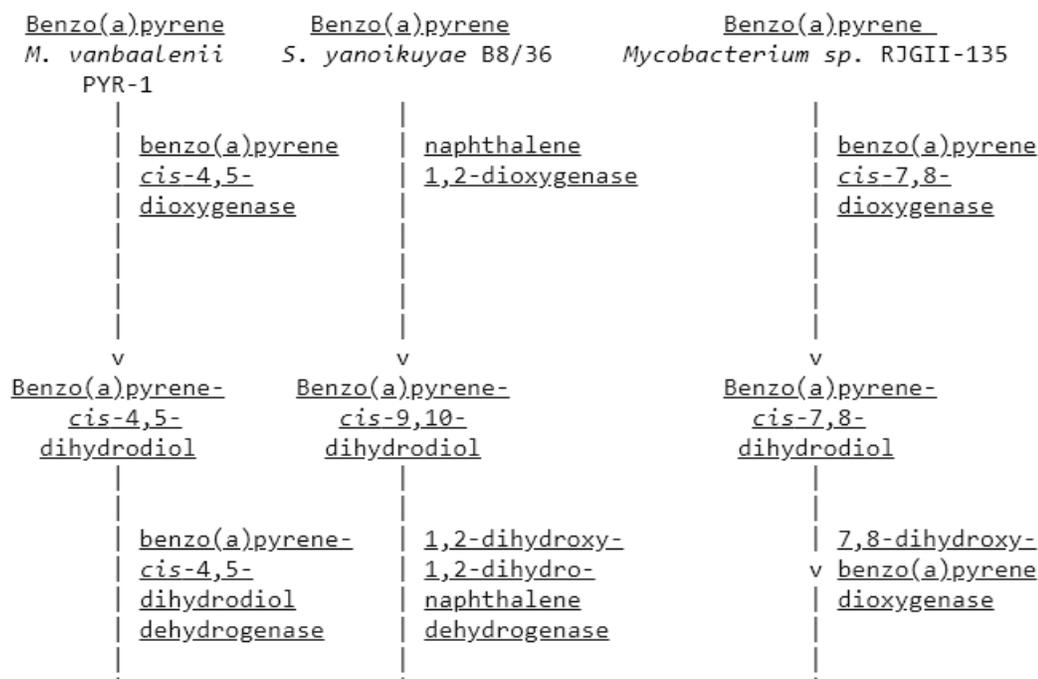


Imagen 17. Rutas metabólicas del benzopireno por diferentes microorganismos (Tomado de Gao, Ellis, & Wackett, 2010)

De la misma manera, el benzopireno también tiene reportes de ser degradado por diferentes enzimas con el mismo microorganismo (Moody et al., 2004). Para ilustrar *M. vanbaalenii* PYR-1 (Imagen 18), además de cortar los anillos de benzopireno a vic-dioles formados por deshidratación, también puede metilar sus grupos hidroxilo.

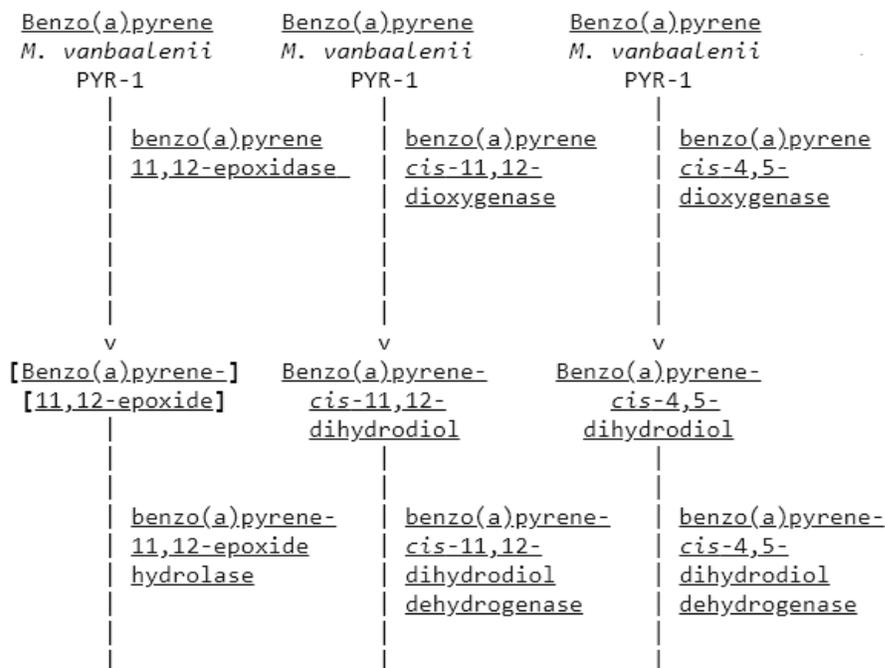


Imagen 18. Diferentes rutas metabólicas del benzopireno (Tomado de Gao, Ellis, & Wackett, 2010)

Se observaron casos particulares en donde el compuesto solo tenía una ruta de degradación registrada, como en el caso del compuesto bifenilo, en la que se reporta un solo microorganismo *Pseudomonas* sp. cepa LB400 (Seeger, Timmis, & Hofer, 1995) con solo una sola enzima por intermediario metabólico (Imagen 19).

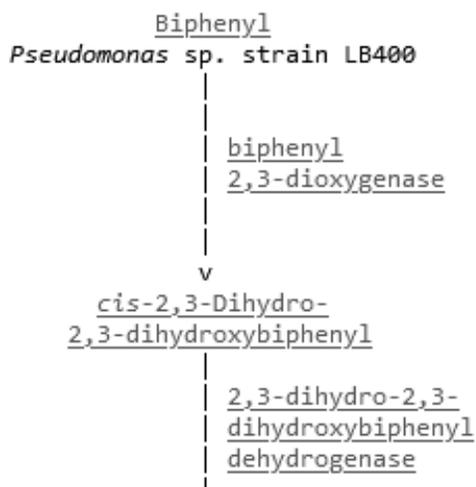


Imagen 19. Ruta metabólica del bifenilo (Tomado de Gao, Ellis, & Wackett, 2010)

Se contemplaron sólo las enzimas que se localizaban al inicio de cada ruta metabólica, puesto que algunas de ellas son enzimas clave para iniciar el proceso de asimilación del hidrocarburo. Dicho lo anterior, se elaboró la Tabla 9.

Tabla 9. Enzimas responsables de la degradación de hidrocarburo

HIDROCARBURO	ENZIMAS	HIDROCARBURO	ENZIMAS
Tolueno	Xileno monooxigenasa Tolueno 2-monooxigenasa Tolueno 3-monooxigenasa Tolueno dioxigenasa Tolueno 4-monooxigenasa Bencil succinato sintasa	Benzopireno	Benzopireno 11,12-epoxidase Benzopireno cis 11,12-dioxigenasa Benzopireno cis 4,5-dioxigenasa Naftaleno 1,2-dioxigenasa Benzopireno cis 7,8-dioxygenasa
Xileno	Xileno monooxigenasa Xileno 3,4-dioxigenasa Xileno 4,5-dioxigenasa Xileno dioxigenasa	Pireno	Pireno dioxigenasa Pireno 4,5-monooxigenasa Pireno 1,2-monooxigenasa
Naftaleno	Naftaleno 2,3-dioxigenasa Naftaleno 1,2-dioxigenasa Tolueno 1,2-dioxigenasa	Fluoreno	Dioxigenasa Naftaleno 1,2-dioxigenasa Fluoreno oxigenasa
Fenantreno	Fenantreno dioxigenasa Fenantreno 1,2 monooxigenasa Fenantreno 9,10 monooxigenasa	Etilbenceno	Etilbenceno dioxigenasa Naftaleno 1,2-dioxigenasa Etilbenceno deshidrogenasa
Antraceno	Naftaleno 1,2-dioxigenasa Antraceno 9,10-dioxigenasa	Acenaftileno	Naftaleno 1,2-dioxigenasa Acenaftileno monooxigenasa
1-metilnaftaleno	1-metilnaftaleno hidroxilasa Naftaleno 1,2-dioxigenasa	2-metilnaftaleno	2-metilnaftaleno hidroxilasa Naftaleno 1,2-dioxigenasa
Alcanos	Alcano 1-monooxigenasa	Benceno	Benceno dioxigenasa
Bifenilo	Bifenilo 2,3 dioxigenasa	Cresol	3,5-xilenol metil hidroxilasa
Ciclohexano	Butano monooxigenasa	Hexano	1-metil pentil succinato sintasa
Octano	Alcano 1-monooxigenasa		

Se visualizan un total de 45 enzimas siendo tolueno, benzopireno y xileno los compuestos que presentaron un mayor número de estas reportadas (hasta 6 enzimas). La mayoría de las enzimas corresponden a las actividades de dioxigenasas y monooxigenasas, este tipo de enzimas son un grupo de metaloenzimas que pueden catalizar la oxidación de una gran variedad de compuestos aromáticos introduciendo uno o dos átomos de oxígeno a partir de oxígeno molecular, estas enzimas destacan por su participación en diversas rutas metabólicas que degradan compuestos xenobióticos contaminantes (Carrillo-Campos, 2019).

Hay que señalar que diferentes compuestos pueden ser degradados por la misma enzima debido a las capacidades catalíticas que poseen, como ejemplo es la enzima “Naftaleno

1,2-dioxigenasa” (ver Tabla 9) que se encuentra relacionada con 8 hidrocarburos (Resnick, Lee, & Gibson, 1996).

Finalmente, se utilizó el nombre de las enzimas en idioma inglés como palabra clave para la búsqueda de genes que codificaban a cada enzima.

4.1.3 Nomenclatura de genes responsables

Una vez determinadas las palabras claves, se continuó con la obtención de la secuencia nucleotídica de los genes relacionados. Para ello se ocupó la base de datos del NCBI, utilizando como filtro las opciones “Nucleotide”, “Gene” y “Protein” y la palabra clave el nombre de la enzima.

Los resultados obtenidos con el filtro “Gene” fueron difíciles de integrar a la biblioteca personal por lo confuso de la información, sin embargo, los resultados promisorios obtenidos se lograron con la palabra “Nucleotide” y “Protein”. Posterior al primer resultado obtenido se observaron registros que pertenecían a taxas correspondientes a animales, plantas, hongos, protistas, bacterias, arqueas y virus (Imagen 20, encerrado en un círculo negro) por lo cual se fijó un segundo filtro el cual limitaba los resultados solo a taxas bacterianas.

The image shows a screenshot of the National Library of Medicine (NIH) search results page. At the top, the NIH logo and the text "National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information" are visible. A search bar contains the query "naphthalene dioxygenase" and the filter "Nucleotide" is selected. The search results are displayed in a list format, showing two items. Item 1 is "Pseudomonas aeruginosa pah genes for 12 ORFs (components of naphthalene dioxygenase, dehydrogenase, hydratase-aldolase, isomerase)" and item 2 is "Streptomyces laurentii DNA, complete genome, strain ATCC 31255". A sidebar on the left lists various species categories, with "Species" circled in black. The sidebar also includes options for "Molecule types" and "Source databases".

Imagen 20. Ejemplo de resultados obtenidos aplicando el buscador “Nucleotide”.

Las secuencias nucleotídicas desplegadas en la página correspondían a resultados relacionados con el contenido del cromosoma, genoma, plásmido, mRNA y gene. Por lo tanto, solo se descargaron las secuencias con el resultado que especificaba la información de gen; en algunos casos la secuencia era completa o parcial como se muestra en la leyenda a continuación:

Pseudomonas putida naphthalene dioxygenase (*rdoA1*) gene, partial cds

El análisis se hizo de la misma manera para todas las enzimas de cada hidrocarburo sin embargo, no todas las enzimas estaban reportadas en la base de datos y en algunos casos sólo se encontraron registros para un compuesto en específico por ejemplo, el caso de los hidrocarburos que se degradaban con la misma enzima. La falta de información acerca de las enzimas y genes puede deberse a investigar solo su cualidad de degradación por el organismo, pero no se analiza molecularmente y por ello se desconoce su secuencia y es que las técnicas para realizar estos estudios suelen ser costosas o incluso se presentan problemas al secuenciar (Diz Mellado, 2020; García Vallejo, 2004), por esta vaguedad, se eliminó aproximadamente el 53% de los hidrocarburos y el 73% de las enzimas que se tenían contemplados.

Finalmente, en la Tabla 10 se encuentran anotados los hidrocarburos, la abreviatura de los genes con secuencia completa o parcial y las enzimas responsables que corresponden a cada uno. La última actualización llevada a cabo en la tabla fue el 08 de abril del 2018.

Aunado a esto, en la Imagen 21 se puede apreciar la cantidad de genes que fueron reportados para los hidrocarburos, obteniendo un total de 54 genes.

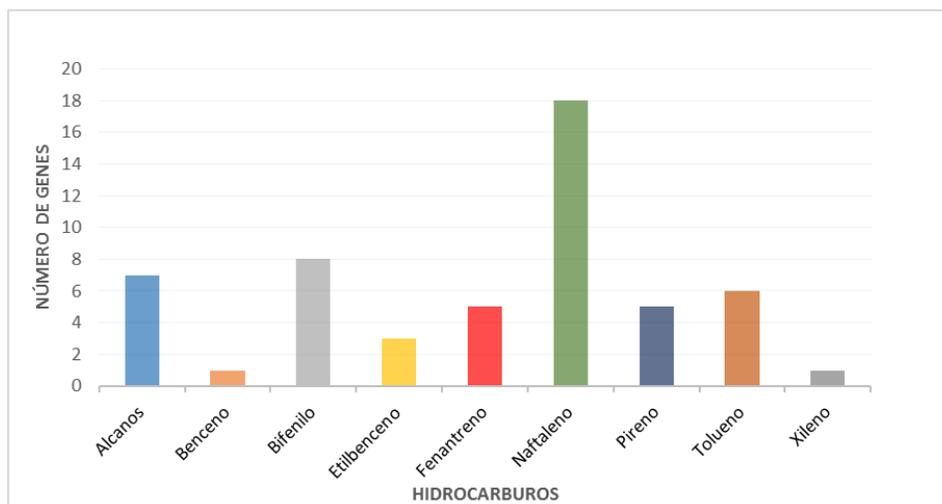


Imagen 21. Cantidad de genes degradantes encontrados hasta el 08/04/18

El compuesto con mayor desglose de resultados correspondía al naftaleno con un total de 18 genes, este compuesto se ha utilizado durante los últimos años como modelo en los estudios de biorremediación (Pawar et al., 2013). En contraste, el benceno y el xileno solo poseen 1 gen degradante reportado.

Tabla 10. Lista de hidrocarburos y enzimas finales

HIDROCARBURO	GENES ENCONTRADOS	ENZIMAS	REFERENCIAS
Alcanos	<ul style="list-style-type: none"> • <i>alk, alkB, alkB1, alkB2, alkB4</i>, Alcano monooxigenasa* 	<ul style="list-style-type: none"> • Alcano 1-monooxigenasa 	(Kloos, Munch, & Schloter, 2006; Cappelletti et al, 2011; Vomberg & Klinner, 2000)
	<ul style="list-style-type: none"> • <i>alkB, alkB1, alkB2</i>, Alcano Hidroxilasa* 	<ul style="list-style-type: none"> • Alcano hidroxilasa 	
Benceno	<ul style="list-style-type: none"> • <i>bedC1</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Benceno dioxigenasa 	(Durán et al., 2019; Tan et al., 1993)
Bifenilo	<ul style="list-style-type: none"> • <i>bphA1, bphAa, bphA, rdoA2, rdoA3, bph, bphA2, bphA3</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Bifenilo 2,3 dioxigenasa 	(Asturias, Díaz, & Timmis, 1995; Furukawa & Arimura, 1987)
Etilbenceno	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ebdA, ebdB, ebdC</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Etilbenceno deshidrogenasa 	(Johnson, Pelletier, & Spormann, 2001)
Fenantreno	<ul style="list-style-type: none"> • <i>phnA1f, phnAc, rdoA2</i> • <i>nahAc, phnA</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Fenantreno dioxigenasa 	(Kahng & Nam, 2002; Chang et al., 2011) (Rodriguez-Conde et al., 2016)
Naftaleno	<ul style="list-style-type: none"> • Naftaleno dioxigenasa*, <i>rdoA1, nahAa, nahAb, nahAc, nahAd, nah, nahc, ndo, ndoA, ndoB, ndoC, nahG, phnA, phnAc, narAa, cndA, nidB</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Naftaleno 2,3-dioxigenasa 	(Kurkela et al., 1988; Tsuda & Iino, 1990; Wilson et al., 2003)
	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ndo, nahAc</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Naftaleno 1,2-dioxigenasa 	
Pireno	<ul style="list-style-type: none"> • <i>pydA, pydB,</i> • <i>nidA, nidB, nidC</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Pireno dioxigenasa 	(DeBruyn, Mead, & Sayler, 2012; Ma, Xu, & Jia, 2013; Zada et al., 2021)
Tolueno	<ul style="list-style-type: none"> • <i>xyIM, xylA, tmoA</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Xileno monooxigenasa 	(Zylstra & Gibson, 1989; Kasai, Inoue, & Harayama, 2001)
	<ul style="list-style-type: none"> • <i>todC, todC1</i>, tolueno dioxigenasa* 	<ul style="list-style-type: none"> • Tolueno dioxigenasa 	
Xileno	<ul style="list-style-type: none"> • <i>xyIM</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Xileno monooxigenasa 	(Kasai, Inoue, & Harayama, 2001)

*El portal aún no tiene asignado una clave para este gen.

4.2 Recolección de secuencias y construcción

4.2.1 Obtención de secuencias en formato FASTA

Como resultado preliminar se pudo observar que las bases de datos internacionales se encuentran asociadas a una misma relación informática, por lo que la información que alguna de ellas contenga ya estará incluida o redireccionada en las demás. En la Imagen 22, se puede apreciar una comparativa de la ficha técnica que despliegan cada una de las bases de datos es muy similar, observando que solo se presentan ligeros cambios en la organización de la información. Por ende, se decidió trabajar solamente con la base de datos del NCBI aunado a la familiarización y dominio que se tenía con esta última.

ENA/NCBI (A)		DDBJ (B)	
LOCUS	HM153082 166 bp DNA linear BCT 25-JUL-2016	ID	HM153082; SV 1; linear; genomic DNA; STD; PRO; 166 BP.
DEFINITION	Rhodococcus sp. Z6 biphenyl 2,3-dioxygenase alpha subunit (bphA1) gene, partial cds.	XX	
ACCESSION	HM153082	AC	HM153082;
VERSION	HM153082.1	XX	
KEYWORDS	.	DT	13-JUL-2010 (Rel. 105, Created)
SOURCE	Rhodococcus sp. Z6	DT	13-JUL-2010 (Rel. 105, Last updated, Version 1)
ORGANISM	Rhodococcus sp. Z6 Bacteria; Actinobacteria; Corynebacteriales; Nocardiaceae; Rhodococcus.	XX	
REFERENCE	1 (bases 1 to 166)	DE	Rhodococcus sp. Z6 biphenyl 2,3-dioxygenase alpha subunit (bphA1) gene, partial cds.
AUTHORS	Petric,I., Hrsak,D., Bru,D., Fingler,S., Udikovic Kolic,N. and Martin-Laurent,F.	XX	
TITLE	Characterization of the PCB-degrading community in small-scale bioremediation assay	OS	Rhodococcus sp. Z6
JOURNAL	Unpublished	OC	Bacteria; Actinobacteria; Corynebacteriales; Nocardiaceae; Rhodococcus.
REFERENCE	2 (bases 1 to 166)	XX	
AUTHORS	Petric,I., Hrsak,D., Bru,D., Fingler,S., Udikovic Kolic,N. and Martin-Laurent,F.	RN	[1]
TITLE	Direct Submission	RP	1-166
JOURNAL	Submitted (26-APR-2010) Zimo, Rudger Boskovic Institute, Bijanic Street 54, Zagreb 10000, Croatia	RA	Petric I., Hrsak D., Bru D., Fingler S., Udikovic Kolic N., Martin-Laurent F.;
BASE COUNT	39 a 44 c 52 g 31 t	RT	"Characterization of the PCB-degrading community in small-scale bioremediation assay";
ORIGIN	1 gcctgatttt cgcaactgg gacgtgacg ccccgacct ggacacctat ctgggtgaag 61 cgaagttcta catggaccac atgttgata gagcgaagc gggcaccgaa gcgatccccg 121 ggattcagaa gtgggtcatt ccctgcaact ggaagttcgc agcggga	RL	Unpublished.
		XX	
		RN	[2]
		RP	1-166
		RA	Petric I., Hrsak D., Bru D., Fingler S., Udikovic Kolic N., Martin-Laurent F.;
		RT	Submitted (26-APR-2010) to the INSDC.
		RL	Zimo, Rudger Boskovic Institute, Bijanic Street 54, Zagreb 10000, Croatia
		SQ	Sequence 166 BP; 39 A; 44 C; 52 G; 31 T; 0 other;
			gcctgatttt cgcaactgg gacgtgacg ccccgacct ggacacctat ctgggtgaag 60 cgaagttcta catggaccac atgttgata gagcgaagc gggcaccgaa gcgatccccg 120 ggattcagaa gtgggtcatt ccctgcaact ggaagttcgc agcggga 166

Imagen 22. Fichas técnicas de las bases de datos: A) ENA/NCBI y B) DDBJ

Se prosiguió con la búsqueda y descarga de las secuencias de nucleótidos, para esto se utilizaron las palabras claves previamente propuestas (enzima + *gen*).

Los archivos se descargaron en formato FASTA (se puede apreciar un ejemplo de este en la Imagen 23), como descripción de este formato al principio se puede observar unas siglas alfanuméricas (>#####...) que sirven como identificador en las bases de datos, seguido por un texto descriptivo en el que se menciona tanto al organismo como enzima y gen al que pertenece, mostrando por último las secuencias de nucleótidos.

```

>HM153082.1 Rhodococcus sp. Z6 biphenyl 2,3-dioxygenase alpha subunit (bphA1) gene, partial
cds
GCCTGATTTTCGCAAACGGGACGCTGACGCCCCGGACCTGGACACCTATCTGGGTGAAGCGAAGTTCTA
CATGGACCACATGTTGGATAGAGCCGAAGCGGGCACCGAAGCGATCCCGGGGATTCAGAAGTGGGTTCATT
CCCTGCAACTGGGAAAGTTCGCAGCGGA

```

Imagen 23. Formato FASTA del gen *bphA1*

4.2.2 Ordenamiento de secuencias obtenidas

Para trabajar en los futuros alineamientos, las secuencias descargadas se guardaron en archivos con formato de Documento de texto. Para ello, el nombre con el que se guardaban fue el mismo que se daba en el identificador, estos nuevos archivos fueron almacenados en 9 carpetas de acuerdo al hidrocarburo que corresponden (Imagen 24).

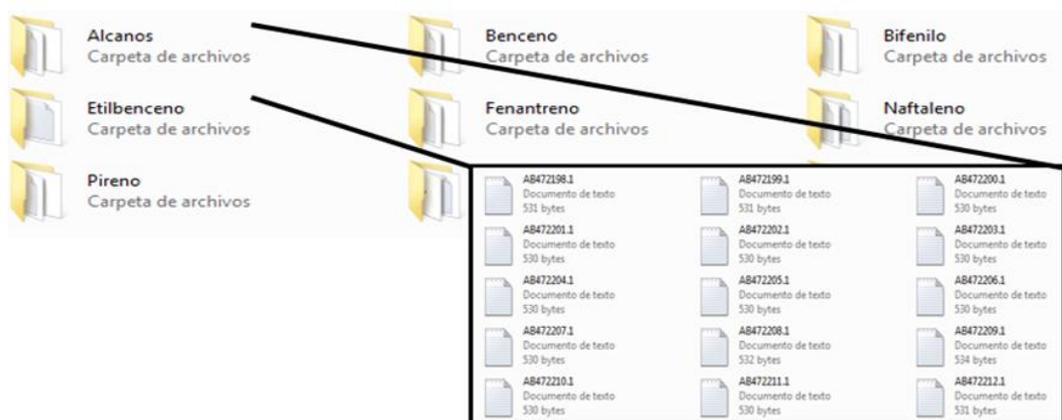


Imagen 24. Organización de base de datos personal

Así mismo, para complementar y tener un control en la información, se elaboró una base de datos personal en Excel, la cual fue llenada utilizando la información de las fichas técnicas. En la Tabla 11, se puede apreciar la estructura de esta base de datos, agregando también como información de importancia el tamaño del gen.

Tabla 11. Base de datos personal

ID	GEN	ENZIMA	ORGANISMO	HIDROCARBURO	TAMAÑO DE GEN
KY613514.1	alkB	Alcano monooxigenasa	<i>Acinetobacter beijerinckii</i>	Alcano	270
KX036864.1	alkB	Alcano monooxigenasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alcano	281
HQ702473.1	alkB	Alcano hidroxilasa	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Alcano	284
HQ702475.1	alkB	Alcano hidroxilasa	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Alcano	291
KJ650249.1	alkB	Alcano monooxigenasa	<i>Novosphingobium</i> sp. PCY	Alcano	300

Se reunieron un total de 512 secuencias, de las cuales solo 28 se reportaban completas, correspondían al pireno (12), seguido de los alcanos y naftaleno (8 y 4 respectivamente) y por último bifenilo, etilbenceno, fenantreno y tolueno con una secuencia.

4.3 Descarte de secuencias duplicadas y reconstrucción de librería personal

Se alinearon todas las secuencias utilizando como la SB o con una región codificada completa. Las secuencias descartadas fueron aquellas que tuvieron un porcentaje >99% de similitud, para ello el propio programa BLAST otorgaba este dato el cual se puede apreciar encerrado en rojo en la Imagen 25.

Query ID: [KT378058.1](#) (nucleic acid)

Query Descr: Pseudomonas sp. 1217 alkane monooxygenase gene, com ...

Query Length: 1134

Subject ID: [EU675621.1](#) and 103 more subject(s) (nucleic acid)

Subject Descr: [See details](#)

Subject Length: 54873

Filter Reset

Descriptions Graphic Summary Alignments

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all 7 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Per. Ident	Accession
Pseudomonas sp. MR21 alkB gene for alkane monooxygenase, partial cds	Pseudomonas sp. MR21	665	665	100.00%	LC179843.1
Pseudomonas aeruginosa strain XCZ alkane hydroxylase (alkB) gene, complete cds	Pseudomonas aeruginosa	2078	2078	99.74%	EU675621.1
Pseudomonas aeruginosa strain J-D-3 alkane hydroxylase (alkB) gene, partial cds	Pseudomonas aeruginosa	741	741	99.03%	EU853419.1
Leucobacter sp. 5-C-1 alkane hydroxylase (alkB) gene, partial cds	Leucobacter sp. 5-C-1	730	730	98.78%	EU853414.1
Alcaligenaceae bacterium ITS167 alkane monooxygenase (alkB) gene, partial cds	Alcaligenaceae bacterium ITS167	449	449	85.82%	FJ014917.1
Pseudomonas sp. ITRI19 alkane monooxygenase (alkB) gene, partial cds	Pseudomonas sp. ITRI19	444	444	85.58%	FJ014918.1
Enterobacteriaceae bacterium ITS132 alkane monooxygenase (alkB) gene, partial cds	Enterobacteriaceae bacterium ITS132	433	433	85.11%	FJ014916.1

Imagen 25. Resultado obtenido en BLAST señalando el porcentaje de similitud

De las secuencias reportadas durante este primer screening se descartó el 20% de los resultados debido a que indicaban secuencias repetidas y registradas con otro código de cepa. El total de secuencias resultantes de este primer filtro fueron 411.

Durante este análisis se observó que existían conjuntos de secuencias que eran reportadas por el mismo autor es decir, pertenecían al mismo microorganismo y en algunos casos tenían la misma longitud de pares de bases por ende, se optó por alinear de nuevo las secuencias por hidrocarburo, con este paso lo que se pretendió hacer era concluir el número de secuencias a analizar.

En la Imagen 26 se puede observar este segundo alineamiento, pertenece a las secuencias del xileno, las líneas rojas señalan las variaciones que han tenido estas secuencias con la SB problema. En el recuadro debajo de la misma imagen, se puede apreciar lo antes mencionado así como el porcentaje de similitud que presentan estas.

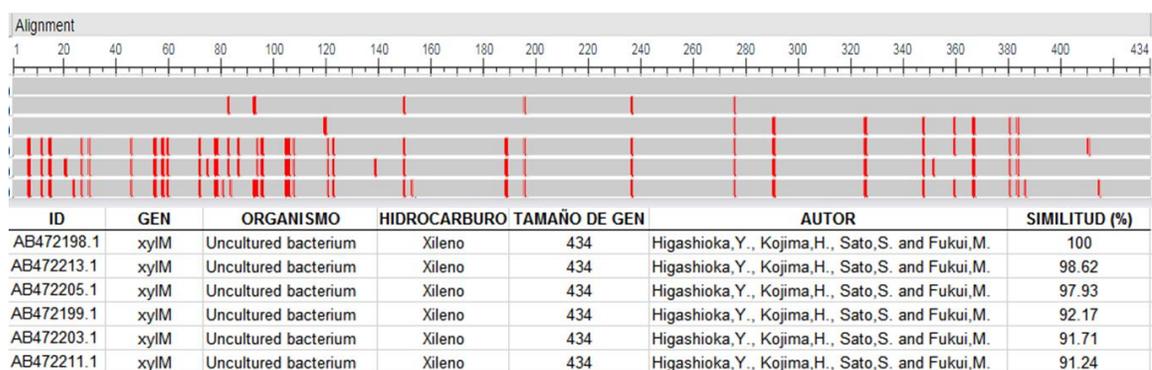


Imagen 26. Alineamiento de secuencias del hidrocarburo xileno

Una vez terminado el análisis se concluye con un total de 174 secuencias. La longitud de las secuencias finales abarcó desde un máximo de 6154 y un mínimo de 166 nucleótidos.

4.4 Detección de regiones conservadas

Se analizaron todas las secuencias finales (base de datos) en grupos respecto al tipo de hidrocarburo. En total, se encontraron 58 regiones conservadas y corresponden solo a seis tipos de hidrocarburos.

El resultado que se esperaba encontrar al inicio de esta fase fue el de tener secuencias conservadas de importante extensión la Imagen 27 enmarca uno de estos resultados satisfactorios.

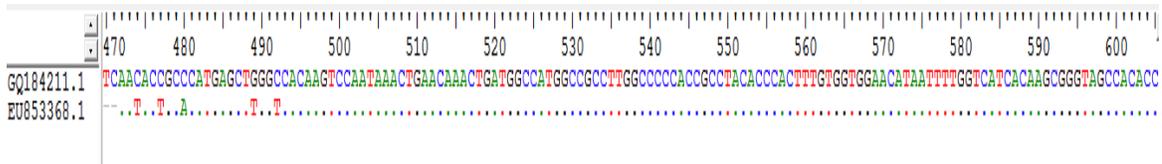


Imagen 27. Alineamiento de secuencias de pertenecientes a alcanos

Existieron resultados en donde al ejecutar el programa solo una secuencia coincidía con la SB. Como se observa en la Imagen 28 solamente la secuencia EU872115.1 (cuadro rojo) coincide con la secuencia remarcada en negro.

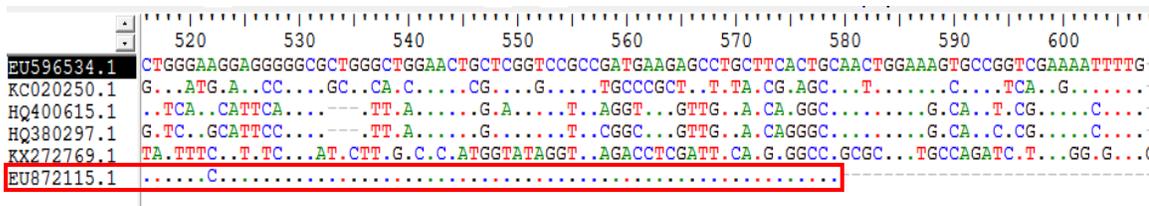


Imagen 28. Alineamiento de secuencias pertenecientes a fenantreno

Sin embargo, hubo otros casos donde la coincidencia fue óptima, ya que esta podía observarse dentro de todas las secuencias alineadas, como se logra ver en la Imagen 29 en donde se aprecia que todas coincidieron con la SB DQ157863.1.



Imagen 29. Alineamiento de secuencias pertenecientes a pireno

En la Tabla 12, se especifica el número total de regiones conservadas y el hidrocarburo al que pertenece la región.

Tabla 12. Número de regiones conservadas por hidrocarburo

HIDROCARBURO	NO. DE REGIONES CONSERVADAS	SECUENCIAS ALINEADAS
Alcanos	18	67
Bifenilo	10	22
Fenantreno	2	7
Naftaleno	13	49
Pireno	10	8
Tolueno	5	17

De manera introductoria se hace resaltar que la región conservada más corta corresponde a uno de los genes de pireno y fue de 50 nucleótidos y que la región conservada de mayor amplitud fue de 627 perteneciente al grupo de los alcanos.

Los péptidos están formados por aminoácidos, cada uno de estos monómeros se integra por la lectura de un codón, y cada codón está conformado por 3 pares de bases.

Müller et al. (2009) detectó que la cepa de *Lactobacillus plantarum* Lp31 produjo una sustancia antimicrobiana bactericida hacia patógenos de grado alimentario, esta Plantaricina es un péptido de solo 14 aminoácidos (traducidos por 42 nucleótidos) y con un bajo peso molecular de 1558.85 Da. Este pequeño péptido, a pesar corta composición de aminoácidos, tiene efectos bactericidas contra *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*.

Existen péptidos catiónicos antimicrobianos codificados en genes que comprenden de 12 a 50 aminoácidos con la capacidad de matar o neutralizar bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, hongos, parásitos, células cancerosas e incluso virus como el VIH y el herpes. Estos péptidos se han encontrado en la mayoría de los seres vivos (plantas, insectos y animales). Por ejemplo, la Indolicidina constituida por únicamente 13 aminoácidos (codificados por 39 nucleótidos) posee efectos antimicrobianos contra bacterias, hongos y VIH (Hancock & Scott, 2000).

Bajo estos hallazgos se hizo una excepción y se consideró en cuenta una región conservada de 47 nucleótidos que no seguía los límites establecidos en esta investigación, dicha región se tomó debido a la importancia y cualidad de algunos péptidos de corta extensión.

4.4.1 Regiones conservadas para alcanos

Las secuencias que corresponden al grupo de los alcanos, corresponden al 38% de las secuencias analizadas. Después de alineamiento se encontraron 18 regiones conservadas distribuidas entre 19 secuencias que mostraron coincidencias, dichos fragmentos se encuentran expresados en el Anexo 2. En este grupo fue donde se localizaron las regiones conservadas con mayor extensión (Tabla 13). En este análisis se pudo apreciar que diferentes especies bacterianas pueden tener más de una región conservada. De acuerdo con Rojo (2009) se puede intuir que no se encontró demasiada relación entre las secuencias, debido a que cada cepa bacteriana tiene varios sistemas de degradación que suelen ser activos muy específicos para cada tipo del alcano presente en medio o de condiciones fisiológicas particulares, sin embargo, en este trabajo se observó que sí puede existir relación genética entre diferentes especies.

Tabla 13. Región conservada con mayor extensión para el gen *alkB*

Secuencia	Microorganismo	Extensión (pb)	Nucleótidos
AJ250560.1	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i>	627	TGGCCGGCTACTCCGATGATCGGAATCTGGCTTGCC AATGAGACTGGCTGGGGTATCTTTTATGGCTTAGTT CTAGCTGTGTGGTACGGGGTCTTCCATTGCTTGAC GCGATGTTTGGTGAGGACTTTAATAATCCGCCTGAG GAAGTAGTGGAGAACTGGAGAAAGAACGTTACTAC CGAGTTTAAACGTATCTAACAGTTCCAATGCATTACG CAGCACTAATCGTGTCTGCATGGTGGGTAGGGACTC AGTCAATGTCTTGGTTCGAAATCGGCACACTTGCCT TGCACTGGGCATCGTGAATGGTTTAGCGCTTAATA CAGGTCACGAACTGGGTCAAAAAAGAAGCCTTTG ATCGTTGGATGGCGAAAATTGTGCTGGCGGTTGTGCG GGTACGGCCACTTCTTTATTGAGCATAATAAAGGCC ATCACCGTGATGTTGCTACACCGATGGACCCTGCCA CCTCACGTATGGGAGAAAATATATATAAATTCTCAAC CCGTGAGATTCTGGAGCGTTTCGTGCTTGGGG GCTTGAGGAACAACGCCTTTCGCGCCGCGGGCAA GCGTTTGGAGTTTCGATAATGAGATCCTCCAGCCAA TGTCATCACAGTT
FJ014898.1	<i>Ochrobactrum</i> sp. ITRH1	242	TTCTCTACACCCTCCTGCTTGCCTTCTTTGGTCCGAA GATGCTGGTATTCTTCCAATTCAGATGGCTTTTCGG GTGGTGGCAGTTAACAAGCGCGAACTACATTGAACA CTACGGTTTGTGCGTGAAAAAATGGCCGATGGACG ATATGAACATCAAAGCCACATCACTCGTGGAAACAG TAACCACATCGTGTCAAATCTGTTCTGTTTCACCTT CAGCGGCACTCGGATCACCACGCG

4.4.2 Regiones conservadas para bifenilo

Furukawa (2000) menciona que la divergencia de los genes entre las cepas que utilizan Bifenilo han evolucionado de un ancestro común, pero fueron acumulando demasiadas mutaciones que algunos genes tuvieron que reorganizarse sin embargo, para el caso del genes *bph*, *bphA1* y *bphAa* en las 22 secuencias analizadas, se encontraron diez regiones conservadas en 13 de ellas, indicando poca divergencia entre las trece especies analizadas. Estas regiones se encuentran expresadas en el Anexo 3.

4.4.3 Regiones conservadas para naftaleno

Se detectaron 13 regiones conservadas en el 28% de las secuencias de naftaleno. Dichas secuencias pertenecen a las taxas bacterianas de *Pseudomonas* sp., *Alteromonas* sp., *Comamonas* sp., *Burkholderia* sp. y Uncultured (Anexo 4). Los genes que se reportan eran variaciones nomenclaturales descritas del gen *nah* reportado en *Pseudomonas* spp. (Mohapatra & Phale, 2021).

4.4.4 Regiones conservadas para pireno

De ocho secuencias analizadas sólo se percibieron regiones conservadas en los genes *nidA* y *nidB* (Anexo 5), los cuales están reportados como codificantes de los principales biomarcadores en el metabolismo de este hidrocarburo (Zada et al., 2021). De los 2 filos bacterianos α -Proteobacteria y Actinobacteria, solo el último presentó mayor número de regiones conservadas, quizás a que pueden producir enzimas de alta calidad que funcionan como biocatalizadores clave en la degradación del pireno (Kim et al., 2007).

4.4.5 Regiones conservadas para fenantreno

El alineamiento de las 7 secuencias pertenecientes a este hidrocarburo dio como resultado 2 regiones conservadas presentes en dos cepas del género bacteriano *Sphingomonas* sp. Proporcionan una similitud mayor al 98% y están detectadas en la parte media de la secuencia base. Curiosamente estas dos secuencias fueron descargadas con diferentes nombres de gen, sin embargo, codifican para la misma enzima (Tabla 14).

Tabla 14. Regiones conservadas en la cepa *Sphingomonas* sp.

Secuencia	Gen	Microorganismo	Extensión (pb)	Nucleótidos
EU596534.1	<i>phnA</i>	<i>Sphingomonas polyaromaticivorans</i>	143	GTGTACGGGCAGGATGGATCGTTGGTCGATGT CCCACTCGAGTCGCGCTGTTACCACAACAACT CGATAAGCAAGAGCTGGCGGCGAAGTCTGTTC GGTTCGAAACCTACAAGGGTTTCATTTTCGGTT GCCATGATCCCGA
EU872115.1	<i>rdoA2</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. DSM 7526	57	GGAGGGGGCGCTGGGCTGGAAGTCTCGGTCC GCCGATGAAGAGCCTGCTTCACTGC

4.4.6 Regiones conservadas para tolueno

Se enlistaron las 17 secuencias de este hidrocarburo y solamente en 4 de ellas se localizaron cinco regiones conservadas (Anexo 6). Tres regiones pertenecen al gen *todC1* y dos al gen *xyIA*, ambos genes están involucrados en el primer paso de las rutas metabólicas tolueno dioxigenasa (TOD) y xileno oxigenasa (TOL) respectivamente, de acuerdo a Di Martino, López, & Raiger lustman (2012) se reporta la presencia de estos genes en la cepa *Pseudomonas* sp. KA.

4.4.7 Regiones conservadas entre hidrocarburos

Las secuencias previamente analizadas sin resultado aparente en el hallazgo de regiones conservadas se analizaron nuevamente para confirmar que entre los grupos de hidrocarburos no existieran regiones conservadas.

En este segundo ensayo de alineamientos se encontraron regiones importantes en las secuencias de los grupos de hidrocarburos naftaleno, fenantreno y pireno. Se localizaron en total 13 regiones conservadas, seis se obtuvieron a partir de los alineamientos entre naftaleno-fenantreno y siete entre la alineación de pireno-naftaleno (Anexo 7).

Si bien los genes reportados pueden tener regiones conservadas, esto no garantiza que los microorganismos tengan la capacidad de degradar el compuesto contra el que se analiza, debido a que la expresión de los genes en los operones pueden verse afectados químicamente por la presencia de compuestos similares (Kahng & Nam, 2002), también el no encontrar conservaciones significativas depende de la organización de los genes dentro de la cepa (Saito, Iwabuchi, & Harayama, 2000), a la cantidad de diferentes tipos de alelos y también a su ubicación cromosómica (Undugoda, Kannangara, & Sirisena, 2016).

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

- Existen regiones parciales conservadas en genes de diferentes especies microbianas que son responsables de la degradación de diferentes hidrocarburos.
- Se construyó una base de datos virtual de acceso público (Anexo 8) con la información de enzimas responsables de degradación, genes, microorganismo, tamaño, hidrocarburo y el número de acceso.
- Se encontraron un total de 67 regiones conservadas; las regiones conservadas entre hidrocarburos van desde los 50 hasta los 627 pb.
- Los genes pertenecientes a los hidrocarburos Benceno y Etilbenceno, no presentaron regiones conservadas en comparación a los demás hidrocarburos.
- El gen evolutivamente más conservado encontrado pertenece a *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* y *Ochrobactrum* sp. ITRH1 y está relacionado con la degradación de alcanos.

PERSPECTIVAS

- Las bases de datos consultadas se renuevan constantemente, debido a esto es necesario actualizar la biblioteca personal.
- Se recomienda la realización de árboles filogenéticos para los genes reportados.
- Se sugiere la construcción de oligonucleótidos universales que permitan la detección de bacterias degradadoras de un hidrocarburo en específico.
- Se recomienda la búsqueda de genes conservados en otros grupos taxonómicos, por ejemplo: hongos y protozoarios.
- Además de ampliar la investigación a otro grupo de contaminantes.

CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry "ATSDR". (agosto de 1995). Resúmenes de Salud Pública - Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). (U. D. "HHS", Ed.) Atlanta, Georgia. Obtenido de https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.pdf
- Agency for Toxic Substances, Disease Registry "ATSDR". (Septiembre de 1999). Resumen de salud pública - Hidrocarburos totales de petróleo (TPH). (U. D. "HHS", Ed.) Atlanta, Georgia. Recuperado el 1 de Octubre de 2017, de ATSDR: https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs123.pdf
- Alexander, L. M. (10 de Septiembre de 2015). Hortalizas. Recuperado el 18 de Octubre de 2017, de Meister Media Worldwide: <http://www.hortalizas.com/semillas/los-ogm-ventajas-y-desventajas-de-su-uso-y-produccion/>
- Al-Hiti, A. H., Al-Joubori, M. H., & Abd Al-Razaq, A. A. (Septiembre de 2007). Biotreatment Technique to Treat Oil Wells Drilling Waste. *Iraqi Journal of Chemical and Petroleum Engineering*, 8(3), 37–41. Obtenido de <https://ijcpe.uobaghdad.edu.iq/index.php/ijcpe/article/view/486>
- Arana, F. (2016). *Ecología para principiantes (Segunda ed.)*. México: Trillas.
- Argüelles, C., & Hernández-Zamora, E. (2007). Dopaje genético: transferencia génica y su posible detección molecular. *Gaceta Médica de México*, 143(2), 169-172.
- Asturias, J. A., Díaz, E., & Timmis, K. N. (1995). The evolutionary relationship of biphenyl dioxygenase from gram-positive *Rhodococcus globerulus* P6 to multicomponent dioxygenases from gram-negative bacteria. *Gene*, 156(1), 11-18. doi:10.1016/0378-1119(94)00530-6
- Atlas, R. M., & Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental (Cuarta ed.)*. Madrid: Pearson Educación.
- Benavides López de Mesa, J., Quintero, G., Guevara Vizcaíno, A. L., Jaimes Cáceres, D. C., Gutiérrez Riaño, S. M., & Miranda García, J. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4(5), 82-90. doi:10.22490/24629448.351

- Bolívar, F. (2011). Por un uso responsable de los organismos genéticamente modificados. (A. M. AMC, Ed.) Tlalpan, México DF, México: Academia Mexicana de Ciencias.
- Brandt, M., & Einhenkel-Arle, D. (Junio de 2016). Polycyclic aromatic hydrocarbons: harmful to the environment! toxic! inevitable? German Environment Agency, 1-26. Obtenido de https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/376/publikationen/poly_cyclic_aromatic_hydrocarbons_web.pdf
- Brim, H., Osborne, J. P., Kostandarithes, H. M., Fredrickson, J. K., Wackett, L. P., & Daly, M. J. (2006). *Deinococcus radiodurans* engineered for complete toluene degradation facilitates Cr(VI) reduction. *Microbiology*, 152, 2469-2477. doi:10.1099/mic.0.29009-0
- Buiatti, M., Christou, P., & Pastore, G. (2013). The application of GMOs in agriculture and in food production for a better nutrition: two different scientific points of view. *Genes & Nutrition*, 8(3), 255-270. doi:10.1007/s12263-012-0316-4
- Camacho, A., & Ariosa, L. (2000). Diccionario de términos ambientales. La Habana: Publicaciones Acuario.
- Cappelletti, M., Fedi, S., Frascari, D., Ohtake, H., Turner, R. J., & Zannoni, D. (2011). Analyses of both the *alkB* gene transcriptional start site and *alkB* promoter-inducing properties of *Rhodococcus* sp. strain BCP1 grown on n-alkanes. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1619-1627. doi:10.1128/AEM.01987-10
- Carmel, L., Rogozin, I. B., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (Julio de 2007). Evolutionarily conserved genes preferentially accumulate introns. *Genome Research*, 17, 1045-1050. doi:10.1101/gr.5978207
- Carrasco, M., & Paz, J. (2000). Tratado de emergencias médicas (Vol. II). España: Arán Ediciones.
- Carrillo-Campos, J. (2019). Estructura y función de las oxigenasas tipo Rieske/mononuclear. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 22, 1-12. doi:10.22201/fesz.23958723e.2019.0.196
- Chang, C.-H., Lee, J., Ko, B.-G., Kim, S.-K., & Chang, J.-S. (2011). *Staphylococcus* sp. KW-07 contains *nahH* gene encoding catechol 2,3-dioxygenase for phenanthrene

- degradation and a test in soil microcosm. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1), 198-203. doi:10.1016/j.ibiod.2010.11.003
- ChemicalBook Inc. (2016). ChemicalBook. Recuperado el 1 de Octubre de 2017, de https://www.chemicalbook.com/ProductCatalog_EN/1320.htm
- Chowdhury, P. P., Sarkar, J., Basu, S., & Dutta, T. K. (Mayo de 2014). Metabolism of 2-hydroxy-1-naphthoic acid and naphthalene via gentisic acid by distinctly different sets of enzymes in *Burkholderia* sp. strain BC1. *Microbiology*, 160(5), 892-902. doi:10.1099/mic.0.077495-0
- Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. (11 de Octubre de 2016). gov.mx. Recuperado el 12 de Octubre de 2017, de <https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/organismos-geneticamente-modificados>
- CONABIO. (10 de Julio de 2020). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Obtenido de Biodiversidad Mexicana: <https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gfamilia>
- Conaré, D., & Le Goulven, K. (2000). OGM: el campo de las incertidumbres, 5 fichas para comprender, anticipar, debatir. Solagrál - UNESCO. Recuperado el 16 de Octubre de 2017, de <http://unesdoc.unesco.org/images/0012/001246/124623s.pdf>
- Curtis, H., Barnes, S., Schnek, A., & Flores, G. (2006). *Invitación a la biología* (Sexta ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Curtis, H., Barnes, S., Schnek, A., & Massarini, A. (2008). *Biología* (Séptima ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Davis, C. P. (13 de Mayo de 2016). MedicineNet. Recuperado el 12 de Octubre de 2017, de <https://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=3344>
- DeBruyn, J. M., Mead, T. J., & Sayler, G. S. (2012). Horizontal Transfer of PAH Catabolism Genes in *Mycobacterium*: Evidence from Comparative Genomics and Isolated Pyrene-Degrading Bacteria. *Environmental Science & Technology*, 46(1), 99-106. doi:10.1021/es201607y

- Di Martino, C., López, N. I., & Raiger lustman, L. J. (2012). Isolation and characterization of benzene, toluene and xylene degrading *Pseudomonas* sp. selected as candidates for bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 67, 15-20. doi:10.1016/j.ibiod.2011.11.004
- Díaz, C., & Chaparro-Giraldo, A. (Junio de 2012). Métodos de transformación genética de plantas. *U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*, 15(1), 49-61.
- Diz Mellado, O. M. (2020). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *NPunto*, 3(20), 88-111.
- Durán, R., Méndez, V., Rodríguez-Castro, L., Barra-Sanhueza, B., Salvà-Serra, F., Moore, E., . . . Seeger, M. (2019). Genomic and Physiological Traits of the Marine Bacterium *Alcaligenes aquatilis* QD168 Isolated From Quintero Bay, Central Chile, Reveal a Robust Adaptive Response to Environmental Stressors. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.00528
- Egland, P. G., Pelletier, D. A., Dispensa, M., Gibson, J., & Harwood, C. S. (1997). A cluster of bacterial genes for anaerobic benzene ring biodegradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), 6484-6489. doi:10.1073/pnas.94.12.6484
- Esteban, C. (2014). Genagen. Recuperado el 8 de Octubre de 2017, de <http://www.genagen.es/area-pacientes/informacion-genetica-y-enfermedades-hereditarias/conceptos-genetica/que-son-los-genes/>
- Fingas, M. (2013). *The basics of oil spill cleanup* (Tercera ed.). CRC Press. doi:10.1201/b13686
- Fuente, N., & Goñi, S. (2005). Organismos genéticamente modificados. En *Fundación antorchas programa de becas para jóvenes destacados del polimodal* (Vol. I, págs. 8-27). Buenos Aires: Serie Digital.
- Furukawa, K. (2000). Biochemical and genetic bases of microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs). *The Journal of General and Applied Microbiology*, 46(6), 283-296. doi:10.2323/jgam.46.283
- Furukawa, K., & Arimura, N. (1987). Purification and properties of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from polychlorinated biphenyl-degrading *Pseudomonas*

- pseudoalcaligenes* and *Pseudomonas aeruginosa* carrying the cloned *bphC* gene. *Journal of Bacteriology*, 169(2), 924-927. doi:10.1128/jb.169.2.924-927.1987
- Gao, J., Ellis, L. B., & Wackett, L. P. (Mayo de 2010). Biocatalysis/Biodegradation Database. Microbial biocatalytic reactions and biodegradation pathways. Obtenido de EAWAG aquatic research: <http://eawag-bbd.ethz.ch/index.html>
- García Vallejo, F. (2004). El nómada molecular: la historia molecular del virus linfotrópico humano tipo (HTLV-1) (Primera ed.). Cali: Universidad del Valle.
- García, L. M. (Mayo de 2016). Evaluación preliminar de las características fisicoquímicas de un suelo contaminado por hidrocarburos aromáticos. Tesis, Instituto Tecnológico Superior de Misantla, Misantla.
- García-Cruz, N. U., & Aguirre-Macedo, M. L. (2014). Biodegradación de petróleo por bacterias: algunos casos de estudio en el Golfo de México. En A. V. Botello, J. Rendón von Osten, J. A. Benítez, & G. Gold-Bouchot, Golfo de México: contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias (Tercera ed., Vol. II, págs. 651-662).
- Gibson, D. T. (1999). *Beijerinckia* sp. strain B1: a strain by any other name. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23(4-5), 284-293. doi:10.1038/sj.jim.2900715
- Habe, H., Kasuga, K., Nojiri, H., Yamane, H., & Omori, T. (Diciembre de 1996). Analysis of cumene (isopropylbenzene) degradation genes from *Pseudomonas fluorescens* IP01. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(12), 4471-4477. doi:10.1128/aem.62.12.4471-4477.1996
- Han, L. (2004). Genetically modified microorganisms: development and applications. En S. R. Parekh, *The GMO handbook: genetically modified animals, microbes, and plants in biotechnology* (págs. 29-51). Springer Science & Business Media. doi:10.1007/978-1-59259-801-4_2
- Hancock, R. E., & Scott, M. G. (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.*, 97(16), 8856-8861. doi:10.1073/pnas.97.16.8856

- Heinaru, E., Truu, J., Stottmeister, U., & Heinaru, A. (Marzo de 2000). Three types of phenol and p-cresol catabolism in phenol- and p-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiology Ecology*, 31(3), 192-205. doi:10.1111/j.1574-6941.2000.tb00684.x
- Igwe, J. C., & Ukaogo, P. O. (2015). Environmental Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Journal of Natural Sciences Research*, 5(7), 117-131.
- Johnson, H. A., Pelletier, D. A., & Spormann, A. M. (2001). Isolation and characterization of anaerobic ethylbenzene dehydrogenase, a novel Mo-Fe-S enzyme. *Journal of Bacteriology*, 183(15), 4536-4542. doi:10.1128/JB.183.15.4536-4542.2001
- Kahng, H.-Y., & Nam, K. (2002). Molecular Characteristics of *Pseudomonas rhodesiae* strain KK1 in response to phenanthrene. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(5), 729-734.
- Karp, G. (2014). *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos* (Séptima ed.). McGraw-Hill.
- Kasai, Y., Inoue, J., & Harayama, S. (2001). The TOL Plasmid pWW0 *xyIN* Gene Product from *Pseudomonas putida* Is Involved in m-Xylene Uptake. *Journal of Bacteriology*, 183(22), 6662-6666. doi:10.1128/JB.183.22.6662-6666.2001
- Kim, S.-J., Kweon, O., Jones, R. C., Freeman, J. P., Edmondson, R. D., & Cerniglia, C. E. (2007). Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on systems biology. *Journal of Bacteriology*, 189(2), 464-472. doi:10.1128/JB.01310-06
- Kloos, K., Munch, J. C., & Schloter, M. (2006). A new method for the detection of alkane-monooxygenase homologous genes (*alkB*) in soils based on PCR-hybridization. *Journal of Microbiological Methods*, 66(3), 486-496. doi:10.1016/j.mimet.2006.01.014
- Koukkou, A.-I., & Vandera, E. (2011). Hydrocarbon-degrading Soil Bacteria: Current Research. En A.-I. Koukkou, *Microbial Bioremediation of Non-metals: Current Research* (págs. 93-117). Caister Academic Press, U.K.
- Kube, M., Heider, J., Amann, J., Hufnagel, P., Kühner, S., Beck, A., . . . Rabus, R. (Marzo de 2004). Genes involved in the anaerobic degradation of toluene in a denitrifying

- bacterium, strain EbN1. Archives of Microbiology, 181(3), 182-194. doi:10.1007/s00203-003-0627-3
- Kurkela, S., Lehv slaiho, H., Palva, E. T., & Teeri, T. H. (1988). Cloning, nucleotide sequence and characterization of genes encoding naphthalene dioxygenase of *Pseudomonas putida* strain NCIB9816. Gene, 73(2), 355-362. doi:10.1016/0378-1119(88)90500-8
- Leuthner, B., Leutwein, C., Schulz, H., H rth, P., Haehnel, W., Schiltz, E., . . . Heider, J. (1998). Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. Molecular Microbiology, 28(3), 615-628.
- Levine, M. D., & Gresham, C. (2017). Hydrocarbon Toxicity: Practice Essentials, Pathophysiology, Epidemiology. Medscape. Obtenido de <https://emedicine.medscape.com/article/821143-overview>
- Lloyd-Jones, G., Laurie, A. D., Hunter, D. W., & Fraser, R. (Mayo de 1999). Analysis of catabolic genes for naphthalene and phenanthrene degradation in contaminated New Zealand soils. FEMS Microbiology Ecology, 29(1), 69-79. doi:10.1111/j.1574-6941.1999.tb00599.x
- López, J. B., Quintero, G., Guevara, A. L., Jaimes, D. C., Gutiérrez, S. M., & Miranda, J. (2006). Biorremediaci n de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. Ciencias Biomédicas NOVA, 4(5), 82-90.
- Ma, J., Xu, L., & Jia, L. (2013). Characterization of pyrene degradation by *Pseudomonas* sp. strain Jpyr-1 isolated from active sewage sludge. Bioresource Technology, 140, 15-21. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.184
- Magni, C. (20 de Enero de 2012). Introducción a la Biotecnología y Genética. Rosario, Argentina. Obtenido de https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/170801/mod_resource/content/1/Genetica_mutacion_plasmidos_fagos.pdf
- Marlowe, I. T., Bone, C. M., Byfield, S., Emmott, M. A., Frost, R., Gibson, N., . . . Stacey, A. (Septiembre de 1995). The categorisation of volatile organic compounds. Department of the Environment: HMIP-commissioned research. (G. Winter, Ed.) Great Britain. Obtenido de <http://www.s-t>

a.org/Files%20Public%20Area/Documents/The%20Categorisation%20of%20Volatile%20Organic%20Compounds%20HMIP%20(1996).pdf

- Mohapatra, B., & Phale, P. S. (2021). Microbial Degradation of Naphthalene and Substituted Naphthalenes: Metabolic Diversity and Genomic Insight for Bioremediation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. doi:10.3389/fbioe.2021.602445
- Moody, J. D., Freeman, J. P., Fu, P. P., & Cerniglia, C. E. (2004). Degradation of benzo[a]pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 340–345. doi:https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.340-345.2004
- Müller, D. M., Carrasco, M. S., Tonarelli, G. G., & Simonetta, A. C. (2009). Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* lp 31 strain isolated from dry-fermented sausage. *Journal of Applied Microbiology*, 106(6), 2031-2040. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04173.x
- Narváez-Florez, S., Gómez, M. L., & Martínez, M. M. (2008). Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del Caribe colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 37(1), 61-75.
- NIGMS. (Abril de 2021). Genética. Obtenido de National Institute of General Medical Sciences: <https://nigms.nih.gov/education/fact-sheets/Pages/genetics-spanish.aspx>
- OEI. (2010). Ciencias Naturales - Octavo Grado. San Salvador: Ministerio de Educación.
- Olguín, E. J., Hernández, M. E., & Sánchez-Galván, G. (2007). Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 23(3), 139-154.
- Ortiz, R., Siebe, C., Díaz, G., & Cram, S. (2007). Fuentes de hidrocarburos en suelos orgánicos. *Terra Latinoamericana*, 25(2), 105-113. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57325202>
- Otenio, M. H., Lopes da Silva, M. T., Oliveira Marques, M. L., Roseiro, J. C., & Bidoia, E. D. (2005). Benzene, Toluene and Xylene Biodegradation by *Pseudomonas putida* CCMI 852. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(3), 258-261. doi:10.1590/S1517-83822005000300010

- Pawar, A. N., Ugale, S. S., More, M. G., Kokani, N. F., & Khandelwal, S. R. (2013). Biological Degradation of Naphthalene: A New Era. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 4(7). doi:0.4172/2155-6199.1000203
- PEMEX. (8 de Agosto de 2014). PEMEX: Petróleos Mexicanos. Recuperado el 1 de Octubre de 2017, de <http://www.pemex.com/comercializacion/productos/Paginas/default.aspx>
- Petit A, k., Colina L, J., Yegres E, F., Moran G, H., & Richard-Yegres, N. (2013). Biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) por hongos aislados de aguas contaminadas con petróleo, podredumbre blanca, y acíbar de Aloe vera. *Química Viva*, 12(3), 288-304. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86329278009>
- Pineda, D. (2005). Patrones genéticos conservados en la regulación del sistema nervioso central: insectos frente a mamíferos. *Encuentros en la Biología*(103), 2.
- Price, R. C., Varadaraj, R., Fiocco, R. J., & Lessard, R. R. (1999). Bioremediation as an Oil Spill Response Tool. *Environmental Technology*, 20(8), 891-896. doi:10.1080/09593332008616884
- Primo, E. (1996). *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria* (Vol. I). Barcelona: Reverté S.A.
- Procuraduría Federal de Protección al Ambiente. (18 de Marzo de 2005). Ley de bioseguridad de organismos genéticamente modificados. 1-44. Ciudad de México, México: Diario Oficial de la Federación.
- Rabus, R., Kube, M., Beck, A., Widdel, F., & Reinhard, R. (Diciembre de 2002). Genes involved in the anaerobic degradation of ethylbenzene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Archives of Microbiology*, 178(6), 506-516. doi:10.1007/s00203-002-0487-2
- Rada Cuentas, J. (2016). *Acinetobacter* un patógeno actual. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, 55(1), 29-48.
- Ratajczak, A., Geibdörfer, W., & Hillen, W. (1998). Alkane hydroxylase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1 is encoded by *alkM* and Belongs to a new family of bacterial integral-

- membrane hydrocarbon hydroxylases. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(4), 175-1179. doi:10.1128/aem.64.4.1175-1179.1998
- Resnick, S. M., Lee, K., & Gibson, D. T. (1996). Diverse reactions catalyzed by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 17(5-6), 438–457. doi:10.1007/BF01574775
- Rodriguez-Conde, S., Molina, L., González, P., García-Puente, A., & Segura, A. (2016). Degradation of phenanthrene by *Novosphingobium* sp. HS2a improved plant growth in PAHs-contaminated environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 10627–10636. doi:10.1007/s00253-016-7892-y
- Royo, F. (2009). Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology*, 10(11), 2477-2490. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 249-252. doi:10.1016/S0958-1669(02)00316-6
- Ruiz, A., Méndez, M., Prieto, B., Romano, A., Caynas, S., & Prospéro, O. (2010). El cerebro, las drogas y los genes. *Salud mental*, 33(6), 535-542.
- Saito, A., Iwabuchi, T., & Harayama, S. (2000). A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides* sp. strain KP7: expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 182(8), 2134–2141. doi:10.1128/jb.182.8.2134-2141.2000
- Schab, T. (24 de Abril de 2017). Sciencing. Recuperado el 1 de Octubre de 2017, de <https://sciencing.com/effects-hydrocarbons-environment-15879.html>
- Schalau, J. (28 de Noviembre de 2018). Backyard Gardener. Crown Gall Disease. Arizona, Yavapai. Obtenido de <https://cals.arizona.edu/yavapai/anr/hort/byg/archive/crowngall2018.html>
- Schneider, J., Grosser, R., Jayasimhulu, K., Xue, W., & Warshawsky, D. (1996). Degradation of pyrene, benz[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(1), 13-19. doi:10.1128/aem.62.1.13-19.1996
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (29 de Marzo de 2005). Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-

2003. México: Diario Oficial de la Federación. Obtenido de [http://www.ordenjuridico.gob.mx/Federal/PE/APF/APC/SEMARNAT/Normas/Oficiales/29032005\(1\).pdf](http://www.ordenjuridico.gob.mx/Federal/PE/APF/APC/SEMARNAT/Normas/Oficiales/29032005(1).pdf)

Seeger, M., Timmis, K. N., & Hofer, B. (1995). Conversion of chlorobiphenyls into phenylhexadienoates and benzoates by the enzymes of the upper pathway for polychlorobiphenyl degradation encoded by the bph locus of *Pseudomonas* sp. strain LB400. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 2654–2658. doi:10.1128/aem.61.7.2654-2658.1995

Shinoda, Y., Akagi, J., Uchihashi, Y., Hiraishi, A., Yukawa, H., Yurimoto, H., . . . Kato, N. (Agosto de 2005). Anaerobic degradation of aromatic compounds by *Magnetospirillum* strains: isolation and degradation genes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(8), 1483-1491. doi:10.1271/bbb.69.1483

Shinoda, Y., Sakai, Y., Uenishi, H., Uchihashi, Y., Hiraishi, A., Yukawa, H., . . . Kato, N. (Marzo de 2004). Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera* sp. strain DNT-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1385-1392. doi:10.1128/AEM.70.3.1385–1392.2004

Sho, M., Hamel, C., & Greer, C. W. (Mayo de 2004). Two distinct gene clusters encode pyrene degradation in *Mycobacterium* sp. strain S65. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(2), 209-220. doi:10.1016/j.femsec.2004.01.011

Shukla, A., & Singh Cameotra, S. (2012). Hydrocarbon pollution: effects on living organisms, remediation of contaminated environments, and effects of heavy metals co-contamination on bioremediation. En L. Romero-Zerón, *Introduction to enhanced oil recovery (EOR) processes and bioremediation of oil-contaminated sites* (págs. 185-206). India: InTech. doi:10.5772/48014

Slack, J. (2014). *Genes: A very short introduction* (Primera ed.). Reino Unido: Oxford University Press.

Smits, T. H., Röthlisberger, M., Witholt, B., & Van Beilen, J. B. (1999). Molecular screening for alkane hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains. *Environmental Microbiology*, 1(4), 307-317. doi:10.1046/j.1462-2920.1999.00037.x

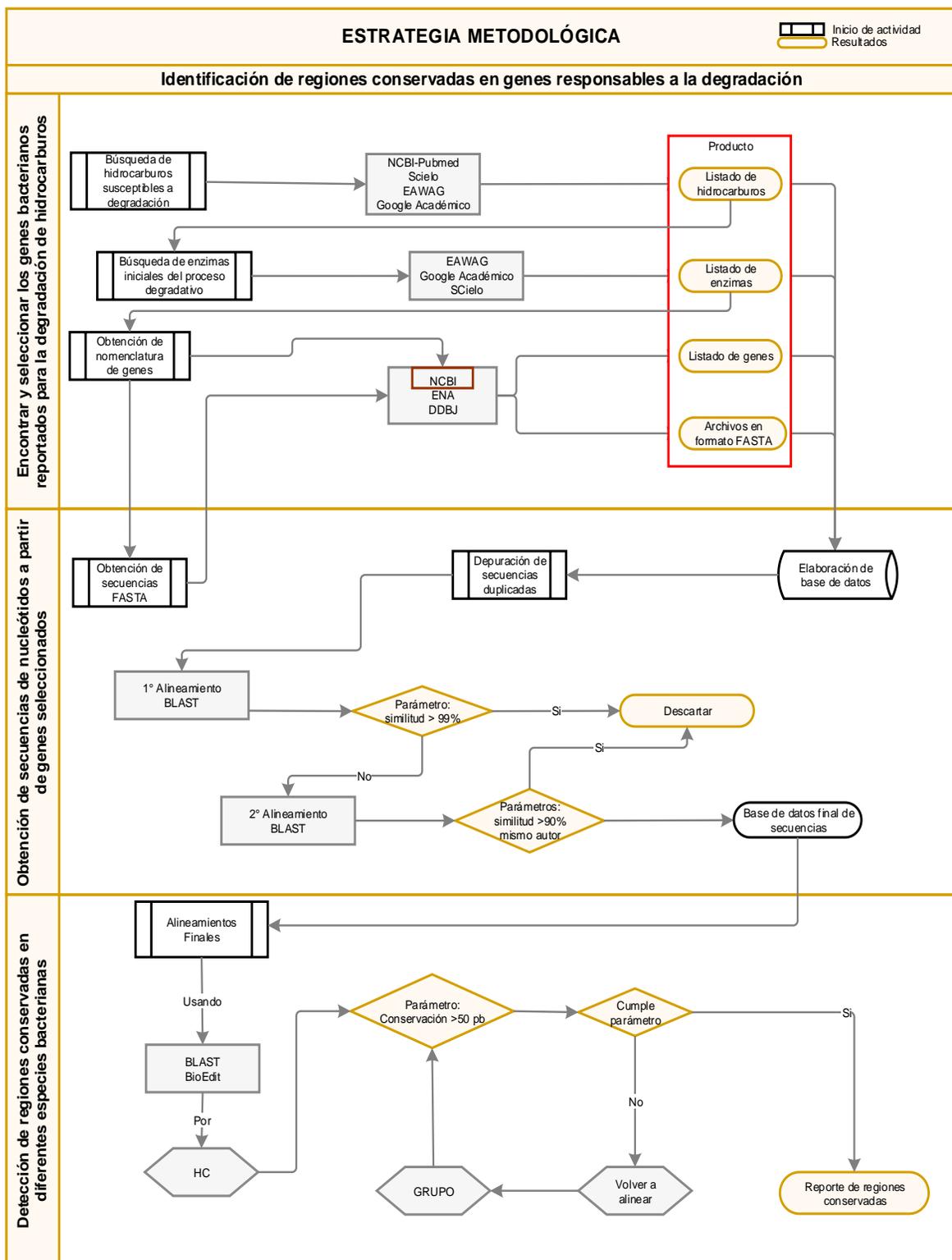
Solomon, L. (2015). Broad Institute. Obtenido de https://www.broadinstitute.org/files/news/stories/full/transposons_720x720_v2.jpg

- Song, B., & Ward, B. B. (Abril de 2005). Genetic diversity of benzoyl coenzyme A reductase genes detected in denitrifying isolates and estuarine sediment communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 2036-2045. doi:10.1128/AEM.71.4.2036-2045.2005
- Tan, H., Tang, H., Joannou, C., Abdel-Wahab, N., & Mason, J. (1993). The *Pseudomonas putida* ML2 plasmid-encoded genes for benzene dioxygenase are unusual in codon usage and low in G + C content. *Gene*, 130(1), 33-39. doi:10.1016/0378-1119(93)90343-2
- The International Tanker Owners Pollution Federation. (2011). Efectos de la contaminación por hidrocarburos en el medio marino. (13). Londres, Inglaterra. Recuperado el 1 de Octubre de 2017, de https://www.itopf.org/fileadmin/uploads/itopf/data/Documents/TIPS_TAPS_new/Final_TIP_13_2011_SP.pdf
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). Introducción a la microbiología (Novena ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Trujillo, R. F. (2010). Hidrocarburos: manejo seguro (Cuarta ed.). Bogotá: Ecoe Ediciones.
- Tsuda, M., & Iino, T. (1990). Naphthalene degrading genes on plasmid NAH7 are on a defective transposon. *Molecular Genetics and Genomics (MGG)*, 223, 33-39. doi:10.1007/BF00315794
- U.S. Department of Health and Human Services "HHS". (7 de Octubre de 2017). National Library of Medicine. Recuperado el 9 de Octubre de 2017, de MedlinePlus: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/basics/gene>
- Undugoda, L., Kannangara, S., & Sirisena, D. (2016). Genetic basis of naphthalene and phenanthrene degradation by phyllosphere bacterial strains *Alcaligenes faecalis* and *Alcaligenes* sp. 11SO. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 7(2). doi:10.4172/2155-6199.1000333
- Valderrama Blanco, B. (2002). Microbiología del petróleo y sus derivados. En E. Martínez Romero, J. C. Martínez Romero, & C. d. UNAM (Ed.), *Microbios en línea*. Cuernavaca. Obtenido de <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap2/>

- van Beilen, J. B., Li, Z., Duetz, W. A., Smits, T. H., & Witholt, B. (2003). Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & Gas Science and Technology - Rev. IFP*, 58(4), 427-440. doi:10.2516/ogst:2003026
- Vomberg, A., & Kliner, U. (2000). Distribution of *alkB* genes within n-alkane-degrading bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 89(2), 339-348. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.01121.x
- Wade, L. (2011). *Química orgánica (Séptima ed., Vol. I)*. México: Pearson Educación.
- Wilson, M. S., Herrick, J. B., Jeon, C. O., Hinman, D. E., & Madsen, E. L. (2003). Horizontal transfer of *phnAc* dioxygenase genes within one of two phenotypically and genotypically distinctive naphthalene-degrading guilds from adjacent soil environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2172-2181. doi:10.1128/AEM.69.4.2172-2181.2003
- Young, T. R. (2004). *Organismos genéticamente modificados y bioseguridad : un documento de antecedentes destinado a responsables de la toma de decisiones y otros interesados para ayudarles en la consideración de los asuntos relativos a los OGM.* (U. M. (IUCN), Ed.) Gland, Suiza: Thanet Press Ltd. doi:10.2305/IUCN.CH.2004.PGC.1.es
- Zada, S., Zhou, H., Xie, J., Hu, Z., Ali, S., Sajjad, W., & Wang, H. (2021). Bacterial degradation of pyrene: biochemical reactions and mechanisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 162. doi:10.1016/j.ibiod.2021.105233
- Zheng, Y., Anton, B. P., Roberts, R. J., & Kasif, S. (2005). Phylogenetic detection of conserved gene clusters in microbial genomes. *BMC Bioinformatics*, 6(243), 243-243. doi:10.1186/1471-2105-6-243
- Zylstra, G. J., & Gibson, D. T. (Septiembre de 1989). Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. Nucleotide sequence of the *todC1C2BADE* genes and their expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 264(25), 14940-14946.
- Zylstra, G. J., Kim, E., & Goyal, A. K. (1997). Comparative molecular analysis of genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. En J. K. Setlow, *Genetic Engineering: principles and methods* (Vol. XIX, págs. 257-269). Boston: Springer. doi:10.1007/978-1-4615-5925-2_14

ANEXOS

Anexo 1. Diagrama de flujo de la metodología



Anexo 2. Regiones conservadas de alcanos

ALCANO				
Secuencia	Gen	Microorganismo	Extensión (pb)	Nucleótidos
GQ184211.1	<i>alkB2</i>	<i>Marinobacter</i> sp. P1-14D	515	CACAAGTCCAATAAACTGAACAAACTGATGGCCATG GCCGCTTGCCCCACCGCCTACACCCACTTTGT GGTGAACATAATTTTGGTCATCACAAGCGGGTAGC CACACCGGAGGACCCCGCCAGCAGCCGAATGGGC GAGAGTTTCTGGAAGTTCTGCCCGAACCGTGTTT GGCGGCATCAAGTCGTCGATCAAGATCGAAAAGGC ACGCTTGAACGCAAGGGTAAGAGCTTCTGGAGTC TTGATAACGAACTGCTACAGGGTTGGCCATGACGG CCGGGTTCTTTGGCGCCACGACGCTGGTCTCGCGC CCGAGGGCGGTGCCGTTCTGGCGGCACAGGCGG TTTATGGCGCCAGTCTGTTGGAGAGTGAATTACA TCGAGCACTATGGTCTGTTGCCGCAAGGACAAGA ATGGCAAGTATGAGCGCACGAAGCCGGAACACAGC TGGAACAGTAATCACATTGTGACCAACTGTTCTGT ATCAGTTGCAACGGCATT
EU853368.1	<i>alkB</i>	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>		GCCGGCGGCCTGCTGCTGGCGCGGCTGTGCTATGC CGGCTTCAAGGTGAAACACGTGCGCGGCCACCATG TACACGTCTCGACCCCGAAGATGCCTCGTCTCGC GCTACGGCCAGAGCCTCTACTGTTCTCCCGCAC GCCTACAAGCACAACTTCTCAACGCCTGGCGCCTG GAGGCCGAGCGCCTGAAGCGCAAGGGCCTGCCGG CCCTGCACTGGCGCAACGAGCTGATCTGGTGGTAC GCCATCAGCGCCCTTCTGCTCGGCTTCAGCCTG GCCTTCGGCTGGCTGGGAGCGATCTTCTTCTCGG CCAGTCGGTGATGGCCTTACCCTGCTGGAGATCCT CAACTAC
KT378058.1	Alcano monooxigenasa	<i>Pseudomonas</i> sp. 1217	360	TGGCCGGCTACTCCGATGATCGGAATCTGGCTTGGC AATGAGACTGGCTGGGTATCTTTATGGCTTAGTT CTAGCTGTGTGGTACGGGGTTCTCCATTGCTTGAC GCGATGTTTGGTGAAGACTTTAATAATCCGCCTGAG GAAGTAGTGGAGAACTGGAGAAAGAACGTTACTAC CGAGTTTTAACGTATCTAACAGTTCCAATGCATTACG CAGCACTAATCGTGTCTGCATGGTGGGTAGGGACTC AGTCAATGTCTTGGTTGAAATCGGCGCATTGCCCT TGTCACTGGGCATCGTGAATGTTTTAGCGCTTAATA CAGGTCACGAACGGGTCACAAAAAAGAAGCCTTTG ATCGTTGGATGGCGAAAATTGTGCTGGCGGTTGTG GGTACGGCCACTTCTTTATTGAGCATAATAAAGGCC ATCACCGTGATGTTGCTACACCGATGGACCCTGCGA CCTCACGTATGGGAGAAAATATATAAATTCTCAAC CCGTGAGATTCTGGAGCGTTTCGTGCTGCTTGGG GGCTTGAGGAACAAGCCTTTCGCGCCGCGGGCAA AGCGTTTGGAGTTTCGATAATGAGATCCTCCAGCCA ATGGTCATCACAGTT
LC179843.1	<i>alkB</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. MR21		TTCTCTACACCCTCCTGCTTGCCTTCTTTGGTCCGAA GATGCTGGTATTCTTCCAATTCAGATGGCTTTCGG GTGGTGGCAGTTAACAAGCGCGAATACATTGAACA CTACGGTTTGCTGCGTGAATAAATGGCCGATGGACG ATATGAACATCAAAAGCCACATCACTCGTGAACAG TAACCACATCGTGTCAAATCTGGTCTGTTTCACCTT CAGCGGCACTCGGATCACCACGCG
AJ250560.1	<i>alkB</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i>	627	ATGGCCAAAATTGTGTTGGCTGTCGTAGGGTACGGT CACTTCTTTATTGAGCATAATAAGGGTCATCACCGTG ATGTCGCTACACCGATGGATCCTGCAACATCCCGGA TGGGAGAAAGCATTATAAAGTTTTCAATCCGTGAGAT CCCAGGAGCATTATTCGTGCTTGGGGGCTTGAGGA ACAACGCCTTTCGCGCCGTGGCCAAAGCGTTTGGGA GTTTCGATAATGAAATCCTCCAACCAATGATCATCAC AGTTATTCTTACGCGCTTCTCCTTGCCTTGTGTTGGA CCTAAGATGCTGGTGTCTGCGGATTCAAATGGCT TTCCGTTGGTGGCAGTGACCAAGTGGCAACTATATT GAACATTACGGCTTGCTCCGTCAAAAAATGGAGGAC GGTCGATATGAGCATCAAAAGCCGACCATCTTGG AATAGTAATCACATCGTCTAATCTAGTGTCTGTTCC ACCTTCAGCGGCA
FJ014898.1		<i>Ochrobactrum</i> sp. ITRH1		242
FJ014908.1	<i>alkB</i>	<i>Bacillus</i> sp. BTRH40	485	ATGGCCAAAATTGTGTTGGCTGTCGTAGGGTACGGT CACTTCTTTATTGAGCATAATAAGGGTCATCACCGTG ATGTCGCTACACCGATGGATCCTGCAACATCCCGGA TGGGAGAAAGCATTATAAAGTTTTCAATCCGTGAGAT CCCAGGAGCATTATTCGTGCTTGGGGGCTTGAGGA ACAACGCCTTTCGCGCCGTGGCCAAAGCGTTTGGGA GTTTCGATAATGAAATCCTCCAACCAATGATCATCAC AGTTATTCTTACGCGCTTCTCCTTGCCTTGTGTTGGA CCTAAGATGCTGGTGTCTGCGGATTCAAATGGCT TTCCGTTGGTGGCAGTGACCAAGTGGCAACTATATT GAACATTACGGCTTGCTCCGTCAAAAAATGGAGGAC GGTCGATATGAGCATCAAAAGCCGACCATCTTGG AATAGTAATCACATCGTCTAATCTAGTGTCTGTTCC ACCTTCAGCGGCA
FJ439530.1	<i>alk</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		ATGGCCAAAATTGTGTTGGCTGTCGTAGGGTACGGT CACTTCTTTATTGAGCATAATAAGGGTCATCACCGTG ATGTCGCTACACCGATGGATCCTGCAACATCCCGGA TGGGAGAAAGCATTATAAAGTTTTCAATCCGTGAGAT CCCAGGAGCATTATTCGTGCTTGGGGGCTTGAGGA ACAACGCCTTTCGCGCCGTGGCCAAAGCGTTTGGGA GTTTCGATAATGAAATCCTCCAACCAATGATCATCAC AGTTATTCTTACGCGCTTCTCCTTGCCTTGTGTTGGA CCTAAGATGCTGGTGTCTGCGGATTCAAATGGCT TTCCGTTGGTGGCAGTGACCAAGTGGCAACTATATT GAACATTACGGCTTGCTCCGTCAAAAAATGGAGGAC GGTCGATATGAGCATCAAAAGCCGACCATCTTGG AATAGTAATCACATCGTCTAATCTAGTGTCTGTTCC ACCTTCAGCGGCA

GQ184210.1	<i>alkB1</i>	<i>Marinobacter</i> sp. P1-14D	62	CGTGATGTGGCTACGCCGATGGACCCGGCGACATC CCGCATGGGCGAGTCCATTTACGCATT
			86	AAAAGTGTCTGGAGCCTGGAGAACAAGTCTTCAG CCGATGATTCTGACGGTCTGCTGTATGCCGATTG CTGGCGTTTTTTGG
KF154234.1	<i>alkB</i>	Uncultured bacterium	161	ATGGCCTTTGGCTGGTGGCAGCTGACCAGCGCCAA CTACATTGAGCATTACGGATTGCTGCGCGAGAAGAT GTCGGATGGACGTTATGAGCGTCAACAACCGCACCA CTCATGGAACCTAAACCATATTATGTCAACCTGATT CTGTTTCATTTGCAACG
EU853348.1	<i>alkB</i>	<i>Alcanivorax dieselolei</i>	387	CACAAGACCGACCGCCACGAGAATGGATGGCCAA GCTATGTCTCGCCCGGTGTTCTATGGCACTTCTA TGTGGAACATAATCGTGGGCATCAGGTGAGGGTTTC CAGGCCGGAGGATCCGGCATCCTCCCGTTTCGGCG AGACGTTCTGGGAGTTCCTGCCGCGCACCGTGATC GGCAGCCTTAAATCCGCTGGTCCGTTGGAGAAACA GCGGCTGGAGCGGCAGGGGCTTTCGGTATGGAGCT GGCATAACGACAATCTGCAGGCCTGGCATTGTGCG GTGGTGCTTTGGGGTGCCCTGATACTGTGGTTGGG CTGGGCGGTGGTCCGTTCCCTGCTGATTGAGACCC TGTTCCGTTTTAGTTGCTGGAGGTGGTCAACTAT
EU853421.1		<i>Alcaligenes</i> sp. II-C-7		
GU593657.1		<i>Alcanivorax</i> sp. 7-C-7		
EU853359.1	<i>alkB</i>	<i>Alcanivorax dieselolei</i>	524	GGTCACAAGAAAACCCGCTGGAGCGCTGGCTGGC CAAGATAGTGTGGCCCGCTGGGATACGGCCACT TCCCCATTGAACACAACAAGGGCCACCACCGTGAGG TGGCTACCCCGGAAGACCCGGCATCATCCCGCATG GGCGAGACCATCTGGGGCTTTGCCCTGCGGGAAT TCCCGGTGCCTTTTTCCGTGCCTGGAACTGGAGG CCGCGCGGCTGAAAAGCAGGGTCAACCGGTATGG TCGCTGCATAATGAAATCTTCAGCCCGCCCTGATG AGCGTGTGATATGGGGCAGCATATTGCCCTGTTT GGCTGGCAGATGGCGCCTTCATTGCCGCGTCAC CCTGTGGTCTACCTGCAGCTGACCTCTGCCAACTA TGTGGAACACTATGGCCTGTTACGCCACAAGCAGCC TGACGGCCGCTATGAGCGTACCCAGCTCACCACA GCTGGAACAGCAACCACATGTTCTCCAACCTGGGCGT CCTTTCACCTGCAGCGTCACTCTGACCA
KF154187.1		Uncultured bacterium		
KF154236.1	<i>alkB</i>	Uncultured bacterium	203	TATGGTCACTTCTTCATTGAACACAATAAAGGGCATC ATCGTGACGTAGCAACACCGATGGACCCGGCTACAT CCCGCATGGGCGAATCTATTTATACGTTTTACTGCT GTGAAATTCCTGGTGCCTTAAACGGGCATGGGGCT TGGAAGAGCAGCGCCTCAGCCGTTGCGGCAAAAGC GTATGGAGCCTAGATAATGAAGT
KF059838.1		<i>Alcanivorax borkumensis</i>	247	TTACAGCCTATGATTTTGACGGTAGTGCTTTATGCCG CATTGCTGGCATTITTCGGTCCITTAATGCTCATCTT TTTGCCATTCAAATGGCCTTCGGCTGGTGGCAGCT GACCAGTGCCAATTATATTGAGCACTACGGACTGCT GCGTGAAAAGCTGCCGAACGGGCGTTACGAGCATC AAAAACCCCATCATTGATGGAATTAACCATGTAAT GTCGAACCTCATCTGTTTCATCTGCAAC
JN384213.1	Alcano hidroxilasa	<i>Acinetobacter venetianus</i>	60	TATGGTCACCATAAACGTGCTGCAACACCAGAAGAT CCAGCATCTTCAAAAATGGGTGAA
KY613513.1	<i>alkB</i>	<i>Acinetobacter beijerinckii</i>	64	CATTCTATGAGTTTTGGCCTCGTACAGTAATTGGTTC ATTCAAATCAGCTGTAGAAATGAAAC

Anexo 3. Regiones conservadas de bifenilo

BIFENILO				
Secuencia	Gen	Microorganismo	Extensión (pb)	Nucleótidos
U95054.1	bphA1	<i>Pseudomonas</i> sp. B4	64	ATTCCGTGCAACTGGAAGTTTGCCGCCGAGCAGTT CTGCAGTGACATGTACCACGCCGGCACCA
JN559868.1		<i>Pseudomonas</i> sp. HP1		
AJ544525.1		<i>Ralstonia eutropha</i> H850		
DQ521939.1	bph	Uncultured bacterium		
KP972446.1	bphA1	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i>	178	GCAATTCTGCAGCGACATGTACCACGCCGGCACCA CATCCCATCTTTCCGGCATTCTCGCGGGCCTGCCT GATGGCGTCGATCTGTCCGAGCTCGGCCCCCA CGGAAGGCATCCAGTACCAGCGCAACCTGGGGCGG GCACGGTAGCGGCTTCTACATCGCGCATCCCAACC TGTTG
AJ544524.1		<i>Rhodococcus opacus</i>	104	TCGCCATCATGGGGCCGAAGGTCACCGAGTACTGG ACTCAGGGCACTGCCGAGAGAAGGCTTCCGAGC GCCTGGGAAGCACAGAGCGTGCCAGCAACTAAT G
JN675900.1	bphAa	Uncultured <i>Rhodococcus</i> sp.	130	CGCAGCATGACCATCTTCCCAACCTGTTGTTCC TGCCAGGCATCAACACCATCCGAGCGTGGCACCCT CGCGGGCCGAACGAGATCGAGGTCTGGGCTTCA CCGTCGTTGATGCCAGCACCCGA
FJ752167.1	bphA1	<i>Rhodococcus</i> sp. P1	62	GAGATGAAAGAGGAATACCGCCAGCAGACTGCG AACCTTCTCGGCAGGTGGTGTCTTCGA
KP972446.1	bphA1	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i>	73	CCGAAGCGGGCACCGAAGCGATCCCGGGGATTCA GAAGTGGGTCAATCCCTGCAACTGGAAGTTCCGAG CGGA
AJ544524.1		<i>Rhodococcus opacus</i>		
HM153082.1		<i>Rhodococcus</i> sp. Z6		
X97923.1	bphA1	<i>Cupriavidus necator</i>	171	CGCCGAGGCCCTGACCTCAAACCTACCTGAGCG ACGCCATGCCCTACATGGACGTGATGCTGCACCGC ACCGAAGCCGGCAGACTATCGTCCGGCGCATGC AAAAGTGGGTCAATCCCTGCAACTGGAAGTTTGT GCCGAGCAATTCTGCAGCGACATGTACCACGC
AJ544522.1		<i>Ralstonia</i> sp. B11	98	GGCAGATGTCTCACCTGTCCGGCGTCTTAGCCAG CTGCCGCCCGAGATGGACCTGACGCAAGTGCAAA TGTCCAAAAATGGCAATCAGTTCCGTGC
AJ544520.2	bphA1	<i>Pseudomonas</i> sp. B6K	127	GTCCGGCATTCTGGCGGGCATGCCGCCAGAAATG GACTTGTGCAATGCTCAGGTGCCGACCAAGGGGAA TCAGTTCCGGGCCAATTGGGGTGGGCACGGCAGC GGATGGTTTGTGACGAGCCGGGC
KY978890.1		<i>Pseudomonas</i> sp.	89	CAGCACATGACCATCTTCCCAACCTGTTCACTTCTG GCCTCCATCAACACCATCCGTAGCTGGCACCCGCG TGGCCCCAACGAAATCGA

Anexo 4. Regiones conservadas de naftaleno

NAFTALENO				
Secuencia	Gen	Microorganismo	Extensión (pb)	Nucleótidos
M83949.1	<i>nahAa, nahAb, nahAc, nahAd</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	73	TTCCGAGCGCCGTTATAAGCTCAATGAAGCCATGA ACGTTTACAACGAAAATTTTCAGCAACTGAAAGTT
AY048762.1	<i>nahAd</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	51	CAAACTGGAGCAACAGCCCGAAGCTGCGCTTTAC TCGCTTCATCACCAAT
HM490144.1	<i>nahAc</i>	<i>Alteromonas</i> sp. P127	81	CCGTACCTTTTGATAAGGAGTTTATGGTGGCTTAC TTGATAAGTGTAAAACTCTCTACATGAAGTGGCAA AAGTTGAAA
AF295036.1		<i>Pseudoalteromonas</i> sp. EH-2-1	146	TTATAACGGCTTCATTTATGGCTGTTTTGATGAAAAC TCCCATCATCTCTGATTATTTAGGCGATCTTAAGT GGTTTTAGACCTTACTTTGAACATTCGGGTGGCC TTGAATTAATTGGACCTCCTGCTCGTTGCCTAATTA
JF329708.1		<i>Alteromonas naphthalenivorans</i>	131	CAGCAGAAAACTTTGTGGGTGATGCTTACCATGTTG GCTGGACACATGCTTCAGCACTACGACTGGTGAA TCAGTTTTACACCACTGGCAGGAAATAGTACACCT CCAACTGAAGGTTTAGGTCTACAA
			221	TAACCAGCAAATTTGGGTCAGGGCTAGGTGTGCTG TGGGATGCTTATGCAGGTATTCATGATAGTTCATTA ATTAACGACATGATGCAATGGCTACCATAAAAGAG CAGCAATTAGCCGAAAAAATTTGGTGTGATCGTGC CAGAATTTATCGATCTCATTTAAATACGACTATCTTT CCTAATAATAGCTTTTTAACAGGATCAGGTGATTTA AAACT
AY568278.1	<i>phnAc</i>	<i>Comamonas testosteroni</i>	47	GAAGCCGGAATGCGAAAGGCTTTGTGTGCAGTTA CCACGGCTGGGG
AY194931.1	<i>nahAc</i>			
AY194921.1				
AY194928.1				
KC878841.1	Naftaleno dioxigenasa			
KY304820.1	<i>nah</i>			
KY304822.1				
KM287401.1				
KU983568.1				
AY433939.1	<i>nahAc</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	206	GGCTTCGGATCCAACGGTGAGCTACAGAGCGTCCC GTTTGAAAAAGAACTGTATGGCGAGTCGCTCAACAA AAAATGTATGGGATTGAAAGAAGTCGCTCGTGTAGA GAGCTTCCATGGCTTCATTTATGGTTGCTTCGATCA GGAGGCACCACCGCTTATGGACTACCTAGGTGATG CAGCTGGTACCTAGAGCCCATTTTCAA

EU660598.1		Uncultured bacterium	217	CATTCTGGTGGTTAGAACTGATCGGTCCCCCAGG AAAGGTAATCATCAAGGCCAACTGGAAAGCACCCG CAGAAAACCTTTGTGGGGGATGCATACCAGTGGGT TGGACTCATGCGTCTTCGCTTCGCTCGGGTCAGTC AATCTTCTCTCGTTAGCAGGCAACGCAGTGCTGC CCCCTGAAGGCGCAGGCTGCAAATGACCTCTAAA TATGGCA
HE798515.1	<i>nahAc</i>	<i>Pseudomonas montellii</i>	55	GAGAGCTTCCATGGCTTCATCTATGGTTGCTTCGAT GAGGAAGCCCCCTTCTCTCA
KT310225.1	<i>ndo</i>	Uncultured gamma proteobacterium	56	AAGGTCATAATCAAGGCTAACTGGAAAGCGCCCGC GGAAAACCTTTGTGGGGGATGC
EU660641.1	<i>nahAc</i>	Uncultured bacterium		
HE798515.1	<i>nahAc</i>	<i>Pseudomonas montellii</i>	60	CACGCAGAAGCAGGTAATGCTAAAGTTTCGTTTG CAGCTATCACGCTGGGGCTTCGGC
KC878847.1	Naftaleno dioxigenasa	Uncultured bacterium		
KY304808.1	<i>nah</i>			
JX966107.1	Naftaleno dioxigenasa	<i>Burkholderia</i> sp. FP2-1	165	CACGGTCTGGGTAGTGCCTTCGATCCGGCTGCCG GCCTGCTCGGCGAAGTGGCAAGGAGATGATGGA GTGGCAGGCTCAGCGGCGTGATCTGATTGAGCAG CGCATCGGTAAGCTGAAAGCGCGTCTCTACCGCTA CCACATGAACGGCACAACTTCCCGAAC
KJ001055.1		Uncultured bacterium		

Anexo 5. Regiones conservadas de pireno

PIRENO				
Secuencia	Gen	Microorganismo	Extensión (pb)	Nucleótidos
DQ157863.1	<i>nidA, nidB, nidC</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. CH-2	53	GTCGAGGCGTTCATGTTCCGGGAGGCGGAGCTACT CGATGGGGGGCAGTTCCG
AY330098.1	<i>nidA, nidB</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. JLS	85	GAATGGTTGGGTCTGCTCGACCCCGACATCCGGTA TGTGGTTCGCGTGCACACCCCGTGAAGATTCCG CGGGTTGGGTGGGCG
KM379098.1	<i>nidB</i>	<i>Stenotrophomonas</i> sp. IITR87	50	CGCACGGTTGCCGGACCGGAGGCTGATGAGTTGA CCGTGCGCTCGAATCT

KF373042.1		<i>Novosphingobium</i> sp. PCY	65	CGCAGCCGCGGAGATAGCGGCCGGTGGGAGTTGC TCTCGGCCGAACGCGTGCACGTGTTGCGCCG
DQ157863.1	<i>nidA, nidB, nidC</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. CH-2	317	ATGACCACCGAAACAACCGGAACAGCTGACGCGAC CGATCCCTACCTGCGGCGCGCTTTCGGGAGGTA GCGGACGGGCTCAAGTTCGGGCGCTTACCGGCC GCGTCGTCAGCGATCCCGCGCTACACACGATCGAG ATGGAGCGGATCTTCGGGCGCGCCTGGGTGTTTCT CGGACACGAGTCGGAGTTGGCCAAGTCCGGCGAC TTCGTGTCGGGCACATCGGGGCCGATTTCGGTGAT CGTTTCCGGGACAACCTCCGGCCGATCCAGGCG CTGTCCAATTCTTGTGCGCCACCGTGGTGCCTCGT GTGCCG
			54	GTACCACGGCTGGGTGTACAGCAACACCGGAGAG CTCGTCGGCGTGCCGGCGAT
HM049728.1	<i>nidA</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. Py148	138	CAAGTCGCAGTGGGGATTACGTACATCCCCATG TCGACTCGTACGCCGGATTATCTTCGGCAGCGTC GATCCGAAGGCGCCGAGCCTGACCGACTACCTCG GCGACACGACGTTCTACCTCGACCTCATTGCGAA
			161	CTCCTACCACACCCTCTTTGCTCACCGCTCGATGGT CGAGCTAGGCATGGCGCCCGGTGACCCAAATTC GCGAGCGCACCGAGCGAAATCTCGCTGCAGAACG GCCACGGCGTCGGCGTACTCGGCTTTCGCCCCAC GCTCGCCGATTTCCCGAGTACG
AY330098.1	<i>nidA, nidB</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. JLS	318	GTCCTACCCGTCGCCGGTACACAAGGACCTGATGC GACGCTCATCCTTTATTACGGCACCGTGTTCGCCG AATTTGTCGTTTCATCAACGTGACCCTCGCGCAGGA CCACATGTCGCCCCCTACCCCTTCATCACGTTCC GGGTATGGCATCCGCTCTCCCATGATCGGATGGAG ATCCTCTCCTGTTCTGGTGAACGCGATGCTCC GGAATGGTTGCGCGATGCGTCCCAGGCGTCTTAC GTCAACAACCTTCGGCCAGGTGGGTTTTTCGAACA GGACGACGCCGAGGCATGGAAGGCCATCACCGAA TCTGT
			160	CAGGGCCCGTTCGCCGGTGAAGGCCTGCTGAAC ACGAAATGGGCATGGAATTGACTCCGCTCACCGAC TGGCCAGGGCCGGGAGAGGCCCTCCCGAGCGGGT ACGCCGAGCAGAATCAGCGCGGTTTTGGGGGAG ATGGCTGGAATACATGGGTCAGC

Anexo 6. Regiones conservadas de tolueno

TOLUENO				
Secuencia	Gen	Microorganismo	Extensión (pb)	Nucleótidos
EF683124.1	Tolueno dioxigenasa	<i>Pseudomonas</i> sp. LE9-2	60	ATGGAGCCCGCTGAAGGCCCGGGTAGAAACCTACA AGGGCCTGATTTTCGCCAACTGGGA
			118	ACGCTGTAGACCTCGACACGTATCTGGGGAGGGCG AAGTTCTACATGGACCACATGCTCGACCGCACCGA GGCCGGCACCGAAGCGATCCCGGGCGTGCAGAAG TGGTCATTCCCTG
JX535285.1	<i>todC1</i>	<i>Serratia marcescens</i>	83	AACTGGAATTGCGCGCAGAGCAGTTTTGCAGCGA CATGTACCATGCCGGGACGACCTCGCATCTGTCTG GCATCCTGGCAGG
KC255405.2	<i>xyIA</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. 2B49	75	ATGGTCTGCGTAGCCGGCGGAACGGGGTTGCTC CAATTAATGTGTTTTGCAGAGCATGACCCAGGCC AGCGA
KJ679464.1		<i>Pseudomonas stutzeri</i>	76	AGCGTGATGTGTTGTTGTTCTTTGGAGCTCGTCAAC AACGTGACCTATATTGCCTCGACGAAATAGAAGCG CTGCA

Anexo 7. Regiones conservadas entre hidrocarburos

Secuencia	Gen	Microorganismo	Hidrocarburo	Extensión (pb)	Nucleótidos
M83949.1	<i>nahAa, nahAb, nahAc, nahAd</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	Naftaleno	92	CTAAGCAGGAAAGGCTGAACAAAGAAATTGGCGA TGTTTCGCGCCCGGATTTATCGCAGCCACCTCAAC TGCACCGTTTTCCCGAACACAGC
				122	TGCTGACCTGCTCGGGTGTTTTCAAAGTATGGAA CCCGATCGACGCAAACACCACCGAGTCTGGAC CTACGCCATTGTGAAAAAGACATGCCCGAGGAT CTCAAGCGCCGCTTGGCCGAC
HQ400615.1	<i>nahAc</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. CH-11	Fenantreno	50	GGGCCTGCTGGCTTCTGGGAAAGCGACGACAAT GACAATATGGAAACAGC
DQ157863.1	<i>nidA, nidB, nidC</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. CH-2	Pireno	180	CCAAACTTCGCGAGCGCACCAGCGGAAATCTCG CTGCAGAACGGCCACGGCGTCGGCGTACTCGGC TTTCCGCCACGCTCGCCGATTTTCCCGAGTACG AGGGATACCCCGACGAAGTCGTCGACCAGATGG CGACGTCTACCCGTCGCCGGTACACAAGGACC TGATGCGACGCTCA
AY032941.1	<i>cndA</i>	Uncultured bacterium	Naftaleno		
AY154360.1	<i>phnAc</i>	<i>Burkholderia glathei</i>	Naftaleno	113	GCGTATGGGGCAGATGGATCGCTTCTAAGTGTTT CATTTGAGAATGAAATTTATCAAAGCGTCTGGAT AAATGCAAAAACGGTCTGCATGAAATTTGGCAAGG TGGAGTCCTA
KC020250.1		<i>Burkholderia</i> sp. AK	Fenantreno		

KC020251.1		<i>Burkholderia</i> sp. BS3702	Naftaleno	53	TGGATGGAAGCCGGCGGGCCATCGAACTCGTC GGGCCGCTGCCCGTGCTT
AY032935.1		Uncultured bacterium			
KX812404.1		<i>Burkholderia</i> sp.			
HM003913.1	<i>ndo</i>	Uncultured bacterium		60	ATCGAAGCCAATTGAAAAGCGCCGTCAGAGAATT TTGTCGGTGACGCCTATCATGTCGGC
KU365776.1	<i>nahAc</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>stutzeri</i>	Pireno	51	TATCGTCTCCAGGCAGAACGACGGTTTCGATTCTG GCTTTTCTGAACGTTTG
				84	CGTACCCTGGCAAGACGCTGGTGCACGCAGAA GCAGGTAATGCTAAAGGTTTCGTTTGCAGCTATC ACGGCTGGGGCTTCGGC
				55	GAGAGCTTCCATGGCTTCATCTATGGTTGCTTCG ATGAGGAAGCCCCTTCTCTCA
HE798515.1	<i>nahAc</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>monteilii</i>	Naftaleno	146	AAATACGGCAGCGGCATGGGTGTGTGTGGGAC GGATATTCAGGCGTGCACAGCGCAGACCTGGTT CCGGAATTGATGGCTTCGGCGGTGCTAAGCAG GAACGGCTGAACAAAGAAATTGGCGAGGTTTCG GCACGAATCTATCG
				144	AGCCACCTCAACGGCACCGTTTTCCGAACAACA GTTTTCTGACCTGCTCGGGTGTCTTCAAGGTATG GCACCCGATCGATGCAATACCACTGAGGTATGG ACCTACGCCATG
				58	CGTCGTTAGCTGGCAACGCAGCTTGGCCCCAGA AGGTGCAGGTCTGCAATGACCTC

Anexo 8. Acceso a base de datos personal

https://drive.google.com/drive/folders/1LtICMWf2sM3kCmLJGwRPL74aeTEBuYhT?usp=s_haring

GLOSARIO

ADN: Sigla de ácido desoxirribonucleico. Biopolímero cuyas unidades son desoxirribonucleótidos y que constituye el material genético de las células y contiene en su secuencia la información para la síntesis de proteínas.

Alineamiento: proceso en el cual diferentes secuencias son comparadas mediante la búsqueda de patrones de caracteres comunes.

BioEdit: programa editor de alineación y análisis de secuencias nucleotídicas.

Biopolímero: Polímero que interviene en los procesos biológicos; por ejemplo, las proteínas y los ácidos nucleicos.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos y encontrar las que tienen mayor parecido así como la significación de cada resultado.

Enzima: Proteína que cataliza específicamente cada una de las reacciones bioquímicas del metabolismo.

FASTA: formato de las secuencias que consiste en una descripción en la línea de cabecera comenzando con un símbolo “mayor que” (>) seguido por un código de identificación de la secuencia y frecuentemente algunas palabras que describen la secuencia, como el organismo al que pertenece, la proteína que codifica, entre otros. La línea de cabecera es seguida por una o más líneas conteniendo la secuencia, ya sea de nucleótidos o de aminoácidos.

Gen homólogo: Dos genes son homólogos cuando poseen similitud en sus secuencias, evaluada mediante algoritmos (BLAST o FASTA). Genes de especies distintas con expresiones fenotípicas similares.

Genoma: Conjunto de los genes de un individuo o de una especie, contenido en un juego haploide de cromosomas.

Nucleótido: Compuesto orgánico constituido por una base nitrogenada, un azúcar y ácido fosfórico. Según que el azúcar sea la ribosa o la desoxirribosa, el nucleótido resultante se denomina ribonucleótido o desoxirribonucleótido.

Organismo genéticamente modificado (OGM): organismo cuyo material genético ha sido transformado de una manera ajena a los métodos naturales de multiplicación o combinación.

Pb (Par de bases): Dos bases nitrogenadas unidas mediante enlaces débiles en el ADN de cadena doble; el emparejamiento específico de estas bases (adenina con timina y guanina con citosina) facilita la replicación exacta del ADN; la cuantificación de los pares de bases (por ejemplo, 8 bp) se refiere a la longitud física de una secuencia de nucleótidos. Bloques que construyen las cadenas de ADN. Así, cada molécula de ADN está formada por dos hebras, y hay cuatro tipos de nucleótidos presentes en el ADN: A, C, T y G.

Región conservada: secuencias biológicas similares o idénticas que pueden encontrarse en ácidos nucleicos, proteínas o polisacáridos, dentro de múltiples especies de organismos o dentro de diferentes moléculas producidas por el mismo organismo. En el caso de conservación cruzada entre especies.

Secuencia: Ordenación específica de las unidades que constituyen un biopolímero; por ejemplo, la de los aminoácidos en las proteínas.