



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
Y BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Análisis bioinformático de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, presentado como requisito previo a la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Jessica Estefania Guerra Ortiz

Tutor: David Andrés Terán Mera, PhD.

Ambato-Ecuador

Enero -2021

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. David Andrés Terán Mera

Certifica

Que el presente trabajo ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación; el mismo que, responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 01 de diciembre de 2020

PhD. David Andrés Terán Mera

C.I. 171656972

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Guerra Ortiz Jessica Estefania declaro que los resultados presentes en el Trabajo de Titulación corresponden a la modalidad de Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, son auténticos y personales a excepción de las citas bibliográficas.



Jessica Estefania Guerra Ortiz

C.I. 0504274796

AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente del Tribunal

Dr. Mario Daniel García Solís

C.I. 110360547-1

Dr. William Ricardo Calero Cáceres

C.I. 171434885-9

Ambato, 08 de enero del 2021

DERECHO DEL AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que considere el presente Trabajo de Titulación o parte de él, como documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Jessica Estefania Guerra Ortiz

C.I. 0504274796

AUTORA

DEDICATORIA

A mis padres y hermano, por su confianza y apoyo incondicional, por el amor que me dan, por todos los sacrificios que han hecho para verme crecer.

AGRADECIMIENTO

“El punto de partida de todo logro es el deseo”

Quiero dar gracias a Dios y a mi familia, que son parte fundamental de mi vida. A mi padre que, con su ejemplo de vida y sus ganas de llegar lejos, me ha impulsado a seguir adelante y luchar por lo que deseo, gracias a su apoyo incondicional y comprensión.

A mi madre, que la considero una mujer digna de admirar, agradezco por siempre apoyarme incondicionalmente, sin importar las circunstancias, por su confianza a lo largo del camino hacia mis metas, por sus cuidados y cariño, sin los cuales no podría haber llegado a ser la persona que soy.

A mi hermano, que es mi amigo y parte fundamental de mi vida, agradezco por todo su apoyo y nunca haberme dejado sola.

Agradezco a mi tutor de tesis, por su tiempo, paciencia y enseñanzas, para lograr culminar este trabajo, por ayudarme en todo momento y haberme dado ánimos a seguir.

Al Dr. Carlos Rodríguez, con quien comenzó esta travesía, por haber confiado en mis capacidades en su momento y haberme dado herramientas para formarme como una buena profesional y mejor persona.

Quiero agradecer a todas esas personas que se convirtieron en parte de mi vida y con las cuales he avanzado esta parte de camino, mis 4F (Jhonny, Eri y César), Ale y Jeny que, sin sus locuras, ánimos, consejos y apoyo, no hubiera sido lo mismo. A Cata, por sus consejos y gran amistad, por haber sido una gran amiga y compañera no solo en aula de clases también en la vida.

A Bryan, por su apoyo, comprensión, paciencia y compañía, en todo momento, por siempre tener las palabras adecuadas y no haberme dejado sola.

Finalmente quiero agradecer a Erick, Rodri y Francisco por haber confiado en mí y haberme visto crecer a lo largo de estos años. A todas esas personas y docentes que han compartido sus conocimientos a lo largo de mi carrera y han sido parte de mi formación personal y profesional.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xiii
<i>ABSTRACT</i>	xiv
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO	1
1.1. Antecedentes investigativos.....	1
1.1.1. Generalidades	1
1.1.2. Contaminación del medio ambiente por petróleo o sus derivados.....	2
1.1.3. Composición del petróleo y clasificación	4
1.1.4. Características del suelo contaminado con petróleo.....	5
1.1.5. Diversidad microbiana en sitios contaminados con petróleo o sus derivados	5
1.1.6. Metabolismo bacteriano	8
1.1.7. Metabolismo bacteriano de hidrocarburos saturados	9
1.1.8. Metabolismo bacteriano de hidrocarburos insaturados	10
1.1.9. Metabolismo bacteriano aerobio de hidrocarburos aromáticos.....	11
1.1.10. Metabolismo bacteriano anaerobio de hidrocarburos.....	12
1.1.11. Bases de datos, información genética y proteica.....	13
1.1.12. Secuenciación de péptidos.....	13
1.1.13. Filogenia.....	14
1.1.14. Árboles filogenéticos	15
1.1.15. Aplicaciones de las secuencias de genomas.....	16
1.1.16. Genómica funcional.....	16
1.1.17. Enzimas en el metabolismo.....	17
1.1.18. Oxigenasas.....	18
1.1.19. Degradación de tolueno y benceno	20
1.2. Objetivos	20
1.2.1. Objetivo General.....	20

1.2.2. Objetivos Específicos	20
CAPÍTULO II.....	22
METODOLOGÍA.....	22
2.1. Materiales, equipos y reactivos.....	22
2.1.1. Materiales	22
2.1.2. Recursos tecnológicos	22
2.2. Métodos	22
2.2.1. Metaanálisis	22
2.2.2. Filogenia de las enzimas.....	24
2.2.3. Construcción de los árboles filogenéticos	25
2.2.4. Análisis estructural	26
CAPÍTULO III	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
3.1. Análisis y discusión de resultados	30
3.1.1. Metaanálisis	30
3.1.2. Filogenia de las enzimas.....	36
3.2. Verificación de la hipótesis.....	60
CAPÍTULO IV	62
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	62
4.1. Conclusiones	62
4.2. Recomendaciones	63
BIBLIOGRAFÍA	64
ANEXOS	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Tipos de árboles filogenéticos de diferentes OTU's</i> (Crisci & López, 1983).	16
Figura 2 <i>Base de datos KEGG. Tomado de página principal de KEGG</i>	23
Figura 3 <i>Web BLAST de NCBI Nota. Tomado de página de NCBI</i>	24
Figura 4 (a)Alineamiento de secuencias (b)Construcción del árbol filogenético ...	26
Figura 5 <i>Base de datos PDB Nota. Tomado de página de Protein Data Bank</i>	26
Figura 6 <i>Página inicial del programa PyMOL y menú</i> (Lyford DeLano, 2000)	27
Figura 7 <i>Ejemplo de alineamiento estructural y opciones del menú a) Opciones del menú desplegada de la opción "Align". b) Menú desplegado de Hide (H), opción "Sticks"</i> . 28	
Figura 8 <i>Ruta general de la degradación de hidrocarburos saturados de manera aerobia</i> (Van Beilen et al., 2003).....	31
Figura 9 <i>Ruta anaerobia para la degradación de alquenos</i> (Van Beilen et al., 2003)....	32
Figura 10 <i>Rutas metabólicas (aerobia) de la degradación del benceno. Se presenta las dos rutas aerobias de degradación (líneas azules y tomate) y las enzimas iniciales en color rojo claro. Modificado de la Base de Datos KEGG</i>	34
Figura 11. <i>Rutas metabólicas (aerobias y anaerobia) de la degradación del tolueno. Se presenta la ruta anaerobia de degradación (líneas cafés) y las rutas aerobias (líneas azul, verde, amarillo y plomo)</i>	36
Figura 12 <i>Árbol filogenético de los resultados BLAST vs la enzima problema (Benceno 1,2-dioxigenasa)</i>	39
Figura 13 <i>Árbol filogenético de los resultados BLAST vs la enzima problema (Fenol 2-monooxigenasa)</i>	41
Figura 14 <i>Árbol filogenético de los resultados BLAST vs la enzima problema (Tolueno 2-monooxigenasa)</i>	42
Figura 15 <i>Árbol filogenético de los resultados BLAST vs la enzima problema (Tolueno metil-monooxigenasa)</i>	44
Figura 16 <i>Árbol filogenético de los resultados BLAST vs la enzima problema (Tolueno 4-monooxigenasa)</i>	45
Figura 17 <i>Árbol filogenético de los resultados BLAST vs la enzima problema (Tolueno dioxigenasa)</i>	47
Figura 18 <i>Estructuras 3D y sitio activo de las enzimas: Benceno 1,2-dioxigenasa y Fenol 2-monooxigenasa</i>	51

Figura 19 Alineamiento estructural de las enzimas 3D: Benceno 1,2-dioxigenasa y Fenol 2-monooxigenasa.....	52
Figura 20 Estructuras 3D y sitio activo de las enzimas: Tolueno 2-monooxigenasa, Tolueno dioxigenasa y Tolueno 4-monooxigenasa	53
Figura 21 Alineamiento estructural de las enzimas 3D: Tolueno 2-monooxigenasa y Tolueno dioxigenasa.	54
Figura 22 Alineamiento estructural de las enzimas 3D: Tolueno 2-monooxigenasa y Tolueno 4-monooxigenasa.	56
Figura 23 Alineamiento estructural de las enzimas 3D: Tolueno dioxigenasa y Tolueno 4-monooxigenasa.....	57
Figura 24 Alineamiento estructural de las enzimas 3D: Tolueno 2-monooxigenasa, Tolueno dioxigenasa y Tolueno 4-monooxigenasa.	58
Figura 25 Alineamiento estructural de las enzimas degradadoras de benceno y tolueno.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Pseudomonas</i> degradadoras de hidrocarburos.....	6
Tabla 2 Enzimas seleccionas para el estudio	37
Tabla 3 Resumen de los query cover obtenidos del BLAST.....	38
Tabla 4 Enzimas escogidas para los análisis estructurales	51
Tabla 5 Resumen de los resultados del alineamiento de las enzimas de la ruta de degradación tolueno y benceno.....	60

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Resumen de bacterias degradadoras de hidrocarburos	73
Anexo 2. Resultados del BLAST de la enzima Benceno 1,2-dioxigenasa	74
Anexo 3. Resultados del BLAST de la enzima Fenol 2-monooxigenasa.....	75
Anexo 4. Resultados del BLAST de la enzima Tolueno 2-monooxigenasa.....	76
Anexo 5. Resultados del BLAST de la enzima Tolueno metil-monooxigenasa.....	77
Anexo 6. Resultados del BLAST de la enzima Tolueno 4-monooxigenasa.....	78
Anexo 7. Resultados del BLAST de la enzima Tolueno dioxigenasa	79
Anexo 8. Resultados del BLAST de la enzima Bencilsuccinato sintasa.....	80
Anexo 9. Árbol general de las enzimas que participan en la ruta de degradación del Benceno	81

Anexo 10. Árbol general de las enzimas que participan en la ruta de degradación del Tolueno..... 84

RESUMEN

Los análisis bioinformáticos realizados se enfocaron en las bacterias degradadoras de hidrocarburos y en los mecanismos que usan para la degradación de estos compuestos. Se busca comprender la evolución de estas a través del tiempo, tomado en cuenta la relación evolutiva y estructural de ciertas enzimas (monooxigenasa y dioxigenasas), entre estas: benceno 1,2-monooxigenasa, fenol 2-monooxigenasa, tolueno 2-monooxigenasa, tolueno metil-monooxigenasa, tolueno dioxigenasa y tolueno 2-monooxigenasa.

El proceso de metaanálisis consistió en determinar las bacterias capaces de degradar hidrocarburos, así como la definición de las rutas metabólicas usadas para la transformación de: tolueno y benceno y las enzimas correspondientes (Total:7).

El proceso de filogenia de las enzimas, se llevó a cabo basándose en los hidrocarburos (tolueno y benceno), se realizó un BLAST de cada una de las enzimas y se construyó arboles filogenéticos individuales y grupales. Basada en esta información se comprendió la evolución de las enzimas y se definió ancestros en común, obteniendo que existe aún secuencias conservadas entre todas a enzimas.

El último análisis realizado fue el análisis estructural de 5 enzimas, donde se compararon entre sí, definiendo así la similaridad estructural. En base a esto se obtuvo que existe similitudes parciales entre las enzimas, que participan en las diferentes rutas metabólicas, afirmado lo antes propuesto.

El estudio del presente trabajo es importante debido que cada uno de los resultados obtenidos, pueden contribuir al desarrollo de enzimas sintéticas a nivel industrial, para mayor eficiencia en la a biorremediación de suelos y aguas contaminados por derrames de petróleo.

Palabras Claves: Bioinformática, contaminación ambiental, filogenia, microbiana, bacterias, alineamiento estructural, hidrocarburos.

ABSTRACT

The bioinformatic analyzes carried out focused on hydrocarbon degrading bacteria and the mechanisms they use for the degradation of these compounds. It seeks to understand the evolution of these over time, taking into account the evolutionary and structural relationship of certain enzymes (monooxygenase and dioxygenases), among these: benzene 1,2-monooxygenase, phenol 2-monooxygenase, toluene 2-monooxygenase, toluene methyl monooxygenase, toluene dioxygenase and toluene 2-monooxygenase.

The meta-analysis process consisted of determining the bacteria capable of degrading hydrocarbons, as well as the definition of the metabolic routes used for the transformation of: toluene and benzene and the corresponding enzymes (Total: 7).

The phylogeny process of the enzymes was carried out based on hydrocarbons (toluene and benzene), a BLAST of each of the enzymes was carried out and individual and group phylogenetic trees were constructed. Based on this information, the evolution of enzymes was understood and common ancestors were defined, obtaining that there are still conserved sequences among all enzymes.

The last analysis performed was the structural analysis of 5 enzymes, where they were compared with each other, thus defining the structural similarity. Based on this, it was obtained that there are partial similarities between the enzymes, which participate in the different metabolic pathways, as stated above.

The study of this work is important because each of the results obtained may contribute to the development of synthetic enzymes at an industrial level, for greater efficiency in the bioremediation of soils and waters contaminated by oil spills.

Key Words: Bioinformatics, environmental contamination, phylogeny, microbial, bacteria, structural alignment, hydrocarbons.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Generalidades

En la actualidad la contaminación de suelos, aguas subterráneas y sedimentos a causa de las diferentes industrias, es parte de los principales problemas del mundo y de nuestro país (**Boopathy, 2000**). Entre las principales causas de contaminación de suelos se encuentra los derrames de petróleo o de sus derivados, donde a escala mundial tanto la extracción como transporte de hidrocarburos afecta considerablemente a la flora y fauna de las zonas (**Benavides et al., 2006**). Para solucionar este problema ambiental, se puede optar por usar varias técnicas de biorremediación, para obtener el llamado equilibrio ambiental (**Cortón & Viale, 2006**).

La biorremediación microbiana es una de las técnicas actuales que emplea procesos biológicos con el fin de eliminar contaminantes tóxicos, mediante el uso del metabolismo de cualquier microorganismo sea este un hongo, actinomicete o bacteria, que sean capaces de devolver las condiciones iniciales que poseía el ecosistema antes de ser contaminado (**Kensa, 2011**). En la actualidad la biorremediación ha logrado resultados notables en la descontaminación de suelos, esto gracias a los avances en los estudios en biología molecular de microorganismos (A. Kumar et al., 2011).

- **Bacterias**

Desde el desarrollo de la microbiología iniciado por Pasteur y Koch como los pioneros en el estudio de estos microorganismos y los avances obtenidos principalmente hasta el siglo XX se ha relacionado la bacteriología con otras ciencias como: biología molecular, proteómica, bioquímica, genética, entre otras, algunas de ellas encargadas del estudio del metabolismo bacteriano con el fin de obtener respuestas cerca de los mecanismos de supervivencia y defensa de estas especies (**Iáñez, 2003**).

Los primeros estudios de bacteriología fueron propuestos por el científico Christian Ehrenberg, considerado como el padre de esta rama, a partir de esto aparece el término latín “bacterium” traducido como bacteria. El primer ascenso taxonómico de las bacterias fue en la familia Viobrina y actualmente en el árbol filogenético constituyen un dominio

(Osorio, 2017). Las bacterias son un grupo de microorganismo unicelulares, consideradas como una de las formas de vida más antiguas en el mundo (Bush, 2018), estos organismos procariotas pertenecientes al reino bacteria y poseen un tamaño entre 0,5 y 3µm, con una relación superficial de volumen alta (Raisman & Gonzalez, 2013).

La estructura bacteriana, es sencilla pues consta de una pared celular rígida y una membrana plasmática flexible, las cuales son encargadas de proteger a la célula y del intercambio de nutrientes y desechos respectivamente, el interior la célula está constituida por ribosomas y el citoplasma en el cual se encuentra disperso el material genético y una gran variedad de enzimas (Cervantes, 2011).

La diversidad microbiana en diferentes ambientes y su aislamiento a través de diferentes técnicas han permitido determinar que existe una gran cantidad de bacterias capaces de codificar enzimas de utilidad (Escalante et al., 2004), relacionadas con el metabolismo bacteriano que posee como objetivo mantener la supervivencia de la célula y proveerla de energía, al igual que los organismos superiores el metabolismo de las bacterias no difiere en sus funciones y se basa en degradar ciertos componentes para su beneficioso (Negroni, 2009).

1.1.2. Contaminación del medio ambiente por petróleo o sus derivados

En las últimas tres décadas Ecuador la explotación de petróleo se ha convertido en el eje fundamental de la economía, pues los ingresos generados constituyen el 11.5% del Producto Interno Bruto del país (Ziritt, 2010). A pesar de esto el mal manejo y la poca seguridad por parte de la industria petrolera han transformado esto en uno de los mayores problemas ambientales del país y del mundo pues también países como: Arabia Saudita, Rusia, Irak, Irán y muchos otros basan sus economías en la exportación de crudo (OPEP, 2010). Los derrames de petróleo afecta la biodiversidad en las zonas de explotación, por lo cual los gobiernos se han visto en la necesidad de minimizar el impacto ambiental generado (Ziritt, 2010).

Empresas como Texaco y Petroecuador han operado dentro de Ecuador por varios años, convirtiéndose en las principales industrias de explotación de petróleo y siendo las responsables de los mayores desastres ambientales en la región Amazónica (Becerra et al., 2013). Texaco extrajo millones de barriles de petróleo por 30 años, operando hasta 356 pozos de petróleo y 1000 piscinas, algunas de manera clandestina, la falta de técnicas

competentes para la perforación y extracción del petróleo produjo daños casi irreparables en más de 2 millones de hectáreas de la Amazonía, desatando la contaminación de agua y suelos, al retiro de la empresa las piscinas fueron cubiertas con materia orgánica y ningún proceso de remediación fue ejecutado (**MREMH, 2015**).

Petroecuador es una empresa nacional que ha expandido sus operaciones de explotación a lo largo de la región Amazónica desde hace más de 25 años, registrando hasta el año 2011 una cantidad de 1 983 derrames de petróleo y que en los últimos años ha ido en aumento. Uno de los accidentes más perjudicial es el ocurrido en la Reserva Nacional de Cuyabeno donde se derramo un aproximado de 600 barriles de petróleo, causando daños en la fauna y flora de la zona. Los diferentes derrames causados por esta empresa se han convertido en un problema de contaminación de suelos y aguas, a pesar de las operaciones de remediación ambiental realizadas no se ha logrado recuperar en su totalidad estas zonas (**Vaca & Astudillo, 2016**).

A nivel mundial, derrames como la Guerra del Golfo Pérsico en 1991 constituyen uno de los accidentes ambientales más desastrosos de la historia con más de 1360000 toneladas de petróleo derramadas en un área de 4242 km^2 y una capa de aproximadamente 12 cm de espesor , hasta la actualidad se puede observar los daños ambientales producidos en la zona (**Lozada & López, 2019**).

África, Alaska y Canadá han sufrido el hundimiento de barcos destinados para el transporte de petróleo, cada uno con un aproximado de 1,8 millones de barriles no solo las pérdidas económicas han sido devastadoras también las zonas marinas no han logrado recuperar la diversidad que las caracterizaba, la vida marina es casi escaza hasta hoy en día (**BBC, 2010**). A pesar de labores ejecutadas por las autoridades para la biorremediación de los suelos y aguas en donde se ha producido derrames de petróleo no se logrado la recuperación completa de estas zonas, empresas como Pemez, UANL, INAM o el Centro de Investigación como el de Jalisco (CIATEJ), México proponen la biorremediación con bacterias u hongos como uno de los mejores procesos para controlar los derrames de petróleo (**OEI, 2000**) .

En Ecuador los derrames de crudo en las costas han ido sucediendo progresivamente a través de los años, el malecón de Las Palmas, en Esmeraldas ha sido uno de los escenarios de derrames de crudo en el año 2017, el cual cubrió tres de los seis kilómetros que conforma la playa, sus aguas se llenaron de crudo y el acceso a turistas y locales fue

prohibido (Espinosa, 2017). Las costas esmeraldeñas han sufrido múltiples derrames, perjudicando a los pesqueros de las diferentes zonas, en el 2016 se registró un derrame a siete millas de las costas del Puerco Artesanal Pesquero de Esmeraldas, que causó daños casi irremediables en la fauna marina de la zona y por tanto en la economía de la zona (Bonilla, 2016). A pesar de las intervenciones por parte de las autoridades no se ha logrado recuperar las zonas en su totalidad (Espinosa, 2017).

1.1.3. Composición del petróleo y clasificación

El petróleo es una mezcla compleja de moléculas de carbono (79,5 % a 88,7%) e hidrógeno (9,6% a 16%), pero también de azufre, nitrógeno y oxígeno en cantidades mínimas (Newbery & Thierry, 2007). Esta composición puede variar ligeramente de acuerdo a los yacimientos e incluso por el proceso para su comercialización. Se dividen en tres grupos según sus estructuras hidrocarbonadas:

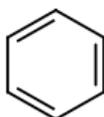
- Hidrocarburos saturados: son cadenas de carbono e hidrógeno cortas lineales algunas con ramificaciones y puntos de ebullición baja, cuyos enlaces carbono – carbono son simples.
- Hidrocarburos insaturados: se caracterizan por poseer uno o varios enlaces dobles y triples de carbono -carbono, son generados en el proceso de cracking (descomposición de los hidrocarburos de elevado peso molecular).
- Hidrocarburos aromáticos: son compuestos cíclicos que poseen anillos aromáticos de entre 5 a 6 carbonos, con puntos de ebullición y densidad elevados, pueden o no ser acoplados a ramificaciones lo que los convierte en difíciles de eliminar de suelos y aguas (Wauquier, 1994).

Entre los principales hidrocarburos aromáticos, se encuentran: el benceno y el tolueno, los dos constan de una única estructura de anillo insaturado conformado por 6 átomos de carbono.

- ***Benceno***

Fórmula molecular: C_6H_6

Estructura molecular:

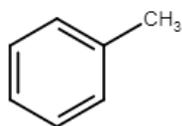


Este compuesto, es un líquido amarillento o incoloro, constituye parte de los hidrocarburos presentes en el petróleo crudo, es también llamado como nafta del carbón, posee una densidad menor que la del agua, con un peso molecular de 78,11 g/mol, su olor es percibirles a concentraciones de 1,5 -4,7 ppm, el cual es dulce y aromático, es una sustancia altamente inflamable y puede liberar vapores tóxicos. Es altamente letal, tanto por consumo, así como por inhalación, debido a su anillo aromático es difícil de eliminar de suelos y aguas (IDEAM, 2010).

- ***Tolueno***

Fórmula molecular: C₇H₈

Estructura molecular:



Es un compuesto incoloro, olor aromático, se considera como un derivado del benceno y al igual que este es menos denso que el agua (densidad de 0,87 g/ml), sus vapores son más densos que el aire y posee un punto de ebullición de 111°C, muy reactivo con ácido nítrico y sulfúrico, es considerado un producto con alta toxicidad. Es difícil de eliminar de suelos y aguas, debido a su anillo aromático, así como su radical, puede ser absorbido con gran facilidad y su acumulación es letal (ATSDR).

1.1.4. Características del suelo contaminado con petróleo

Características como la porosidad, pH, conductividad eléctrica, carbono orgánico, capacidad de intercambio catiónico, textura y retención de humedad influyen en el comportamiento del petróleo con el suelo (Castellanos et al., 2015). La cuantificación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) en zonas de derrames, es fundamental en el análisis de vulnerabilidad de los suelos y la biodegradabilidad. En medios porosos el método de Soxhlet es el más usado para conocer la concentración de productos derivados de petróleo (Serrano et al., 2013).

1.1.5. Diversidad microbiana en sitios contaminados con petróleo o sus derivados

La detección e identificación de diversidad bacteriana ha permitido realizar estudios para el aprovechamiento de sus metabolitos o de su actividad metabólica, con el fin de obtener

beneficios en diferentes procesos biotecnológicos (Leyva et al., 2015), se considera que la gran diversidad de estos microorganismos depende de dos razones fundamentales: la primera debido a la rápida evolución y la segunda debido a su capacidad de adaptación (Capello et al., 2000). Las bacterias contribuyen en procesos industriales, procesos biotecnológicos, procesos simbióticos y algunas son protagonistas en ciclos de la naturaleza, contribuyendo de diferentes maneras al beneficio del ser humano (Letosa, 2000).

A causa de su capacidad de adaptación y crecimiento en ambientes extremos o tóxicos, los diferentes estudios en su diversidad han contribuido en gran parte al desarrollo de la biorremediación, debido que pueden producir altas cantidades de enzimas productos de su metabolismo, con el fin de lograr degradar desechos orgánicos tóxicos en compuestos inofensivos (Azubuike et al., 2016). Con esto, el interés de la industria petrolera va en crecimiento y se enfoca en la recuperación de suelos contaminados por derrames de petróleo, la utilidad de las bacterias que produce biosulfatantes es importante pues este compuesto es el responsable del crecimiento en medios con petróleo debido que disminuye la tensión superficial, logrando un crecimiento óptimo (Sulbarán et al., 2008).

Entre las diferentes bacterias que se pueden encontrar en suelos contaminados con petróleo, generalmente se halla una gran cantidad de *Pseudomonas*, que son capaces de consumir petróleo como una fuente de carbono, no obstante, a esto no se quita la existencia de otros grupos de bacterias, con esa misma capacidad. La diversidad bacteriana también dependerá de las características físicas y químicas de los suelos, así como su toxicidad es decir el grado de la concentración de petróleo en su hábitat. Otros factores como disponibilidad de nutrientes también afectan a la diversidad (Debarati et al., 2005). Algunos ejemplos de *Pseudomonas* se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1

Pseudomonas degradadoras de hidrocarburos

Nombre Bacteria

Pseudomona extremaustralis

Pseudomona putida

Pseudomona fluorescens

Pseudomona chlororaphis

Pseudomona oleovorans
Pseudomona aeruginosa
Pseudomonas stutzeri
Pseudomona grimontii
Pseudomona erytopolis
Pseudomona alcaligenes
Pseudomona fluorescens
Pseudomona synxantha
Pseudomona reactants
Pseudomona mendocina
Pseudomona plecoglossicida
Pseudomona balearica
Pseudomona moraviensis
Pseudomona prosekii
Pseudomona frederiksbergensis

El uso de bacterias para la biorremediación de aguas, es una solución a la acumulación y persistencia de los hidrocarburos que afectan a estos ecosistemas, donde la presencia de *Pseudomonas sp.*, es común pues posee la capacidad de eliminar metales pesados como: el cromo VI, compuesto peligroso para la salud de cualquier ser vivo que lo consuma (Otiniano et al., 2019). Bacterias de los géneros *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Sphingomonas*, también tienen la capacidad degradadora en sistemas acuáticos (Das & Chandran, 2011).

Las poblaciones microbianas por su rápida adaptación se encuentran presentes también en manglares zonas que son muy difíciles de recuperar después de un derrame, debido a la falta de nutrientes, nitrógeno y fósforo las bacterias presentes depende de la materia orgánica presente en el medio y así logran controlar el flujo de nitrógeno en estas zonas, entre las bacterias presentes se puede encontrar: *Pseudomonas aeruginosa*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas luteola* and *Pseudomonas fluorescens* (ruiz).

Los aislamientos de bacterias capaces de degradar hidrocarburos y su identificación, han sido fundamentales en comprender el desarrollo bacteriano y su adaptabilidad en los

medios, para contribuir de manera beneficiosa al ser humano, sus metabolismos variables han reducido el contenido de hidrocarburos en zonas de derrames.

1.1.6. Metabolismo bacteriano

La biorremediación una tecnología pionera en el aprovechamiento del metabolismo de microorganismos es decir aquellos que poseen una alta capacidad de degradación, para limpiar o remediar terrenos contaminados. Por lo cual el uso de sistemas biológicos es indispensable, de esta manera se potencia la destrucción o transformación de los compuestos tóxicos en otros menos peligrosos con el uso de microorganismos como las bacterias las cuales evitan la acumulación de residuos peligrosos para el ambiente y para los seres vivos (**Gibson & Sayler, 1992**).

El metabolismo es un conjunto de reacciones químicas capaces de formar biomoléculas necesarias para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos, con el fin de mantenerlos funcionales. Es el conjunto de transformaciones químicas que modifican las sustancias que ingresan al organismo, proceso llevado a cabo de manera continua (**A. García, 2012**).

El metabolismo bacteriano se divide en catabolismo y anabolismo, donde este último está ligado al proceso de biosíntesis, que consiste en la capacidad de la bacteria de producir sus propios componentes esenciales para su supervivencia, degradando lo que su entorno le ofrece. El carbono es uno de los principales macronutrientes necesario para las bacterias, así como es uno de los más abundantes dentro de las células, usado tanto en la biosíntesis como en la generación de energía (**Varela, 2002**).

El mayor rendimiento metabólico obtenido en degradación de hidrocarburos, se obtiene en la fase exponencial de la cinética de crecimiento, pues en esta fase las bacterias son capaces de metabolizar y mineralizar el contaminante a CO_2 y H_2O (**Alexander, 1994**). Generalmente las bacterias metabolizan los hidrocarburos hasta convertirlos en compuestos parcialmente oxidados los cuales son fáciles de incorporar en ciclos biogeoquímicos (**Gómez et al., 2008**). En algunos casos la degradación de los hidrocarburos se ve limitado por su hidrofobicidad, por lo cual algunas cepas producen biotensioactivos permitiendo así la asimilación (**Das & Chandran, 2011**).

Compuestos de baja hidrofobicidad como los alcanos lineales de cadenas cortas son metabolizados a través de la ruta de β -oxidación produciendo alcohol como intermediario,

mientras que alcanos de cadenas largas ($C > 40$) son más hidrofóbicos y requieren de más tiempo para ser metabolizados (DeLaune & Wright, 2011). Los compuestos más difíciles de metabolizar son los compuestos aromáticos pues la ruta metabólica para su degradación depende principalmente del número de anillos que poseen, comúnmente son degradados por la ruta de los ácidos tricarbóxicos después de un proceso de oxidación (Das & Chandran, 2011).

Estudios realizados por (Rojas et al., 2010), muestran que las cepas aisladas de suelos con hidrocarburos, tienen la tendencia a generar ácido indolacético, de manera que esta lleva a comprobar la existencia de una alta actividad enzimática. Las bacterias usadas para la biorremediación de suelos contaminados por petróleo y sus derivados, poseen características especiales entre estas: su alta capacidad de soportar pH ácidos provocados por la presencia de los hidrocarburos, convirtiendo así a la biodegradación de estos compuestos en un proceso lento. A pesar de la escasa humedad, que se pueden encontrar en estos suelos la viabilidad de estas cepas se mantiene, pues son capaces de provocar una variación en la composición de los ácidos grasos presentes en la membrana evitando así su deshidratación y cambios estructurales bruscos que produzcan su muerte (Gómez et al., 2008).

La susceptibilidad de los hidrocarburos para su degradación esta dado en base a sus estructuras donde se puede encontrar: alcanos, alquenos y alquinos como estructuras simples y en casos de ser ramificados aumenta la complejidad de los procesos de degradación, en el caso de los compuestos aromáticos varía dependiendo de su peso molecular, pues algunos llegan a ser muy elevados y por su complejidad estructural su degradación es un proceso lento (Das & Chandran, 2011).

1.1.7. Metabolismo bacteriano de hidrocarburos saturados

La degradación de alcanos está delimitada por su estructura, donde la longitud de su cadena carbonada dependerá la rapidez del proceso degradativo. Muchas cepas microbianas tienen la capacidad de desarrollarse en medios ricos en alcanos y consumirlos como fuente de carbono (Janssen et al., 2001).

La degradación de alcanos es un proceso de oxidación, inicialmente por la acción de una monooxigenasa lo convierte en un alcohol primario y continuara hasta llegar a ser un aldehído y posteriormente un ácido carboxílico, con el fin de generar ácidos grasos que

ingresaran a la ruta de β -oxidación obteniendo como producto final acetyl-CoA. En los alcanos cortos el alcohol obtenido puede ser una cetona que se oxida hasta convertirlo en un éster y posteriormente llegar a la obtención de un ácido graso y continuar en la ruta de la β -oxidación (**Van Beilen et al., 2003**).

La activación de alcanos de cadena corta se da de manera terminal o subterminal, aunque en algunos casos los alcanos de cadena larga pueden ser activados de la misma manera, esta oxidación se presenta sobre todo en especies del género *Penicillium*, *Bacillus* y *Pseudomonas*. En caso de la oxidación subterminal la enzima monooxigenasa convierte al alcano en alcohol secundario que posteriormente se convierte en un éster y así obtener el ácido graso que ingresara en la ruta de β -oxidación (**Grossi et al., 2008**). Pocas bacterias degradan anaeróbicamente los alcanos, esto a través de la adición de fumarato.

Los cicloalcanos, forman parte del grupo de hidrocarburos saturados, debido a sus estructuras rígidas y simétricas, su densidad y punto de ebullición son elevados a diferencia de los alcanos, propiedad que les permite tener atracciones intramoleculares más efectivas. Esos son degradados al igual que los alcanos de cadena por la acción de oxigenasas, con el fin de llevarlo a ser una cadena alifática (**Olguín et al., 2007**).

1.1.8. Metabolismo bacteriano de hidrocarburos insaturados

Al igual que los alcanos las bacterias degradan los hidrocarburos insaturados de manera que estos lleguen a ser ácidos grasos, sin embargo, por los enlaces dobles o triples presentes se lo considera como compuestos más reactivos químicamente, lo que da como resultado reacciones extras como: epoxidación e hidratación (**Bouwer & Zehnder, 1993**). A pesar de la necesidad de oxígeno para la degradación el proceso de hidratación de los alquenos se puede dar de manera anaerobia, mientras que en alquinos el proceso es similar para convertirse en una fuente de carbono y energía (**Bouwer & Zehnder, 1993**).

Algunas cepas bacterianas han demostrado que la degradación de alquenos y alquinos de manera anaerobia es extremadamente efectiva pues el producto obtenido es la formación de alcoholes y ácidos grasos con el mismo número de carbonos que poseía el sustrato inicial y con ramificaciones, lo que demuestra que los productos obtenidos son los mismos que en presencia de oxígeno. Pocos estudios en bacterias reductoras demuestra

que los alquenos son convertidos en cetonas para seguir un metabolismo nuevo que no se conoce en su totalidad (Grossi et al., 2008).

1.1.9. Metabolismo bacteriano aerobio de hidrocarburos aromáticos

La degradación de compuestos aromáticos varía dependiendo de la complejidad de las estructuras, es decir, por la cantidad de anillos presentes, debido a esto las bacterias se enfocan en la ruptura de los anillos llevada a cabo por enzimas degradativas que trabajan conjuntamente con moléculas de oxígeno (Das & Chandran, 2011).

La mayoría los hidrocarburos aromáticos son agrupados como HAPs, este grupo está constituido por varios compuestos los más conocidos son el benceno, xileno, tolueno y etilbenceno (TBEX), los cuales son considerados como contaminantes orgánicos altamente perjudiciales debido a su alta toxicidad para el ambiente y salud humana. La degradación microbiana de los compuestos aromáticos depende de las condiciones ambientales, el número y el tipo de microorganismos, así como la naturaleza química del compuesto (Haritash & Kaushik, 2009). Existen dos tipos de rutas principales para su degradación, las rutas clásicas y las rutas híbridas.

- *Ruta clásica*

La mineralización es un proceso adecuado para transformar hidrocarburos aromáticos en compuestos menos complejos logrando tener como productos CO_2 y H_2O , a través de un proceso netamente aerobio, por la transferencia de grupos hidroxilos (Loera et al., 2016). Las bacterias trabajan en la degradación de estos compuestos a través de la oxidación de las moléculas para formar dihidrodioles que por ataque enzimático orto o meta podrán formar varios compuestos intermediarios, como: catecol o protocatecuato, que entrarán a la ruta de los ácidos carboxílicos (García & Aguirre, 2014), una vez obtenidos este anillo puede ser abierto por la acción de un dioxigenasa o monooxigenasa, proceso conocido como vías bajas y tiene como resultado llegar a la obtención de succinato (Loera et al., 2016). La degradación aerobia de compuestos aromáticos está basada principalmente en la participación de oxigenasas que adicionan moléculas de oxígeno al anillo aromático y con una dehidrogenación obtener el catecol o el protocatenol, uno de los grupos más efectivos es esta degradación son las del género *Rhododoccus* (Ortega, 2010).

- *Rutas híbridas*

Estas rutas mantienen características de catabolismo aerobio y del catabolismo anaerobio, y busca transformar los sustratos a derivados del acetil CoA por medio de un proceso de tioesterificación ejecutado por enzimas ligasas CoA, la ruptura del anillo se da por la desestabilización de la densidad electrónica de la estructura aromática (**Rinken et al., 1991**). Existen gran cantidad de vías periféricas dependiendo del sustrato, todas con la finalidad de transformar el sustrato a benzoil-CoA, para que sea ingresado en la vía central de la degradación (**J. Heider & Fuchs, 1997**).

Es importante mencionar que algunos compuestos halogenados presentes con los hidrocarburos de cualquier tipo y su eliminación se puede dar en el proceso de degradación y en algunos casos pueden funcionar como aceptores de electrones, por lo cual no solo la molécula de oxígeno puede funcionar como aceptora de electrones (**Janssen et al., 2001**).

1.1.10. Metabolismo bacteriano anaerobio de hidrocarburos

Mucho tiempo se pasó sin saber si el metabolismo de las bacterias podría llevarse a cabo en medios sin oxígeno hasta 1980, se descubrió que la degradación de hidrocarburos no se lleva de manera estricta por bacterias aerobias, sino que también podía ser llevada a cabo por bacterias anaerobias. Este tipo de bacterias, usan compuestos como: nitrato, hierro o sulfato como receptores de electrones y así llevar a cabo procesos anaerobios de degradación, muy diferente al que participan las oxidasas en las rutas metabólicas anteriormente expuestas (**Widdel & Rabus, 2001**). Este metabolismo bacteriano busca transformar a los hidrocarburos en compuestos más simples como alcoholes secundarios, así como usar procesos de carboxilación (**Janssen et al., 2001**).

La degradación de compuestos aromáticos sin presencia de oxígeno se basa en degradar los sustratos a intermediarios centrales los cuales ingresaran a una vía central para la ruptura del anillo por reducción de electrones, el intermediario más común es el Benzoil-CoA, que se reduce a dieno cíclico con ayuda de ATP necesario para la activación de la enzima Benzoil-CoA reductasa y el producto obtenido será el ciclohex-1,5-dieno-1-carboxil-CoA que se oxida a acetil CoA, a través de una ruta modificada de β - oxidación (**Johann Heider et al., 1998**). La degradación de alquenos también es un proceso que puede ser llevado a cabo en usencia de oxígeno, donde el alqueno se hidrata por la presencia de agua en el medio para convertirse en un alcohol y seguir una ruta similar a la aerobia (**Bouwer & Zehnder, 1993**).

1.1.11. Bases de datos, información genética y proteica

A través de los años la recopilación de información acerca de muchos microorganismos es un hecho que colabora en el análisis de esta información para su uso en otros fines. Varias plataformas reúnen la información dado lugar a la aparición de bibliotecas como el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) que desde su aparición en 1988 alberga información de biología molecular, con la ventaja que en actualidad cuenta con herramientas bioinformáticas de uso público y gratuitas. El Banco de Datos de Proteínas, maneja información de estructuras tridimensionales de proteínas y ácidos nucleicos de todo tipo la mayoría de estos datos obtenidos mediante cristalografía de rayos X.

La información genética de las bacterias se encuentra contenida en la molécula de ADN, el material genético, se encuentra disperso en toda la célula pues estas carecen de núcleo y posee una forma circular cerrada por un enlace covalente (**Betancor et al., 2002**). El tamaño de esta doble cadena varía dependiendo de la especie en un rango de 0,58 megabases hasta 10 megabases (**Latorre & Silva, 2013**). Debido que las bacterias carecen de histonas el material genético que poseen no se compacta en nucleosomas, pero lo logran a través de un proceso denominado como superenrollamiento (**Betancor et al., 2002**). Algunas bacterias cuentan con ADN extracromosómico (plásmidos), el cual no posee un función esencial dentro de la célula (**Betancor et al., 2002**).

El uso del genoma para la clasificación de los organismos, incluyó el desarrollo de varios métodos para la obtención de las secuencia de ácidos nucleicos, convirtiendo a la caracterización genotípica en de las principales herramientas para conseguir la llamada taxonomía molecular (**Uad, 2012**) y con ello la aparición de mapas genéticos. Los genomas completos de bacterias pueden ser secuenciados en pocas semanas con la tecnología adecuada y los resultados obtenidos permiten el estudio de varios procesos celulares e incluso en un análisis de la evolución de los organismos con la construcción de árboles filogenéticos (**Orellana, 2002**).

1.1.12. Secuenciación de péptidos

Existen varios métodos que permiten conocer la secuencia de aminoácidos y el orden de encadenamiento de estos, los más usados son: el método Sanger, reactivo de Edman y espectrometría de masas (**Sancho, 2019**). Varias enzimas, tanto de interés industrial como

académico, han pasado por el proceso de secuenciación y sus resultados han sido publicados en varias bases de datos públicas (**Bernal et al., 2006**).

- *Reactivo de Edman*: Debido a la fiabilidad que produce a partir del aminoácido 30 detectado, en la actualidad no es tan utilizado. Este reactivo separa el aminoácido N-terminal del resto del péptido y lo derivatiza para su detección, lo que permite la secuenciación por ciclos de separación y posteriormente la identificación por cromatografía (**Sancho, 2019**).
- *Espectrometría de masas*: Este método fue incluido en el estudio de biomoléculas en los años 70 y en la actualidad en un método muy útil. La herramienta de mapeo de masa péptida, busca dividir a la proteína en péptidos de tamaño medio y determinar sus masas y así compararla con datos ya obtenidos en bases de datos, la masa de un péptido es determinada por la masa de los aminoácidos que la conforma. Este proceso actualmente es automatizado, por un conjunto de programas informáticos (**Abián et al., 2008**).
- *Método Sanger*: Este método, se basa en la ruptura de la proteína en sitios específicos, con el fin de obtener un péptido de tamaño adecuado, los cuales serán separados por cromatografía. Se determina el orden de encadenamiento debido, que los péptidos de un mismo conjunto de secuencias se solaparán con las de otro grupo (**Sancho, 2019**).

1.1.13. Filogenia

El término filogenia aparece en el año de 1866 propuesto por Ernst Haeckel y deriva del griego filo (raza) y genea (generación). Es considerada la rama de la biología que hace énfasis en la evolución a través de los años e intenta agrupar las similitudes entre estos para definir especies o ancestros (**Hug et al., 2016**). La filogenia microbiana, apareció entre los años 1960 - 1970 y con esto los árboles filogenéticos basados en las secuencias de ADN y de algunas proteínas importantes (**Van Dyke, 2008**).

Desde el descubrimiento de las bacterias la taxonomía se ha asociado con la filogenia pues la clasificación fenotípica y molecular han permitido el análisis de varias características, de manera que una bacteria es colocada en un orden jerárquico ascendente de acuerdo al grupo donde se la asocia, a través de los años va

agrupándose en otras categorías, debido a los avances investigativos y tecnológicos (Otero, 2017).

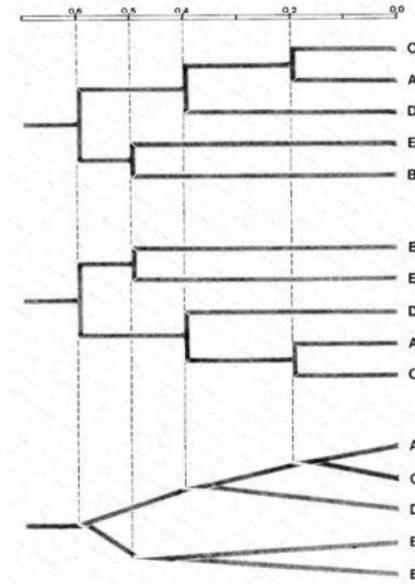
1.1.14. Árboles filogenéticos

Un árbol filogenético es una representación de la evolución de una especie, genes o población, donde cada uno de los nodos que conectan las ramificaciones muestran la variación que han tenido los linajes en el tiempo, marcando así la relación evolutiva de los organismos o estructuras (Sadava & Purves, 2008). Este diagrama evolutivo busca conectar las ramificaciones con un ancestro en común, de manera que muestre la divergencia de las secuencia de ADN por mutaciones y por tanto de estructuras proteicas (Sosa, 2009).

La construcción de árboles filogenéticos agrupa datos moleculares y fenéticos según el caso de estudio para definir la distancia evolutiva hasta el ancestro en común, en este caso existen principalmente cuatro métodos de inferencia filogenética, los cuales son: Máxima Parsimonia (MP), Maximum Likelihood (ML), Inferencia Bayesiana (IB) y Neighbor-Joining (NJ), este último es el más utilizado (Peña, 2011). El método Neighbor Joining permite la construcción de árboles filogenéticos a partir de datos de distancia evolutiva partiendo de la formación de pares de OTU'S (Saitou & Nei, 1987).

El alineamiento de secuencias es una herramienta bioinformática que se basa en determinar el parentesco de dos o más secuencias de nucleotídicas, con el fin de determinar el parentesco entre bacterias (Chaves et al., 2010). Zuckerkandl y Pauling (1962), proponen que para cada gen o proteína su tasa de evolución es aproximadamente constante, hipótesis que es soportada por Dickerson (1971), con su estudio en proteínas que afirma que haya cambios en los aminoácidos en el tiempo de divergencia en diferentes organismos, a lo que se define como la hipótesis del reloj molecular. La predicción filogenética con las secuencias implica un estudio de relaciones evolutivas desde distintos campos (Santamaría, 2020).

Figura 1
Tipos de árboles filogenéticos de diferentes OTU's



Tomado de (Crisci & López, 1983)

1.1.15. Aplicaciones de las secuencias de genomas

Las secuencias de genomas y la construcción de árboles filogenéticos no solo delimitan los taxones entre especies, también contribuye en análisis más complejos orientados al estudio del metabolismo bacteriano y de otros organismos (Orellana, 2002). Este tipo de datos también están ligados a enfoques como: la taxonomía polifásica y aplicaciones como:

- Pangenoma, se enfoca al estudio global de genes en un taxón bacteriano específico.
- Sesgo en el uso de codones, tiene como fundamento principal la degeneración del código genético para producir aminoácidos.
- Sintenia, una de las aplicaciones más útiles analiza las relaciones entre bacterias y los genes que comparten a través de su evolución en el tiempo.
- Genómica funcional, su utilidad radica en las relaciones entre los genes y sus productos (Arroyo, 2019).

1.1.16. Genómica funcional

La genómica funcional, es una herramienta comparativa de las funciones genéticas de un organismo, es decir, la relación entre los genes y sus productos, proporcionando una visión general del metabolismo y de los procesos reguladores de las bacterias, de esta manera se busca tener como resultados los perfiles metabólicos de un organismo (Arroyo,

2019). Se ha demostrado que los árboles filogenéticos orientados a las rutas metabólicas proporcionan información más compleja y precisa acerca de la evolución debido que considera los diferentes saltos evolutivos de los genes en el tiempo (**Laissue, 2011**). La genómica funcional, usa los genomas completos de las bacterias para los análisis, debido que muchos de los productos de los genes proporcionan características únicas al organismo (**Guevara, 2006**).

1.1.17. Enzimas en el metabolismo

Las enzimas son biomoléculas proteicas encargadas de acelerar la velocidad en los procesos metabólicos, sus funciones varían de acuerdo a sus estructuras y al centro activo, pues de este dependerá el acoplamiento con el sustrato. El plegamiento de las enzimas depende de la secuencia de aminoácidos e influye directamente en la función a cumplir por esta (**Ramírez, 2014**).

En las rutas metabólicas existe la participación de una gran cantidad de enzimas que al actuar en conjunto regulan el metabolismo celular, por tanto, las vías enzimáticas, es importante mencionar que un producto generado tiende a ser usado por la siguiente vía enzimática de ser necesario (**Aldabe, 2011**). El estudio de la estructura, plegamiento y funciones de una enzima es fundamental en el momento de conocer el papel que aporta en una ruta metabólica, una estructura tridimensional puede variar según su complejidad de la enzima y del plegamiento, esta última es producto del conjunto de varios de enlaces covalentes (**Fersht, 1980**) .

Estudios como de **López, 2013**, demuestran que las enzimas están relacionadas con la distribución geográfica de las especies, pues factores como la temperatura, pH afectan a ciertas enzimas, mientras en otras las regula para cumplir su función en rutas importantes. Al adaptarse un organismo a ciertas condiciones las enzimas también lo logran, permitiendo que la enzima evolucione su estructura para mantener sus funciones (**López, 2003**) .

Las enzimas pueden catalizar una gran cantidad de reacciones similares en diferentes especies de un mismo dominio, esto debido a que su objetivo principal es la regulación de la célula (**Fersht, 1980**). Ramas como la proteómica desde su aparición en 1994 se encarga de analizar grupos de proteínas que se expresan teniendo en cuenta factores

externos y el genoma, así permite determinar las relaciones estructurales entre enzimas y las reacciones metabólicas llevadas a cabo por una célula (**Torrades, 2004**).

1.1.18. Oxigenasas

Las oxigenasas juegan un papel fundamental en los diferentes metabolismos de las bacterias, estas enzimas son capaces de oxidar sustratos complejos, a través de la adición de uno o dos átomos de oxígeno molecular, al ser enzimas oxidoreductasas varios estudios apuntan a la obtención de resultados exitosos en la reducción de hidrocarburos (**Carrillo, 2019**).

Las oxigenasas participan en la degradación de compuestos xenobióticos y son enzimas de alto interés industrial, su participación en la degradación de alcanos, alquenos y alquinos es fundamental, así como también en la degradación de compuestos aromáticos que es un proceso complejo (**Ortega, 2010**), las dioxigenasas poseen un rol altamente importante para la ruptura de los anillos y por tanto para la degradación de compuestos aromáticos policíclicos (**Carrillo, 2019**).

La alta especificidad de las oxigenas a ciertos sustratos y su versatilidad, han permitido que estas enzimas logren eliminar compuestos extremadamente complejos, usualmente estas enzimas poseen un centro activo que contiene un elemento metálico para lograr los estados de oxidación. Se pueden dividir en monooxigenasa o dioxigenasas y dependiendo de sus funciones en un sustrato pueden variar (**French et al., 2013**). Las enzimas oxigenasas, se clasifican según el número de oxígenos que incorporan en el hidrocarburo a degradar y se conoce dos tipos: dioxigenasas y monooxigenasas, enzimas importantes en la degradación bacteriana aerobia (**M. García & Peralta, 2008**).

- **Monooxigenasas**

Las monooxigenasas son enzimas que incorporan un solo átomo de oxígeno al sustrato, se encuentran presentes en la degradación de compuestos aromáticos, alifáticos saturados e insaturados, estas enzimas se clasifican en dos subclases que varía según el cofactor, siendo estas: las monooxigenasas dependientes de flavina y las P450 monooxigenasas, donde las primeras necesitan de NADP o NADPH como coenzima y la presencia de flavina en su estructura le confiere su nombre, mientras que las P450 son especializadas en la degradación de ácidos grasos, varios alcanos y compuestos aromáticos (**P. Kumar et al., 2010**). Existen enzimas dependientes de coenzimas tal como: la pterina y de

algunos iones metálicos, es importante recalcar que a pesar que la mayoría depende de cofactores, existen aquellas que, con solo la presencia del oxígeno molecular, son capaces de degradar el sustrato (**P. Kumar et al., 2010**).

Varias enzimas monooxigenasas han sido identificadas en la degradación de n- alcanos, a pesar de las variaciones existentes en los sustratos y las enzimas específicas se mantienen que existen similitudes (**Izquierdo, 2013**). Las monooxigenasa destinadas a la degradación de alcanos de cadena corta, se las reconoce por ser enzimas relacionadas con la familia de las metano monooxigenasas (MMO) (**Di Martino, 2015**), el tipo particulada a pesar de ser una enzima muy inestable de manejar a nivel de laboratorio, se caracteriza por tener la capacidad de degradar una gran gama de hidrocarburos alifáticos e incluso aromáticos (**Valdebenito, 2015**). La degradación de alcanos de cadena media (>C14), son regulados por monooxigenasas de hierro no hémico del tipo AlkB, identificado en *Pseudomonas putida* GPo1, también existen registro de la participación de enzimas de la familia citocromo P450 enzimas del grupo hemo unido a cisteína y un centro catalítico con histidina, la primera identificada de esta familia se denominó como CYP153A1 en el metabolismo de *Acinetobacter sp.* (**Pérez et al., 2007**). En la degradación de alcanos largos se han detectado dos enzimas: AlkMa y AlkMb relacionadas a la cepa de *Pseudomonas putida* y se conoce la existencia de una tercera dependiente del Cu^{2+} (**Izquierdo, 2013**).

- **Dioxigenasas**

Las dioxigenasas se encuentran comúnmente presentes en la degradación de hidrocarburos con anillos aromáticos como: benceno, tolueno, naftaleno, antraceno, pireno y otros (**Gibson & Parales, 2000**). Donde se encarga de incorporar dos átomos de oxígeno a la estructura a catalizar, al estar presentes en el inicio de las rutas metabólicas son fundamentales en la dihidroxilación de los compuestos para la oxidación del núcleo aromático y por ende la ruptura del anillo. Estas enzimas se pueden clasificar en la familia oxigenasas de hierro no hemo de Riesk, que buscan la formación de areno *cis*-dioles, la agrupación de las oxigenasas generalmente se da según la correlación con los sustratos a degradar, por ejemplo: la familia del tolueno engloba a todas aquellas enzimas que degradan tolueno, benceno, isopropilbenceno, clorobenzenos y bifenilo (**Gibson & Parales, 2000**).

1.1.19. Degradación de tolueno y benceno

El tolueno y el benceno son compuestos de gran interés, debido a su alta toxicidad y por su baja solubilidad. La degradación de estos compuestos, puede ser llevada a cabo por varias especies bacterianas e incluso hongos, debido a la facilidad y efectividad que necesitan estos procesos, el uso de bacterias es más común. *Pseudomonas aeruginosa* es un ejemplo de bacteria degradadora y se ha detectado que este género es eficiente en periodos cortos y poseen gran capacidad en biorremediación, el tolueno puede ser degradado en concentraciones de 0,05 a 0,37 M a nivel de laboratorio (**Rangel et al., 2007**).

La degradación aerobia del benceno y tolueno, es llevada a cabo por monooxigenasas y dioxigenasas, donde la oxigenación es el paso fundamental para obtener productos más fáciles de eliminar. Se han reportado 5 rutas metabólicas para la degradación aerobia del tolueno y una de manera anaerobia, de tal forma que cada una de estas inicia con enzimas oxigenasas, a excepción de la anaerobia que inicia con una liasa. Las rutas aerobias han sido denominadas como: tod, tom, tbu, tou y pTol y varían por las enzimas que participan, estudios específicos ha detectado los genes que codifican para cada una de las enzimas y las rutas metabólicas descritas en diferentes especies de *Pseudomonas*, entre estas: *P. putida*, *P. ceparia*, *P. picketti*, *P. mendocina*, *P. stutzeri* (**Parales et al., 2000**).

El benceno, es un compuesto xenobiótico muy perjudicial para el ambiente y tóxico para los seres vivos, al igual que el tolueno las rutas metabólicas ha sido reportadas en *Pseudomonas spp.*, existen dos rutas alternativas que buscan llegar al metabolismo central del catecol y posteriormente al Ciclo de Krebs, las rutas inician con la adición de O₂ al hidrocarburo con la finalidad de producir la ruptura del anillo, estas enzimas participantes es la fenol monooxigenasa y benceno dioxigenasa (**Durán & Ramírez, 2013**). A nivel de laboratorio *Pseudomonas aeruginosa* tolera hasta concentraciones de 0,03-0,28 M, manteniendo una eficiencia más del 50% según reportes de **Cordero, 2007**.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

- Analizar bioinformáticamente las bacterias con capacidad de degradación de hidrocarburos y su mecanismo metabólico.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Elaborar una revisión sistemática y extensiva de las bacterias, el metabolismo y enzimas implicadas en la degradación de hidrocarburos.
- Identificar el origen metabólico de las enzimas dioxigenasas y monooxigenasas que degradan tolueno y benceno.
- Establecer un análisis estructural de las enzimas monooxigenasas y dioxigenasas presentes en las rutas metabólicas de las bacterias que degradan tolueno y benceno.

1.3. Hipótesis

1.3.1. Hipótesis nula

Los estudios bioinformáticos (Metaanálisis, Filogenia y Análisis estructural) de las bacterias degradadoras de hidrocarburos y de las enzimas (monooxigenasas, dioxigenasas) presentes en las rutas metabólicas del tolueno y benceno, no poseen relación evolutiva, por tanto, no es posible la similaridad estructural entre estas.

1.3.2. Hipótesis alternativa

Los estudios bioinformáticos (Metaanálisis, Filogenia y Análisis estructural) de las bacterias degradadoras de hidrocarburos y de las enzimas (monooxigenasas, dioxigenasas) presentes en las rutas metabólicas tolueno y benceno, poseen relación evolutiva, por tanto, es posible la similaridad estructural entre estas.

1.4. Señalamiento de las variables de la hipótesis

1.4.1. Variable dependiente

- Relación evolutiva.

1.4.2. Variables independientes

- Programas informáticos (DNA Baser Assembler, UGENE y PyMOL).
- Archivos pdb y fasta.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales, equipos y reactivos

2.1.1. Materiales

- Softwares bioinformáticos:
 - DNA Baser Assembler
 - UGENE
 - PyMOL
 - NCBI
 - KEGG
 - PROTEIN DATA BANK
- Material bibliográfico
 - Libros
 - Artículos Científicos
 - Revistas Técnicas
 - Bases de datos

2.1.2. Recursos tecnológicos

- Computadora personal

2.2. Métodos

2.2.1. Metaanálisis

Se realizó una búsqueda sistemática de bacterias degradadoras de hidrocarburos, basándose en la información de artículos online y de plataformas digitales (Springer, Dialnet, entre otras), con la finalidad de agrupar la información reportada en los diferentes trabajos de investigación. Con la información obtenida se creó una tabla de resumen que contiene: nombre de la bacteria, clase de hidrocarburo que degradan y tipo de bacteria por tinción de Gram, así como el metabolismo.

El metaanálisis consistió principalmente en compilar la información más relevante acerca de las bacterias degradadoras de los hidrocarburos, agrupando así: las bacterias con esta capacidad, metabolismos usados y enzimas relevantes que participen en el proceso. La investigación se realizó de manera informática utilizando los recursos que nos ofrece hoy en día la tecnología, por lo cual parte de la investigación sistemática consistió en definir los hidrocarburos adecuados para enfocarse dentro del presente trabajo de investigación,

las rutas metabólicas implicadas y por ende las enzimas fundamentales en cada una de estas. Los hidrocarburos para poner en estudio se eligieron bajo los criterios de:

- I. Dificultad del hidrocarburo a degradar: se definió este criterio, con el fin de elucidar las contribuciones, para futuras investigaciones acerca de la eliminación de los hidrocarburos.
- II. Tipo de hidrocarburo (alifáticos saturados e insaturados, aromático o poliaromático): criterio relacionado principalmente con la estructura del compuesto y por ende la complejidad de su degradación.
- III. Factibilidad de degradación: la existencia de investigaciones pasadas, dentro de este ámbito y por ende la existencia de rutas metabólicas.
- IV. Ruta metabólica usada: existencia de información y las posibilidades de contribuir con cosas nuevas, de relevancia a futuro.

Se definió al tolueno y benceno como los compuestos de estudio y se procedió a recopilar la información adecuada para los análisis posteriores, la primera parte consta de las rutas metabólicas, para lo cual se usó la base de datos de KEGG, la cual posee una colección de genomas, rutas enzimáticas y químicos biológicos. Una vez realizada la búsqueda correspondiente se obtuvo las rutas metabólicas existentes para cada hidrocarburo (tolueno y benceno), con esto se procedió a la selección de las enzimas que forman parte del análisis bioinformático, bajo los criterios de:

- I. Importancia de la enzima en la ruta metabólica.
- II. Actividad enzimática (basándose en trabajos reportados).

Figura 2
Base de datos KEGG



Nota. Tomado de página principal de KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)

Es importante mencionar, que existen gran variedad de enzimas, pero también se enfocó en que estas sean monooxigenasas y dioxigenasas, debido a la importancia que poseen dentro de la degradación de hidrocarburos, escogiendo un total de 7 enzimas.

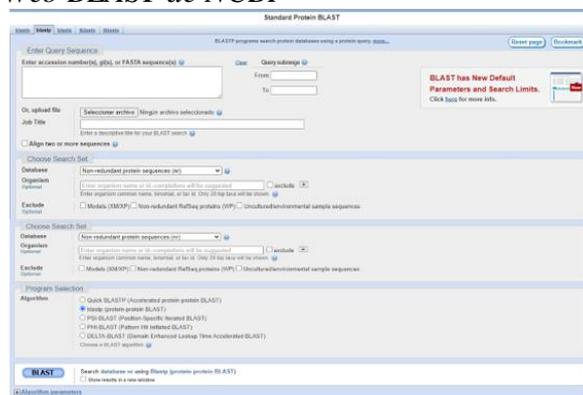
2.2.2. Filogenia de las enzimas

La filogenia busca conocer el origen de las enzimas y la comprensión de su evolución en el tiempo, para lo cual se definió la base de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI), como la plataforma adecuada para la obtención de las secuencias de aminoácidos de las enzimas. Realizada la búsqueda, se seleccionó la secuencia, donde debido al número de resultados obtenidos, se filtraron en base a la necesidad del investigador; para este estudio se tomó en cuenta la bacteria a la que pertenecía y su capacidad de degradar hidrocarburos.

Se descargó las secuencias seleccionadas mediante el menú “Send to”, el cual permite escoger el destinatario y el formato de descarga, en este caso “FASTA”, el proceso se realizó para cada una de las enzimas escogidas. Se procedió a realizar un BLAST, con las secuencias obtenidas, proceso que consistió en:

- Ingresar a la herramienta de Blast que ofrece el NCBI.
- Seleccionar la opción “Protein BLAST”.
- Subir el archivo FASTA, en la opción “Upload file”.
- Ejecutar el BLAST (configuraciones predeterminadas).
- Obtenido el BLAST, seleccionar “Download All”.
- Escoger el formato “XML”.

Figura 3
Web BLAST de NCBI



Nota. Tomado de página de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

El análisis BLAST, se usó para elaborar los árboles filogenéticos, de manera que cada uno de los resultados fueron tomados en cuenta. Se tomó cada una de las secuencias similares reportadas en el BLAST y se procedió acceder a la base de datos del NCBI, con los códigos de acceso (*Accession*) presentes en el BLAST. Se repitió el proceso de descarga de la secuencia de aminoácidos, antes mencionada, manteniendo el formato FASTA. Cada BLAST dio un resultado de máximo 100 secuencias aminoacídicas de bacterias, por tanto, se descargó un aproximado de 100 secuencias por cada archivo obtenido anteriormente.

Las secuencias, se unieron en un solo archivo mediante el programa DNA Baser Assembler, por defecto el archivo de salida es tipo “XML, por lo cual se usó el programa UGENE, para transformarlo en formato “FASTA”. Cada archivo unido contenía las secuencias del Blast y la secuencia de la enzima problema antes mencionada.

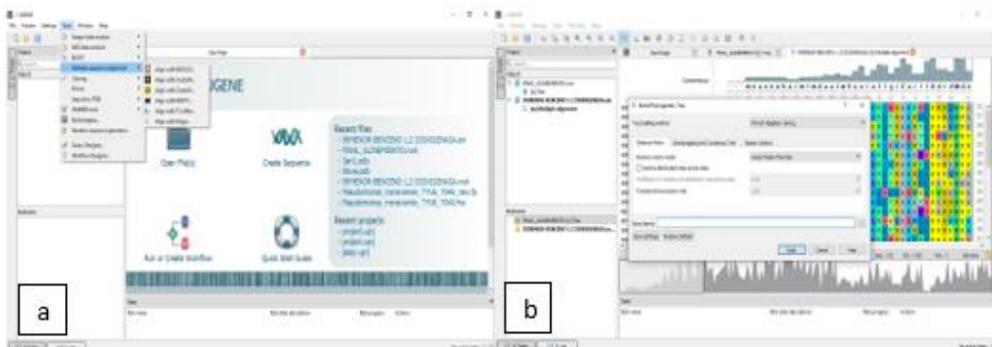
2.2.3. Construcción de los árboles filogenéticos

El programa UGENE, fue usado para la creación de los árboles filogenéticos, siguiendo los pasos:

- Elegir la opción “Tools”.
- Seleccionar “Multiple Sequence Alignment” y “Align with MUSCLE”.
- Ingresar el archivo a alinear, así como la ubicación y nombre del archivo resultado, configurar las opciones del alineamiento.
- Iniciar el alineamiento, con “Align”, el archivo resultado se obtuvo en formato “Clustal alignment file (aln.)”.
- Seleccionar “Build Tree”, para generar el árbol filogenético. El método usado para la construcción del árbol es PHYLIP Neighbor Joining y el modelo de matriz de distancia el de Jones -Taylor-Thornton.
- Editar el árbol filogenético, usando el menú “Tree Settings”.

Figura 4

(a) Alineamiento de secuencias (b) Construcción del árbol filogenético



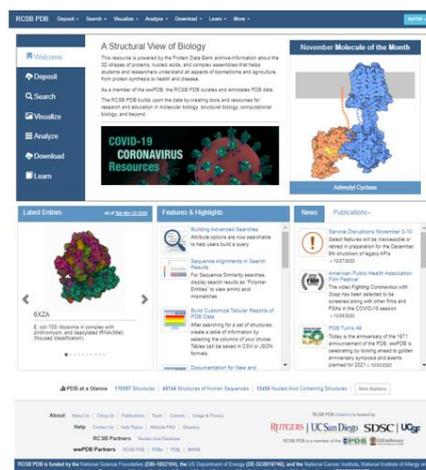
Los árboles filogenéticos, se crearon individualmente para cada enzima, con su respectivo BLAST, posteriormente se agrupó todas las enzimas de acuerdo a la ruta metabólica de cada hidrocarburo (tolueno y benceno), de esta manera se obtuvo un árbol filogenético general por hidrocarburo, con la finalidad de establecer la base para el análisis del origen enzimático. Es importante mencionar que las secuencias utilizadas no fueron modificadas, es decir, se usó directamente los archivos descargados de la base de datos.

2.2.4. Análisis estructural

El análisis estructural, partió con la definición de las enzimas a analizar, seleccionando 5 enzimas. Se usó la base de datos del Protein Data Bank (PDB), con el fin de obtener los archivos con las estructuras enzimáticas en 3D, la búsqueda de estas se realizó en la opción “Advanced search”, la cual permite elegir el tipo de búsqueda a realizarse, de esta manera se optó por la búsqueda a través de secuencias, tomando los archivos FASTA obtenidos en procesos anteriores, de manera que el número de resultados fue limitado. Se eligió la secuencia tomando en cuenta que la estructura de la enzima, satisfaga las necesidades del investigador y de la presente investigación. Se descargó las estructuras, a través de la opción “Download Files” y se seleccionó como formato “PDB”, obteniendo así las estructuras 3D de las enzimas de interés.

Figura 5

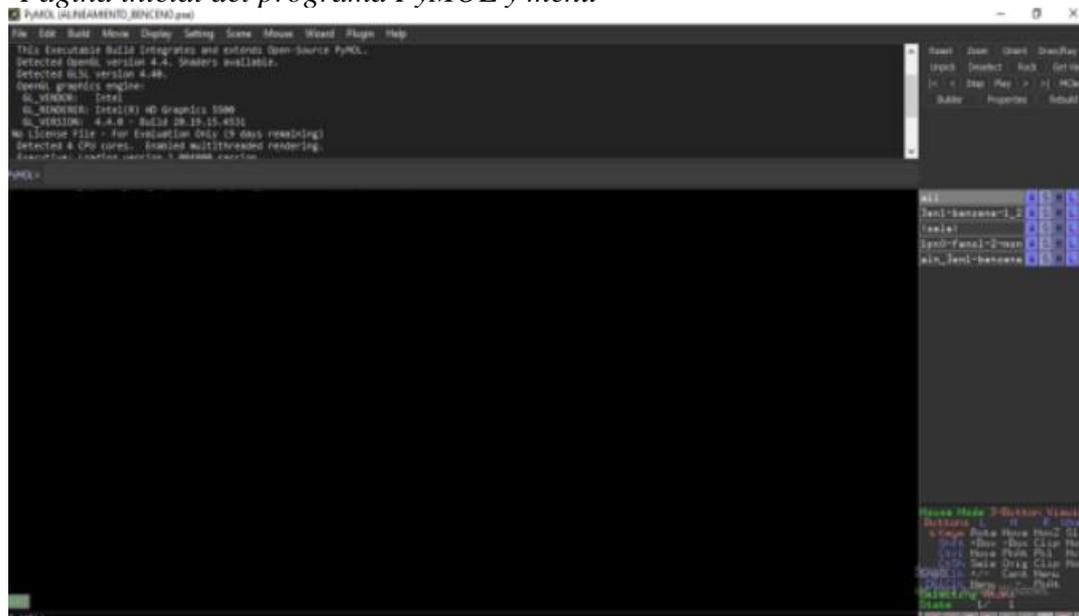
Base de datos PDB



Nota. Tomado de página de Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>)

Una vez obtenidas las estructuras, estas fueron cargadas en el programa PyMOL, un programa de múltiples funciones y adecuado para el análisis del presente trabajo. Al abrir el programa, la ventana inicial contiene una barra de herramientas tal como se observa en la Figura 6., donde la opción “File”, permite abrir los archivos PDB antes obtenidos, para esto se seleccionó la opción “Open”, escogiendo aquí el documento correspondiente a cada enzima, de esta manera permite visualizar las estructuras 3D contenidas en cada archivo PDB.

Figura 6
Página inicial del programa PyMOL y menú



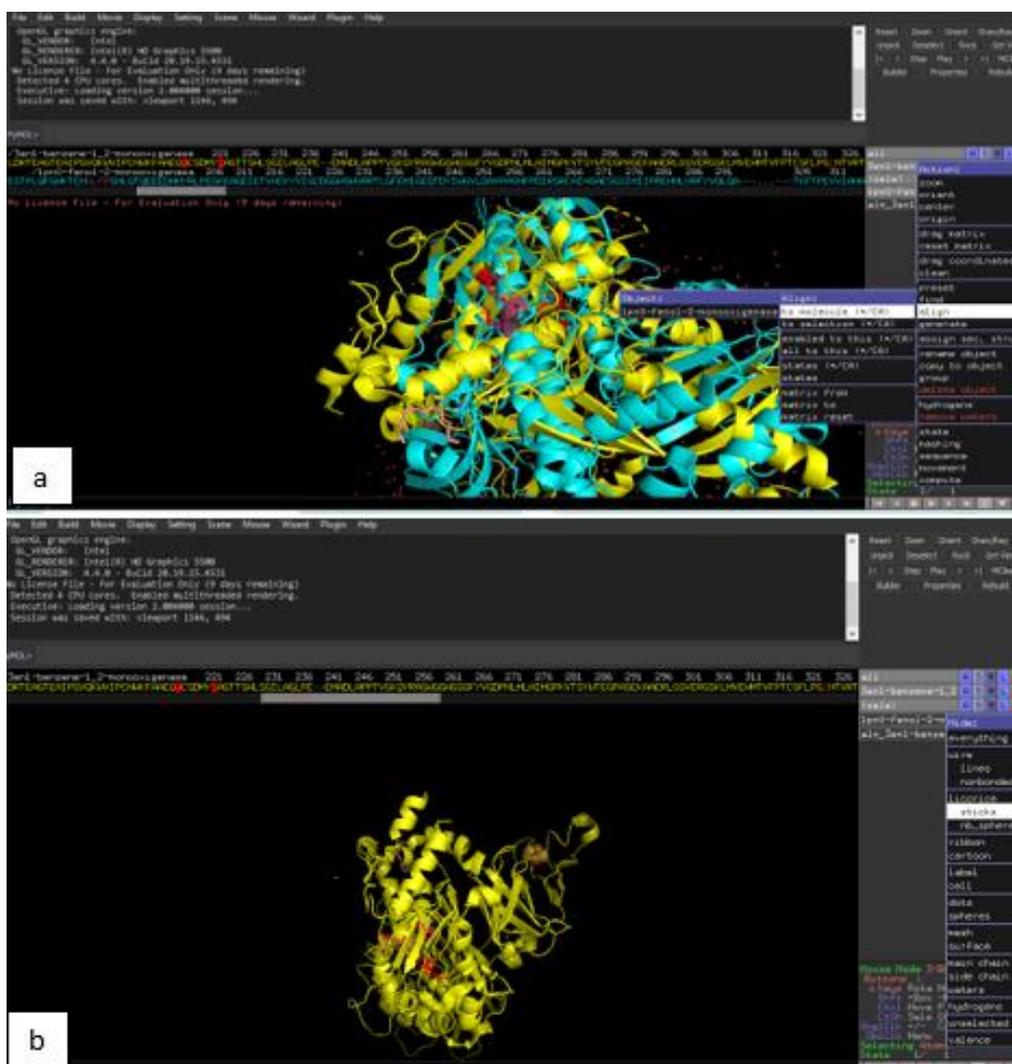
Nota. Tomado de PyMOL (Lyford DeLano, 2000)

Cada una de las estructuras fueron analizadas de manera individual, con el fin de localizar los sitios activos, uno de los puntos más importantes del análisis estructural, para esto se

recurrió al análisis de los artículos relacionados con las estructuras obtenidas de la página de PDB, una vez obtenidos los residuos que rodean al sitio activo, se procedió a diferenciarlos de las hojas alfa y beta de las estructuras enzimáticas, procediendo con los siguientes pasos:

1. Seleccionar la opción “Display” y escoger “Sequences” (permitirá visualizar la cadena de aminoácidos).
2. Seleccionar el aminoácido y dar clic izquierdo para modificar el color.
3. Seleccionar la opción “Sticks”, tal como se muestra en la Figura 7 (a), para visualizar las estructuras aminoacídicas.

Figura 7
Ejemplo de alineamiento estructural y opciones del menú



Nota. a) Opciones del menú desplegada de la opción “Align”. b) Menú desplegado de Hide (H), opción “Sticks”. Esta figura fue obtenida usando PyMOL (<http://www.pymol.org>).

Una vez, localizados los residuos del sitio activo en cada una de las enzimas, se procedió a agrupar estas en una sola ventana de trabajo de PyMOL, de acuerdo a la ruta metabólica del hidrocarburo en donde participan. Al tener en una sola ventana las enzimas por cada hidrocarburo se procedió con el proceso de alineamiento estructural (Figura 7 (b).), con los siguientes pasos:

1. Escoger una de las enzimas (Menú izquierdo).
2. Seleccionar la letra A, del menú y escoger la opción “Align”.
3. Seleccionar “to molecule (*CA)”.
4. Escoger la enzima con la que se va alinear.

Una vez realizado el último paso, el programa automáticamente, realiza el alineamiento estructural de las enzimas de interés. Este mismo proceso, fue llevado a cabo para las enzimas que participan en la ruta de degradación del tolueno. Cabe recalcar que en el proceso se realizó un alineamiento por pares, por hidrocarburo y finalmente de manera general, agrupando todas las enzimas.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de resultados

3.1.1. Metaanálisis

A lo largo de la investigación realizada se observó una gran cantidad de bacterias capaces de degradar hidrocarburos, incluyendo el tolueno y benceno. Una de las familias más expuestas en los trabajos de investigación son las *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, entre ellas la especie de *Pseudomonas putida*, es una especie que se ha tomado como modelo de estudio en el ámbito de la biorremediación, dándole gran enfoque por su alta eficacia y fácil desarrollo tanto en laboratorio como en campo. Reportes como los de **Braibant (2004)**, afirman el uso de bacterias dentro de la biorremediación de suelos afectados por derrames, mientras que **Di Martino (2015)**, reporta un listado de *Pseudomonas*, entre ellas: *P. extremaustralis*, *P. fluorescens*, *P. oleovans* y *P. aeruginosa*, cada una de estas cepas capaces de crecer en hidrocarburos como una fuente única de carbono.

Los reportes en diferentes trabajos de investigación, traen a deducir que existe una gran diversidad de bacterias degradadoras de hidrocarburos, que aún no han sido utilizadas en medio *in situ* para reparaciones ambientales, a pesar de existir estudios de este ámbito a nivel de laboratorios. La mayoría de estas cepas han sido recuperadas de ambientes perjudicados por derrames de petróleo y han sido capaces de adaptarse por supervivencia. En el Anexo 1., se muestra un listado de bacterias, que se conocen degradan hidrocarburos (saturados, insaturados y aromáticos), dando a elucidar que las poblaciones bacterias son capaces de consumir los hidrocarburos sin sufrir bioacumulación, en su sistema.

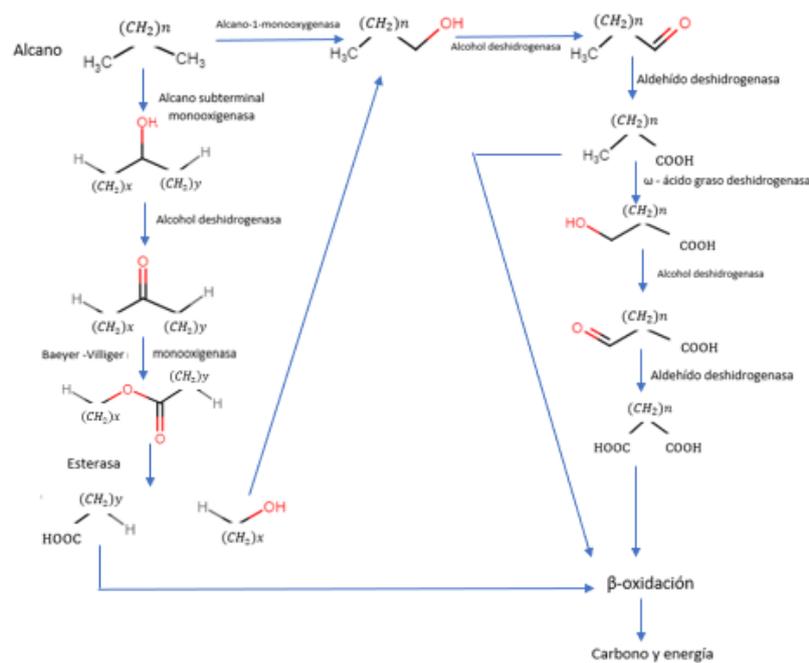
Cada especie bacteriana posee un metabolismo diferente y por ende este varía según el hidrocarburo (saturados, insaturados y aromáticos), cada uno de estos es metabolizado de manera diferente, con un mismo principio, el usar el hidrocarburo como única fuente de carbono para la producción de energía. **Fortúrbel (2011)**, manifiesta que la energía generada por los microorganismos, resultado de su metabolismo, es de gran utilidad, permitiendo así su empleo en biorreactores y tecnologías enfocadas para la descontaminación de aguas y suelos.

Toda bacteria degradadora de hidrocarburos cuenta con sistemas metabólicos especializados en esta función, permitiendo así la supervivencia bacteriana y el beneficio de eliminar estos compuestos perjudiciales para el ambiente. Los primeros reportes de

degradación de hidrocarburos de tipo saturados (alcanos), se dieron con cadenas carbonadas de 44 átomos, un ejemplo es: *Acinetobacter* capaz de degradar alcanos de cadena largas (C13-C44). La degradación de hidrocarburos saturados tales como: los alcanos o cicloalcanos, comienza con la adición de oxígeno en el sustrato (alcanos), catalizado por oxidasas, con el fin de romper las estructuras hidrocarbonadas, la Figura 8. , muestra la ruta metabólica general que se ha tomado como modelo, para comprensión del proceso de degradación, las primeras enzimas son las oxidasas, que según **Van Beilen et al. (2003)**, la mayoría de estas pertenecen a la familia de las citocromo P450, enzimas especializadas en la degradación de alcanos.

Figura 8

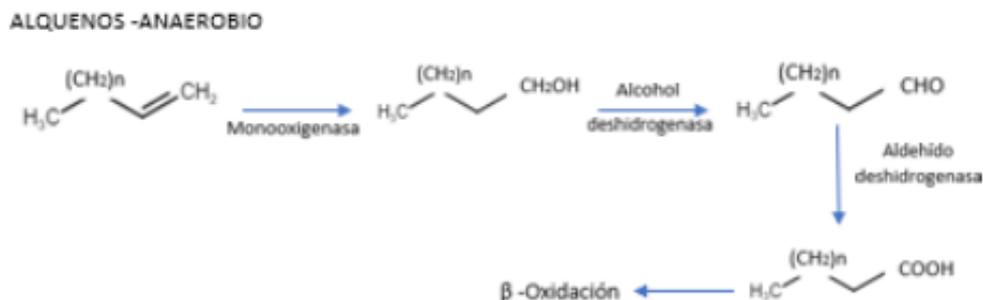
Ruta general de la degradación de hidrocarburos saturados de manera aerobia.



Fuente: **Van Beilen et al. (2003)**

A pesar de la existencia de una gran variedad de bacterias no se ha tenido reportes específicos de degradación de hidrocarburos insaturados, por lo cual **Grossi et al. (2008)**, reporta que estos se degradarían de la misma manera que los saturados, usando el mismo principio enzimático y también se puede llevar a cabo por degradación anaerobia, como una de las opciones de degradación de alquenos y alquinos (Figura 9.), el resultado es obtener un compuesto que puedan ingresar a la β - oxidación para obtener energía para la célula, tal como se muestra en la Figura 9.

Figura 9
Ruta anaerobia para la degradación de alquenos



Fuente: **Van Beilen et al. (2003)**

Los compuestos aromáticos son los más complejos de degradar, debido a su anillo y el número de estos, lo que complica la degradación convencional como en los casos antes expuestos, la degradación inicia con la participación de las oxigenasas sean estas monooxigenasa o dioxigenasas, estas enzimas son fundamentales para la ruptura de los anillos aromáticos por la adición de oxígeno y por tanto buscan ayudar a transformar los compuestos aromáticos a acetyl CoA.

Entre los compuestos más comunes presentes en derrames de petróleo se encuentra el tolueno y benceno, compuestos aromáticos de un solo anillo y estructuras similares, por lo cual estos fueron elegidos, para el presente trabajo. **Meléndez et al. (2015)**, en su estudio enfocado a degradación de hidrocarburos aromáticos, manifiesta que varias cepas bacterianas pueden lograr transformar el tolueno y benceno a compuestos menos tóxicos, estudio que se llevó a cabo en condiciones donde las bacterias fueron colocadas en un medio enriquecido de estos compuestos, como resultados existió un consumo es rápido y eficaz en condiciones de pH 7,1, apoyando así a la importancia de este trabajo para futuras investigaciones. Se ha reportado que en biorremediación encontrar tolueno y benceno como contaminantes de suelos o aguas, causado por derrames es común, por lo cual la presencia de *Pseudomonas* también acompaña este hecho, se puede decir a nivel que estas comunidades microbianas van en aumento el contaminante va en disminución.

La elección del tolueno y benceno como los compuestos de estudio se basó en los criterios presentados, estos hidrocarburos aromáticos son complejos de eliminar y a diferencia de un alcano conlleva un proceso más lento y complicado, que necesita de más energía celular para ser llevado a cabo, **Acuña et al. (1999)**, señala específicamente a los

compuestos parte de los BTEX, como compuestos altamente tóxicos y difíciles de controlar dentro del ambiente, varios trabajos investigativos se ha realizado alrededor de este ámbito y no han logrado dilucidar por completo los procesos a nivel enzimático. **Acuña et al. (1999)**, menciona que un cultivo mixto de bacterias degradadoras son capaces de consumir tolueno y benceno a una velocidad de 0,14 y 0,44 h⁻¹, respectivamente.

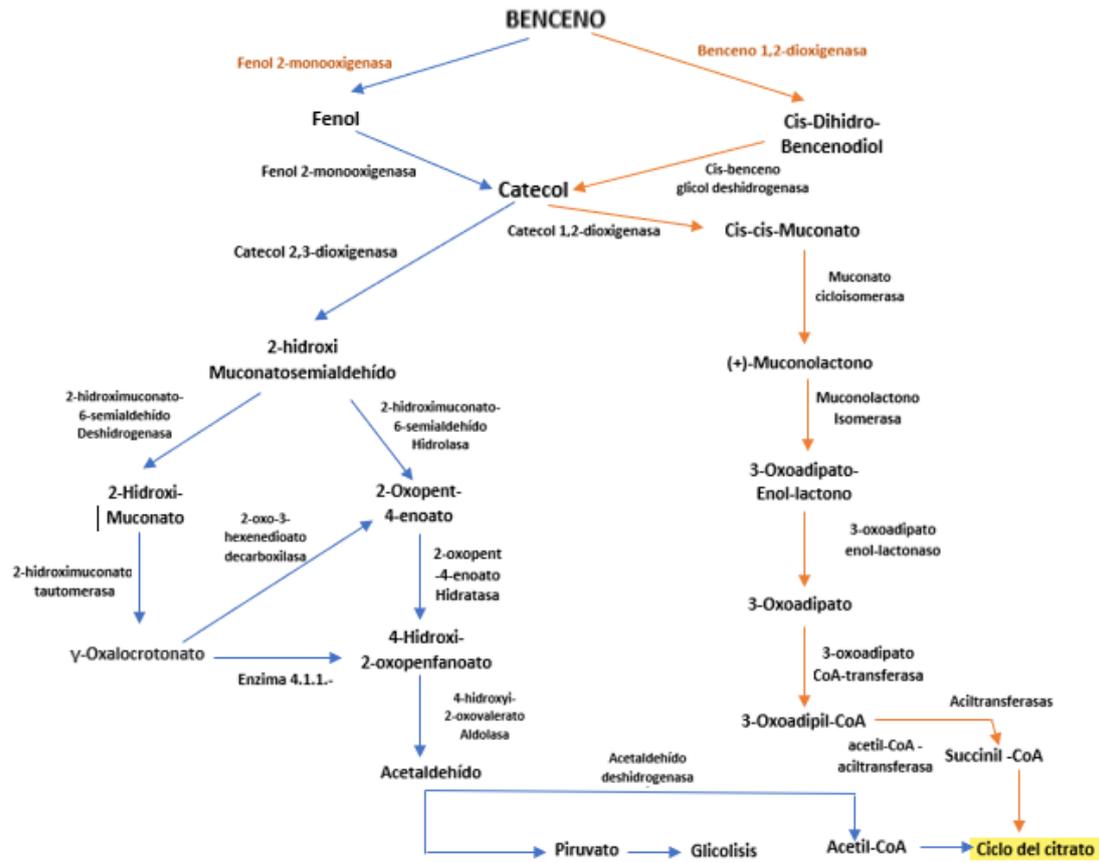
A lo largo de la investigación del presente trabajo, la elucidación de las rutas metabólicas ha sido fundamentales para comprender el proceso con él se lograr degradar los hidrocarburos, resultados presentados en la Figura 10. y Figura 11., correspondiente a las rutas metabólicas del benceno y tolueno con las enzimas participantes, respectivamente.

El benceno es compuesto aromático monocíclico que posee 6 carbonos y 6 hidrógenos, la complejidad de su degradación, está dada sus tres enlaces dobles que forman parte de su estructura. Se conoce que los hidrocarburos aromáticos tienen a reaccionar por sustitución heterolítica, proceso que se sabe es llevado a cabo por el oxígeno para la desestabilización del enlace en la molécula aromática. En la Figura 10., se muestra que el paso principal e inicial de la degradación, es llevado a cabo por el fenol 2- monooxigenasa y benceno 1,2-dioxigenasa, correspondiente a una división de dos rutas metabólicas.

Jindrová, E. (2002), afirma que las monooxigenasas cumplen su función, atacando al anillo directamente, con la incorporación de oxígeno, para producir la destrucción de este, a través de una reacción de oxidación. Mientras la dioxigenasa, ataca al anillo aromático para el mismo resultado, formando compuestos hidroxilados (reacción de hidroxilación). **Bamforth & Singleton. K. (2005)**., muestra en sus estudios que la formación de cis-dihidrodiol es común, pues de aquí parte la obtención de intermediarios como el catecol, gracias a la deshidrogenación de los dioles. El catecol es un compuesto intermediario manejado por mineralización mediante fisión del anillo aromático (**Bamforth & Singleton, 2005**), tal como se ve en la ruta metabólica (Figura 10.). Una vez obtenido el catecol existen tres rutas que conllevan a la formación de un compuesto CoA, que ingresará al ciclo del citrato, debido que busca obtener energía para la célula, con esta única fuente de carbono, afirma **Varela (2002)**, que las deshidrogenasas son enzimas encargadas de descomponer y trabajar en conjunto con las enzimas oxidasas.

Figura 10

Rutas metabólicas (aerobia) de la degradación del benceno.



Nota. Se presenta las dos rutas aeróbicas de degradación (líneas azules y tomate) y las enzimas iniciales en color rojo claro. Modificado de la Base de Datos KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

El tolueno es un compuesto aromático, con un sustituyente metil en su estructura, es considerado monocíclico igual que el benceno, por su único anillo. En la Figura 11., se muestra la ruta de degradación, marcado con rojo las enzimas iniciales en el proceso de ruptura del anillo, al igual que el benceno la participación de monooxigenasas y dioxigenasas es fundamental. El proceso inicia con las oxigenasas, **Bamforth et al. (2005)**, por el ingreso del oxígeno, que ataca a los sustituyentes de la estructura (grupo metilo), de manera que se formará los intermediarios presentados en el resto de la ruta metabólica. Las dioxigenasas trabajan con dos oxígenos, el primero ingresa al anillo aromático y el segundo átomo se usa para la oxidación de grupo metilo, el resultado es la formación de compuestos 2-hidroxi-sustituídos, que a lo largo del proceso serán mineralizados (**Bamforth & Singleton, 2005**).

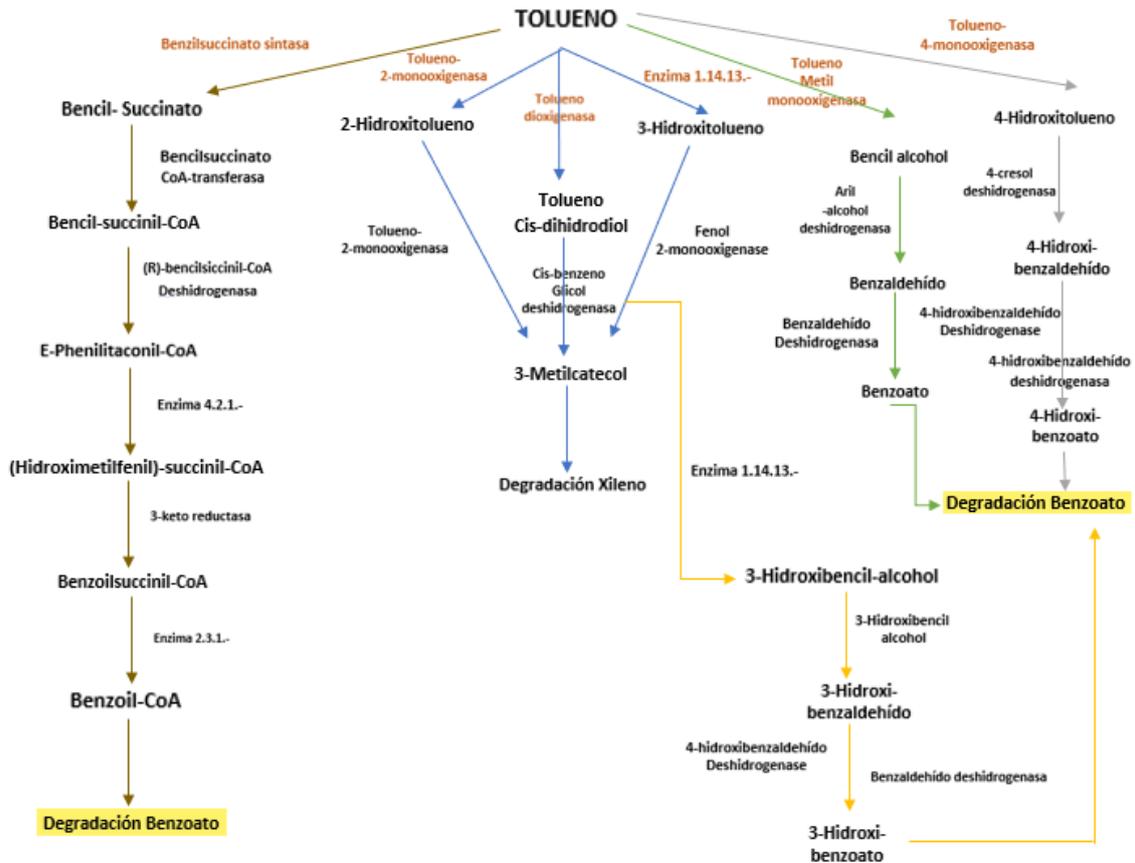
En la Figura 11., se muestra cuatro rutas metabólicas diferentes, donde las rutas señaladas con líneas azules son rutas entre conectadas que finalizan al ingresar a la degradación del xileno. Algunas de las enzimas en esta ruta metabólica cumplen funciones similares y por ende finalizará en la obtención de intermediarios que se agrupan en el Ciclo de Krebs, **Bertoni, et al. (1998)**, menciona que el xileno comparte dos rutas con el tolueno, estas con denominadas como: *tou* y *pTol*, ya que las dos usan como intermediario el 3-metilcatecol que será transformado a piruvato acetaldehído, lo que demuestra la conexión de dos de las rutas, tal como se observa en el diagrama presentado en la Figura 13. La ruta de la mitad marcada de color azul perteneciente a la enzima tolueno dioxigenasa y está ligada como la ruta *tod* que se distingue por el complejo multienzimático y lo destaca de las demás rutas. En la Figura 11., se muestra inicialmente a la enzima 1.14.13.-, esta enzima aún no se encuentra reportada en la base de datos de KEGG, aunque **Kahng et al. (2000)**, propone que esta ruta es llamada *tbu* y esta enzima corresponde a tolueno 3-monooxigenasa, siendo la única enzima en participaren en la ruta, para formar el 3-metilcatecol.

La ruta marcada de plomo y verde, corresponde a dos de las últimas rutas aerobias por la cual se degrada el tolueno, esta iniciada con la enzima tolueno 4- monooxigenasa y el tolueno metil monooxigenasa, que buscan la formación de benzoato como intermediario, la degradación del benzoato tiene como resultado final la obtención de productos que ingresen al ciclo del citrato. **Sentchillo et al. (2000)**, ha descrito esta rutas en el género *Pseudomonas* y *Alcaligenes eutrophus*, demostrando que el proceso se lleva a cabo con la introducción de dos grupos hidroxilos, para producir la reacción de hidroxilación y para la fisión del anillo (**Carmona & Díaz, 2005**).

La última ruta descrita en la Figura 11., marcada de color tomate es la ruta anaerobia, que en muchas bacterias se ha demostrado que es eficaz al igual que las aerobias. **Villarreal et al. (2014)**, bajo su estudio de degradación de hidrocarburos aromáticos, comprobó que esta ruta puede ser llevada a cabo por un gran grupo de bacterias fermentativas, sulfato reductoras, desnitrificantes y algunas metalogénicas. En base a la ruta metabólica se puede afirmar que existe una activación inicial y posteriormente se logra obtener un compuesto derivado de CoA y como producto final Benzil CoA, como el intermediario central que será degradado por la vía de pimílica o adípica, obteniendo productos más simples como el acetyl CoA.

Figura 11

Rutas metabólicas (aerobias y anaerobia) de la degradación del tolueno.



Nota. Se presenta la ruta anaerobia de degradación (líneas cafés) y las rutas aerobias (líneas azul, verde, amarillo y plomo). Modificado de la Base de Datos KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

3.1.2. Filogenia de las enzimas

La filogenia ha sido una herramienta que aportado a innumerables avances a nivel de investigación y, por ende, para la comprensión de la evolución, bases de datos han puesto al alcance de los investigadores varias herramientas para lograr este cometido. **González (2016)**, afirma que el NCBI es una de las bases más completas en la actualidad, creada desde 1992 y su contenido público incluye ADN, ARNm, ADNc, secuencias y datos crudos, sin mencionar la información de estructuras y material bibliográfico de apoyo.

Las secuencias obtenidas de las enzimas, presentadas en la Tabla 2, corresponden a las enzimas que se presentaron de rojo claro en las Figura 10. y Figura 11., tomadas en cuenta por el hecho de iniciar los procesos de degradación del tolueno y benceno, **Aldabe (2011)**, evidencia esta idea, pues estas enzimas poseen el sitio donde se unirá el sustrato (sitio

activo), para formar el complejo enzima -sustrato, una vez obtenida esta reacción el producto continuará a lo largo de la ruta metabólica, como antes se ha mencionado.

Tabla 2
Enzimas seleccionadas para el estudio

Enzima	Código NCBI	Bacteria	Ruta metabólica
Bencilsuccinato sintasa	KGO32693.1	Desulfobulbus sp.	Tolueno /Anaerobia
Tolueno 2-monooxigenasa	ABF08210.1	Cupriavidus metallidurans	Tolueno
Tolueno dioxigenasa	ABQ79011.1	Pseudomonas putida	Tolueno
Tolueno 4- monooxigenasa	AAA26001.1	Pseudomonas mendocina	Tolueno
Tolueno metil- monooxigenasa	CAC86827.1	Pseudomonas putida	Tolueno
Benceno 1,2-dioxigenasa	WP_184065188.1	Sphingosinicella soli	Benceno
Fenol 2-monooxigenasa	SSR08645.1	Acinetobacter nosocomialis	Benceno

- **BLAST y filogenia**

El BLAST permite la identificación de regiones comunes o de dominios que coincidan con la secuencia problema (*query*), a través de un alineamiento con las secuencias presentes dentro de la base de datos (*target*). Cada uno de los resultados obtenidos variaban de porcentajes tal como se presenta en el resumen de Tabla 3., hecho que demuestra que existe una gran cantidad de secuencias homólogas a la de las proteínas problemas, del presente estudio. El archivo de resultados BLAST arrojan varios datos, entre ellos el E-value, por el cual será ordenado los resultados, por ende, los números más bajos se en contratan al final, **Santamaría (2017)**, demuestra que el valor más pequeño, es tomado como un alineamiento significado, es decir, la coincidencia del *query* es alta con respecto al *target*. No obstante, algunas veces los falsos positivos se pueden presentar, debido a la existencia de proteínas homólogas.

Tabla 3
Resumen de los query cover obtenidos del BLAST

Enzima	Intervalos Query cover (%)
Bencilsuccinato sintasa	75-100
Tolueno 2-monooxigenasa	94 -100
Tolueno dioxigenasa	81 - 100
Tolueno 4- monooxigenasa	95 – 100
Tolueno metil-monooxigenasa	39 -100
Benceno 1,2-dioxigenasa	92 – 100
Fenol 2-monooxigenasa	100

Santamaría (2017), menciona que se puede considerar como alineamientos perfectos a los valores de 10^{100} , valores que generalmente se encuentran en la parte superior de los resultados BLAST y son cercanos a cero, en caso de la Anexo 2., se tiene los primeros valores inicialmente cercanos a este tipo en los primeros resultados, incluyendo una secuencia del mismo nombre de la enzima (benceno 1,2-dioxigenasa), perteneciente a *Sphingorhabdus sp.*, con un *query cover* de 100%, donde el alineamiento muestra de 84/164 de aminoácidos, alineados completamente, tal como este resultado a lo largo del Anexo 2, se observan varias coincidencias similares al ejemplo expuesto, estas coincidencias se podría explicar por la variedad de bacterias existentes que son capaces de degradar benceno y poseen la misma ruta metabólica para este proceso.

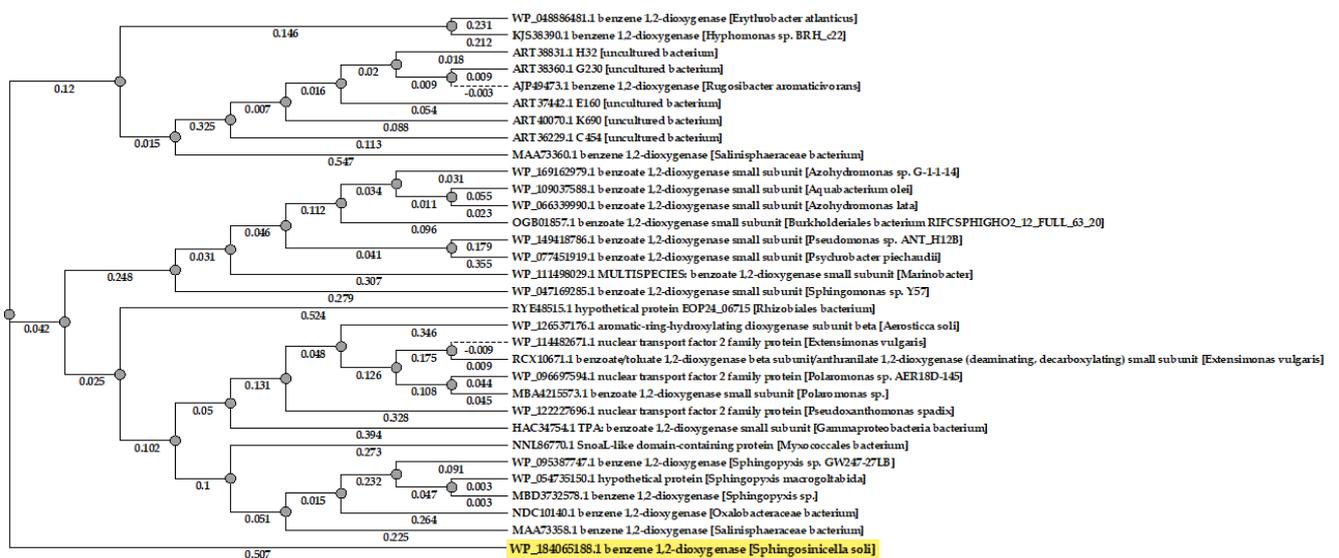
El árbol filogenético, presentado en la Figura 12., muestra la relación de las enzimas, a través de la formación de las ramificaciones, donde en primera instancia tenemos que el benceno 1,2-dioxigenasa (amarillo), se encuentra al final y de donde parten las demás ramificaciones, por tanto, esta es el ancestro más lejano y común entre todas las demás secuencias. De esta parten dos ramificaciones, la segunda ramificación (de arriba hacia abajo), debido a la distancia pequeña que presenta, demuestra que esta divergencia fue más pronta que el primer linaje (primera ramificación). Del segundo linaje se presenta dos ramificaciones más que muestran que la evolución de la enzima desde este punto fue mucho más rápida, esto puede ser debido a diferentes necesidades a las que hayan sido

expuestas las bacterias a las que pertenece cada *target*, presentado en el árbol filogenético. Es importante mencionar que se usó los resultados del BLAST con un *query cover* $\leq 95\%$, para una comprensión más adecuada de la evolución enzimática.

Benceno 1,2-dioxigenasa, fue purificada por primera vez en 1973, definiendo que era un enzima multicomponente formado por 4 proteínas y una de estas por dos subunidades, donde el primer componente del complejo se trataba de una ferredoxina reductasa, encargada de la transferencia de electrones. En la Figura 12., la enzima de código RYE48S15.1, pertenece a una proteína hipotética que posee una ramificación sola en el segundo linaje, definida por **Crombie et al. (2018)**, esta enzima es capaz de degradar isopreno, un gas producido por arbusto leñosos en grandes cantidades, donde su unidad principal es una isopreno monooxigenasa funcional, que trabaja de manera similar a la enzima benceno 1,2- monooxigenasa. El linaje que agrupa las benzoato 1,2-dioxigenasa, son enzimas multicomponentes, parte de la familia de las oxidoreductasa que actúa como donadores de electrones, a través de la incorporación o reducción del oxígeno molecular (**BRENDA:EC 1.14.12.10, n.d.**), funciones similares a la que cumple la benceno 1,2-dioxigenasa. **Cowles et al. (2000)**, explicó que el benzoato puede ser degradado, adecuado con el regulador XylS para inducir la expresión del operón *meta*, ruta codificada por el plásmido TOL, encargado de la degradación del tolueno. Por ende, la enzima benceno 1,2-dioxigenasa, a divergido en el tiempo y ha conseguido adaptarse para las necesidades de las diferentes bacterias y en la mayoría de los casos mantener su función. Según el análisis para: ART38369.1, WP_11448267.1 y WP_054735150, son enzimas también se encuentran ligadas a la degradación de hidrocarburos aromáticos.

Figura 12

Árbol filogenético de los resultados BLAST vs la enzima problema (Benceno 1,2-dioxigenasa)



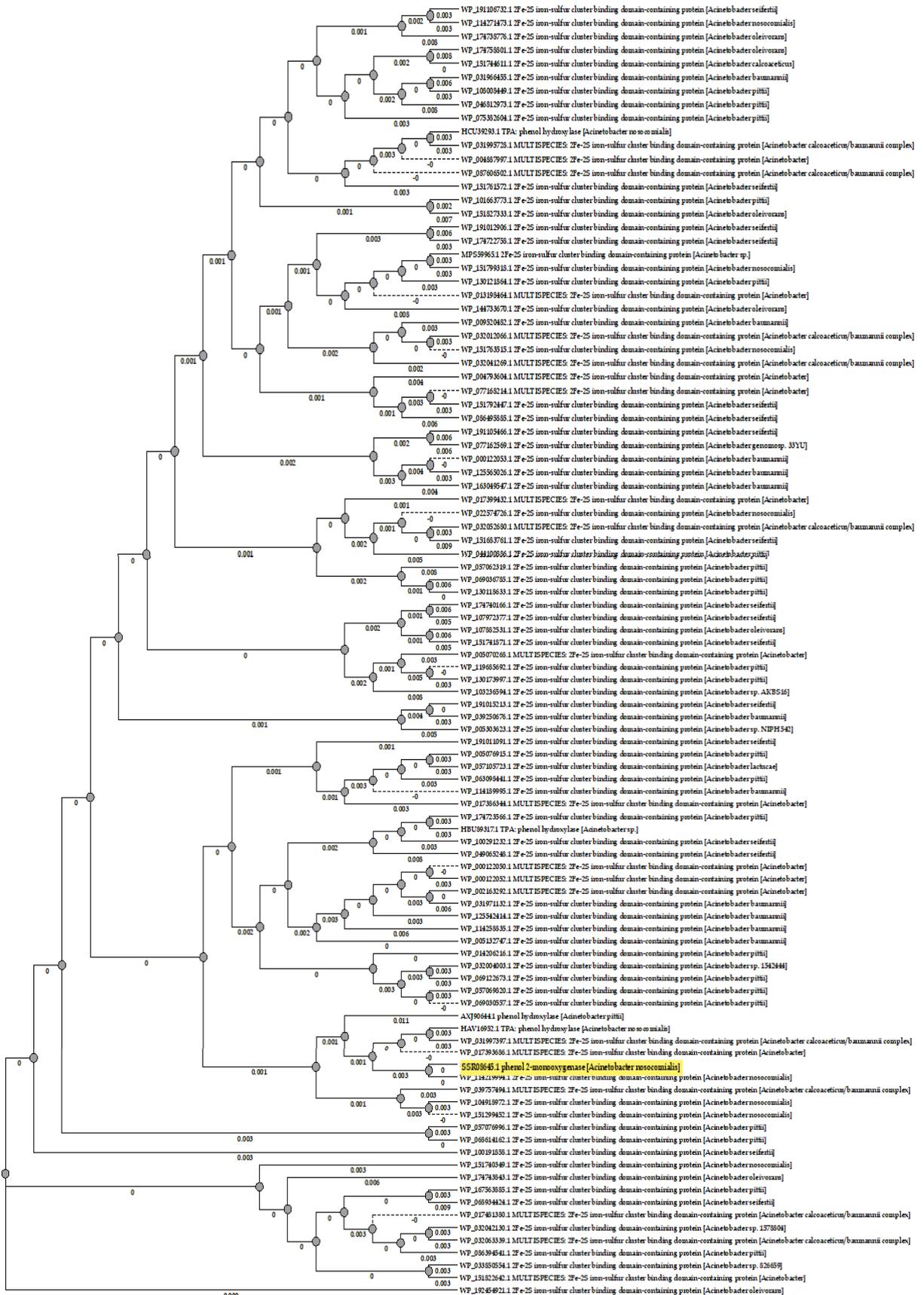
El Anexo 3., corresponde a la enzima fenol 2-monooxigenasa y los resultados del BLAST obtenido muestra un solo valor de E-value de todas las secuencias, que es de 0.0, lo que se considera como un alineamiento perfecto, esto se puede explicar por el tamaño de las secuencias que conformaban los *targets*, pues son secuencias de length grandes y hay más posibilidades que el *query*, pueda conseguir tener un alineamiento perfecto en la mayoría de los casos.

La construcción del árbol filogenético, se realizó tomando en cuenta todos los resultados obtenidos del BLAST y se presenta en la Figura 13., donde se observa que todas las ramificaciones derivan de la enzima código WP_192454921.1, ubicada al final del árbol, este se considera el ancestro común de todos los demás *targets* en comparación, esto significa que hubo un momento en el tiempo que esta secuencia enzimática sufrió cambios hasta obtener los diferentes linajes que se produjeron, al inicio del árbol se observa la separación de las ramificaciones en dos linajes completamente diferenciados pero con un nombre igual, en bacterias de diferentes tipos, lo que lleva a deducir que existe una relación en común, entre todos ellos. El ancestro en común es un componente proteico especializado, presentes en la mayoría de enzimas encargadas de la degradación de hidrocarburos, es denominado ferredoxina, las enzimas con estas subunidades pertenecientes a una misma familia y poseen la característica de ser proteínas de hierro y azufre, encargadas de la transferencia de electrones, en múltiples reacciones, en el año de 1962 la primera enzima de este tipo fue purificada y años más tarde se conoció que el grupo Fe-S, era capaz de captar y aceptar electrones (**Rypniewski et al., 1991**).

Se conoce que varias enzimas oxidoreductasas poseen este dominio redox entre ellas la fenol 2-monooxigenasa. **Fukuyama et al. (1989)**, menciona que las ferredoxinas antes de su actual clasificación han sufrido múltiples eventos en sus secuencias, pero manteniendo regiones conservadas, entre estos cambios se encuentran: duplicación, transposición y fusión de genes, lo que pudo haber causado su aparición en múltiples proteínas y por tanto su aparición en gran cantidad de organismos de diferentes especies. Tal como se observa en la Figura 13. la divergencia de esta proteína, ha llevado a obtener con el tiempo algunas de las oxigenasas de importancia dentro de la biorremediación y la fenol 2- monooxigenasa (amarillo), no es la excepción, por eso se observa su aparición en una de las ramificaciones de primer linaje a partir del ancestro en común. También de esta manera se logra comprender la relación directa de cada uno de los targets presentes en el árbol filogenético.

Figura 13

Árbol filogenético de los resultados BLAST vs la enzima problema (Fenol 2-monooxigenasa)

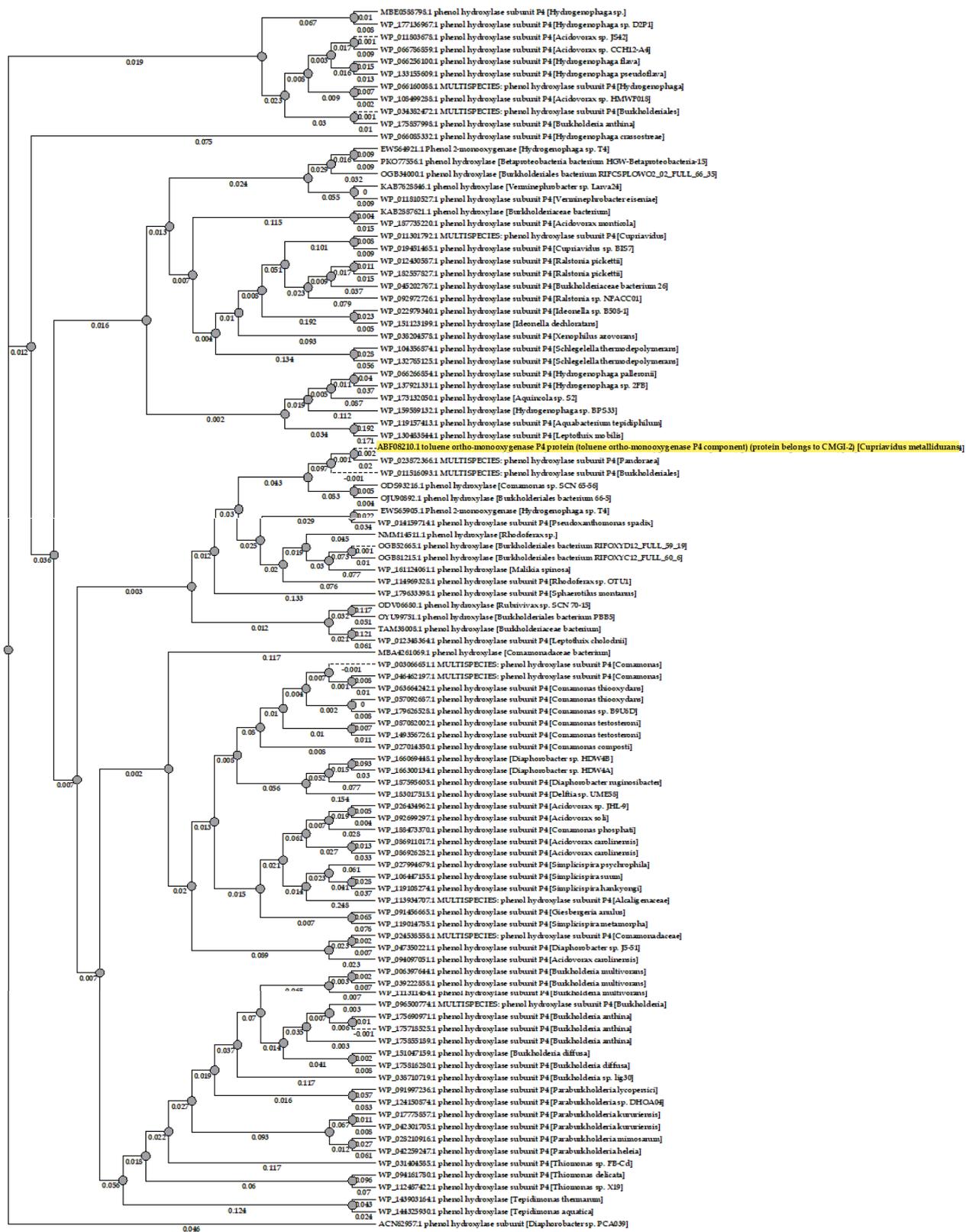


El Anexo 4., muestra los resultados obtenidos del BLAST de la enzima tolueno 2-monooxigenasa, lo que muestra valores de E-value cercanos a cero, este BLAST no presenta valores muy lejanos, lo que también es notable en el rango del *query cover*, que se muestra en la Tabla 3., mientras pues el número de aminoácidos emparejados es mayor a 172. **García (2007)**, manifiesta que la tolueno 2-monooxigenasa produce una adición de manera *orto* en el anillo aromático, mientras **Harwood & Parales (1996)**, afirman que este tipo de desestabilización también se presenta en la ruta de fenol, así como en el xileno, de manera que, al cumplir esta función similar se puede explicar su relación con fenol hidroxilasa. También es importante mencionar que los alineamientos del resultado del BLAST, muestra que estos se dan en secuencias de length parcialmente grandes y todas señalan a un alineamiento de una región conservada de los *targets*.

Esta enzima es conocida como tolueno *orto*-monooxigenasa, señalada con amarillo dentro del árbol filogenético (Figura 14.), el ancestro en común de las secuencias es una subunidad de la enzima fenol hidroxilasa, de donde parte cada una de las demás ramificaciones, al igual que los casos anteriores existe dos ramificaciones principales de donde la primera pareciera independiente de la segunda, a pesar de tener el mismo nombre, pudiendo ser por la enzima a la que pertenecen (fenol hidroxilasa). El ancestro en común posee una región conserva de la enzima fenol hidroxilasa (pfam04663) y fue detectada en la propuesta de una ruta nueva de p-cloroanilina donde los genes *pcaKLMNOP*, coinciden en 94% con los genes de fenol hidroxilasa (**Liu et al., 2010**). En base a los resultados se puede deducir que la enzima tolueno *orto*-monooxigenasa, es una subunidad, con secuencias conservadas de una de las subunidades de fenol hidroxilasa y su evolución estaría asociado a esto.

Figura 14

Árbol filogenético de los resultados BLAST vs la enzima problema (Tolueno 2-monooxigenasa)



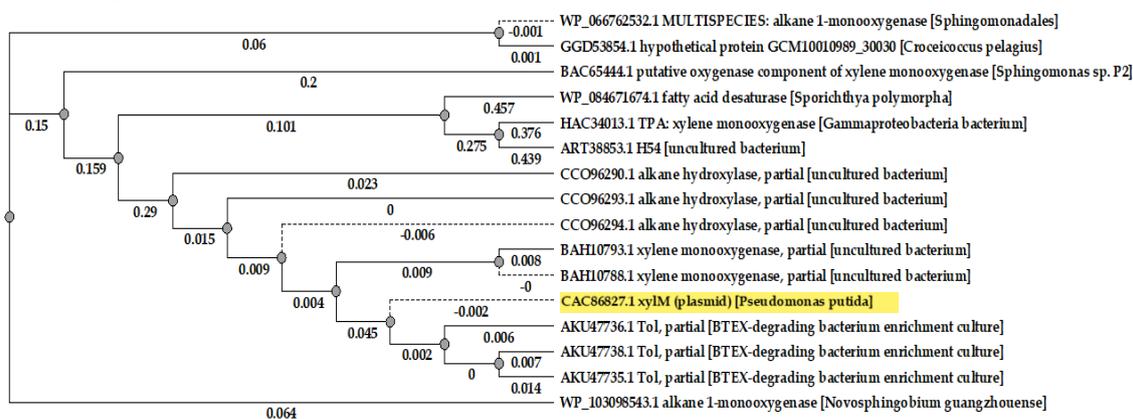
En la Anexo 5., perteneciente a los resultados obtenidos del BLAST de la enzima tolueno metil- monooxigenasa (Amarillo), tenemos los 19 primeros resultados, con un E-value de valores corresponden a 0.0, de manera que se puede decir que son alineamientos completamente significativos. En este BLAST, la mayoría de las coincidencias en el alineamiento se da con xileno monooxigenasa, hecho que puede ser basado en la afirmación de **Bühler et al. (2002)**, quien menciona que esta enzima es capaz de catalizar

la oxidación del grupo metilo del tolueno y xileno, tal como se habló anteriormente este es uno de los pasos principales para la degradación el tolueno, también se puede afirmar esto debido que la subunidad 1 de esta enzima es transcrita por el gen *xyIM*, el mismo que transcribe la enzima tolueno metil-monooxigenasa, de esta manera se puede explicar el alineamiento de secuencias con la xileno monooxigenasa.

El árbol filogenético, presentado en la Figura 15., se usó los resultados BLAST con un *query cover* $\leq 95\%$, todas las ramificaciones de las secuencias obtenidas parten del ancestro en común, siendo una enzima alcano 1-monooxigenasa, esta enzima está integrado por un alcano hidroxilasa y una cadena de transferencia de electrones con dos proteínas: rubredoxina y una reductasa que se encarga de la transferencia de electrones hacia la alcano hidroxilasa para la degradación de alcanos (Van Beilen et al., 2003), se podría decir que la coincidencia del BLAST con tolueno metil- monooxigenasa es debido a la presencia de la reductasa, también presente en esta enzima, la divergencia de estas pudo haber sucedido y la región conservada ser la reductasa que en ambas enzimas cumple la misma función.

Figura 15

Árbol filogenético de los resultados BLAST vs la enzima problema (Tolueno metil-monooxigenasa)



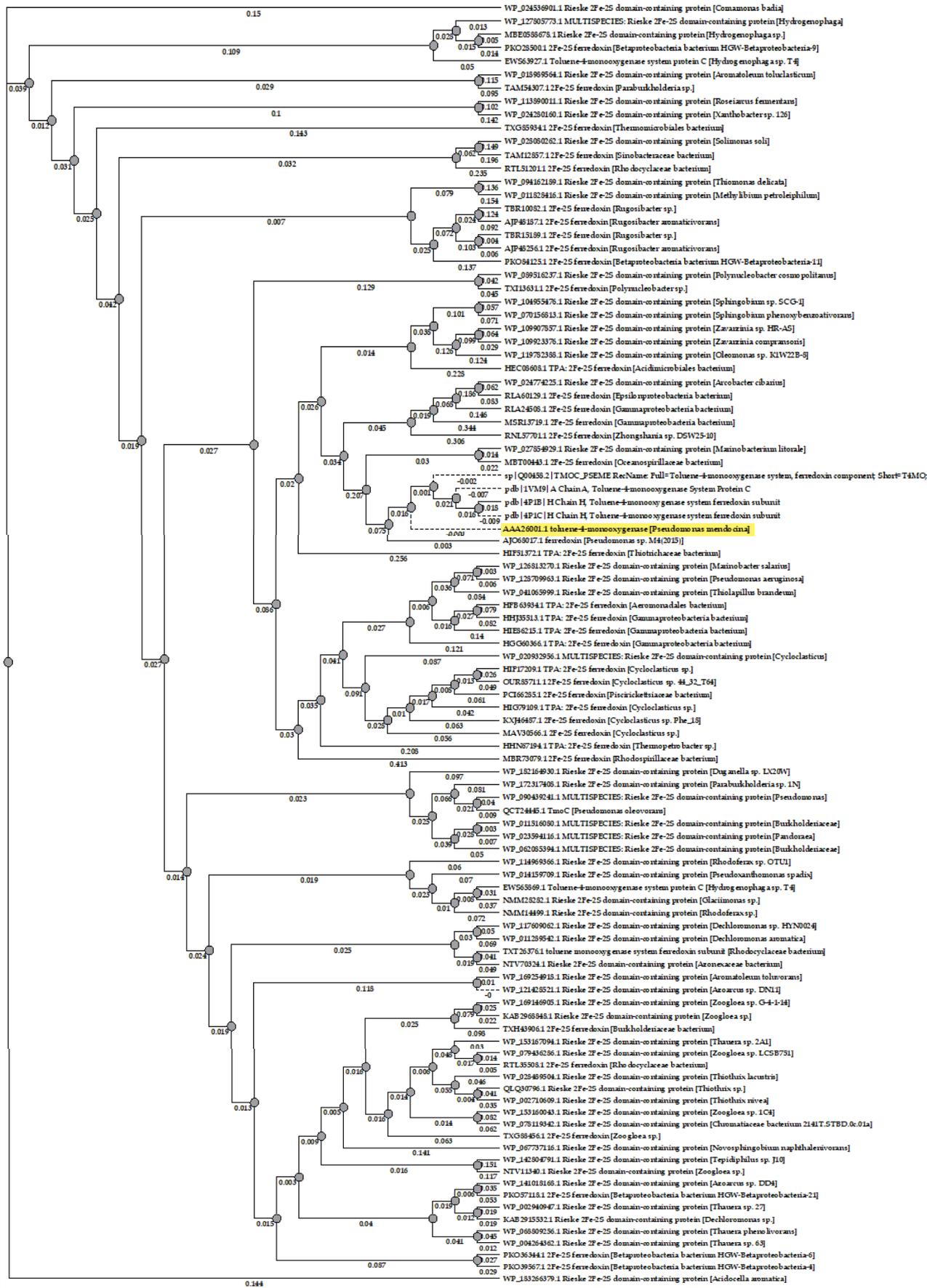
En el Anexo 6., presenta los resultados del BLAST obtenidos de la enzima tolueno 4-monooxigenasa (amarillo), tal como se observa en la Tabla 4., los valores de *query cover*, poseen un rango muy $\sim 100\%$, debido que el alineamiento del *query* es muy alta a las secuencias *targets*, probablemente por el length de la secuencia problema. Mientras que porcentaje de identidad no es menor a ~ 50.00 , lo que demuestra que la similitud entre las secuencias es muy alta. La enzima tolueno 4-monooxigenasa es una enzima ferredoxina, que logra el traspaso de electrones por el centro Rieske [2Fe-2S] (Acheson et al., 2014).

En la Figura 16., al inicio del árbol se observa dos ramificaciones, en donde la primera se encuentra sola en la parte superior del árbol y corresponde a un dominio de Rieske [2Fe-2S] con el código WP_024536901.1, mientras que el ancestro común coincide con el mismo dominio perteneciente a un organismo diferente, este con el código WP_1832266329, ubicado al final del árbol, se puede decir que estas dos ramificaciones comparten un ancestro más cercano entre sí. A pesar de esto en el segundo linaje podemos distinguir más divergencia, entre el resto de *targets*, en donde en una de las ramificaciones, se encuentra la enzima problema (tolueno 4-monooxigenasa).

La divergencia entre los *targets* en el segundo linaje, probablemente se deba a los resultados del BLAST, pues estos corresponden en la mayoría al dominio Rieske [2Fe-2S], que sabemos es un componente de la enzima tolueno 4-monooxigenasa, enzima que se caracteriza por poseer este dominio en el componente llamado ferredoxina, razones con las cuales podemos denotar que la secuencia conservada pertenece a este dominio y a través del tiempo se ha mantenido parcialmente en los diferentes organismos y ha evolucionado, sufriendo cambios necesarios, según la necesidad de la enzima y por tanto del organismo en donde esté presente. La tolueno 4- monooxigenasa, es una de las enzimas que está presente en diferentes organismos, por la versatilidad enzimática y sus múltiples interacciones proteicas y debido a su ferredoxina de tipo Rieske, puede poseer varias secuencias homólogas entre sí, tal como se presenta en la Figura 17.

Figura 16

Árbol filogenético de los resultados BLAST vs la enzima problema (Tolueno 4-monooxigenasa)



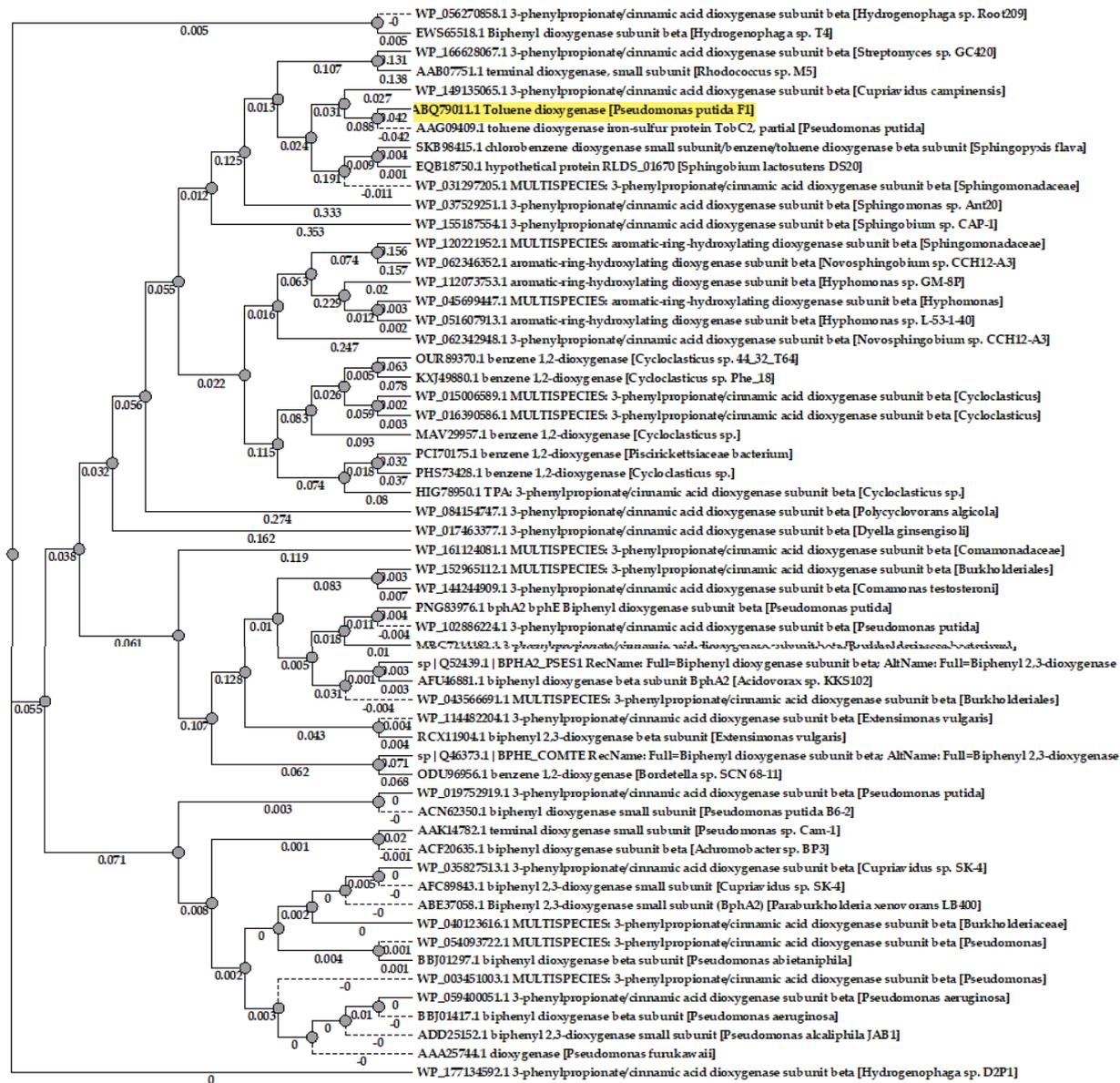
El Anexo 7., corresponde a la enzima tolueno dioxigenasa (amarillo), enzima muy eficaz en el proceso de degradación de tolueno. Los resultados obtenidos del BLAST son

similares entre ellos en la mayoría de los casos, donde los E-values, son cercanos a cero y se tiene un alineamiento casi completo con las secuencias *targets*, tal como en casos anteriores se creó un árbol filogenético para la comprensión del origen de esta enzima, por ende, la evolución de esta a través del tiempo, esta enzima según **Yuan Lin et al. (2012)**, posee tres componentes principales entre ellos la reductasa, ferredoxina (tipo Rieske) y la dioxigenasa. Para esto se ha usado los resultados con un *query cover* $\leq 95\%$, de donde los resultados presentados en la Figura 17., muestran que el ancestro en común (WP_1777134592.1), es una enzima multicomponente denominada 3- fenilpropionato dioxigenasa, capaz de degradar fenilpropanoato, que forma parte del metabolismo de compuestos aromáticos, al igual que la tolueno dioxigenasa, en la mayoría de las divergencias en las demás ramificaciones coincide los resultados, pues cada uno de los *targets*, poseen un ferredoxina, secuencias que pueden ser conservadas parcialmente, en el tiempo, así también se puede mencionar que las dos primeras relaciones de ancestro en común son de enzimas similares.

La divergencia de la enzima tolueno dioxigenasa (amarillo), con su ancestro en común se puede considerar algo lejana pues esta posee ancestros más cercanos con respecto a la enzima AAG09409.1, por ende, esta enzima llegó a evolucionar a través del tiempo y mantiene parte de su secuencia conservada de su ancestro en común, se podría decir que es basado en la presencia de la ferredoxina.

Figura 17

Árbol filogenético de los resultados BLAST vs la enzima problema (Tolueno dioxigenasa)



El último BLAST, es presentado en el Anexo 7., perteneciente de la enzima Bencilsuccinato sintasa, perteneciente a la ruta anaerobia en la degradación del tolueno, los E-values de los targets son cercanos a cero y los valores de *query over*, son porcentajes de alineamientos altos (Tabla 3.). la Bencilsuccinato sintasa, es una enzima encargada de adición del fumarato al grupo metilo del tolueno, es activada por el cofactor de flavina, posee tres subunidades α , β y γ . **Leuthner et al.(1998)**., menciona que la proteína glicil radical, posee las mismas tres subunidades y comparten homología, con la bencilsuccinato sintasa, así como, el opero que regula y ordena los cuatro genes que codifican la proteína activadora, son los mismos en las dos enzimas y su transcripción son inducidas por tolueno, de esta manera se explicaría su alineamiento.

- **Filogenia enzimática por hidrocarburo**

- *Benceno*

En el Anexo 9., se presenta un árbol filogenético de la agrupación de las dos enzimas presentes en la degradación de benceno, esta construcción se dio tomando en cuenta los resultados obtenidos del BLAST de las dos enzimas. Se puede observar que existe un ancestro en común que conecta todas los linajes, este corresponde al dominio de unión de hierro-azufre [2Fe -2S], con el código WP_192454921.1, anteriormente se ha explicado este mismo dominio como ancestro en común de fenol 2-monooxigenasa (Figura 14.), que contiene 2Fe -S, en su componente ferredoxina y en la Anexo 9., coincide en el árbol como el ancestro en común de los *targets* agrupados.

Se observa en el Anexo 9., que la enzima benceno 1,2-dioxigenasa, se encuentra alejada de la fenol 2-monooxigenasa, lo que muestra que la evolución de esta enzima para cumplir su función actualmente conocida, se dio tiempo después de la fenol 2-monooxigenasa, y actualmente mantienen un parentesco parcial en sus secuencias aminoacídicas. La enzima fenol 2-monooxigenasa se presenta en las primeras ramificaciones del ancestro en común, mientras que la benceno 1,2-monooxigenasa se encuentra mucho más arriba en el árbol, lo que da a entender que esta enzima se especializó a través del paso del tiempo, quizás por necesidad del organismo y hasta hoy mantiene parte de la funcionalidad conferida por el ancestro en común. El resto de *targets* se agruparon de manera que se encuentran cerca de las enzimas problemas, como se muestra en los árboles filogenéticos individuales (Figura 13. y Figura 14.).

Las regiones conservadas para que estas dos enzimas, al ser parte de dominio Rieske [2Fe- 2S], puede conferirles la capacidad de degradar benceno, debido que la presencia de metales dentro del sitio activo, juega un papel fundamental en el traspaso de electrones, así como también es importante mencionar que estas dos enzimas son parte de la familia de oxidoreductasas, encargadas del ingreso del oxígeno hacia el anillo aromático. Los géneros de *Shingomonas*, *Pseudomonas*, *Erythrorobacter*, *Pseudoxanthomonas* y *Acinetobacter*, son algunos de los ejemplos de bacterias que se encuentran dentro del árbol filogenético como resultados del BLAST y se conoce son bacterias capaces de degradar hidrocarburos no solo aromáticos también alifáticos saturados e insaturados.

- *Tolueno*

Para comprender la evolución de las enzimas degradadoras de tolueno, a través de la filogenia, se presenta un árbol filogenético general (Anexo 10.), construido con todos los resultados del BLAST anteriormente expuestos, el Anexo 10., presenta en los resultados que la secuencia aminoacídica perteneciente a WP_188473370.1 correspondiente a la subunidad de la enzima fenol hidroxilasa, es el ancestro común de las enzimas elegidas para el presente estudio (Tabla 3.), esta subunidad es la encargada de catabolizar el fenol y posee entre sus capacidades la catálisis de muchos derivados aromáticos que se encuentran metilados, al igual que las enzimas de estudio es dependiente de O₂ y de cofactores como FAD e iones metálicos que ayuden en el proceso de activación del oxígeno, para el traspaso de electrones (Naranjo, 2017). Esta codificado por el gen *dmpO* también conocido como *pheA5* y al igual que las enzimas del estudio. El árbol filogenético conecta todas las enzimas de estudio con el ancestro en común, mientras que los linajes que parten de esta a través del tiempo muestran conexión entre los ancestros de cada enzima. El Anexo 10., muestra que la evolución de tolueno 2-monooxigenasa con tolueno metil-monooxigenasa, están conectadas por ancestros en común mucho más cercanos que las otras enzimas, por lo cual se puede decir que existe conservación de las secuencias. Se puede deducir que la evolución de tolueno 2-monooxigenasa es similar al tolueno 4-monooxigenasa, a lo que en posteriores análisis se esperaría que estas dos enzimas muestren similitud estructural. La enzima tolueno dioxigenasa posee más afinidad evolutiva con la enzima tolueno 4-monooxigenasa, a comparación de las demás enzimas, pues tal como se observa en el árbol filogénico, poseen ancestros más cercanos.

Cada una de las ramificaciones muestran que los resultados de los BLAST, se ven agrupados dentro de grupos similares. Debido que cada una de los *targets*, se han analizado anteriormente, a pesar de estar conectadas filogenéticamente por ancestros en común, cada enzima junto con su ancestro más lejano obtenidos de los árboles filogenéticos individuales, se colocan en familias diferentes. La conexión del ancestro en común, demuestra que existen secuencias conservadas, y por tanto, las bacterias de donde son recuperadas las secuencias aminoacídicas, poseerían un parecido similar entre ellas, por ello a pesar de la evolución en el tiempo algunas especies bacterianas de géneros como: *Burkholderiales*, *Pseudomonas*, *Shingmonadales*, *Thiomonas* y *Alcaligenaceae*, degradan hidrocarburos de todo tipo y poseen enzimas con funciones similares, pero diferentes parcialmente.

3.1.3. Análisis estructural

Para el análisis estructural, se seleccionó 5 enzimas de las rutas metabólicas, teniendo en cuenta la importancia de estas dentro de la degradación del tolueno y benceno, se presentan en la Tabla 4., estas enzimas son fundamentales para el inicio de las rutas metabólicas y que el hidrocarburo pueda seguir su proceso de degradación, pues se encargan de la desestabilización del anillo y así lograr su posterior ruptura.

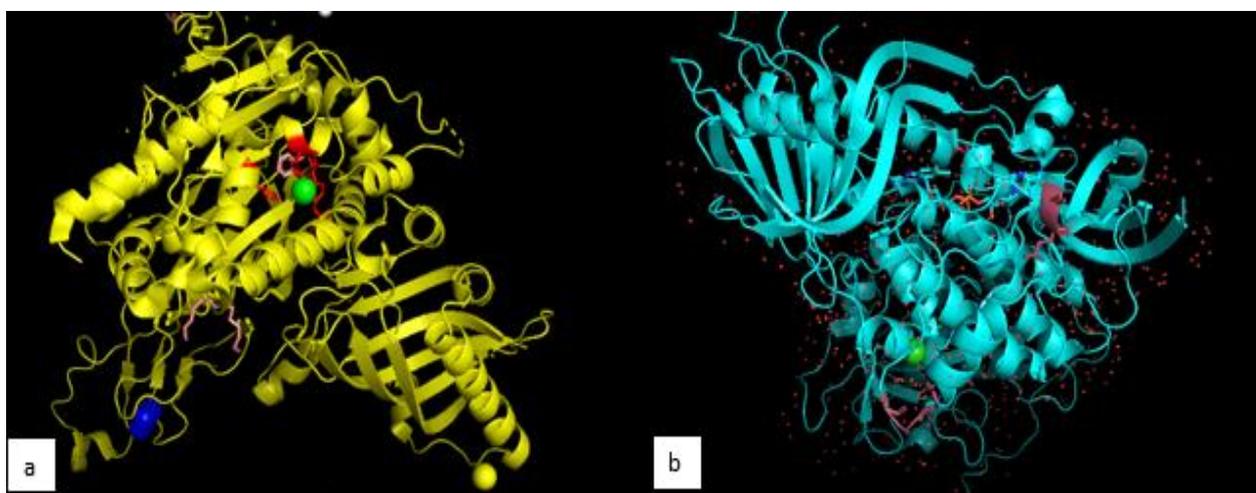
Tabla 4

Enzimas escogidas para los análisis estructurales

Nombre Enzima	Código (PDB)	Organismo al que pertenece	Ruta metabólica
Benceno 1,2-dioxigenasa	3EN1	Pseudomona putida	Benceno
Fenol 2-monooxigenasa	1PN0	Cutaneotrichosporom cutaneum	Benceno
Tolueno 2-monooxigenasa	3u52	Pseudomona stutzeri	Tolueno
Tolueno 4-monooxigenasa	4P1C	Pseudomona mendocina	Tolueno
Tolueno dioxigenasa	4EMJ	Pseudomona putida	Tolueno

Figura 18

Estructuras 3D y sitio activo de las enzimas: Benceno 1,2-dioxigenasa y Fenol 2-monooxigenasa.



Nota: Representación de los aminoácidos que rodean el sitio activo de las enzimas degradadoras de benceno, a) Enzima Benceno 1,2-dioxigenasa (amarillo), con los residuos de aminoácidos color rojo (F216, H222, I324 y F366), moléculas de Fe naranja, S de color amarillo oscuro y estructuras de PE3 y MBN de color morado claro (Friedmann et al., 2009). b) Enzima Fenol 2-monooxigenasa (celeste), residuos de color morado (R123, E171, D172, G186, R189, Q405 y P406), moléculas de Cl (verde) y FAD (celeste y azul oscuro) (Enroth, 2003).

En la Figura 18., se muestra los residuos del sitio activo, de las enzimas de Benceno 1,2-dioxigenasa y Fenol 2-monooxigenasa, el igual que anteriores enzimas estas perteneces a la familia de oxidoreductasas y sus sitios activos son regiones hidrofóbicas que facilitan la interacción sustrato-enzima. Estas dos enzimas pertenecen a las rutas con las que se pueden degradar benceno, se conoce que principalmente que la enzima fenol 2-monooxigenasa, también se encuentra en la ruta de la degradación del fenol, conocida como fenol hidroxilasa y posee la función del primer paso de la degradación de este compuesto.

Figura 19

Alineamiento estructural de las enzimas 3D: Benceno 1,2-dioxigenasa y Fenol 2-monooxigenasa.



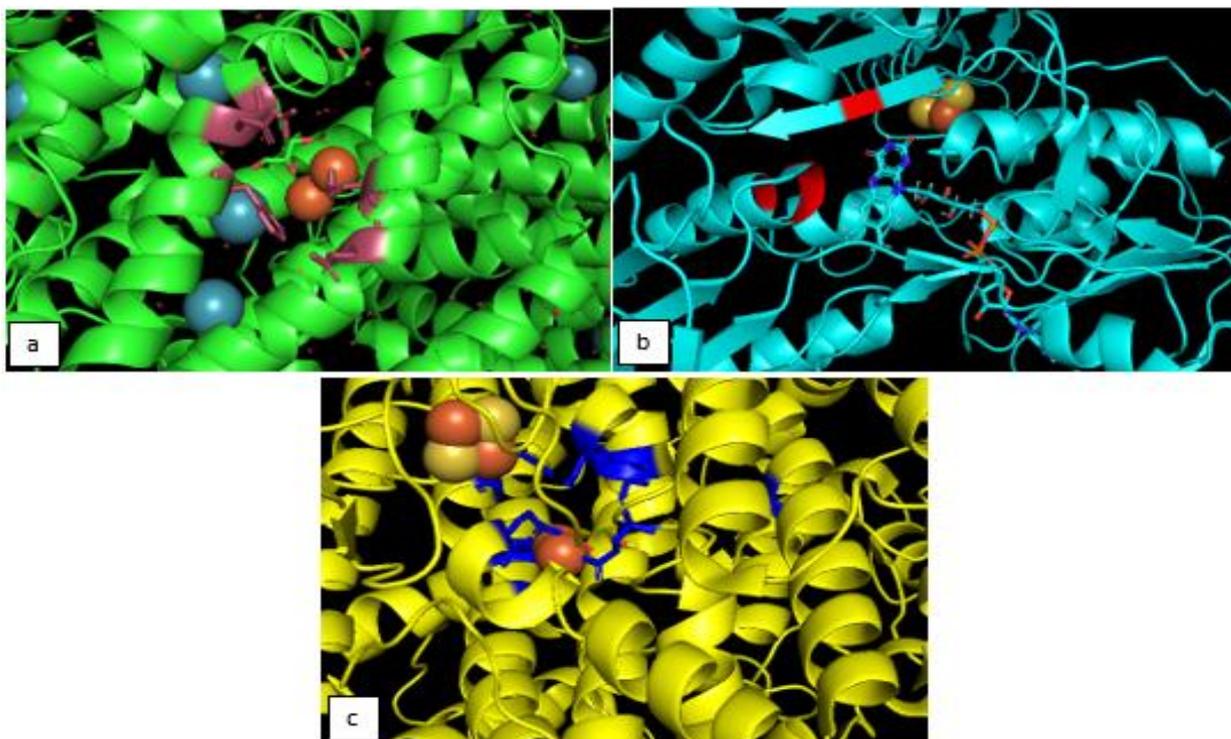
Nota: Benceno 1,2-dioxigenasa (amarillo), Fenol 2-monooxigenasa (celeste). a) Visualización del alineamiento de las enzimas y de los sitios activos de las dos enzimas.

Estas enzimas, tal como se observa en la Figura 19., se produjo un alineamiento que muestra que las enzimas, no son muy similares entre ellas, incluso los sitios activos se

encuentran separados entre sí y con las secuencias se comprobó no existe alineamiento en los residuos cercanos al sitio activo. El valor obtenido del RMSD corresponde a 23.137, lo que considera un valor alto, a comparación de las demás alineaciones, antes presentadas, esta desviación demuestra que el alineamiento sucedió en regiones específicas. En los resultados cuantitativos, mostro una alineación de 324 átomos de un matriz de 604 *652, demostrando así la falta de similitud de las enzimas, pues las cadenas de residuos aminoacídicos de las dos enzimas son extensas. A pesar de estos resultados, se sabe que estas dos enzimas son capaces de cumplir una misma función y es importante mencionar que a pesar de pertenecer a la misma familia enzimática, la benceno 1,2-dioxigenasa es un enzima de Fe no hemílico de tipo Rieske, como la enzima tolueno dioxigenasa y se encuentra compuesta por tres componentes: una reductasa, ferredoxina y un dioxigenasa (**Friemann et al., 2009**), mientras que la fenol 2-monooxigenasa, se conoce que forma parte de una de las subunidades de fenol hidroxilasa, se caracteriza por ser dependiente de FAD, como se observa en la Figura 18., y los residuos del sitio activo serán los encargados del movimiento del FAD para el primer paso de la degradación de benceno (**Enroth, 2003**).

Figura 20

Estructuras 3D y sitio activo de las enzimas: Tolueno 2-monooxigenasa, Tolueno dioxigenasa y Tolueno 4-monooxigenasa

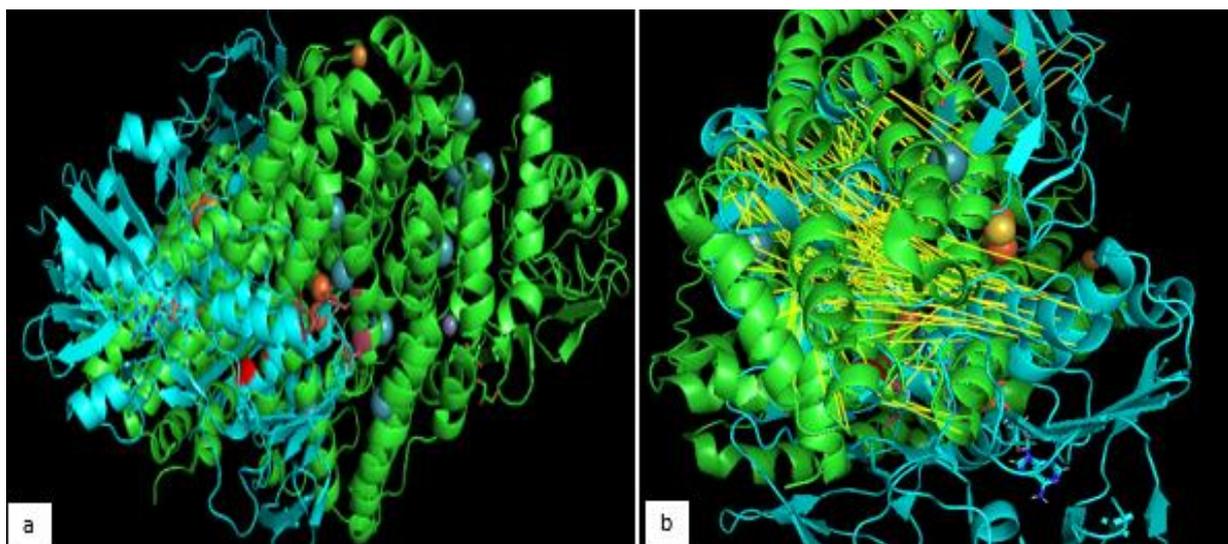


Nota: Representación de los aminoácidos que rodean el sitio activo de las enzimas degradadoras de tolueno, a) Enzima Tolueno 2-monooxigenasa (verde), con los residuos de aminoácidos morado claro (T201, N202, F205, Q228 y E231), moléculas de Fe naranja, Zn de morado y esferas de color azul claro moléculas de Xe (**McCormick & Lippard, 2011**). b) Enzima Tolueno dioxigenasa (celeste), residuos de color rojo (P44, K48, L153, I154, E157, R181, G238, E290 y W320), moléculas de Fe (tomate) y S (amarillo oscuro) (**Yuan Lin et al., 2012**). c) Enzima Tolueno 4-monooxigenasa (amarillo), residuos de color azul oscuro (E134, H137, E197, T201, N202, E228, E231 y A265), Fe de naranja y S de amarillo oscuro (**Acheson et al., 2014**).

La Figura 20., muestra cada uno de los sitios activos de las enzimas elegidas para el análisis estructural del presente estudio (Tabla 4.), con respecto a degradación del tolueno, a diferencia de las enzimas analizadas para los árboles filogenéticos, la estructura 3D de la enzima tolueno metil-monooxigenasa, no existe aún, por lo cual se anuló en esta parte del estudio. Los sitios activos de cada una de las enzimas se encuentran en regiones hidrofóbicas, formando bolsas de este tipo conjunto, con los residuos de aminoácidos que participaran en la interacción del sustrato, en donde observa también existe la interacción de metales, para la reacción catalítica. **Ramírez (2014)**, afirma que todos estos elementos en conjunto, facilitan el rompimiento y formación de nuevos enlaces, por ende, la reacción catalítica que se debe llevar a cabo en este sitio.

Figura 21

Alineamiento estructural de las enzimas 3D: Tolueno 2-monooxigenasa y Tolueno dioxigenasa.



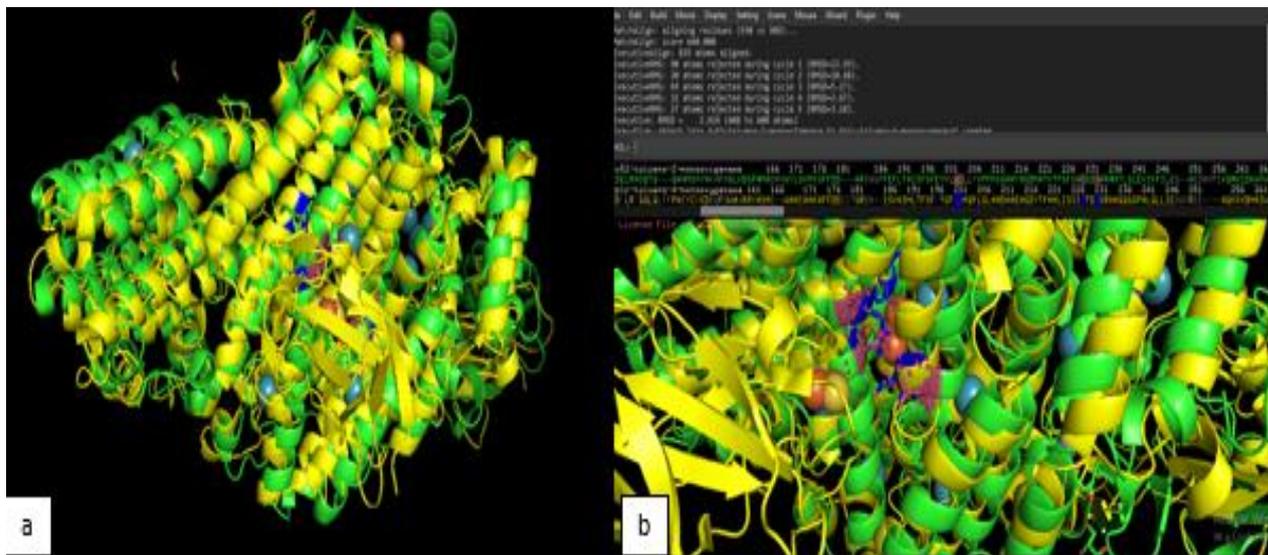
Nota: Tolueno 2-monooxigenasa (verde) y Tolueno dioxigenasa (celeste). a) Visualización de los sitios activos de las dos enzimas. b) Visualización del alineamiento de las enzimas.

La Figura 21 (b)., muestra el alineamiento estructural de dos del enzima: tolueno 2-monooxigenasa (fenol hidroxilasa) vs tolueno dioxigenasa, participantes en la degradación de tolueno, observando las imágenes se obtuvo que estas enzimas, no son tan similares estructuralmente, debido que su alineación fue parcial, de manera que tal como se dedujo en el árbol filogenético (Figura 14.) estas mantienen algo de las secuencias conservadas a partir de su ancestro en común, pero no poseen una cercanía filogenética en la evolución, por ende, el alineamiento obtenido posiblemente se deba a su ancestro en común. Entre los resultados obtenidos, se presenta el RMSD (desviación de la media cuadrática), corresponde a un valor de 20.272, en un alineamiento de residuos de 930 vs 512, correspondiente a cada estructura, este valor nos muestra que la divergencia de las moléculas es alta, debido a que los pares de residuos alineados son 136 átomos. En la Figura 31(a), se puede observar que los sitios activos no coinciden, a pesar de ubicarse cerca, por ende, la homología estructural es muy lejanas y las conservaciones de secuencias no se dieron en residuos del sitio activo, lo cual fue comprobado en el alineamiento de Pymol.

A pesar de que las dos estructuras alineadas pertenecen al género de *Pseudomonas*, de especies específicas como se muestran en la Tabla 4., y corresponden a las enzimas oxidoreductasas con cavidades hidrofóbicas para acoplamiento del sustrato, no se logró un alineamiento completo. La Tolueno 2-monooxigenasa, es una enzima que posee una subunidad funcional que se encarga de transformar los hidrocarburos a alcoholes, aunque posee la capacidad de transfórmalos en epóxidos, según la necesidad del microorganismo, esta clase de enzimas poseen un centro diiron, el cual se encarga del transporte del oxígeno al sitio activo, para lograr la reacción catalítica, necesario para el inicio de catabolismo, es importante mencionar que el sitio activo se encuentra a 12 Å de la superficie de la enzima. Al igual que la enzima anterior la tolueno dioxigenasa es una enzima que consta de 3 componentes principales: una reductasa, ferredoxina (tipo Rieske) y una dioxigenasa (**Yuan Lin et al., 2012**), este mismo autor menciona que el traspaso de electrones sucede mucho más rápido, debido a que esta maneja dos oxígenos, en vez de uno solo como las monooxigenasas y de esta manera se evita la producción de reacciones secundarias no deseables. Estas razones pueden ser las principales por lo cual la diferenciación de las enzimas, pero que en cierta manera logran cumplir una función para un mismo objetivo de degradar tolueno.

Figura 22

Alineamiento estructural de las enzimas 3D: Tolueno 2-monooxigenasa y Tolueno 4-monooxigenasa.



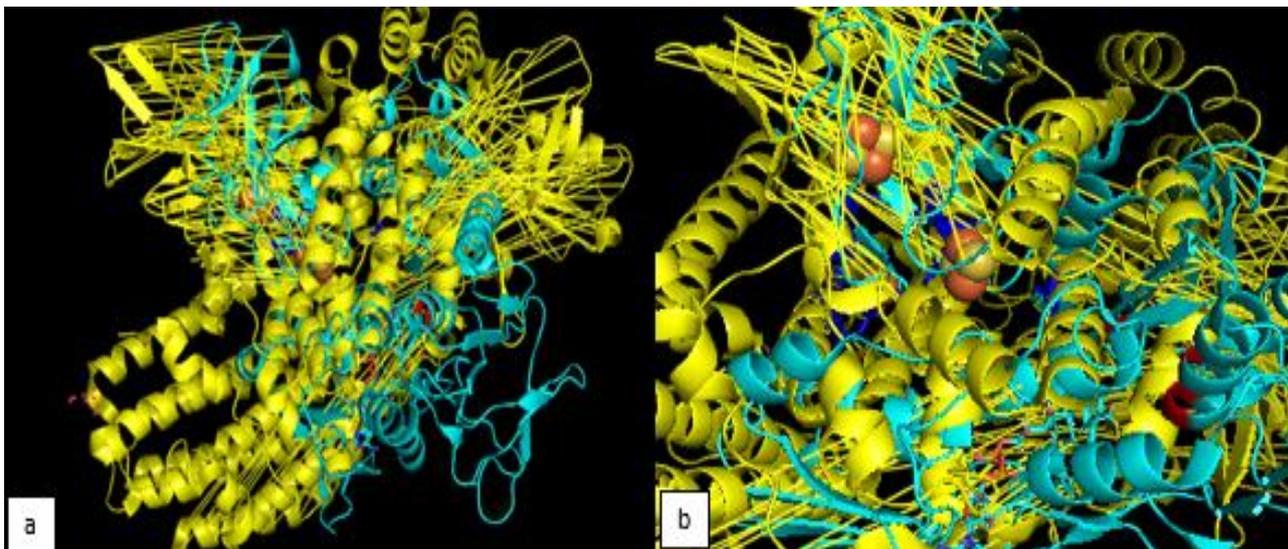
Nota: Tolueno 2-monooxigenasa (verde) y Tolueno 4-monooxigenasa (amarillo). a) Visualización del alineamiento de las enzimas. b) Visualización de los sitios activos de las dos enzimas.

En la Figura 22., se presenta el alineamiento la enzima Tolueno 2-monooxigenasa con la enzima Tolueno 4-monooxigenasa y tal como se ha expuesto anteriormente en el árbol filogenético (Figura 16.), se puede comprobar que estas dos enzimas son capaces de superponerse casi completamente, debido en primera instancia son enzimas oxidoreductasas y poseen una función similar, con la diferencia que producen la desestabilización del anillo en diferentes posiciones, razón que explicaría su similitud. Estas dos enzimas al igual que en caso anterior pertenecen al género *Pseudomonas* (Tabla 4.), bacterias muy capaces de degradar tolueno con gran eficiencia y se caracterizan por poseer un sitio activo, con un elemento metálico, en este caso, el hierro no hemílico, así como poseen también un centro diiron que es encargado de reaccionar con el O_2 para formar el epóxido. Tal como se observa en la Figura 22 (b)., los residuos del centro activo se encuentran alineados entre estos coinciden 4 de los residuos (T201, N202, Q228 y E231), marcados también en la línea de secuencias, presentada en la Figura 22 (b). El valor de RMDS, corresponde a 2.914, lo que permite entender que el alineamiento fue casi completo, en una matriz de 930 *980 pares de residuos, es importante mencionar que se alinearon 835 átomos, dando, así como resultado que las dos enzimas son estructuralmente homólogas, teniendo en cuenta que algunos pares de residuos no lograron alinearse. Hojas alfa y beta se observan alineadas y el valor de RMSD lo

confirman. La enzima tolueno 4 – monooxigenasa, se diferencia, por el sitio activo de tipo Rieske [2Fe-2S] /mononuclear, tal como muestra en la Figura 22 (a)., donde el hierro mononuclear es también coincidente en la enzima tolueno 2-monooxigenasa.

Figura 23

Alineamiento estructural de las enzimas 3D: Tolueno dioxigenasa y Tolueno 4-monooxigenasa

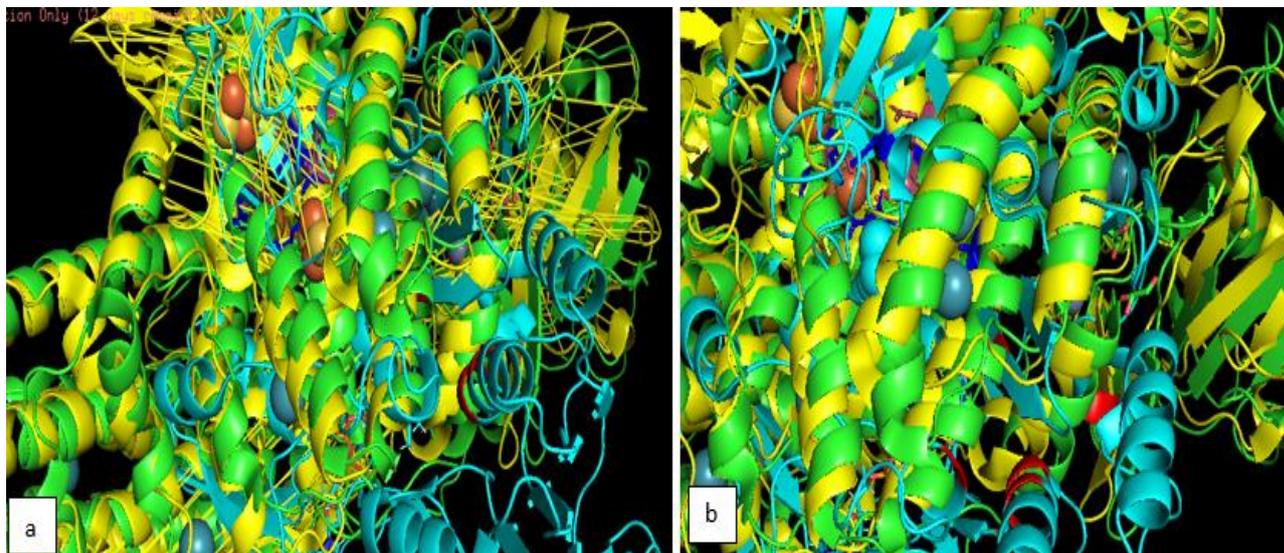


Nota: Tolueno dioxigenasa (celeste) y Tolueno 4-monooxigenasa (amarillo). a) Visualización del alineamiento de las enzimas. b) Visualización de los sitios activos de las dos enzimas.

La Figura 23., muestra el alineamiento de las enzimas tolueno dioxigenasa y tolueno 4-monooxigenasa, obteniendo un alineamiento mínimo, pues estas dos enzimas son diferentes en la mayoría de sus estructuras, a pesar de que esta dos se caractericen por poseer un centro Rieske [Fe-S], estas moléculas no lograron un alineamiento y tal como se observa los centros activos se encuentra en diferentes posiciones y muy alejados. El valor de RDMS obtenido corresponde a 28.621, lo que es un valor alto a comparación de los anteriores análisis, demostrando cuantitativamente que el alineamiento se dio en pocos pares de residuos, donde este número corresponde a 190 átomos, en una matriz de 512*988 pares. También podemos ver que las moléculas de los metales están cercanas, pero no se alinean de ninguna manera de tal, podemos decir que estas ayudan a la función de las enzimas, pero no son tan similares estructuralmente.

Figura 24

Alineamiento estructural de las enzimas 3D: Tolueno 2-monooxigenasa, Tolueno dioxigenasa y Tolueno 4-monooxigenasa.

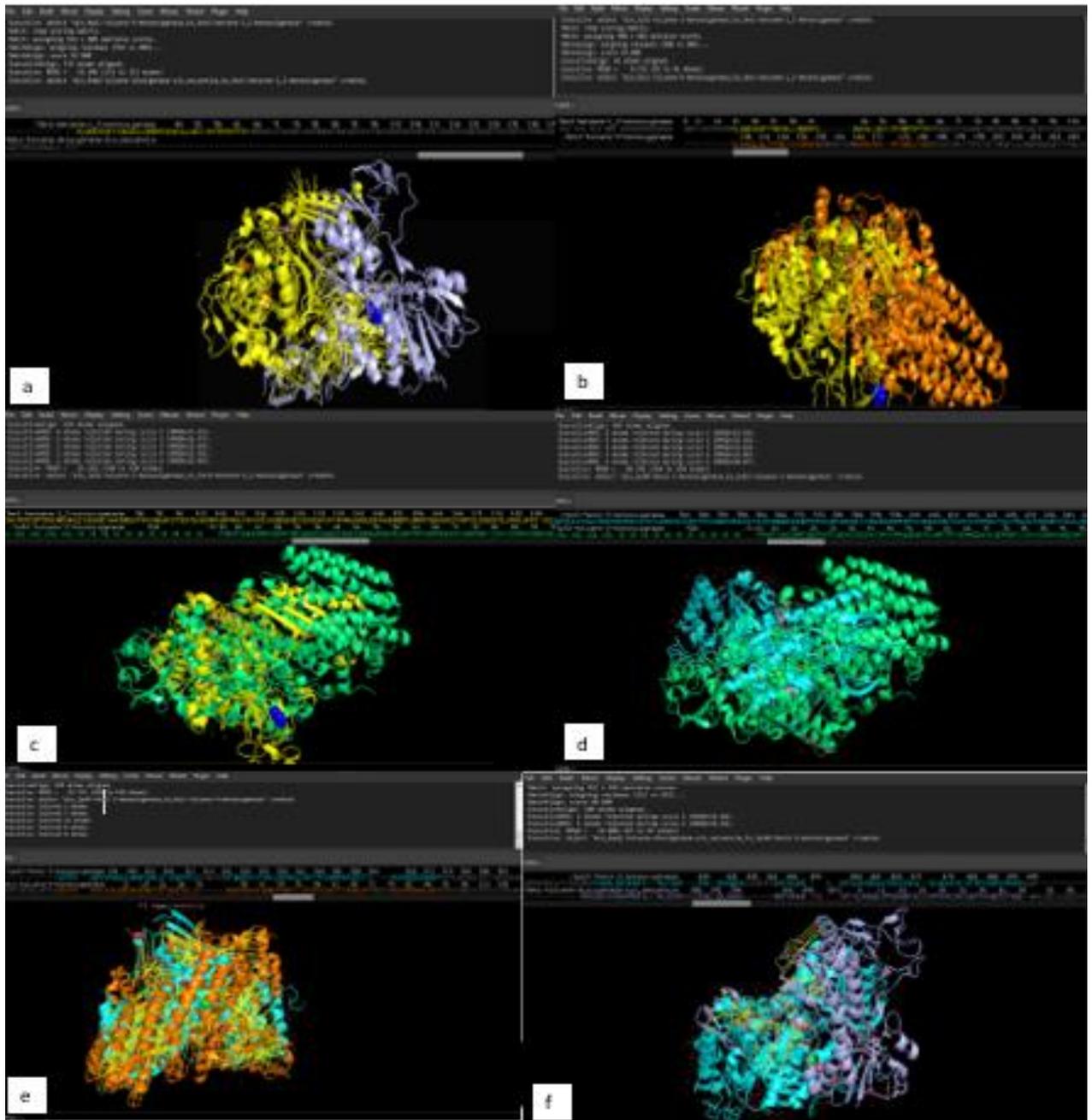


Nota: Tolueno 2-monooxigenasa (verde), Tolueno dioxigenasa (celeste) y Tolueno 4-monooxigenasa (amarillo). a) Visualización del alineamiento de las enzimas. b) Visualización de los sitios activos de las tres enzimas.

Tal como se reporta en la Figura 24., se observa que las tres figuras alineadas la más diferente corresponde a la tolueno dioxigenasa, de manera que se podría deducir que a pesar de cumplir funciones similares de activación y transporte de oxígeno hacia la estructura del tolueno, para lograr la desestabilización este y participar en la misma ruta, las estructuras se diferencian, la principal razón podría deberse a que la tolueno dioxigenasa según **Yuan Lin et al. (2012)**, posee los tres componentes y por ende puede existir diferente arreglos de los residuos conservados, con esto definir como una razón de la diferencia con las otras dos enzimas (tolueno 2-monooxigenasa y tolueno 4-monooxigenasa), es importante mencionar que como estas tres estructuras pertenecen a un mismo género: *Pseudomonas*. Se menciona a lo largo del trabajo, que la enzima dioxigenasa cumple la oxigenación con la adición de dos átomos de oxígeno, mientras que cada enzima con los centros metálicos, coordinan la transferencia de electrones desde el centro Rieske, hacia el Fe mononuclear no hémico.

Figura 25

Alineamiento estructural de las enzimas degradadoras de benceno y tolueno.



Nota: Benceno 1,2-dioxigenasa (amarillo), Fenol 2-monooxigenasa (celeste), Tolueno 2-monooxigenasa (verde claro), Tolueno dioxigenasa (plomo) y Tolueno 4-monooxigenasa (naranja). a) Visualización del alineamiento de las enzimas Tolueno dioxigenasa (plomo) y Tolueno 4-monooxigenasa (naranja). b) Visualización del alineamiento de las enzimas Benceno 1,2-dioxigenasa (amarillo) y Tolueno 4-monooxigenasa (naranja). c) Visualización del alineamiento de las enzimas Benceno 1,2-dioxigenasa (amarillo) y Tolueno 2-monooxigenasa (verde claro). d) Visualización del alineamiento de las enzimas Tolueno 2-monooxigenasa (verde claro) y Fenol 2-monooxigenasa (celeste). e) Visualización del alineamiento de las enzimas Fenol 2-monooxigenasa (celeste) y Tolueno 4-monooxigenasa (naranja). f)

Visualización del alineamiento de las enzimas Fenol 2-monooxigenasa (celestes) y Tolueno dioxigenasa (plomo).

Tabla 5

Resumen de los resultados del alineamiento de las enzimas de la ruta de degradación tolueno y benceno.

Alineamiento (Código Figura 23.)	RMSD	Átomos alineados
a	19.2006	113
b	9.175	41
c	25.318	334
d	30.741	369
e	34.791	428
f	15.006	100

En la Figura 25., se muestra los alineamientos de las enzimas que participan tanto en la degradación de tolueno como en el benceno respectivamente, logrando comparar cada una de las estructuras, de donde como resumen cuantitativo del análisis se obtuvo la Tabla 5., donde muestra que el valor más bajo es de la Figura 25 (b)., el cual demuestra que las enzimas poseen un alineamiento más notorio que los demás análisis presentados, a pesar de esto no se obtuvo alineamientos de los residuos del sitio activo. Como se analizado anteriormente todas las enzimas son de tipo oxidoreductasas, pero los valores al alinearse son altos, lo que lleva a demostrar que poseen secuencias similares entre sí de manera mínima, por ende, a pesar de encontrarse en rutas metabólicas diferentes estas mantiene secuencias conservadas que contribuye a su estructura actual, estas enzimas comparten características y mantienen una funcionalidad muy común entre ellas lo que explicaría que los resultados de los alineamientos a pesar de no ser muy optimistas, si existen.

3.2.Verificación de la hipótesis

Los estudios bioinformáticos de las bacterias degradadoras de hidrocarburos y de las enzimas presentes en la rutas metabólicas del tolueno y benceno, se realizaron con éxito por lo tanto la hipótesis alternativa “Los estudios bioinformáticos (Metaanálisis,

Filogenia y Análisis estructural) de las bacterias degradadoras de hidrocarburos y de las enzimas (monooxigenasas, dioxigenasas) presentes en las rutas metabólicas tolueno y benceno, poseen relación evolutiva, por tanto, es posible la similaridad estructural entre estas” se aceptan y se rechaza la hipótesis nula.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se analizó bioinformáticamente las bacterias con capacidad de degradación de hidrocarburos y su mecanismo metabólico, mediante tres estudios (metaanálisis, filogenia y alineamiento estructural); encontrando que varias bacterias son capaces de degradar todo tipo de hidrocarburos (alifáticos saturados e insaturados y aromáticos), debido a sus sistemas metabólicos que les permite transformar los hidrocarburos a compuestos más simples, sin sufrir acumulación dentro de su organismo.
- Se elaboró una revisión sistemática y extensiva de las bacterias, el metabolismo y enzimas implicadas en la degradación de hidrocarburos, obteniendo que existen varias rutas metabólicas alternativas en la degradación de hidrocarburos, que depende del hidrocarburo, así como del organismo que lleva a cabo el proceso de degradación, en donde varias enzimas juegan un papel fundamental en ruptura de las cadenas carbonadas, así como la ruptura de anillos en caso de los hidrocarburos aromáticos; donde las principales enzimas implicadas son las oxigenasas.
- Se identificó el origen metabólico de las enzimas dioxigenasas y monooxigenasas que degradan tolueno y benceno, realizando un análisis filogenético de 7 enzimas en total de donde 5 enzimas son parte de las rutas del tolueno y 2 de las rutas del benceno, para esto se construyó un árbol filogenético con los resultados de un BLAST, de cada enzima, mediante alineación de secuencias aminoacídicas, obtenido así los ancestros de cada análisis individual de las enzimas y la relación filogenética entre sí, obteniendo que todas poseen un ancestro en común.
- Se estableció un análisis estructural de 5 enzimas monooxigenasas y dioxigenasas presentes en las rutas metabólicas del tolueno y benceno, a través de un alineamiento estructural, usando el programa PyMOL; demostrando que existen similitudes parciales basadas en las comparaciones estructurales de las secuencias aminoacídicas, así como de los residuos del sitio activo; por ende, se obtiene que existe conservación de secuencias entre las enzimas, por ende, se encuentran relacionadas entre sí, teniendo en algunos casos mayor relación estructural.

4.2. Recomendaciones

- Realizar estudios in vitro, de las 5 enzimas analizadas estructuralmente, para obtener enzimas con mayor efectividad y capacidad, en la degradación de hidrocarburos, a través de la biología sintética.
- Realizar más estudio enfocados al funcionamiento de las enzimas en otros tipos de hidrocarburos y su evolución a través del tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abián, J., Carrascal, M., & Gay, M. (2008). Introducción a la Espectrometría de Masas para la caracterización de péptidos y proteínas en Proteómica. *Preoteómica*, 1(2), 16–35.
- Acheson, J. F., Bailey, L. J., Elsen, N. L., & Fox, B. G. (2014). Structural basis for biomolecular recognition in overlapping binding sites in a diiron enzyme system. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms6009>
- Aldabe, J. (2011). *Las enzimas* (Vol. 1, pp. 2–33).
- Alexander, M. (1994). Biodegradation and Bioremediation - Martin Alexander - Google Libros. In *Biodegradation and Bioremediation* (Academic P, Vol. 2, pp. 9–17). Academic Press.
- Arroyo, L. (2019). *Taxogenómica en Rhodobacteraceae*. Universidad de Valencia.
- Azubuike, C. C., Chikere, C. B., & Okpokwasili, G. C. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>
- Bamforth, S., & Singleton, I. (2005). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology J Chem Technol Biotechnol*, 80, 723–736. <https://doi.org/10.1002/jctb.1276>
- BBC. (2010). *Los 10 peores derrames de la historia*. BBC News Mundo. https://www.bbc.com/mundo/internacional/2010/06/100616_derrame_especial_extension_il
- Becerra, S., Paichard, E., Sturma, A., & Maurice, L. (2013). Vivir con la contaminación petrolera en el ecuador: percepciones sociales del riesgo sanitario y capacidad de respuesta. *Revista Lider*, 102–120.
- Benavides, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutiérrez, S., & Miranda, J. (2006). Häufige Symptome bei sterbenden Menschen mit Demenz. *Nova*, 45(10), 46–49. <https://doi.org/10.1024/1662-9027/a000045>
- Bernal, C., Galindo, I., Pérez, D., & Diez, N. (2006). Aplicación de la Proteómica comparativa para la identificación de proteínas en *Phaseolus vulgaris* asociadas a resistencia a plagas. In *Agronomía Trop* (Vol. 56, Issue 4).
- Betancor, L., Gadea, M., & Flores, K. (2002). *Genética bacteriana*. <http://130.206.160.21/rid=1NQMWD86S-1N93KN5-R6/GeneticaBacteriana.pdf>

- Bonilla, M. (2016). 40 embarcaciones pesqueras se contaminaron con petróleo a siete millas de las costas de Esmeraldas | El Comercio. *El Comercio*. <https://www.elcomercio.com/actualidad/embarcaciones-pesqueras-contaminaron-petroleo-esmeraldas.html>
- Boopathy, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74(1), 63–67. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00144-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00144-3)
- Bouwer, E., & Zehnder, A. (1993). Bioremediation of organic compounds - putting microbial metabolism to work. *Trends in Biotechnology*, 11(8), 360–367. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(93\)90159-7](https://doi.org/10.1016/0167-7799(93)90159-7)
- BRENDA:EC 1.14.12.10. (n.d.). Information on EC 1.14.12.10 - benzoate 1,2-dioxygenase. In *BRENDA- The Comprehensive Enzyme Information System*. Retrieved November 16, 2020, from <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.14.12.10>
- Bush, L. (2018). Introducción a las bacterias - Infecciones. In *Manual MSD*. Atlantic University. <https://www.msmanuals.com/es/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-introducción/introducción-a-las-bacterias>
- Capello, R., Donovarros, C., & Giono, S. (2000). La Diversidad Microbiana en México. In *Biodiversidad* (pp. 6–7). CONABIO.
- Carmona, M., & Díaz, E. (2005). Iron-reducing bacteria unravel novel strategies for the anaerobic catabolism of aromatic compounds. *Molecular Microbiology*, 58(5), 1210–1215. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04937.x>
- Carrillo, J. (2019). Estructura y función de las oxigenasas tipo Rieske/mononuclear . *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 22, 1–12.
- Castellanos, M., Isaza, R., & Torres, J. (2015). Evaluación de los hidrocarburos totales de petróleo (TPH) sobre suelos urbanos en Maicao, Colombia. *Revista Colombiana Química*, 44, 11–17. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v44n3.55605>
- Cervantes, C. (2011). El maravilloso mundo de las bacterias. *Revista de Divulgación*.
- Chaves, D., Sandoval, A., Rodríguez, L., García, J., Restrepo, S., & Zambrano, M. (2010). Análisis comparativo de seis genomas del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomédica*, 30, 23–31. <http://bioinfo.hku.hk/EMBOSS>,
- Cortón, E., & Viale, A. (2006). *Solucionando grandes problemas ambientales con la ayuda de pequeños amigos: las técnicas de biorremediación*. *Revista Científica de ecología y medio ambiente*. <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/499>

- Crisci, J. V., & López, M. F. (1983). *Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica* (Vol. 1).
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Research Biotechnology Research International*, 2011, 13. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>
- Debarati, P., Gunjan, P., Janmejay, P., & Rakesh, J. (2005). Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 23, Issue 3, pp. 135–142). Institute of Microbial Technology. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.01.001>
- DeLaune, R. D., & Wright, A. L. (2011). Projected Impact of Deepwater Horizon Oil Spill on U.S. Gulf Coast Wetlands. *Soil Science Society of America Journal*, 75(5), 1602–1612. <https://doi.org/10.2136/sssaj2011.0168>
- Di Martino, C. (2015). *Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales* [Universidad de Buenos Aires]. www.tdx.cat
- Durán, Y., & Ramírez, P. (2013). *Caracterización molecular de bacterias degradadoras de pentaeritritol tetranitrato (PETN) aisladas de ambientes mineros y evaluación de su eficiencia de degradación*. Universidad Nacional de San Marcos.
- Enroth, C. (2003). High-resolution structure of phenol hydroxylase and correction of sequence errors. *Acta Crystallographica - Section D Biological Crystallography*, 59(9), 1597–1602. <https://doi.org/10.1107/S0907444903014902>
- Escalante, A., Gosset, G., Martínez, A., & Bolívar, F. (2004). Diversidad bacteriana del suelo: métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. In *Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología*. Keller y Zengler. <https://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2004/nov-dic/art-2.pdf>
- Espinosa, M. (2017). Las Palmas ya está habilitada para los turistas tras derrame de crudo, según Rafael Correa | El Comercio. *El Comercio*. <https://www.elcomercio.com/actualidad/laspalmas-habilitada-turistas-derramedecrudo.html>
- Fersht, A. (1980). *Estructura y mecanismo enzimas*. Reverté, S.A.
- French, L., Rodríguez, M., Bisset, J., Leyva, Y., Gutiérrez, G., & Fuentes, I. (2013). Actividad incrementada de las enzimas citocromo P450 monooxigenasas en cepas cubanas de *Aedes aegypti* de referencia, resistentes a insecticidas. *Revista Cubana*

- de Medicina Tropical*, 65(3), 1–14.
- Friemann, R., Lee, K., Brown, E. N., Gibson, D. T., Eklund, H., & Ramaswamy, S. (2009). Structures of the multicomponent Rieske non-heme iron toluene 2,3-dioxygenase enzyme system. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 65(1), 24–33. <https://doi.org/10.1107/S0907444908036524>
- García, A. (2012). *Efecto de los polifenoles sobre el crecimiento y metabolismo de bacterias lácticas del vino. Potencial uso como alternativa al empleo de los sulfitos durante la vinificación* [Universidad Autónoma de Madrid]. <https://digital.csic.es/handle/10261/60799>
- García, M., & Peralta, M. (2008). Cometabolismo en la biodegradación de hidrocarburos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 7(1), 1–12.
- García, N., & Aguirre, M. (2014). *Golfo de México. contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias Biodegradación de petróleo por bacterias: algunos casos de estudio en el Golfo de México*.
- Gibson, D. T., & Parales, R. E. (2000). Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(3), 236–243. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00090-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00090-2)
- Gibson, D. T., & Sayler, G. S. (1992). *Scientific Foundations of Bioremediation: Current Status and Future Needs*.
- Gómez, E., Gutiérrez, C., Hernández, A., Losada, M., & Mantilla, P. (2008). Vista de Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos | Nova. *Publicación Científica En Ciencias Biomédicas*, 6, 76–85.
- Grossi, V., Cravo, C., Guyoneaud, R., Ranchou, A., & Hirschler, A. (2008). Metabolism of n-alkanes and n-alkenes by anaerobic bacteria: A summary. *Organic Geochemistry*, 39(8), 1197–1203. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2008.02.010>
- Guevara, S. (2006). Genómica y genómica funcional en microbiología. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 131–145.
- Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009, September 30). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1–3), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>
- Heider, J., & Fuchs, G. (1997). Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *European Journal of Biochemistry*, 243(3), 577–596. <https://doi.org/10.1111/j.1432->

1033.1997.00577.x

- Heider, Johann, Spormann, A. M., Beller, H. R., & Widdel, F. (1998). Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, 22(5), 459–473. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00381.x>
- Hug, L. A., Baker, B. J., Anantharaman, K., Brown, C. T., Probst, A. J., Castelle, C. J., Butterfield, C. N., Hemsdorf, A. W., Amano, Y., Ise, K., Suzuki, Y., Dudek, N., Relman, D. A., Finstad, K. M., Amundson, R., Thomas, B. C., & Banfield, J. F. (2016). A new view of the tree of life - Phylogeny. *Nature Microbiology*, 1(5). <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48>
- Iáñez, E. (2003). *Desarrollo histórico de la Microbiología*. IDEAM. (2010). *Benceno*. <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/018903/Links/Guia7.pdf>
- Izquierdo, A. (2013). *Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales* [Universidad de Barcelona]. www.tdx.cat
- Janssen, D., Oppentocht, J., & Poelarends, G. (2001). *Microbial dehalogenation*. <http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs02-03/RBurgos/dades/Articulos/Dehalogenation.pdf>
- Kensa, M. (2011, June). *Bioremediation*. <http://www.icontrolpollution.com/articles/bioremediation--an-overview-.php?aid=37408>
- Kumar, A., Bisht, B., Joshi, V., & Dhewa, T. (2011). Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool. *International Journal of Environmental Sciences*, 1(6), 15. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.422.2461&rep=rep1&type=pdf>
- Kumar, P., Srivastava, A., & Pal, V. (2010). Application of Monooxygenases in Dehalogenation, Desulphurization, Denitrification and Hydroxylation of Aromatic Compounds. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 01(03), 1–8. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000112>
- Laissue, P. (2011). Genómica funcional y medicina molecular del siglo XXI. *Revista Ciencias de La Salud*, 1–20. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-72732011000300001

- Latorre, A., & Silva, F. (2013). *El tamaño del genoma y la complejidad de los seres vivos - Revista Método*. Método. <https://metode.es/revistas-metode/monograficos/el-tamano-del-genoma-y-la-complejidad-de-los-seres-vivos.html>
- Letosa, M. (2000). Microbiología positiva. *Medicina Naturista*, 1^o, 51–57.
- Leyva, M., Zamudio-Maya, Corona, A., González José, & Rojas, A. (2015). Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 2, 99–115. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=358636340008>
- Liu, Y. C., Li, L. Z., Wu, Y., Tian, W., Zhang, L. P., Xu, L., Shen, Q. R., & Shen, B. (2010). Isolation of an alkane-degrading *Alcanivorax* sp. strain 2B5 and cloning of the *alkB* gene. *Bioresource Technology*, 101(1), 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.028>
- Loera, P., Pérez, S., López, C., Balagurusamy, N., & Luévanos, M. (2016). Biodegradación de compuestos aromáticos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*.
- López, L. (2003). Diferencias Termo-adaptativas en enzimas deshidrogenasa NAD-dependientes de peces marinos pelagicos templados y tropicales. In *Adaptación térmica de enzimas*. <https://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/cienciapesquera/CP10/CP10-08.pdf>
- Lozada, A., & López, V. (2019). Los 10 peores derrames petroleros. *LatinAmerican Post*. <https://latinamericanpost.com/es/27528-los-10-peores-derrames-petroleros>
- Lyford DeLano, W. (2000). *PYMOL*. Licencia de Python. www.pymol.org
- McCormick, M. S., & Lippard, S. J. (2011). Analysis of substrate access to active sites in bacterial multicomponent monooxygenase hydroxylases: X-ray crystal structure of xenon-pressurized phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. OX1. *Biochemistry*, 50(51), 11058–11069. <https://doi.org/10.1021/bi201248b>
- MREMH. (2015). *El caso Chevron / Texaco en Ecuador Una lucha por la justicia ambiental y social*. <https://www.cancilleria.gob.ec/>
- Naranjo, C. (2017). *Aislamiento e Identificación de microorganismos con capacidad de degradar hidrocarburos en suelos contaminados de la comunidad Lumbaqui, provincia de Sucumbíos*. [UDLA]. <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/7458/1/UDLA-EC-TIB-2017-23.pdf>
- Negrón, M. (2009). *Microbiología Estomatológica* (2nd ed., Vol. 1). Editorial Médica Panamericana.

- Newbery, J., & Thierry, J. (2007). *El petróleo* (Vol. 1).
- OEI. (2000). *Biorremediación, opción contra derrames petroleros*. Divulgación y Cultura Científica Iberoamericana. https://www.oei.es/historico/divulgacioncientifica/noticias_371.htm
- Olguín, E., Hernández, M., & Sánchez, G. (2007). CONTAMINACIÓN DE MANGLARES POR HIDROCARBUROS Y ESTRATEGIAS DE BIORREMEDIACIÓN, FITORREMEDIACIÓN Y RESTAURACIÓN. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*.
- OPEP. (2010). *Organización de los Países Exportadores de Petróleo / OPEP*. <https://www.cadtm.org/Organizacion-de-los-Paises?lang=es>
- Orellana, O. (2002). Perspectivas de la secuenciación de genomas bacterianos: nuevas estrategias en el desarrollo de terapias antimicrobianas. *Revista Chilena de Infectología*, 19, S46–S49. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182002019100009>
- Ortega, D. (2010). *Diversidad microbiana y de oxigenasas de hidrocarburos en las rizosferas de plantas pioneras que crecen en suelos contaminados con petróleo*. Instituto Politécnico Nacional.
- Osorio, C. (2017, June 1). Sobre el origen del término bacteria: Una paradoja semántica. *Revista Chilena de Infectología*, 34(3), 265–269. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182017000300011>
- Otero, P. A. (2017). Historia de la biología - Carl Woese y los dominios de la vida. *Revista Boletín Biológica*, 3–10. [http://www.revistaboletinbiologica.com.ar/pdfs/N37/historia\(37\).pdf](http://www.revistaboletinbiologica.com.ar/pdfs/N37/historia(37).pdf)
- Otiniano, M., Tuesta, L., Robles, H., Luján, M., & Chávez, M. (2019). Biorremediación de cromo VI de aguas residuales de curtiembres por *Pseudomonas* sp y su efecto sobre el ciclo celular de *Allium cepa*. *Vallejian Medical Journal*, 4(1), 32–42. <https://doi.org/10.18050/revistamedicavallejiana.v4i1.2218>
- Parales, R. E., Ditty, J. L., & Harwood, C. S. (2000). Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene, and trichloroethylene. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 4098–4104. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4098-4104.2000>
- Peña, C. (2011). Métodos de inferencia filogenética. *Revista Peruana de Biología*, 7(2), 211. <https://doi.org/10.15381/rpb.v7i2.6829>
- Pérez, S., Camacho, M., Gómez, M., Rodríguez, A., Cantero, D., & Viñas, M. (2007, March). Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de

- hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 1–3.
- Raisman, J., & Gonzalez, A. (2013). *Procariotas*. Procariotas. <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/micro1.htm>
- Ramírez, J. (2014). Enzimas: ¿qué son y cómo funcionan? *Revista Diaria Universitaria*, 15(12), 1–21. <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/#>
- Rangel, M., Garza, Y., Martínez, J., Rodríguez, J., Carranza, B., Cardenas, J., & Saltillo, C. (2007). Degradación de tolueno por células de *Pseudomonas aeruginosa* libres e inmovilizadas en *Opuntia imbricata*. *XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*.
- Rinken, R., de Vries, J., Weichenhan, D., & Wackernagel, W. (1991). The recA-recBCD dependent recombination pathways of *Serratia marcescens* and *Proteus mirabilis* in *Escherichia coli*: functions of hybrid enzymes and hybrid pathways. *Biochimie*, 73(4), 375–384. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(91\)90104-9](https://doi.org/10.1016/0300-9084(91)90104-9)
- Rojas, A., Rodríguez, A., Montes, S., & Pérez, S. (2010). Evaluación de la promoción del crecimiento de *Cynodon dactylon* L. por rizobacterias productoras de fitohormonas aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. *Polibotánica*, 29, 131–147. <http://www.scielo.org.mx/pdf/polib/n29/n29a6.pdf>
- Rypniewski, W. R., Breiter, D. R., Benning, M. M., Wesenberg, G., Oh, B. H., Markley, J. L., Rayment, I., & Holden, H. M. (1991). Crystallization and Structure Determination to 2.5-Å Resolution of the Oxidized [2Fe-2S] Ferredoxin Isolated from *Anabaena* 7120. *Biochemistry*, 30(17), 4126–4131. <https://doi.org/10.1021/bi00231a003>
- Sadava, D., & Purves, W. (2008). *Vida / Life: La ciencia de la biología / The Science of Biology - David Sadava, William H. Purves - Google Libros* (Médica Panamericana, Vol. 1).
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The Neighbor - Joining Method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Health Science Center Ot Houston*, 46.
- Sancho, J. (2019). *Secuenciación de proteínas*. <https://www.bifi.es/~jsancho/estructuramacromoleculas/20secuenciacionproteinasyDNA/20seqprotyDNA.htm>
- Santamaría, R. (2020). *Predicción Filogenética*.
- Serrano, M., Torrado, L., & Pérez, D. (2013). Impact of Oil Spills on the Mechanical Properties of Sandy Soils. *Revista Científica "General José María Córdova,"* 11,

233–244.

- Sosa, V. (2009). *El árbol de la vida* (Ciencia, Vol. 1).
- Sulbarán, M., Bahsas, A., Velásquez, W., & Otoniel, R. (2008). Caracterización de Biosurfactantes producidos por *Pseudomonas* Fluorescentes aisladas de emulsiones de petróleo pesado. *Ciencia*, 13(2), 228–239. <http://arxiv.org/abs/0805.0452>
- Torrades, S. (2004). Proteómica. *Offarm- Elsevier*, 23(4), 126–130.
- Uad, I. (2012). *Caracterización fisiológica y molecular de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas de fondos marinos (Del Prestige)*. Universidad de Granada.
- Vaca, M., & Astudillo, E. (2016). Diagnóstico de la gestión de derrames de hidrocarburos en gasolineras. *Investigation*, 7, 63–78.
- Valdebenito, E. (2015). *Caracterización Molecular y Estudio Funcional de Bacterias Metanotróficas Aisladas desde Lagunas y Bosques de la Región del Bío Bío, Chile*. Universidad de Concepción.
- Van Beilen, J., Li, Z., Duetz, W., Smits, T., & Witholt, B. (2003). Diversity of Alkane Hydroxylase Systems in the Environment. *Oil & Gas Science and Technology-Rev. IFP*, 58(4), 427–440.
- Van Dyke, F. (2008). *Conservation Biology: Foundations, Concepts, Applications - Fred Van Dyke - Google Libros*. Springer.
- Varela, G. (2002). *Fisiología y metabolismo bacteriano*. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap 11.pdf>
- Wauquier, J. P. (1994). *El Refino Del Petróleo: Petróleo Crudo, Productos Petrolíferos, Esquemas* (Editions T, Vol. 1).
- Widdel, F., & Rabus, R. (2001). *Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons*.
- Yuan Lin, T., Werther, T., Hun Jeoung, J., & Dobbek, H. (2012). Suppression of electron transfer to dioxygen by charge transfer and electron transfer complexes in the FAD-dependent reductase component of toluene dioxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 287(45), 38338–38346. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.374918>
- Ziritt, J. (2010). *El petróleo en cifras*. <http://biblioteca.olade.org/opac-tmpl/Documentos/cg00065.pdf>

ANEXOS

Anexo 1. Resumen de bacterias degradadoras de hidrocarburos

ESPECIE	HIDROCRABURO METABOLIZADO	TINCIÓN/METABOLISMO	CITA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	(Ruiz et al., 2013)
<i>Pseudomonas luteola</i>	Alifáticos saturados	Gram - / Aerobio	
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Aromáticos	Gram - / Aerobio	(García & Aguirre, 2014)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Arthrobacter</i> sp.	Alifáticos saturados y aromáticos	Gram + / Aerobio	(García & Aguirre, 2014)
<i>Burkholderia</i> sp.	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Methylosinus trichosporium</i>	Alifáticos saturados e insaturados	Gram - / Aerobio	(Ruiz et al., 2013)
<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	Aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Rhodococcus</i> sp.	Alifáticos y aromáticos	Gram + / Aerobio	(Ruiz et al., 2013)
<i>Bacillus subtilis</i>	Aromáticos	Gram + / Aerobio	
<i>Alcaligenes</i> sp.	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	(Ruiz et al., 2013)
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Alifáticos saturados y aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Corynebacterium</i> sp.	Alifáticos y aromáticos	Gram + / Aerobio	(Ruiz et al., 2013)
<i>Kocuria roseus</i>	Aromáticos	Gram + / Aerobio	
<i>Brevibacterium aurantiacum</i>	Alifáticos saturados	Gram + / Aerobio	(Ruiz et al., 2013)
<i>Aeromicrobium</i> sp.	Alifáticos y aromáticos	Gram + / Aerobio	
<i>Mycobacterium</i> sp.	Aromáticos	Gram + / Aerobio	(Chaillan et al., 2004)
<i>Gordonia terrae</i>	Alifáticos saturados y aromáticos	Gram + / Aerobio	
<i>Aeromicrobium erythreum</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram + / Aerobio	(Chaillan et al., 2004)
<i>Gordonia hydrophobica</i>	Alifáticos saturados y aromáticos	Gram + / Aerobio	
<i>Burkholderia thailandensis</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	(Chaillan et al., 2004)
<i>Dietzia</i> sp.	Aromáticos	Gram + / Aerobio	
<i>Brevibacterium</i> sp.	Alifáticos y aromáticos	Gram + / Aerobio	(Bracho et al., 2005)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	(Bracho et al., 2005)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Aromáticos	Gram + / Anaerobio	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aromáticos	Gram + / Anaerobio	(Pucci et al., 2010)
<i>Aeromonas</i> sp.	Aromáticos	Gram - / Anaerobio	
<i>Glutamicibacter mysorens</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	(Pucci et al., 2010)
<i>Bacillus atrophaeus</i>	Aromáticos	Gram + / Aerobio	
<i>Bacillus megaterium</i>	Aromáticos	Gram + / Aerobio	(Pucci et al., 2010)
<i>Bacillus pumilus</i>	Aromáticos	Gram + / Aerobio	
<i>Brevibacillus choshinensis</i>	Alifáticos insaturados	Gram + / Aerobio	(Pucci et al., 2010)
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Burkholderia cepacia</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	(Pucci et al., 2010)
<i>Halomonas aquamarina</i>	Alifáticos y aromáticos	-----/-----	
<i>Rothia kristinae</i>	Aromáticos	Gram + / Aerobio	(Pucci et al., 2010)
<i>Kocuria varians</i>	Aromáticos	Gram + / Aerobio	
<i>Kurthia gibsonii</i>	Aromáticos	Gram + / Aerobio	(Pucci et al., 2010)
<i>Lysobacter enzymogenes</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Microbacterium liquefaciens</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram + / Aerobio	(Pucci et al., 2010)
<i>Micrococcus luteus</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram + / Aerobio	
<i>Micrococcus lysae</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram + / Aerobio	(Pucci et al., 2010)
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	Aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Paracoccus denitrificans</i>	Aromáticos	Gram - / Anaerobio	(Pucci et al., 2010)
<i>Photobacterium</i> sp.	Aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Photobacterium angustum</i>	Aromáticos	Gram - / Aerobio	(Pucci et al., 2010)
<i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i>	Aromáticos	-----/-----	
<i>Pseudomonas putida</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	(Pucci et al., 2010)
<i>Psychrobacter immobilis</i>	Aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Rhodobacter</i> sp.	Alifáticos saturados y aromáticos	Gram - / Anaerobio-Aerobio	(Pucci et al., 2010)
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Aromáticos	Gram - / Anaerobio-Aerobio	
<i>Sphingopyxis macrogoltabida</i>	Alifáticos saturados	-----/-----	(Pucci et al., 2010)
<i>Staphylococcus hominis</i>	Alifáticos saturados y aromáticos	Gram + / Aerobio	
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Alifáticos saturados e insaturados	Gram - / Aerobio	(Pucci et al., 2010)
<i>Vibrio diazotrophicus</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Vibrio fischeri</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	(Pucci et al., 2010)
<i>Zobellia uliginosa</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Planococcus</i> sp.	Aromáticos	Gram + / Aerobio	(Pucci et al., 2010)
<i>Ralstonia</i> sp.	Aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Alteromonas</i> sp.	Aromáticos	Gram - / Aerobio	(Narváez et al., 2008)
<i>Klebsiella</i> sp.	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Anaerobio	
<i>Chromobacterium</i> sp.	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Anaerobio	(Narváez et al., 2008)
<i>Pseudomonas oryzae</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Enterobacter cloacae</i>	Alifáticos saturados y aromáticos	Gram - / Anaerobio	(Narváez et al., 2008)
<i>Bacillus brevis</i>	Alifáticos saturados y aromáticos	Gram + / Aerobio	
<i>Bacillus cereus</i>	Alifáticos saturados y aromáticos	Gram + / Anaerobio-Aerobio	(Reyes et al., 2018)
<i>Serratia</i> sp.	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Anaerobio	
<i>Raoultella</i> sp.	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	(Llano & Reategui, 2018)
<i>Citrobacter</i> sp.	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Agrobacterium</i> sp.	Aromáticos	Gram - / Aerobio	(Roger & Teresinha, 2020)
<i>Sporosarcina</i> sp.	Alifáticos y aromáticos	Gram + / Aerobio	
<i>Azospirillum brasilense</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	(Hernández et al., 2003)
<i>Azospirillum lipoferum</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Alifáticos saturados y aromáticos	Gram + / Aerobio	(Acuña et al., 2010)
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Brevundimonas diminuta</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	(Acuña et al., 2010)
<i>Marinomonas</i> sp.	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Azotobacter</i> sp.	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	(Viñas, 2005)
<i>Flavobacteriaceae</i> str.	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Labrys monachus</i>	Aromáticos	Gram - / Aerobio	(Viñas, 2005)
<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Sphingomonas</i> sp.	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	(Nápoles et al., 2019)
<i>Alcaligenes defragrans</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Acinetobacter bouvetii</i>	Aromáticos	Gram - / Aerobio	(Nápoles et al., 2019)
<i>Deftuvibacter lusitensis</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram + / Anaerobio-Aerobio	(Nápoles et al., 2019)
<i>Raoultella terrigena</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Burkholderia</i> sp.	Alifáticos saturados y aromáticos	Gram - / Aerobio	(Nápoles et al., 2019)
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	Alifáticos saturados	Gram + / Anaerobio-Aerobio	
<i>Aeromonas</i> sp.	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Anaerobio	(Naranjo, 2017)
<i>Nocardia</i> sp.	Aromáticos	Gram - / Anaerobio	
<i>Flavobacterium</i> sp.	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Anaerobio	(Naranjo, 2017)
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram + / Anaerobio	
<i>Brevundimonas diminuta</i>	Aromáticos	Gram - / Aerobio	(Naranjo, 2017)
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	(Naranjo, 2017)
<i>Bacillus smithii</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram + / Anaerobio	
<i>Bacillus sphaericus</i>	Alifáticos saturados y aromáticos	Gram - / Anaerobio	(Maposita et al., 2011)
<i>Serratia rubidae</i>	Alifáticos y aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Spirillum</i> sp.	Alifáticos saturados y aromáticos	Gram - / Anaerobio	(Maposita et al., 2011)
<i>Xanthomonas</i> sp.	Aromáticos	Gram - / Aerobio	
<i>Bacillus licheniformis</i>	Alifáticos saturados y aromáticos	Gram + / Anaerobio-Aerobio	(Maposita et al., 2011)
<i>Microbacterium testaceum</i>	Alifáticos saturados y aromáticos	Gram - / Anaerobio	
<i>Desulfatibacillum aliphaticivorans</i>	Alifáticos saturados e insaturados	Gram - / Anaerobio	(Cevallos & Niño, 2014)
<i>Desulfatiferula olefinivorans</i>	Alifáticos saturados e insaturados	Gram - / Anaerobio	
<i>Thauera aromatica</i>	Aromáticos	Gram - / Anaerobio	(Grossi et al., 2008)
<i>Magnetospirillum</i> spp.	Aromáticos	Gram - / Anaerobio	
<i>Burkholderia xenovorans</i>	Aromáticos	Gram - / Aerobio	(Arbelli, 2009)

Anexo 2. Resultados del BLAST de la enzima Benceno 1,2-dioxigenasa

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Accession
benzene 1,2-dioxygenase [Sphingosinicella soli]	337	337	100%	4e-117	100.00	WP_184065188.1
nuclear transport factor 2 family protein [Sphingobium sp. TB-6]	272	272	100%	3e-91	76.83	WP_169576828.1
nuclear transport factor 2 family protein [Sphingopyxis...]	170	170	100%	9e-51	51.83	WP_105998637.1
nuclear transport factor 2 family protein [Sphingopyxis sp. H050]	169	169	100%	1e-50	51.22	WP_058815035.1
MULTISPECIES: nuclear transport factor 2 family protein...	169	169	100%	2e-50	51.22	WP_058807215.1
MULTISPECIES: nuclear transport factor 2 family protein...	168	168	100%	4e-50	51.22	WP_037557632.1
benzene 1,2-dioxygenase [Sphingorhabdus sp. YGSM121]	162	162	100%	6e-48	51.22	WP_100093368.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit beta...	159	159	100%	2e-46	48.78	WP_013832806.1
MULTISPECIES: aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit...	157	157	97%	8e-46	49.69	WP_051520062.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit beta...	157	157	100%	9e-46	48.17	WP_088443872.1
MULTISPECIES: aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit...	156	156	97%	2e-45	50.93	WP_088189940.1
MULTISPECIES: aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit...	156	156	100%	2e-45	47.56	WP_035540703.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit beta...	156	156	100%	3e-45	47.56	WP_072673784.1
benzene 1,2-dioxygenase [Novosphingobium sp. SCN 66-18]	155	155	100%	4e-45	46.95	ODU68243.1
MULTISPECIES: aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit...	155	155	100%	5e-45	46.95	WP_007015973.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit beta...	155	155	100%	6e-45	46.95	WP_130030104.1
benzene 1,2-dioxygenase [Hyphomonas sp. BRH_c22]	154	154	92%	9e-45	50.33	KJ538390.1
benzene 1,2-dioxygenase [Alphaproteobacteria bacterium]	154	154	100%	1e-44	46.06	MSP43496.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit beta...	153	153	100%	2e-44	48.19	WP_154691301.1
MULTISPECIES: nuclear transport factor 2 family protein...	152	152	100%	5e-44	46.34	WP_025548174.1
MULTISPECIES: aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit...	152	152	100%	1e-43	46.34	WP_137865410.1
putative toluene/benzoate dioxygenase small subunit...	152	152	100%	2e-43	46.34	ACV31387.1
benzene 1,2-dioxygenase [Erythrobacter atlanticus]	151	151	95%	2e-43	48.41	WP_048886481.1
phenylpropionate dioxygenase small subunit [uncultured bacteri...	149	149	100%	1e-42	48.17	AMK59420.1
hypothetical protein EOP24_06715 [Rhizobiales bacterium]	149	149	92%	2e-42	46.36	RYE48515.1
benzene 1,2-dioxygenase [Rugosibacter sp.]	149	149	97%	2e-42	45.62	TAJ12362.1
benzene 1,2-dioxygenase [Rugosibacter aromaticivorans]	148	148	97%	2e-42	45.62	AJP49403.1
nuclear transport factor 2 family protein [Parvivaculum...]	148	148	100%	3e-42	46.95	WP_012110674.1
benzene 1,2-dioxygenase [Rugosibacter sp.]	148	148	97%	4e-42	45.62	TBR14861.1
small subunit of phenylpropionate dioxygenase [uncultured...]	147	147	100%	7e-42	46.95	ADI19682.1
nuclear transport factor 2 family protein [Burkholderia sp. Bk]	147	147	96%	1e-41	45.34	WP_030101491.1
hypothetical protein DI523_16640 [Paraburkholderia fungorum]	147	147	96%	1e-41	45.34	PZR46748.1
E160 [uncultured bacterium]	147	147	95%	1e-41	45.86	ART37442.1
benzene 1,2-dioxygenase [Rugosibacter sp.]	146	146	96%	2e-41	44.30	TBR12667.1
benzene 1,2-dioxygenase [Rugosibacter aromaticivorans]	144	144	95%	2e-40	45.22	AJP49473.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit beta...	143	143	100%	2e-40	44.51	WP_066762537.1
G230 [uncultured bacterium]	143	143	95%	3e-40	45.22	ART38360.1
MULTISPECIES: aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit...	143	143	100%	4e-40	44.51	WP_008828130.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit beta...	143	143	100%	4e-40	43.90	WP_039337014.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit beta...	143	143	100%	4e-40	43.90	KHS43813.1
benzene 1,2-dioxygenase [Oxalobacteraceae bacterium]	142	142	93%	4e-40	45.45	NDC10140.1
MULTISPECIES: aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit...	142	142	100%	6e-40	43.90	WP_010891026.1
benzoate 1,2-dioxygenase small subunit [Polaromonas sp.]	142	142	92%	7e-40	45.22	MBA4215573.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase, beta subunit...	142	142	100%	7e-40	43.90	ABP64108.1
benzene 1,2-dioxygenase [Sphingopyxis sp. GW247-27LB]	142	142	93%	8e-40	45.45	WP_095387747.1
MULTISPECIES: aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit...	142	142	100%	8e-40	44.51	WP_103000335.1
benzene 1,2-dioxygenase [Novosphingobium sp. TW-4]	140	140	100%	3e-39	43.29	WP_169494290.1
benzoate 1,2-dioxygenase small subunit [Gammaproteobacteria...]	140	140	96%	3e-39	43.75	RLA12345.1
benzene 1,2-dioxygenase [Rugosibacter sp.]	139	139	96%	6e-39	44.30	TAJ22815.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit beta...	139	139	100%	1e-38	43.29	WP_122129293.1
B207 [uncultured bacterium]	139	139	100%	1e-38	41.46	ART35955.1
benzene 1,2-dioxygenase [Salinisphaeraeaceae bacterium]	139	139	92%	1e-38	44.74	MAA73360.1
Snoal-like domain-containing protein [Mycococcales bacterium]	139	139	92%	1e-38	46.05	NNL86770.1
benzene 1,2-dioxygenase [Salinisphaeraeaceae bacterium]	139	139	95%	1e-38	42.95	MAA73358.1
TPA: benzene 1,2-dioxygenase [Alphaproteobacteria bacterium]	139	139	100%	2e-38	41.82	HAK63646.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit beta [Aerostic...]	138	138	93%	2e-38	43.23	WP_126537176.1
benzoate 1,2-dioxygenase small subunit [Polaromonas glacialis]	137	137	100%	4e-38	47.59	WP_029525065.1
benzoate 1,2-dioxygenase small subunit [Polaromonas...]	137	137	100%	4e-38	46.67	WP_011801498.1
G110 [uncultured bacterium]	137	137	98%	4e-38	41.98	ART38732.1
F417 [uncultured bacterium]	137	137	98%	5e-38	41.36	ART37810.1
benzoate 1,2-dioxygenase small subunit [Azohydromonas lata]	137	137	94%	5e-38	47.44	WP_066339990.1
L63 [uncultured bacterium]	137	137	100%	6e-38	40.24	ART40610.1
TPA: benzoate 1,2-dioxygenase small subunit [Gammaproteobacter...]	137	137	94%	6e-38	43.59	HAC34754.1
nuclear transport factor 2 family protein [Pseudomonas...]	137	137	100%	7e-38	40.24	WP_025167845.1
benzoate 1,2-dioxygenase small subunit [Sphingomonas sp. Y57]	137	137	92%	7e-38	48.05	WP_047169285.1
chlorobenzoate 1,2-dioxygenase subunit beta [uncultured...]	137	137	98%	7e-38	40.74	AMK59447.1
D296 [uncultured bacterium]	137	137	98%	9e-38	41.98	ART36831.1
nuclear transport factor 2 family protein [Pseudoxanthomonas...]	136	136	95%	1e-37	41.67	WP_122227696.1
benzoate/toluene 1,2-dioxygenase beta subunit/anthrilate...	137	137	92%	1e-37	45.10	RCX10671.1
nuclear transport factor 2 family protein [Immundisolibacter...]	136	136	98%	1e-37	41.98	WP_068805458.1
nuclear transport factor 2 family protein [Extensimonas vulgaris]	136	136	92%	1e-37	45.10	WP_114482671.1
F155 [uncultured bacterium]	136	136	98%	1e-37	41.36	ART38087.1
benzoate 1,2-dioxygenase small subunit [Kocuria marina]	136	136	99%	1e-37	46.06	WP_098055063.1
hypothetical protein [Gammaproteobacteria bacterium]	136	136	100%	2e-37	42.07	MSR13584.1
hypothetical protein A3J24_03485 [Deltaproteobacteria bacteri...]	136	136	100%	2e-37	39.63	OGQ52468.1
MULTISPECIES: benzoate 1,2-dioxygenase small subunit...	135	135	100%	2e-37	47.59	WP_068579844.1
B138 [uncultured bacterium]	135	135	98%	2e-37	41.36	ART36176.1
benzoate 1,2-dioxygenase small subunit [Kocuria indica]	136	136	99%	2e-37	46.06	WP_162228530.1
benzoate 1,2-dioxygenase small subunit [Burkholderiales...]	135	135	94%	3e-37	46.15	OG801857.1
benzoate 1,2-dioxygenase small subunit [Psychrobacter piechaudii]	135	135	93%	3e-37	44.87	WP_077451919.1
nuclear transport factor 2 family protein [Immundisolibacter sp.]	135	135	98%	3e-37	41.36	MBC7161097.1
C454 [uncultured bacterium]	135	135	95%	4e-37	43.31	ART36229.1
benzene 1,2-dioxygenase [Hoeftlea sp.]	136	136	100%	5e-37	42.07	MBC7284983.1
nuclear transport factor 2 family protein [Polaromonas sp...]	135	135	92%	5e-37	42.68	WP_096697594.1
benzoate 1,2-dioxygenase small subunit [Aquabacterium olei]	135	135	94%	5e-37	45.51	WP_109037588.1
benzoate 1,2-dioxygenase small subunit [Azohydromonas sp...]	134	134	94%	6e-37	46.15	WP_169162979.1
benzoate 1,2-dioxygenase small subunit [Pseudomonas sp. ANT_H12B]	134	134	93%	6e-37	46.79	WP_149418786.1
nuclear transport factor 2 family protein [Immundisolibacter...]	134	134	97%	7e-37	42.59	WP_068804233.1
MULTISPECIES: benzoate 1,2-dioxygenase small subunit...	134	134	92%	8e-37	48.05	WP_111498029.1
benzoate 1,2-dioxygenase small subunit [Kocuria indica]	134	134	99%	9e-37	45.45	WP_144997201.1
benzoate 1,2-dioxygenase small subunit [Flavobacterium viscosus]	134	134	97%	1e-36	41.61	WP_124898715.1

Anexo 3. Resultados del BLAST de la enzima Fenol 2-monooxigenasa

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Accession
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	732	732	100%	0.0	100.00	WP_114219994.1
MULTISPECIES: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding...	728	728	100%	0.0	99.72	WP_017393686.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	725	725	100%	0.0	99.15	WP_191011891.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	725	725	100%	0.0	99.15	WP_100191858.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	725	725	100%	0.0	99.15	WP_130118633.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	725	725	100%	0.0	99.15	WP_014206216.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	725	725	100%	0.0	99.15	WP_151740349.1
MULTISPECIES: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding...	725	725	100%	0.0	98.87	WP_005070268.1
MULTISPECIES: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding...	724	724	100%	0.0	99.15	WP_151822642.1
TPA: phenol hydroxylase [Acinetobacter nosocomialis]	724	724	100%	0.0	99.43	HAV16952.1
MULTISPECIES: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding...	724	724	100%	0.0	99.43	WP_031997397.1
MULTISPECIES: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding...	724	724	100%	0.0	99.15	WP_017481380.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	724	724	100%	0.0	99.15	WP_068614162.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	724	724	100%	0.0	99.15	WP_022574726.1
MULTISPECIES: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding...	723	723	100%	0.0	98.87	WP_039757494.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	723	723	100%	0.0	98.87	WP_005132747.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	723	723	100%	0.0	98.87	WP_174743843.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	723	723	100%	0.0	98.58	WP_119685692.1
MULTISPECIES: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding...	723	723	100%	0.0	98.87	WP_017386344.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	723	723	100%	0.0	98.87	WP_151299452.1
MULTISPECIES: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding...	723	723	100%	0.0	99.15	WP_087606502.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	723	723	100%	0.0	99.15	WP_033850554.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	723	723	100%	0.0	98.87	WP_151744611.1
MULTISPECIES: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding...	723	723	100%	0.0	99.15	WP_017399432.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	723	723	100%	0.0	98.87	WP_086394541.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	723	723	100%	0.0	99.15	WP_167563885.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	723	723	100%	0.0	98.58	WP_000122053.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	723	723	100%	0.0	98.87	WP_069030557.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	723	723	100%	0.0	98.87	WP_005303623.1
MULTISPECIES: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding...	723	723	100%	0.0	98.87	WP_032063339.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	722	722	100%	0.0	98.87	WP_191015213.1
MULTISPECIES: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding...	722	722	100%	0.0	98.87	WP_032052680.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	722	722	100%	0.0	98.58	WP_114271473.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	722	722	100%	0.0	98.87	WP_057076996.1
MULTISPECIES: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding...	722	722	100%	0.0	98.87	WP_013198464.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	722	722	100%	0.0	98.30	WP_031971132.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	722	722	100%	0.0	98.58	WP_151741871.1
phenol hydroxylase [Acinetobacter pittii]	722	722	100%	0.0	98.58	AXJ90644.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	721	721	100%	0.0	98.87	WP_114189995.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	721	721	100%	0.0	98.58	WP_100291232.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	721	721	100%	0.0	98.87	WP_151763515.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	721	721	100%	0.0	98.58	WP_192454921.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	721	721	100%	0.0	98.87	WP_108008449.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	721	721	100%	0.0	98.87	WP_101663773.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	721	721	100%	0.0	98.58	WP_068934424.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	721	721	100%	0.0	98.58	WP_174740166.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	721	721	100%	0.0	98.58	WP_130121864.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	721	721	100%	0.0	98.30	WP_130173997.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	721	721	100%	0.0	98.30	WP_191105466.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	721	721	100%	0.0	98.58	WP_174723566.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	721	721	100%	0.0	98.30	WP_069122673.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	721	721	100%	0.0	98.58	WP_107972377.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	721	721	100%	0.0	98.58	WP_057069820.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	721	721	100%	0.0	98.30	WP_032004003.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	721	721	100%	0.0	98.87	WP_032042130.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	721	721	100%	0.0	98.30	WP_125565026.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	721	721	100%	0.0	98.87	WP_151761572.1
MULTISPECIES: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding...	721	721	100%	0.0	98.58	WP_000122050.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	721	721	100%	0.0	98.58	WP_057105723.1
MULTISPECIES: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding...	721	721	100%	0.0	98.58	WP_004793604.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	721	721	100%	0.0	98.58	WP_039250676.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	720	720	100%	0.0	98.58	WP_009520482.1
MULTISPECIES: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding...	720	720	100%	0.0	98.58	WP_077168214.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	720	720	100%	0.0	98.30	WP_163049547.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	720	720	100%	0.0	98.58	WP_104918972.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	720	720	100%	0.0	98.58	WP_191106732.1
MULTISPECIES: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding...	720	720	100%	0.0	98.87	WP_004887997.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	720	720	100%	0.0	98.58	MPS59965.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	720	720	100%	0.0	98.58	WP_063098441.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	720	720	100%	0.0	98.30	WP_057062319.1
MULTISPECIES: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding...	720	720	100%	0.0	98.58	WP_032041269.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	720	720	100%	0.0	98.87	WP_075382604.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	720	720	100%	0.0	98.30	WP_046812973.1
TPA: phenol hydroxylase [Acinetobacter sp.]	720	720	100%	0.0	98.58	HBU89317.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	719	719	100%	0.0	98.58	WP_069036785.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	719	719	100%	0.0	98.30	WP_174722758.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	719	719	100%	0.0	98.58	WP_151799318.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	719	719	100%	0.0	98.30	WP_077162569.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	719	719	100%	0.0	98.58	WP_031966455.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	719	719	100%	0.0	98.30	WP_151827333.1
MULTISPECIES: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding...	719	719	100%	0.0	98.30	WP_002163292.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	719	719	100%	0.0	98.02	WP_114258835.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	719	719	100%	0.0	98.58	WP_044100886.1
MULTISPECIES: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding...	719	719	100%	0.0	98.58	WP_031995728.1
TPA: phenol hydroxylase [Acinetobacter nosocomialis]	719	719	100%	0.0	98.58	HCU39293.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	719	719	100%	0.0	98.30	WP_151792447.1
MULTISPECIES: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding...	719	719	100%	0.0	98.30	WP_000122052.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	719	719	100%	0.0	98.02	WP_058062163.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	719	719	100%	0.0	98.58	WP_044100886.1
MULTISPECIES: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding...	719	719	100%	0.0	98.58	WP_031995728.1
TPA: phenol hydroxylase [Acinetobacter nosocomialis]	719	719	100%	0.0	98.58	HCU39293.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	719	719	100%	0.0	98.30	WP_151792447.1
MULTISPECIES: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding...	719	719	100%	0.0	98.30	WP_000122052.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	719	719	100%	0.0	98.02	WP_058062163.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	719	719	100%	0.0	98.02	WP_191012906.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	719	719	100%	0.0	98.30	WP_151683761.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	718	718	100%	0.0	98.30	WP_103236594.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	718	718	100%	0.0	98.58	WP_005076915.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	718	718	100%	0.0	98.30	WP_107882531.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	718	718	100%	0.0	98.02	WP_144733670.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	718	718	100%	0.0	98.30	WP_086495885.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	718	718	100%	0.0	98.02	WP_174758801.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	718	718	100%	0.0	98.02	WP_049065248.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	717	717	100%	0.0	98.30	WP_174738776.1
MULTISPECIES: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding...	717	717	100%	0.0	98.58	WP_032012066.1
2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein...	717	717	100%	0.0	98.30	WP_125542414.1

Anexo 4. Resultados del BLAST de la enzima Tolueno 2-monooxigenasa

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident.	Accession
MULTISPECIES: phenol hydroxylase subunit P4 [Burkholderiales]	245	245	100%	6e-82	100.00	WP_011516093.1
MULTISPECIES: phenol hydroxylase subunit P4 [Pandoraea]	243	243	100%	4e-81	98.31	WP_023872366.1
phenol hydroxylase [Comamonas sp. SCN 65-56]	211	211	100%	2e-68	84.75	ODS93216.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Pseudoxanthomonas spadix]	209	209	100%	6e-68	81.36	WP_014159714.1
phenol hydroxylase [Burkholderiales bacterium 66-5]	209	209	100%	8e-68	83.90	OJU90892.1
phenol hydroxylase [Rhodiferax sp.]	209	209	100%	1e-67	82.20	NM14511.1
Phenol 2-monooxygenase [Hydrogenophaga sp. T4]	207	207	100%	6e-67	80.51	EW565905.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Rhodiferax sp. OTU1]	204	204	100%	7e-66	80.51	WP_114969328.1
phenol hydroxylase [Burkholderiales bacterium...]	202	202	100%	5e-65	78.81	OG852665.1
phenol hydroxylase [Malikia spinosa]	201	201	100%	1e-64	79.66	WP_161124061.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Giesbergeria anulus]	201	201	100%	2e-64	79.66	WP_091456665.1
phenol hydroxylase [Burkholderiales bacterium...]	199	199	100%	1e-63	77.97	OG881215.1
MULTISPECIES: phenol hydroxylase subunit P4 [Comamonadaceae]	197	197	100%	3e-63	77.97	WP_024538558.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Diaphorobacter sp. J5-51]	197	197	100%	4e-63	77.97	WP_047350221.1
phenol hydroxylase [Burkholderiales bacterium PBB5]	196	196	98%	8e-63	80.17	OYU99751.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Simplicispira metamorpha]	196	196	98%	2e-62	80.17	WP_119014785.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Hydrogenophaga palleronii]	196	196	100%	2e-62	78.81	WP_066266854.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Comamonas thiooxydans]	195	195	100%	3e-62	76.27	WP_057092687.1
phenol hydroxylase subunit [Diaphorobacter sp. PCA039]	195	195	98%	3e-62	78.45	ACN62957.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Acidovorax carolinensis]	193	193	98%	2e-61	78.45	WP_094097051.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Leptothrix cholodnii]	193	193	98%	2e-61	77.59	WP_012348364.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Comamonas testosteroni]	192	192	98%	3e-61	76.72	WP_149356726.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Sphaerotilus montanus]	192	192	100%	5e-61	76.86	WP_17963398.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Comamonas sp. B9U6D]	192	192	100%	5e-61	75.42	WP_179626528.1
MULTISPECIES: phenol hydroxylase subunit P4 [Comamonas]	191	191	98%	1e-60	76.72	WP_003066651.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Comamonas composti]	191	191	98%	1e-60	76.72	WP_027014350.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Acidovorax monticola]	191	191	99%	1e-60	74.36	WP_187735220.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Hydrogenophaga sp. 2FB]	191	191	98%	2e-60	77.59	WP_137921331.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Acidovorax sp. HMF018]	191	191	98%	2e-60	76.72	WP_108499288.1
phenol hydroxylase [Aquincola sp. S2]	191	191	100%	2e-60	75.42	WP_173132050.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Comamonas phosphati]	191	191	98%	2e-60	75.00	WP_188473370.1
MULTISPECIES: phenol hydroxylase subunit P4 [Alcaligenaceae]	189	189	100%	6e-60	75.42	WP_113934707.1
MULTISPECIES: phenol hydroxylase subunit P4 [Comamonas]	189	189	98%	1e-59	75.86	WP_046462197.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Simplicispira psychrophila]	189	189	98%	1e-59	75.86	WP_027994679.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Xenophilus azovorans]	189	189	98%	1e-59	75.86	WP_038204578.1
MULTISPECIES: phenol hydroxylase subunit P4 [Hydrogenophaga]	189	189	98%	1e-59	75.86	WP_066160888.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Acidovorax sp. JHL-9]	188	188	98%	2e-59	75.00	WP_026434962.1
phenol hydroxylase [Burkholderiaceae bacterium]	188	188	99%	2e-59	73.50	KAB2887621.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Hydrogenophaga crassostreae]	188	188	98%	2e-59	75.00	WP_066085332.1
phenol hydroxylase [Comamonadaceae bacterium]	187	187	98%	3e-59	75.86	MBA4261069.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Comamonas thiooxydans]	187	187	98%	3e-59	75.86	WP_063664242.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Paraburkholderia lycopersici]	187	187	98%	3e-59	74.14	WP_091997236.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Acidovorax sol1]	187	187	98%	4e-59	75.00	WP_092699297.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Acidovorax carolinensis]	187	187	98%	5e-59	76.72	WP_086911017.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Acidovorax sp. J542]	186	186	98%	7e-59	74.14	WP_011803678.1
phenol hydroxylase [Rubrivivax sp. SCN 70-15]	186	186	98%	9e-59	75.86	ODV06680.1
MULTISPECIES: phenol hydroxylase subunit P4 [Burkholderiales]	186	186	98%	1e-58	74.14	WP_034382472.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Acidovorax sp. CCH12-A4]	186	186	98%	1e-58	73.28	WP_066786859.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Comamonas testosteroni]	186	186	98%	1e-58	75.86	WP_087082002.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Verminephrobacter eiseniae]	186	186	100%	2e-58	74.58	WP_011810527.1
phenol hydroxylase [Hydrogenophaga sp. BPS33]	185	185	98%	3e-58	74.14	WP_159589132.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Paraburkholderia sp. DHOA04]	185	185	100%	3e-58	69.49	WP_124150874.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Paraburkholderia mimosarum]	185	185	100%	4e-58	69.49	WP_028210916.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Ralstonia pickettii]	185	185	100%	4e-58	72.73	WP_182557827.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Simplicispira suum]	184	184	98%	5e-58	74.14	WP_106447155.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Burkholderia anthina]	184	184	98%	5e-58	73.28	WP_175857998.1
phenol hydroxylase [Verminephrobacter sp. Larva24]	184	184	98%	7e-58	75.00	KAB7628846.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Ralstonia pickettii]	184	184	100%	7e-58	73.55	WP_012430587.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Burkholderiaceae bacterium 26]	184	184	100%	7e-58	71.90	WP_045202767.1
phenol hydroxylase [Betaproteobacteria bacterium...]	184	184	98%	9e-58	74.14	PK077556.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Schlegelella thermodepolymerans]	184	184	100%	1e-57	72.88	WP_104356874.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Thiomonas sp. FB-Cd]	184	184	100%	1e-57	72.03	WP_031404585.1
Phenol 2-monooxygenase [Hydrogenophaga sp. T4]	183	183	98%	1e-57	74.14	EW564921.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Hydrogenophaga flava]	183	183	98%	2e-57	73.28	WP_066256100.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Acidovorax carolinensis]	182	182	98%	4e-57	73.28	WP_086926282.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Hydrogenophaga sp. pseudoflava]	182	182	98%	4e-57	72.41	WP_133155609.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Simplicispira hankyongi]	182	182	98%	5e-57	72.41	WP_119108274.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Diaphorobacter ruginosibacter]	182	182	98%	5e-57	72.41	WP_187595605.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Thiomonas sp. X19]	182	182	100%	6e-57	70.34	WP_112487422.1
phenol hydroxylase [Burkholderiaceae bacterium]	181	181	98%	1e-56	72.41	TAM38008.1
phenol hydroxylase [Diaphorobacter sp. HDW4A]	181	181	98%	1e-56	71.55	WP_166300134.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Ralstonia sp. NFACC01]	181	181	100%	1e-56	71.07	WP_092972726.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Paraburkholderia heleia]	181	181	100%	2e-56	67.80	WP_042259247.1
phenol hydroxylase [Tepidimonas aquatica]	180	180	98%	3e-56	71.55	WP_144325930.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Schlegelella thermodepolymerans]	180	180	100%	3e-56	69.49	WP_132765125.1
phenol hydroxylase [Burkholderiales bacterium...]	180	180	98%	3e-56	72.41	OGB34000.1
phenol hydroxylase [Ideonella dechloratans]	179	179	100%	5e-56	70.34	WP_151123199.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Thiomonas delicata]	179	179	100%	8e-56	71.19	WP_094161780.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Paraburkholderia kururiensis]	179	179	98%	9e-56	69.83	WP_017775857.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Paraburkholderia kururiensis]	179	179	98%	1e-55	70.69	WP_042301705.1
phenol hydroxylase [Diaphorobacter sp. HDW4B]	179	179	94%	1e-55	72.32	WP_166069448.1
phenol hydroxylase [Tepidimonas thermarum]	178	178	100%	1e-55	69.49	WP_143903164.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Hydrogenophaga sp. D2P1]	178	178	98%	2e-55	69.83	WP_177136967.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Cupriavidus sp. B157]	178	178	100%	2e-55	68.85	WP_019451465.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Ideonella sp. B508-1]	177	177	100%	3e-55	69.49	WP_022979340.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Hydrogenophaga sp.]	177	177	98%	4e-55	69.83	MBE0588798.1
MULTISPECIES: phenol hydroxylase subunit P4 [Cupriavidus]	177	177	100%	5e-55	68.03	WP_011301792.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Leptothrix mobilis]	175	175	100%	2e-54	69.49	WP_130483844.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Aquabacterium tepidiphilum]	174	174	98%	5e-54	70.69	WP_119157413.1
phenol hydroxylase [Burkholderia diffusa]	174	174	98%	5e-54	68.97	WP_151047159.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Burkholderia diffusa]	174	174	98%	6e-54	68.97	WP_175816280.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Burkholderia anthina]	174	174	98%	8e-54	68.97	WP_175855189.1
MULTISPECIES: phenol hydroxylase subunit P4 [Burkholderia]	173	173	98%	1e-53	68.10	WP_096500774.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Deiftia sp. UME58]	173	173	98%	1e-53	70.69	WP_183017515.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Burkholderia multivorans]	173	173	99%	1e-53	67.52	WP_111311454.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Burkholderia anthina]	173	173	98%	2e-53	68.10	WP_175718525.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Burkholderia sp. lig30]	172	172	98%	2e-53	69.83	WP_038710719.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Burkholderia multivorans]	172	172	99%	3e-53	67.52	WP_039222858.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Burkholderia multivorans]	172	172	99%	3e-53	67.52	WP_006397644.1
phenol hydroxylase subunit P4 [Burkholderia anthina]	172	172	98%	3e-53	68.10	WP_175690971.1

Anexo 5. Resultados del BLAST de la enzima Tolueno metil-monooxigenasa

Description	Max Score	Total Query Score	E Value	Per. Ident	Accession
MULTISPECIES: xylene monooxygenase subunit XylM [Pseudomonas]	759	759	100%	0.0	100.00 WP_011805930.1
MULTISPECIES: xylene monooxygenase subunit XylM [Pseudomonas]	755	755	100%	0.0	99.19 WP_0888137674.1
xylene monooxygenase subunit XylM [Pseudomonas aeruginosa]	753	753	100%	0.0	98.92 WP_115759382.1
MULTISPECIES: xylene monooxygenase subunit XylM [Pseudomonas]	747	747	100%	0.0	98.11 WP_004575986.1
xylene monooxygenase hydroxylase subunit XylM [Pseudomonas...]	746	746	100%	0.0	97.84 ALP69153.1
xylene monooxygenase subunit XylM [Pseudomonas putida]	746	746	100%	0.0	97.84 WP_013100937.1
MULTISPECIES: xylene monooxygenase subunit XylM [Pseudomonas]	744	744	100%	0.0	97.84 WP_011600766.1
xylene monooxygenase subunit XylM [Pseudomonas sp. Ant30-3]	709	709	100%	0.0	91.06 WP_028624485.1
xylene monooxygenase hydroxylase subunit [Pseudomonas putida]	707	707	100%	0.0	90.79 AGT95742.1
xylene monooxygenase subunit XylM [Pseudomonas taeanensis]	703	703	97%	0.0	93.35 WP_025167848.1
XylM [Pseudomonas migulae]	682	682	99%	0.0	88.04 AGC70348.1
MULTISPECIES: xylene monooxygenase subunit XylM [Pseudomonas]	682	682	99%	0.0	88.04 WP_016355720.1
4-nitrotoluene monooxygenase hydroxylase component NtnMA...	659	659	100%	0.0	86.18 AAC38359.1
xylene monooxygenase subunit XylM [Pseudoxanthomonas spadix]	653	653	97%	0.0	84.49 WP_043290721.1
xylene monooxygenase hydroxylase subunit [Halioxenophilus...]	623	623	97%	0.0	81.28 BBB44451.1
xylene monooxygenase [Pseudoxanthomonas spadix BD-a59]	622	622	93%	0.0	84.06 AER57606.1
fatty acid desaturase [Spongibacter sp. KMU-166]	613	613	98%	0.0	79.56 WP_168450403.1
alkane 1-monooxygenase [Alteromonas macleodii]	609	609	97%	0.0	79.61 WP_156087426.1
alkane 1-monooxygenase [Tepidiphilus succinatimandens]	596	596	98%	0.0	74.59 WP_141056724.1
alkane 1-monooxygenase [Sphingomonas sp. TF3]	491	491	97%	2e-171	65.65 WP_126849439.1
alkane 1-monooxygenase [Panacagrionas perspica]	464	464	100%	2e-160	60.05 WP_133881468.1
alkane 1-monooxygenase [Panacagrionas perspica]	463	463	100%	7e-160	59.79 TDU31631.1
alkane 1-monooxygenase [Hyphomonas oceanitis]	451	451	97%	2e-155	60.61 WP_035540765.1
alkane 1-monooxygenase [Porphyrobacter sanguineus]	451	451	98%	3e-155	60.05 WP_072673750.1
fatty acid desaturase [Hyphomonas oceanitis SCH89]	450	450	97%	1e-154	60.33 KDA01186.1
MULTISPECIES: alkane 1-monooxygenase [unclassified Henriciella]	449	449	97%	2e-154	60.06 WP_119404664.1
alkane 1-monooxygenase [Sphingopyxis bauzanensis]	446	446	97%	2e-153	59.13 WP_088443831.1
alkane 1-monooxygenase [Sphingorhabdus sp. YGSMI21]	437	437	97%	6e-150	58.58 WP_100093386.1
alkane 1-monooxygenase [Polycyclovorans algicola]	436	436	97%	1e-149	58.36 WP_029889238.1
fatty acid desaturase [Hydrogenophaga sp. D2P1]	432	432	96%	5e-148	57.89 WP_177137693.1
MULTISPECIES: alkane 1-monooxygenase [unclassified Sphingobium]	428	428	97%	3e-146	56.95 WP_096063843.1
alkane 1-monooxygenase [Sphingobium sp. Z007]	427	427	97%	5e-146	56.95 WP_088189923.1
alkane 1-monooxygenase [Novosphingobium sp. PP1Y]	425	425	98%	4e-145	55.86 WP_013834097.1
alkane 1-monooxygenase [Polycyclovorans algicola]	425	425	98%	5e-145	57.38 WP_029889237.1
xylene monooxygenase [Novosphingobium sp. SCN 66-18]	423	423	98%	2e-144	55.59 ODU68261.1
MULTISPECIES: alkane 1-monooxygenase [Sphingobium]	421	421	98%	1e-143	55.71 WP_025548206.1
xylene monooxygenase [Sphingobium sp. 32-64-5]	420	420	98%	4e-143	55.16 OYW88507.1
MULTISPECIES: alkane 1-monooxygenase [Sphingomonadaceae]	420	420	97%	4e-143	56.49 WP_010891008.1
fatty acid desaturase [Novosphingobium sp. TW-4]	419	419	97%	9e-143	56.49 WP_169494272.1
alkane 1-monooxygenase [Novosphingobium sp. PP1Y]	419	419	98%	1e-142	55.43 WP_013832824.1
MULTISPECIES: alkane 1-monooxygenase [Sphingomonadaceae]	418	418	97%	3e-142	55.95 WP_008828148.1
alkane 1-monooxygenase [Betaproteobacteria bacterium]	417	417	97%	6e-142	56.01 NBS64977.1
alkane 1-monooxygenase [Novosphingobium kunmingense]	414	414	97%	1e-140	57.38 WP_100868216.1
fatty acid desaturase [Novosphingobium indicum]	413	413	97%	2e-140	55.68 WP_188823841.1
fatty acid desaturase [Novosphingobium marinum]	410	410	97%	2e-139	56.83 WP_179406838.1
MULTISPECIES: alkane 1-monooxygenase [unclassified...]	410	410	98%	4e-139	55.71 WP_137865392.1
alkane hydroxylase [uncultured bacterium]	396	396	53%	2e-136	95.94 CC096294.1
alkane 1-monooxygenase [Novosphingobium guangzhouense]	402	402	95%	4e-136	55.28 WP_103098543.1
alkane hydroxylase [uncultured bacterium]	392	392	53%	7e-135	94.92 CC096293.1
MULTISPECIES: alkane 1-monooxygenase [Sphingomonadales]	387	387	94%	2e-130	55.43 WP_066762532.1
alkane hydroxylase [uncultured bacterium]	380	380	52%	3e-130	93.75 CC096290.1
alkane 1-monooxygenase [Sphingobium scionense]	384	384	98%	8e-129	52.13 MBB4149588.1
hypothetical protein GCM10010989_30030 [Croceicoccus pelagius]	377	377	91%	1e-126	55.75 GGD53854.1
oxygenase component of xylene monooxygenase [Sphingobium...]	379	379	98%	1e-126	51.60 ABM79805.1
fatty acid desaturase [Pseudonocardia sp. CGMCC 4.4532]	377	377	99%	3e-126	48.39 WP_185717015.1
putative oxygenase component of xylene monooxygenase...	365	365	81%	2e-121	56.86 BAC65444.1
MULTISPECIES: alkane 1-monooxygenase [unclassified Mycobacterium]	357	357	96%	2e-118	48.63 WP_144952168.1
fatty acid desaturase [Mycolicibacterium mucogenicum]	353	353	99%	1e-116	47.62 WP_082762013.1
fatty acid desaturase [Mycolicibacterium sp. CH28]	349	349	98%	8e-115	46.26 WP_135423448.1
fatty acid desaturase [Mycolicibacterium austroafricanum]	348	348	99%	1e-114	46.15 WP_105387028.1
fatty acid desaturase [Mycobacterium sp. ENV421]	348	348	99%	1e-114	46.15 WP_102810005.1
xylene monooxygenase [Salinisphaeraeaceae bacterium]	344	344	99%	4e-113	46.65 MA473359.1
Tol [BTEX-degrading bacterium enrichment culture]	330	330	42%	1e-110	100.00 AKU47734.1
TPA: alkane 1-monooxygenase [Thiotrichaceae bacterium]	337	337	97%	2e-110	45.60 HIF51357.1
Tol [BTEX-degrading bacterium enrichment culture]	327	327	42%	8e-110	99.37 AKU47736.1
Tol [BTEX-degrading bacterium enrichment culture]	326	326	42%	3e-109	99.37 AKU47738.1
Tol [BTEX-degrading bacterium enrichment culture]	326	326	42%	3e-109	98.73 AKU47735.1
TPA: xylene monooxygenase [Cycloclasticus sp.]	333	333	98%	6e-109	45.90 HIG79211.1
TPA: alkane 1-monooxygenase [Cycloclasticus sp.]	331	331	98%	4e-108	45.90 HIF18273.1
E146 [uncultured bacterium]	329	329	100%	2e-107	45.70 ART37428.1
xylene monooxygenase [Rugosibacter sp.]	326	326	97%	3e-106	45.00 TBR14292.1
xylene monooxygenase [Piscirickettsiaceae bacterium]	325	325	98%	6e-106	45.26 PCI70577.1
xylene monooxygenase [Piscirickettsiaceae bacterium]	325	325	98%	9e-106	45.26 PCI71339.1
fatty acid desaturase [Sporichthya polymorpha]	324	324	93%	2e-105	46.70 WP_084671674.1
xylene monooxygenase [Gammaproteobacteria bacterium]	323	323	97%	5e-105	44.01 RLA09746.1
xylene monooxygenase [Cycloclasticus sp.]	323	323	98%	5e-105	44.38 PHS73738.1
K704 [uncultured bacterium]	323	323	100%	7e-105	44.89 ART40084.1
xylene monooxygenase [uncultured bacterium]	323	323	99%	9e-105	43.82 AKI30016.1
xylene monooxygenase [Oxalobacteraceae bacterium]	320	320	97%	7e-104	48.20 NDC10141.1
MULTISPECIES: fatty acid desaturase [Cycloclasticus]	319	319	97%	2e-103	44.20 WP_015006703.1
xylene monooxygenase [Piscirickettsiaceae bacterium]	318	318	98%	4e-103	43.56 PCI18098.1
fatty acid desaturase [Cycloclasticus pugetii]	317	317	97%	1e-102	43.92 WP_073023125.1
xylene monooxygenase [Cycloclasticus sp.]	317	317	97%	2e-102	43.92 PHR50882.1
G210 [uncultured bacterium]	316	316	98%	4e-102	43.56 ART38340.1
fatty acid desaturase [Cycloclasticus zancles]	315	315	97%	1e-101	43.92 WP_020932071.1
B108 [uncultured bacterium]	315	315	98%	1e-101	43.56 ART35802.1
alkane 1-monooxygenase [Immundisolibacter sp.]	312	312	97%	1e-100	42.74 MBC7160875.1
H54 [uncultured bacterium]	308	308	92%	1e-99	44.61 ART38853.1
xylene monooxygenase [Cycloclasticus sp. 44_32_T64]	307	307	96%	6e-99	43.45 OUR87572.1
alkane 1-monooxygenase [Paenibacillus naphthalenovorans]	307	307	97%	7e-99	42.82 WP_062406576.1
F123 [uncultured bacterium]	306	306	97%	4e-98	42.47 ART38055.1
hypothetical protein PG1C_06560 [Rugosibacter aromaticivorans]	305	305	97%	4e-98	43.65 AJP48210.1
alkane 1-monooxygenase [Immundisolibacter cernigliae]	306	306	97%	4e-98	43.13 WP_068805066.1
xylene monooxygenase [Rugosibacter sp.]	303	303	97%	2e-97	44.48 TBR08126.1
alkane 1-monooxygenase [Novosphingobium resinovorum]	303	303	98%	5e-97	43.17 WP_036525232.1
TPA: xylene monooxygenase [Gammaproteobacteria bacterium]	300	300	94%	7e-96	44.16 HAC34013.1
fatty acid desaturase [Aromatoleum aromaticum]	300	300	98%	8e-96	41.10 WP_168954088.1
xylene monooxygenase [uncultured bacterium]	291	291	39%	1e-95	95.17 BAH10788.1
xylene monooxygenase [uncultured bacterium]	290	290	39%	2e-95	94.48 BAH10793.1
fatty acid desaturase [Sphingopyxis italica]	297	297	98%	6e-95	42.15 WP_167921603.1

Anexo 6. Resultados del BLAST de la enzima Tolueno 4-monooxigenasa

Description	Max Score	Total Query Score	E Value	Per. Ident	Accession
RecName: Full-Toluene-4-monooxygenase system, ferredoxin...	234	234	100%	9e-78	100.00 Q00458.2
ferredoxin [Pseudomonas sp. M4(2015)]	231	231	100%	1e-76	98.21 AJ068017.1
Chain A, Toluene-4-monooxygenase System Protein C [Pseudomonas...	227	227	99%	5e-75	98.20 1VM9_A
Chain H, Toluene-4-monooxygenase system ferredoxin subunit...	225	225	99%	2e-74	97.30 4P1C_H
Chain H, Toluene-4-monooxygenase system ferredoxin subunit...	220	220	99%	2e-72	96.40 4P1B_H
2Fe-2S ferredoxin [Oceanospirillaceae bacterium]	215	215	100%	2e-70	88.39 MBT00443.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Marinobacterium...]	211	211	100%	1e-68	86.61 WP_027854929.1
TPA: 2Fe-2S ferredoxin [Aeromonadales bacterium]	158	158	100%	1e-47	63.39 HFB63934.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Sphingobium sp. SCG-1]	154	154	100%	4e-46	60.71 WP_104955476.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Sphingobium...]	153	153	100%	7e-46	59.82 WP_070156813.1
TPA: 2Fe-2S ferredoxin [Acidimicrobiales bacterium]	153	153	100%	7e-46	63.39 HEC08608.1
2Fe-2S ferredoxin [Zhongshania sp. DSM25-10]	152	152	95%	1e-45	63.55 RNL57701.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Zavarzina compransoris]	152	304	100%	3e-45	58.04 WP_109923376.1
TPA: 2Fe-2S ferredoxin [Gammaproteobacteria bacterium]	150	150	100%	1e-44	59.82 HGG660366.1
2Fe-2S ferredoxin [Gammaproteobacteria bacterium]	149	149	100%	3e-44	60.71 RLA24508.1
TPA: 2Fe-2S ferredoxin [Thermopetrobacter sp.]	149	149	100%	4e-44	58.41 HNM67194.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Oleomonas sp. K1W22B-8]	147	147	100%	1e-43	59.82 WP_119782388.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Zavarzina sp. HR-AS]	147	147	100%	1e-43	57.14 WP_109907857.1
2Fe-2S ferredoxin [Cycloclasticus sp.]	144	144	100%	3e-42	55.36 MAV38566.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Pseudomonas aeruginosa]	144	144	100%	3e-42	57.14 WP_128709963.1
2Fe-2S ferredoxin [Betaproteobacteria bacterium...]	144	144	100%	4e-42	59.82 PK039567.1
2Fe-2S ferredoxin [Burkholderiaceae bacterium]	143	143	100%	8e-42	59.82 TXH43906.1
TPA: 2Fe-2S ferredoxin [Gammaproteobacteria bacterium]	143	143	100%	9e-42	52.68 HIE86215.1
TPA: 2Fe-2S ferredoxin [Thiotrichaceae bacterium]	142	142	100%	1e-41	58.04 HIF51372.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Thioliapillus brandeum]	142	142	100%	1e-41	56.25 WP_041065999.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Marinobacter salarius]	142	142	100%	1e-41	56.25 WP_126813270.1
2Fe-2S ferredoxin [Rhodocyclusaceae bacterium]	142	142	100%	2e-41	57.14 RTL35508.1
2Fe-2S ferredoxin [Cycloclasticus sp. 44_32_T64]	142	142	100%	2e-41	54.46 OUR85711.1
TPA: 2Fe-2S ferredoxin [Cycloclasticus sp.]	142	142	100%	2e-41	53.57 HIG79109.1
2Fe-2S ferredoxin [Betaproteobacteria bacterium...]	142	142	100%	2e-41	58.93 PK036344.1
TPA: 2Fe-2S ferredoxin [Cycloclasticus sp.]	142	142	100%	3e-41	52.68 HIF17209.1
2Fe-2S ferredoxin [Piscirickettsiaceae bacterium]	141	141	100%	4e-41	53.57 PCI66285.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Thauera phenolivorans]	141	141	100%	5e-41	57.14 WP_068809256.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Aromatoleum toluovorans]	141	141	100%	5e-41	57.14 WP_169254918.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Zoogloea sp. LCSB751]	141	141	100%	6e-41	57.14 WP_079436286.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Azoarcus sp. DN11]	140	140	100%	9e-41	56.25 WP_121428521.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Zoogloea sp. G-4-1-14]	140	140	100%	9e-41	58.04 WP_169146905.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Thauera sp. 2A1]	140	140	100%	9e-41	55.36 WP_153167094.1
Toluene-4-monooxygenase system protein C [Hydrogenophaga sp. T4]	141	141	100%	1e-40	54.46 EWS56869.1
TPA: 2Fe-2S ferredoxin [Gammaproteobacteria bacterium]	140	140	100%	1e-40	58.93 HH335513.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Arcobacter cibarius]	140	140	100%	2e-40	57.89 WP_024774225.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Zoogloea sp.]	140	140	100%	2e-40	58.04 KAB2968848.1
TmOC [Pseudomonas oleovorans]	139	139	100%	2e-40	55.36 QCT24445.1
toluene monooxygenase system ferredoxin subunit [Rhodocyclusaceae...]	139	139	100%	3e-40	56.25 TTX26376.1
2Fe-2S ferredoxin [Rugosibacter sp.]	139	139	99%	3e-40	54.95 TBR15189.1
2Fe-2S ferredoxin [Rugosibacter aromaticivorans]	139	139	99%	4e-40	54.95 AJP48256.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Thauera sp. 27]	139	139	100%	4e-40	57.14 WP_020940947.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Dechloromonas sp.]	138	138	100%	7e-40	58.04 KAB2915532.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Thauera sp. 63]	138	138	100%	8e-40	57.14 WP_004264362.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Duganella sp. LX20W]	138	138	100%	8e-40	53.57 WP_182164930.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Azoarcus sp. DD4]	138	138	100%	8e-40	56.25 WP_141018168.1
2Fe-2S ferredoxin [Epsilonproteobacteria bacterium]	138	138	100%	1e-39	57.89 RLA60129.1
2Fe-2S ferredoxin [Cycloclasticus sp. Phe_18]	137	137	100%	1e-39	50.89 KX346487.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Azonexaceae bacterium]	137	137	100%	1e-39	55.36 NTV70324.1
2Fe-2S ferredoxin [Rugosibacter aromaticivorans]	137	137	99%	1e-39	53.15 AJP48187.1
2Fe-2S ferredoxin [Zoogloea sp.]	137	137	100%	2e-39	57.14 TXG88456.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Pseudoxanthomonas...]	137	137	100%	2e-39	53.57 WP_014519709.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Rhodiferax sp.]	137	137	100%	2e-39	53.57 MWM14499.1
MULTISPECIES: Rieske 2Fe-2S domain-containing protein...	137	137	100%	2e-39	50.89 WP_020932956.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Chromatiaceae bacteri...]	137	137	100%	2e-39	55.36 WP_078119342.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Glaciimonas sp.]	137	137	100%	3e-39	52.68 MWM28282.1
MULTISPECIES: Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Pandoraea]	136	136	100%	3e-39	52.68 WP_023594116.1
MULTISPECIES: Rieske 2Fe-2S domain-containing protein...	136	136	100%	6e-39	52.68 WP_011516080.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Polynucleobacter...]	136	136	100%	6e-39	55.36 WP_089516237.1
MULTISPECIES: Rieske 2Fe-2S domain-containing protein...	135	135	100%	8e-39	54.46 WP_090439241.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Dechloromonas sp....]	135	135	100%	1e-38	55.36 WP_117609062.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Paraburkholderia sp. 1N]	135	135	100%	1e-38	53.57 WP_172317408.1
2Fe-2S ferredoxin [Polynucleobacter sp.]	135	135	100%	1e-38	54.46 TXI13631.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Zoogloea sp. 1C4]	135	135	100%	1e-38	53.57 WP_153160043.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Aromatoleum...]	134	134	100%	2e-38	54.46 WP_018989564.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Thiothrix lacustris]	134	134	100%	3e-38	52.68 WP_028489504.1
2Fe-2S ferredoxin [Betaproteobacteria bacterium...]	134	134	100%	4e-38	56.25 PK057118.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Acidocella aromatica]	134	134	100%	5e-38	56.25 WP_183266379.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Rhodiferax sp. OTU1]	133	133	100%	5e-38	52.68 WP_114969366.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Thiothrix nivea]	133	133	100%	7e-38	50.89 WP_002710609.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Comamonas badia]	132	132	100%	1e-37	54.46 WP_024536901.1
2Fe-2S ferredoxin [Rugosibacter sp.]	132	132	95%	1e-37	52.34 TBR10082.1
MULTISPECIES: Rieske 2Fe-2S domain-containing protein...	132	132	100%	1e-37	53.57 WP_127805773.1
2Fe-2S ferredoxin [Thermomicrobiales bacterium]	132	132	100%	1e-37	55.36 TXG85934.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Thiothrix sp.]	132	132	100%	1e-37	51.79 LQ30796.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Thiomonas delicata]	132	132	100%	2e-37	52.68 WP_094162189.1
2Fe-2S ferredoxin [Sinobacteraceae bacterium]	132	132	100%	2e-37	52.68 TAN12857.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Novosphingobium...]	131	131	99%	4e-37	54.05 WP_067737116.1
2Fe-2S ferredoxin [Betaproteobacteria bacterium...]	131	131	100%	4e-37	53.57 PK084125.1
MULTISPECIES: Rieske 2Fe-2S domain-containing protein...	131	131	100%	5e-37	52.68 WP_062085394.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Methylobium...]	130	130	100%	6e-37	53.57 WP_011828416.1
2Fe-2S ferredoxin [Betaproteobacteria bacterium...]	130	130	100%	6e-37	52.68 PK028500.1
Toluene-4-monooxygenase system protein C [Hydrogenophaga sp. T4]	130	130	100%	9e-37	52.68 EWS63927.1
2Fe-2S ferredoxin [Gammaproteobacteria bacterium]	130	130	100%	9e-37	49.11 MSR13719.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Hydrogenophaga sp.]	130	130	100%	1e-36	53.57 MBE0588678.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Tepidiphilus sp. J10]	130	130	100%	1e-36	51.79 WP_142804791.1
2Fe-2S ferredoxin [Rhodocyclusaceae bacterium]	130	130	100%	1e-36	53.57 RTL51201.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Zoogloea sp.]	130	130	100%	1e-36	50.00 NTV11340.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Xanthobacter sp. 126]	129	129	100%	2e-36	54.46 WP_024280160.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Dechloromonas aromatica]	129	129	100%	2e-36	52.68 WP_011289542.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Solimonas soli]	129	129	100%	3e-36	51.79 WP_028080262.1
2Fe-2S ferredoxin [Paraburkholderia sp.]	128	128	100%	5e-36	52.68 TAM54307.1
Rieske 2Fe-2S domain-containing protein [Roseiarcus fermentans]	128	128	100%	5e-36	51.79 WP_113890011.1
2Fe-2S ferredoxin [Rhodospirillaceae bacterium]	128	128	96%	7e-36	54.63 MBR73079.1

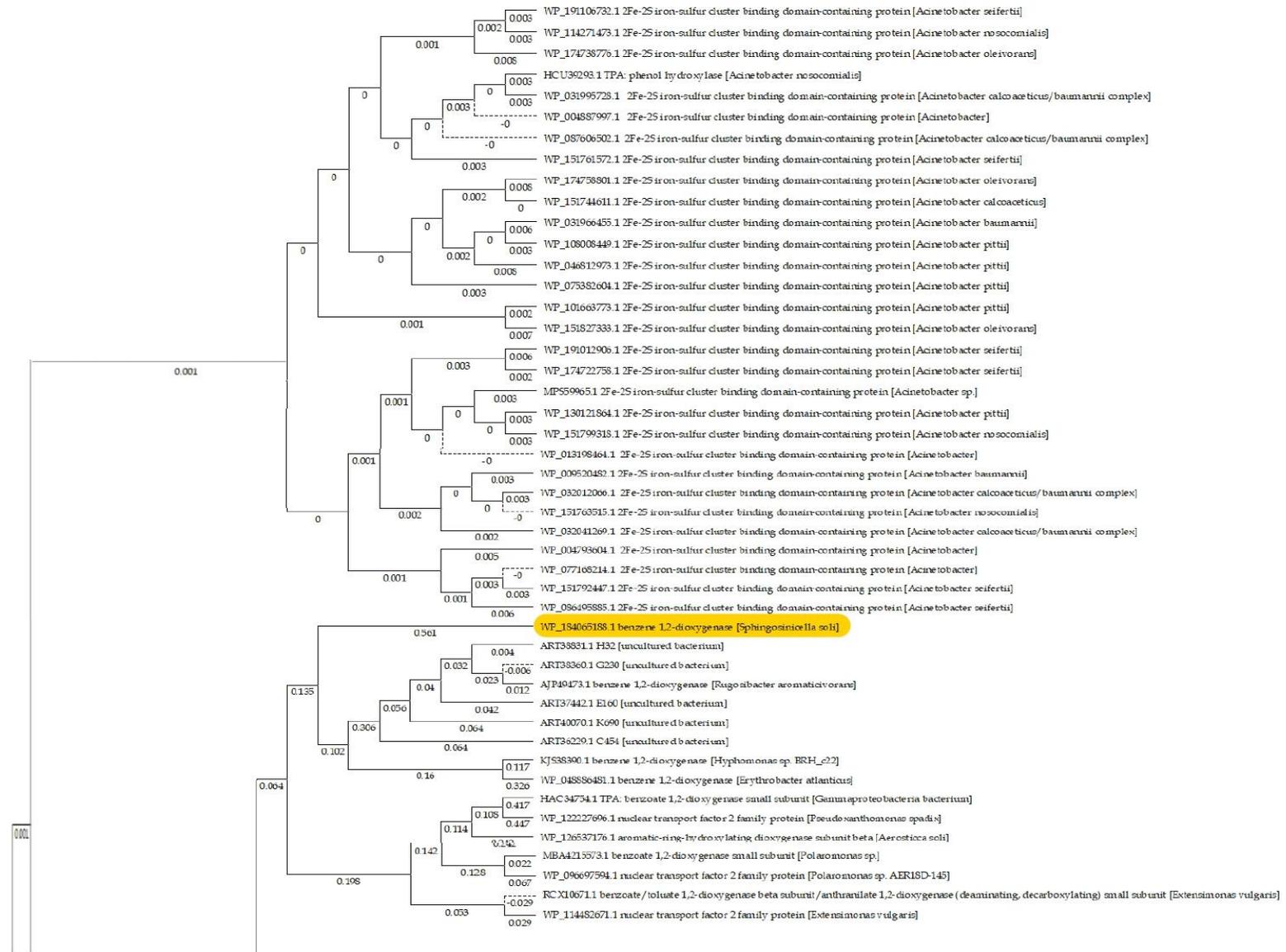
Anexo 7. Resultados del BLAST de la enzima Tolueno dioxigenasa

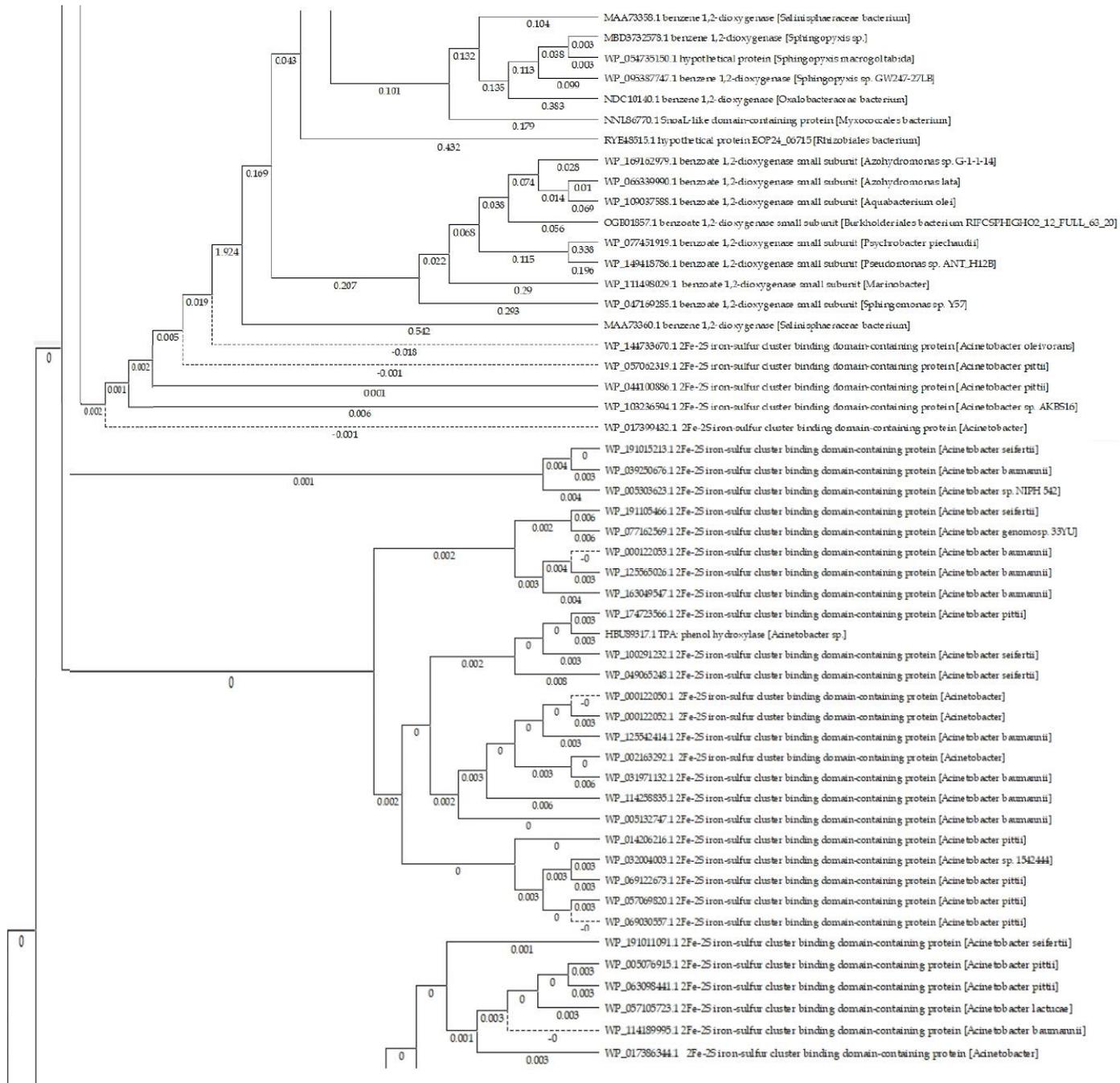
Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Accession
MULTISPECIES: 3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase...	384	384	100%	1e-134	100.00	WP_012052600.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxigenase subunit beta...	369	369	100%	9e-129	95.19	WP_087013791.1
terminal oxygenase small subunit [Ralstonia sp. JS705]	365	365	100%	4e-127	93.05	CAA06971.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxigenase subunit beta...	361	361	100%	1e-125	91.98	WP_131381925.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	354	354	100%	7e-123	90.37	WP_012250636.1
terminal dioxigenase beta subunit [Bordetella sp. IITR-02]	352	352	100%	4e-122	89.84	ACF16029.1
terminal dioxigenase beta-subunit [Pseudomonas nitroreducens]	351	351	100%	8e-122	89.30	ABR26226.1
MULTISPECIES: 3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase...	350	350	100%	1e-121	90.37	WP_032489607.1
TecA2 [Burkholderia sp.]	350	350	100%	2e-121	89.30	AAC46391.1
benzene 1,2-dioxigenase [Acinetobacter sp. RIFCSPHIGHO2_12_41_5]	348	348	100%	9e-121	89.84	OFW85784.1
benzene 1,2-dioxigenase [Pandoraea pnomenusu]	348	348	100%	2e-120	88.77	ANC47581.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	347	347	100%	3e-120	88.77	WP_081256095.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	321	321	100%	7e-110	81.28	WP_115015680.1
biphenyl 2,3-dioxigenase subunit beta [Rhodococcus jostii]	314	314	100%	4e-107	79.14	WP_011599001.1
toluene dioxigenase iron-sulfur protein TobC2 [Pseudomonas...	311	311	81%	2e-106	100.00	AAG09409.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	312	312	100%	2e-106	79.68	WP_135995327.1
MULTISPECIES: biphenyl 2,3-dioxigenase subunit beta [Rhodococcus]	310	310	100%	2e-105	78.07	WP_005254552.1
isopropylbenzene 2,3-dioxigenase [Rhodococcus erythropolis]	307	307	100%	2e-104	77.54	AAB08026.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	305	305	88%	6e-104	88.55	WP_149135065.1
NtdA2 [Rhodococcus sp. ZWL3NT]	301	301	100%	3e-102	76.47	AFW98859.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	297	297	100%	2e-100	75.40	WP_160095664.1
MULTISPECIES: 3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase...	291	291	100%	6e-98	72.19	WP_105416146.1
biphenyl 2,3-dioxigenase, small subunit [Janibacter sp. TBM322]	290	290	99%	1e-97	74.73	BAK52804.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	281	281	100%	6e-94	68.98	WP_118928741.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	276	276	100%	3e-92	68.98	WP_116571600.1
hypothetical protein RLD5_01670 [Sphingobium lactosutens DS20]	269	269	93%	4e-89	75.86	EQB18750.1
MULTISPECIES: 3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase...	268	268	93%	6e-89	75.86	WP_031297285.1
chlorobenzene dioxigenase small subunit/benzene/toluene...	268	268	93%	8e-89	75.86	SKB98415.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	266	266	93%	3e-88	70.69	WP_166628067.1
terminal dioxigenase, small subunit [Rhodococcus sp. MS]	258	258	93%	7e-85	67.82	AAB07751.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxigenase subunit beta [Martelel...	246	246	100%	3e-80	65.78	WP_024706840.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxigenase subunit beta [Rhodovul...	245	245	100%	8e-80	64.71	WP_037209948.1
MULTISPECIES: aromatic-ring-hydroxylating dioxigenase subunit...	245	245	100%	9e-80	64.71	WP_038068060.1
MULTISPECIES: aromatic-ring-hydroxylating dioxigenase subunit...	244	244	100%	2e-79	64.71	WP_054540706.1
iron sulfur protein small subunit [Rhodococcus aetherivorans I24]	241	241	100%	2e-78	63.64	AAL61664.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxigenase subunit beta...	240	240	100%	9e-78	64.17	WP_013654821.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxigenase subunit beta [Rhizobiu...	239	239	100%	2e-77	62.57	WP_147188955.1
putative aromatic hydrocarbon dioxigenase beta subunit...	239	239	100%	2e-77	62.57	BAK61714.1
chlorobenzene dioxigenase, small subunit of terminal oxygenase...	239	239	100%	4e-77	58.82	EIE49956.1
MULTISPECIES: aromatic-ring-hydroxylating dioxigenase subunit...	238	238	100%	4e-77	58.82	WP_034453106.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxigenase subunit beta [oceanico...	237	237	100%	9e-77	58.82	WP_036563004.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	235	235	94%	6e-76	64.41	WP_037529251.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxigenase subunit beta...	230	230	96%	5e-74	62.22	WP_043868195.1
Biphenyl dioxigenase subunit beta [Hydrogenophaga sp. T4]	231	231	90%	5e-74	63.53	EW565518.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	230	230	89%	9e-74	64.07	WP_019752919.1
H468 [uncultured bacterium]	230	230	98%	9e-74	59.24	ART38946.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	229	229	90%	1e-73	63.53	WP_056270858.1
naphthalene dioxigenase beta subunit [Starkeya sp.]	229	229	100%	1e-73	55.61	QCS37636.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	229	229	90%	1e-73	63.53	WP_177134592.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxigenase subunit beta...	229	229	88%	2e-73	65.66	WP_062346352.1
biphenyl dioxigenase small subunit [Pseudomonas putida B6-2]	230	230	89%	2e-73	64.07	ACN62350.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	228	228	94%	5e-73	61.02	WP_062342948.1
MULTISPECIES: 3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase...	228	228	98%	6e-73	60.33	WP_011797817.1
TPA: 3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	227	227	94%	1e-72	60.44	HIG78950.1
benzene 1,2-dioxigenase [Cycloclasticus sp.]	226	226	89%	2e-72	63.22	PHS73428.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	226	226	92%	3e-72	62.07	WP_102886224.1
bpha2 bphE Biphenyl dioxigenase subunit beta [Pseudomonas putida]	226	226	92%	3e-72	62.07	PNG83976.1
biphenyl dioxigenase subunit beta [Achromobacter sp. BP3]	226	226	89%	6e-72	62.87	ACF20635.1
G452 [uncultured bacterium]	225	225	98%	7e-72	58.70	ART38400.1
MULTISPECIES: 3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase...	225	225	92%	9e-72	62.64	WP_152965112.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	225	225	91%	9e-72	62.57	WP_144244909.1
MULTISPECIES: 3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase...	224	224	89%	1e-71	62.87	WP_040123616.1
MULTISPECIES: aromatic-ring-hydroxylating dioxigenase subunit...	224	224	88%	1e-71	66.27	WP_120221952.1
MULTISPECIES: 3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase...	224	224	89%	1e-71	62.87	WP_003451003.1
MULTISPECIES: 3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase...	224	224	89%	1e-71	62.87	WP_054093722.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	224	224	98%	1e-71	58.15	WP_122227263.1
dioxigenase [Pseudomonas furukawai]	225	225	89%	2e-71	62.87	AAA25744.1
Biphenyl 2,3-dioxigenase small subunit (BphA2) [Paraburkholder...	225	225	89%	2e-71	62.87	ABE37058.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	224	224	98%	2e-71	58.15	WP_122227566.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxigenase subunit beta...	224	224	100%	2e-71	61.70	WP_004398235.1
biphenyl dioxigenase beta subunit [Pseudomonas abietaniphila]	224	224	89%	3e-71	62.87	BB301297.1
benzene 1,2-dioxigenase [Cycloclasticus sp. 44_32_T64]	223	223	88%	3e-71	63.95	OUR89370.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	223	223	89%	4e-71	62.28	WP_035827513.1
MULTISPECIES: aromatic-ring-hydroxylating dioxigenase subunit...	223	223	91%	4e-71	62.21	WP_045699447.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxigenase subunit beta [Hyphomon...	223	223	91%	5e-71	62.21	WP_051607913.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	223	223	92%	5e-71	61.49	MBC7214182.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxigenase subunit beta [Hyphomon...	223	223	88%	6e-71	63.86	WP_112073753.1
terminal dioxigenase small subunit [Pseudomonas sp. Cam-1]	223	223	89%	7e-71	61.68	AAK14782.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	222	222	91%	8e-71	60.23	WP_084154747.1
biphenyl 2,3-dioxigenase small subunit [Cupriavidus sp. SK-4]	223	223	89%	8e-71	62.28	AF89843.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	222	222	89%	9e-71	61.68	WP_059400051.1
biphenyl dioxigenase beta subunit [Pseudomonas aeruginosa]	223	223	89%	2e-70	61.68	BB301417.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	221	221	94%	2e-70	57.46	WP_017463377.1
MULTISPECIES: 3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase...	219	219	92%	9e-70	60.92	WP_043566691.1
biphenyl dioxigenase beta subunit BphA2 [Acidovorax sp. KKS102]	220	220	92%	9e-70	60.92	AFU46881.1
benzene 1,2-dioxigenase [Bordetella sp. SCN 68-11]	219	219	90%	1e-69	58.82	ODU96956.1
ReName: Full=Biphenyl dioxigenase subunit beta; AltName:...	219	219	92%	1e-69	60.92	Q52439.1
MULTISPECIES: 3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase...	219	219	90%	1e-69	60.59	WP_161124081.1
biphenyl 2,3-dioxigenase small subunit [Pseudomonas alcaliphil...	220	220	89%	2e-69	61.68	ADD25152.1
ReName: Full=Biphenyl dioxigenase subunit beta; AltName:...	219	219	92%	2e-69	60.34	Q46373.1
benzene 1,2-dioxigenase [Cycloclasticus sp.]	219	219	94%	2e-69	59.56	NAV29957.1
biphenyl 2,3-dioxigenase beta subunit [Extensimonas vulgaris]	219	219	92%	3e-69	60.34	RCX11904.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	218	218	92%	3e-69	59.77	WP_155187554.1
benzene 1,2-dioxigenase [Cycloclasticus sp. Phe_18]	218	218	91%	3e-69	58.66	KX349880.1
3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase subunit beta...	218	218	92%	3e-69	60.34	WP_114482204.1
benzene 1,2-dioxigenase [Piscirickettsiaceae bacterium]	218	218	89%	4e-69	61.49	PCI70175.1
beta subunit of terminal oxygenase [Xanthobacter...]	218	218	100%	6e-69	54.26	BAC98957.1
aromatic-ring-hydroxylating dioxigenase subunit beta...	218	218	98%	1e-68	55.50	WP_029044276.1
MULTISPECIES: 3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase...	216	216	91%	2e-68	58.66	WP_016390586.1
MULTISPECIES: 3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxigenase...	216	216	91%	2e-68	58.66	WP_015006589.1

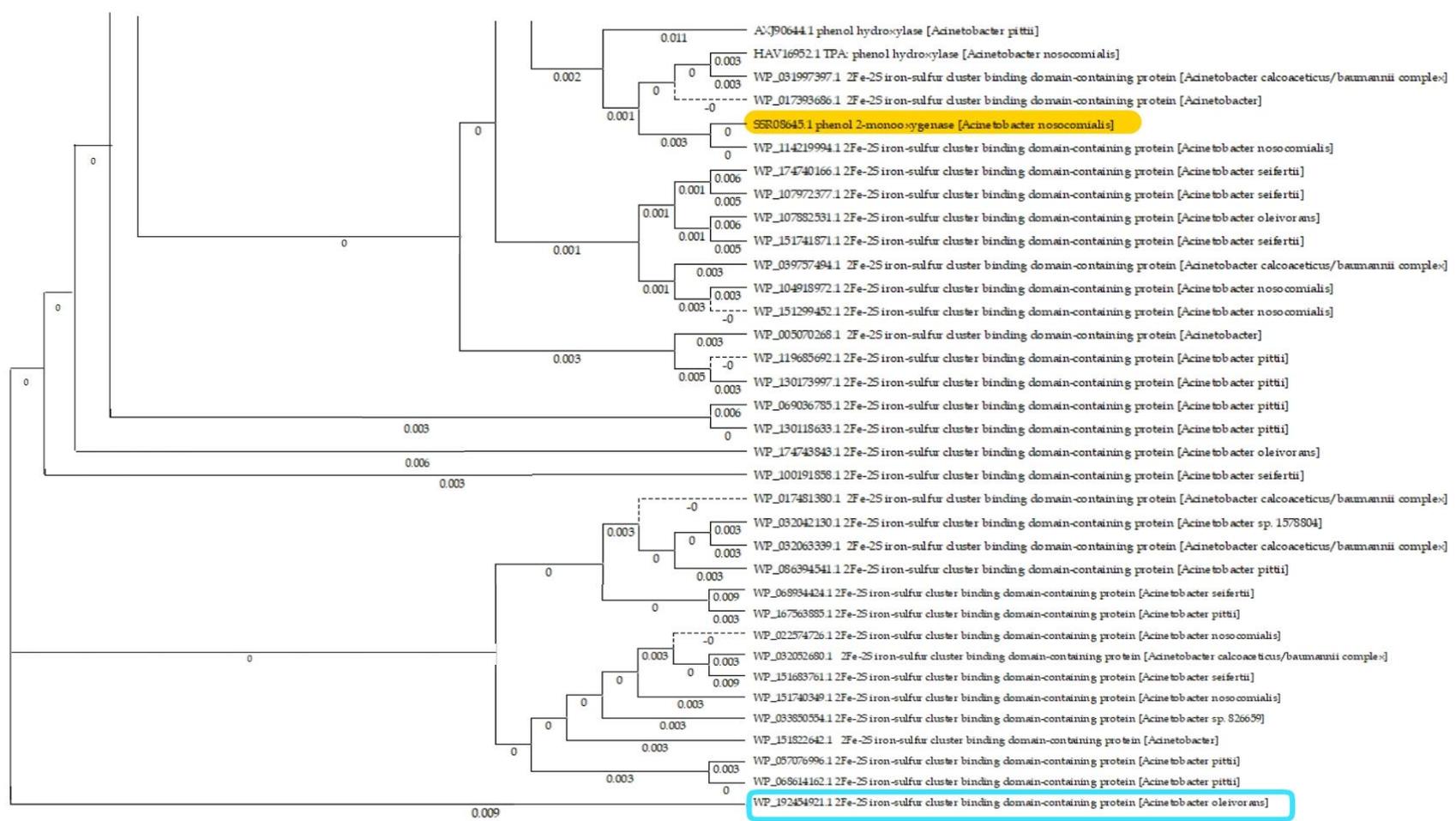
Anexo 8. Resultados del BLAST de la enzima Bencilsuccinato sintasa

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Accession
benzylsuccinate synthase [Desulfobulbus sp. Tol-SR]	682	682	100%	0.0	100.00	KG032693.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Desulfosarcina ovata]	528	528	97%	0.0	75.70	WP_155326218.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Desulfosarcina...]	498	498	100%	3e-175	73.03	WP_083456427.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Desulfosarcina ovata...]	483	483	90%	1e-169	74.75	BB085956.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Desulfosarcina ovata]	427	427	96%	2e-147	60.06	WP_155308357.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Desulfosarcina ovata]	426	426	96%	1e-146	59.75	WP_155320638.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Desulfobaccula...]	417	417	98%	5e-143	61.42	WP_014955670.1
BssD [Thauera sp. DNT-1]	400	400	96%	8e-136	57.23	BAC05499.1
[benzylsuccinate synthase]-activating enzyme [Aromatoleum...]	392	392	96%	2e-133	56.25	WP_169256949.1
MULTISPECIES: [benzylsuccinate synthase]-activating enzyme...	389	389	96%	6e-132	55.31	WP_050417933.1
[benzylsuccinate synthase]-activating enzyme [Aromatoleum...]	387	387	96%	2e-131	55.00	WP_169138095.1
[benzylsuccinate synthase]-activating enzyme [Azoarcus sp. DN11]	384	384	96%	4e-130	55.31	WP_121430777.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Desulfosarcina...]	384	384	93%	5e-130	55.70	WP_155306557.1
[benzylsuccinate synthase]-activating enzyme [Aromatoleum...]	384	384	96%	5e-130	54.69	WP_169119533.1
[benzylsuccinate synthase]-activating enzyme [Aromatoleum...]	384	384	96%	7e-130	55.00	WP_169199220.1
[benzylsuccinate synthase]-activating enzyme [Aromatoleum...]	384	384	97%	9e-130	55.11	WP_157866581.1
4-isopropylbenzyl-succinate synthase activating enzyme [Thauer...]	384	384	94%	9e-130	57.64	AIS23706.1
benzylsuccinate synthase activating enzyme [Aromatoleum...]	382	382	96%	2e-129	55.62	CAI07157.1
[benzylsuccinate synthase]-activating enzyme [Aromatoleum...]	382	382	96%	3e-129	55.00	WP_040395829.1
benzylsuccinate synthase subunit delta [Desulfobacteraceae...]	382	382	96%	3e-129	59.87	OPX32963.1
TutE [Thauera aromatica]	382	382	96%	1e-128	55.35	AAC38452.1
[benzylsuccinate synthase]-activating enzyme [Aromatoleum...]	379	379	96%	4e-128	55.00	WP_169206342.1
[benzylsuccinate synthase]-activating enzyme [Magnetospirillum...]	375	375	94%	5e-127	55.10	WP_096700837.1
[benzylsuccinate synthase]-activating enzyme [Hermnimonas sp...]	375	375	96%	1e-126	54.06	WP_025917640.1
putative benzylsuccinate synthase activating enzyme...	374	374	94%	2e-126	54.78	BAD42364.1
[benzylsuccinate synthase]-activating enzyme [Thauera aromatica]	374	374	99%	2e-125	52.89	WP_170110019.1
RecName: Full=benzylsuccinate synthase activating enzyme...	371	371	96%	5e-125	53.75	087941.2
[benzylsuccinate synthase]-activating enzyme [Thauera...]	370	370	96%	8e-125	53.12	WP_075147768.1
[benzylsuccinate synthase]-activating enzyme [Aromatoleum...]	370	370	96%	1e-124	55.94	WP_076604498.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Desulfosarcina ovata]	369	369	94%	3e-124	54.66	WP_155321810.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Geobacter daltonii]	358	358	94%	1e-119	57.05	WP_012647522.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Geobacter bremensis]	356	356	97%	6e-119	55.21	WP_026842267.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Desulfosarcina...]	351	351	96%	2e-117	52.68	WP_054693345.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Geobacter daltonii]	347	347	96%	2e-115	55.14	WP_012647532.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Geobacter argillaceus]	332	332	94%	2e-109	51.92	WP_145023180.1
hypothetical protein APF81_25810 [Desulfosporosinus sp. BRH_c37]	327	327	94%	5e-108	50.32	KU070668.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Geobacter...]	328	328	94%	1e-107	55.10	WP_004511525.1
[benzylsuccinate synthase]-activating enzyme [Desulfosporosinu...]	327	327	94%	1e-107	49.68	KU073709.1
benzylsuccinate synthase subunit delta [Deltaproteobacteria...]	323	323	93%	1e-106	49.68	RLB68605.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Desulfallas gibsoniae]	324	324	91%	1e-106	51.49	WP_006524659.1
Glycyl-radical enzyme activating protein family...	320	320	94%	8e-105	48.90	KUK63984.1
TPA: benzylsuccinate synthase subunit delta [Desulfotomaculum...]	320	320	94%	2e-104	48.90	HBV05128.1
hypothetical protein VR66_15790 [Peptococcaceae bacterium...]	318	318	96%	2e-104	46.88	KJ548100.1
hypothetical protein VR66_20855 [Peptococcaceae bacterium...]	318	318	96%	4e-104	49.69	KJ547219.1
hypothetical protein J157_12745 [Desulfosporosinus sp. BICA1-9]	316	316	94%	2e-103	50.00	KJ588035.1
hypothetical protein J705_06945 [Desulfosporosinus sp. Tol-M]	315	315	96%	5e-103	48.77	KGP76101.1
Glycyl-radical enzyme activating protein family...	313	313	94%	4e-102	47.94	KUK53658.1
TPA: benzylsuccinate synthase subunit delta [Desulfotomaculum...]	312	312	94%	5e-102	47.94	HAU31726.1
hypothetical protein DSC00X_00280 [Desulfosarcina ovata subsp...]	310	310	75%	5e-102	56.92	BB086848.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Moorrella glycerini]	310	310	97%	4e-101	46.79	WP_170291074.1
hypothetical protein DSC028_00240 [Desulfosarcina ovata subsp...]	305	305	75%	2e-100	56.13	BB079458.1
TPA: hypothetical protein [Candidatus Atribacteria bacterium]	304	304	94%	8e-99	46.96	HBV57499.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Desulfallas gibsoniae]	301	301	93%	9e-98	47.42	WP_006524669.1
hypothetical protein APF81_00510 [Desulfosporosinus sp. BRH_c37]	296	296	94%	5e-96	46.33	KU072244.1
benzylsuccinate synthase subunit delta [Firmicutes bacterium...]	295	295	94%	2e-95	45.08	PKM86308.1
putative benzylsuccinate synthase BssD [Clostridia bacterium...]	293	293	94%	9e-95	45.25	ADJ93882.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Deltaproteobacteria...]	289	289	93%	3e-93	46.60	RLB11084.1
Glycyl-radical enzyme activating protein family [Atribacteria...]	286	286	89%	1e-91	45.45	KUK98705.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Desulfosarcina ovata]	261	261	92%	5e-82	42.72	WP_155309492.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Desulfatibacillum...]	258	258	93%	1e-80	41.77	WP_073475849.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Desulfatibacillum...]	256	256	81%	3e-80	45.82	WP_012610859.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Desulfatibacillum...]	256	256	91%	7e-80	45.45	WP_073472226.1
hypothetical protein N47_203820 [uncultured Desulfobacterium sp.]	255	255	93%	2e-79	42.86	CBX29401.1
putative naphthyl-2-methyl-succinate synthase activating enzym...	255	255	93%	3e-79	42.86	AD084295.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Desulfatibacillum...]	254	254	81%	3e-79	45.45	WP_028315532.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Desulfatibacillum...]	254	254	93%	5e-79	41.46	WP_015946970.1
TPA: glycyl-radical enzyme activating protein [Candidatus...]	252	252	85%	5e-79	44.06	HEC92699.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Desulfoglaeba...]	253	253	93%	1e-78	39.10	WP_137424349.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Desulfoglaeba...]	252	252	93%	2e-78	38.54	WP_137425332.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Desulfobacteraceae...]	249	249	92%	5e-77	39.87	RJP38489.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Firmicutes bacterium]	248	248	92%	1e-76	40.13	MLY38516.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Desulfoglaeba...]	247	247	93%	1e-76	38.14	WP_137425329.1
hypothetical protein VR68_04565 [Peptococcaceae bacterium...]	246	246	93%	2e-76	39.30	KJ501641.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Clostridium...]	246	246	93%	3e-76	41.94	WP_029162773.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Desulfobacteraceae...]	246	246	93%	4e-76	37.66	RJP94181.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Actinobacteria...]	245	245	92%	6e-76	40.65	NPV59199.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Dehalococcoidia...]	245	245	89%	1e-75	42.71	TET14489.1
glycyl-radical-activating protein [Desulfobacterales bacterium...]	244	244	92%	2e-75	39.10	PFP37942.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Clostridium...]	244	244	91%	2e-75	40.73	WP_185162045.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Clostridia bacterium]	243	243	91%	2e-75	43.38	WP_178478267.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Clostridium fallax]	243	243	92%	2e-75	40.33	WP_072897840.1
glycyl-radical-activating protein [Syntrophobacteriales bacteri...]	244	244	92%	3e-75	39.55	PFP07760.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Clostridium...]	243	243	91%	3e-75	40.73	WP_104409157.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Clostridium...]	243	243	91%	3e-75	41.39	WP_115640397.1
putative naphthyl-2-methyl-succinate synthase activating enzym...	245	245	95%	3e-75	38.60	SPD74688.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Proteobacteria...]	244	244	80%	4e-75	44.40	RIK93666.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Candidatus...]	243	243	89%	5e-75	42.03	PDN26119.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Candidatus...]	243	243	89%	6e-75	42.03	RJS53564.1
TPA: glycyl-radical enzyme activating protein...	243	243	92%	6e-75	38.14	HBN26962.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Clostridium sp. CL-2]	242	242	92%	8e-75	38.03	WP_032118223.1
TPA: glycyl-radical enzyme activating protein [Anaerolineae...]	242	242	92%	1e-74	40.85	HIE39028.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Clostridium...]	241	241	91%	1e-74	41.06	WP_029452368.1
TPA: benzylsuccinate synthase subunit delta [Desulfotomaculum...]	241	241	81%	1e-74	44.16	HAG11748.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Clostridium sporogenes]	241	241	92%	1e-74	39.34	WP_163253456.1
4-hydroxyphenylacetate decarboxylase activating enzyme...	241	241	92%	2e-74	38.36	SK04563.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Actinobacteria...]	241	241	92%	2e-74	40.32	MBC7253279.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Clostridium drakei]	241	241	93%	2e-74	40.97	WP_032076937.1
glycyl-radical enzyme activating protein family [Candidatus...]	241	241	94%	2e-74	38.14	OL513187.1
MULTISPECIES: glycyl-radical enzyme activating protein...	241	241	92%	2e-74	39.02	WP_003489912.1
glycyl-radical enzyme activating protein [Drancourtella sp....]	241	241	93%	3e-74	40.45	WP_087201768.1

Anexo 9. Árbol general de las enzimas que participan en la ruta de degradación del Benceno

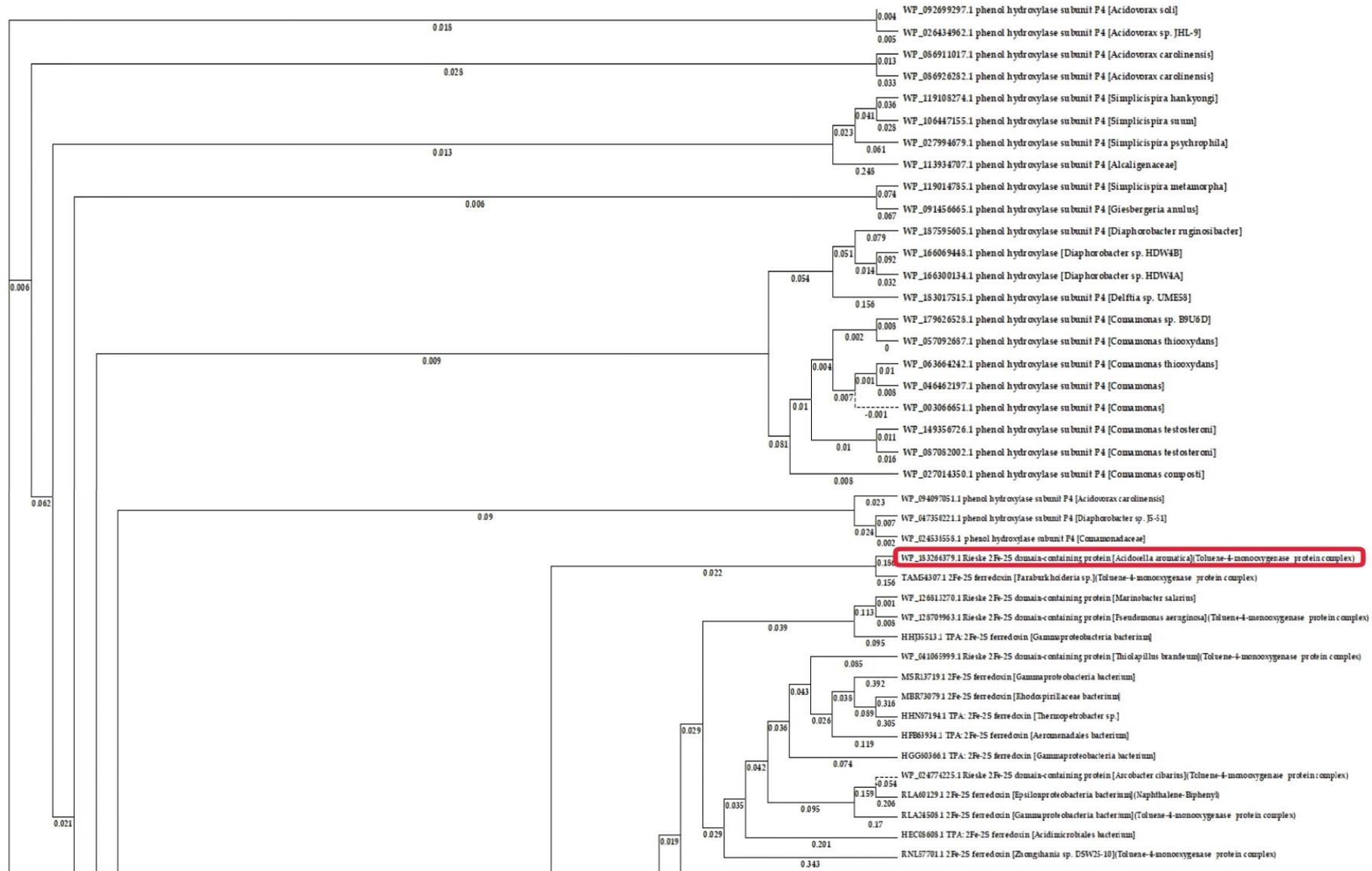




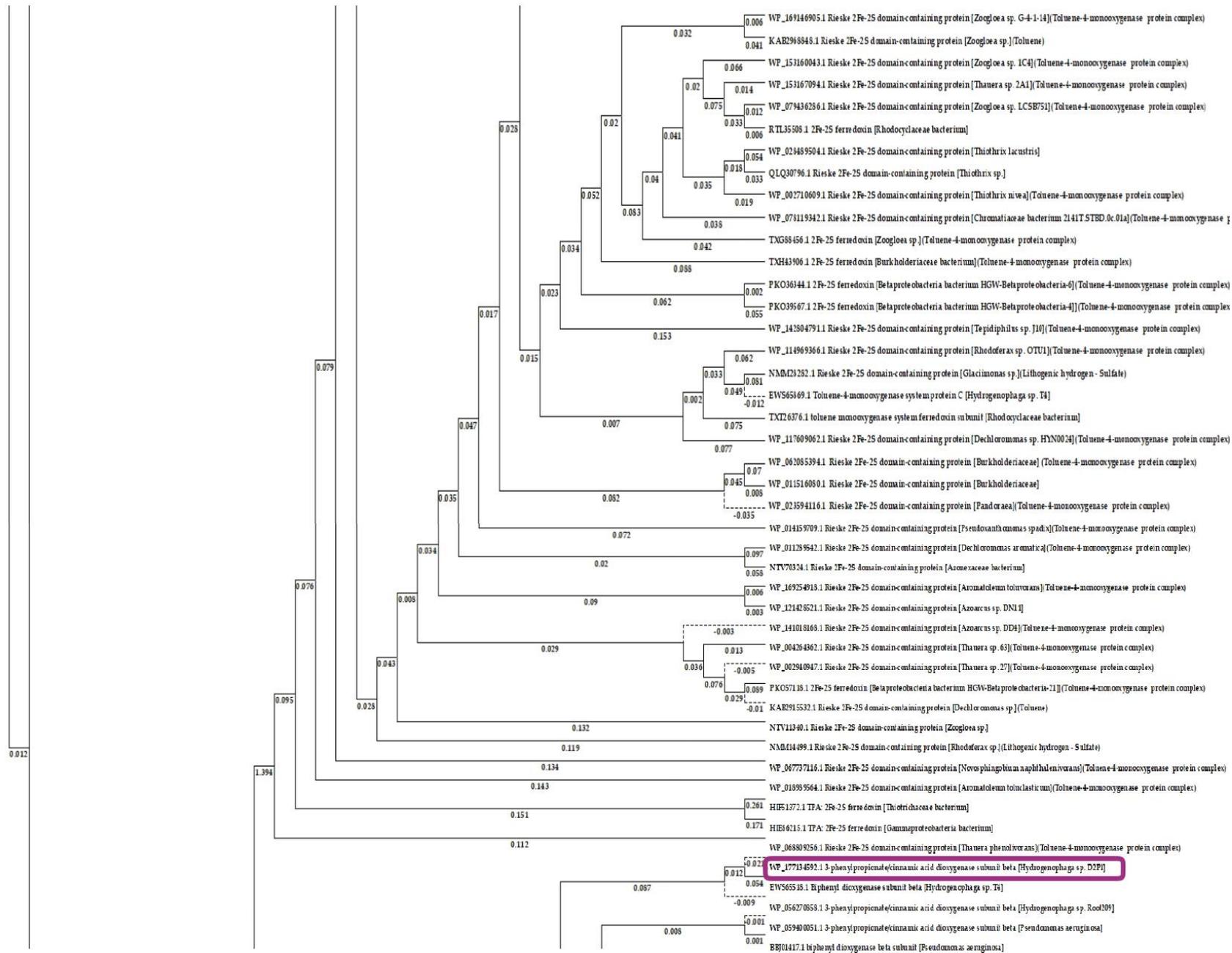


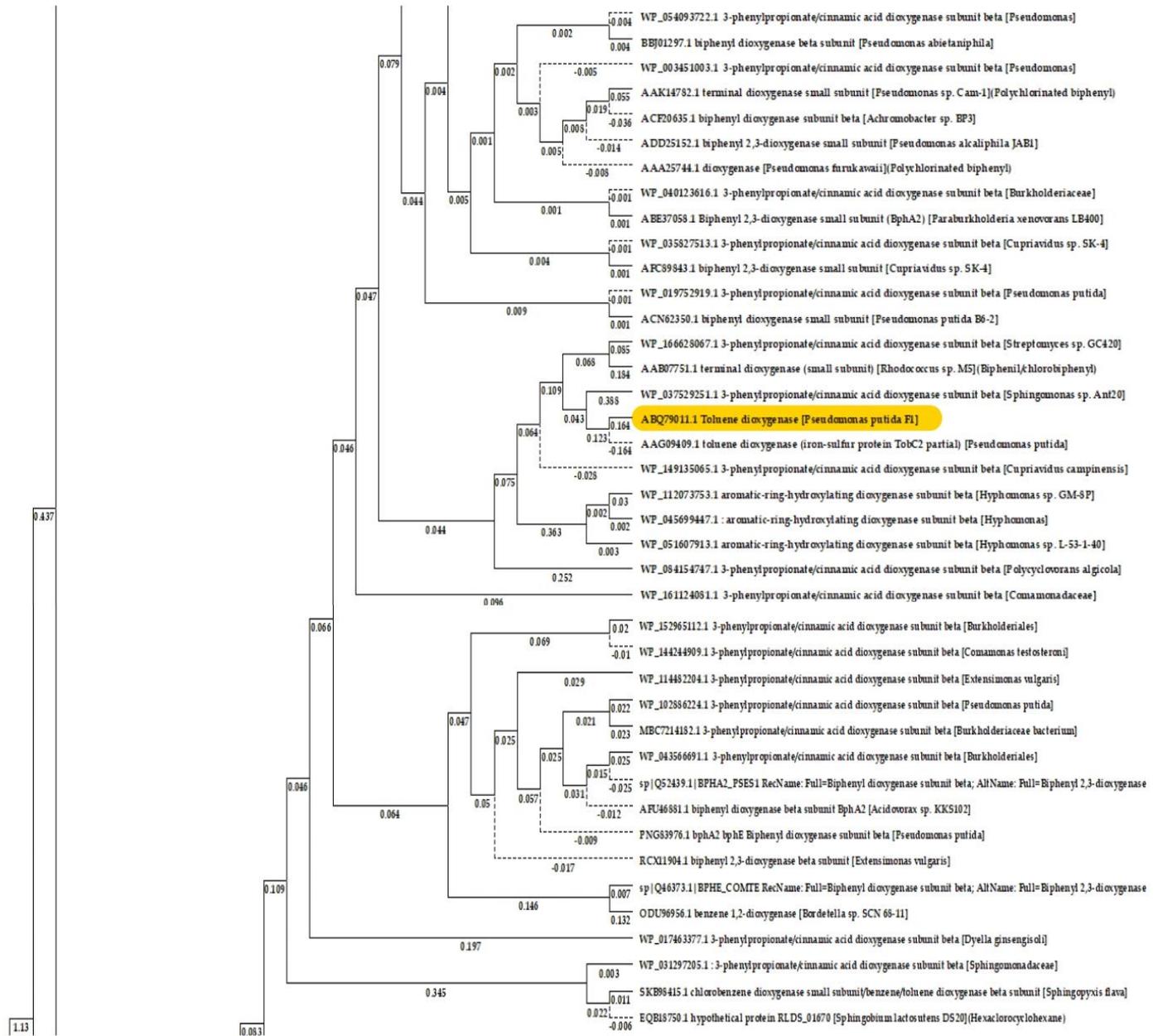
Nota: Las enzimas parte de las rutas para la degradación del benceno se marcan de amarillo y el recuadro celeste pertenece al ancestro de la Fenol 2-monooxigenasa.

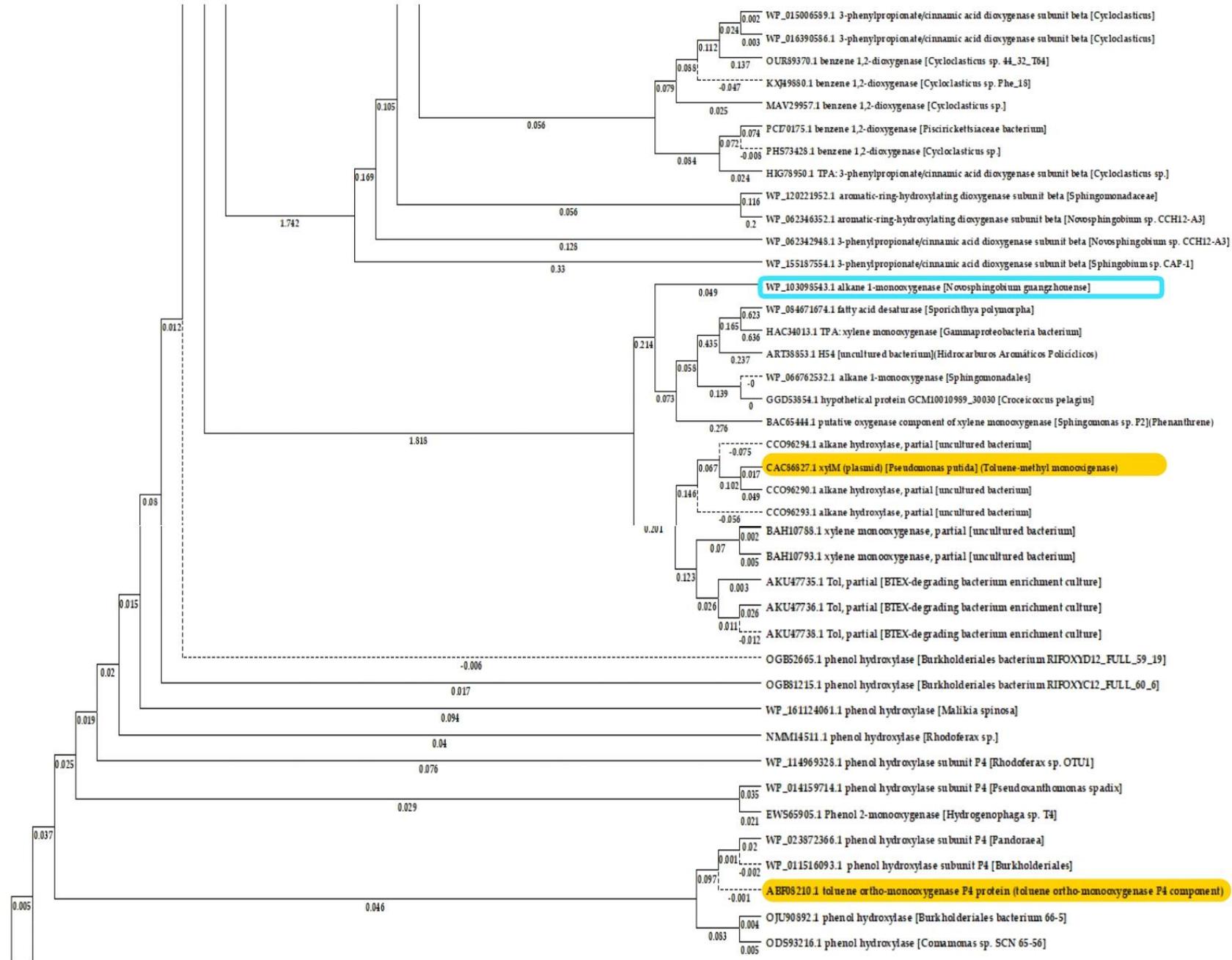
Anexo 10. Árbol general de las enzimas que participan en la ruta de degradación del Tolueno

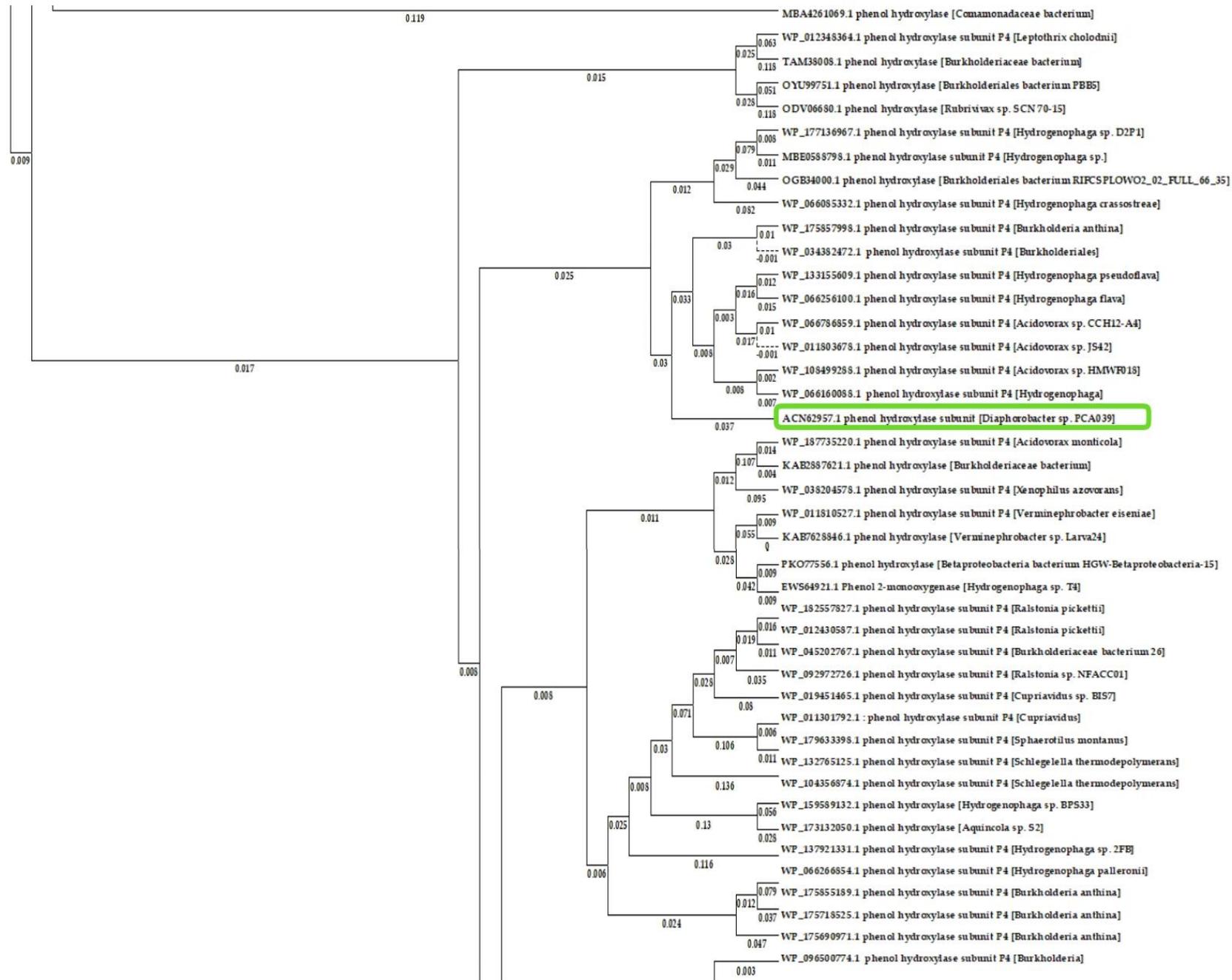


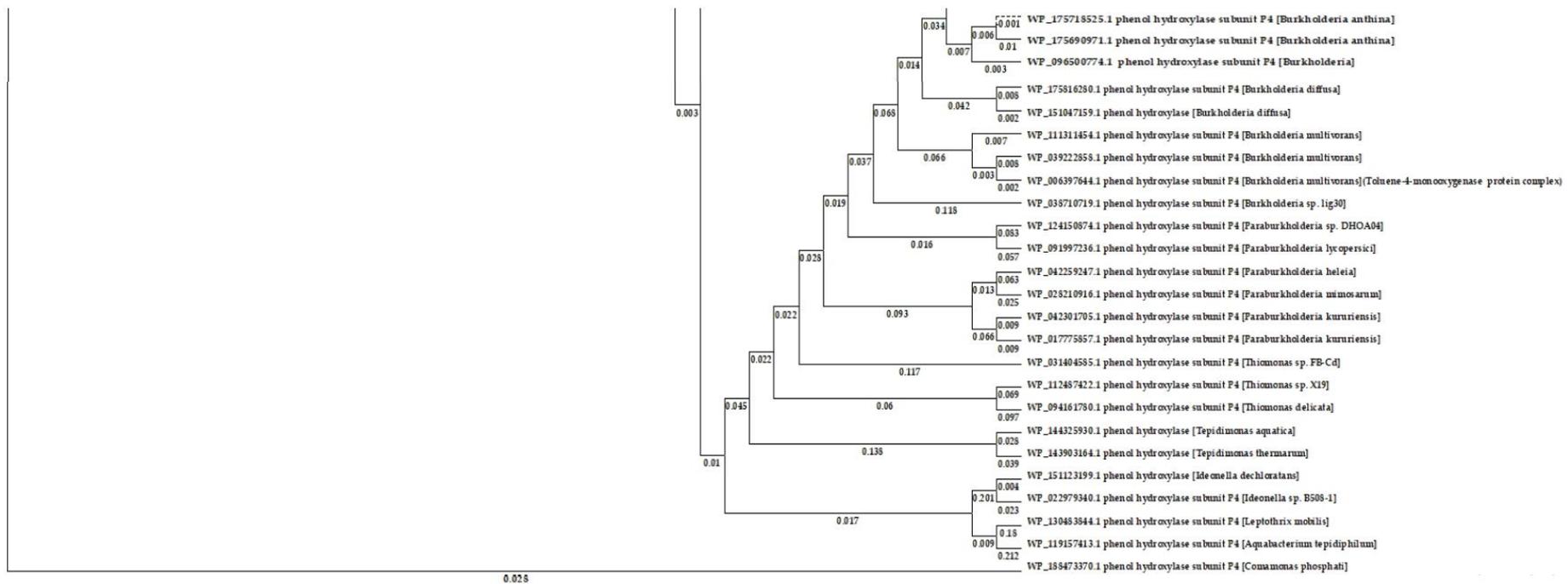












Nota: Las enzimas parte de las rutas para la degradación del benceno se marcan de amarillo y los recuadros corresponden a los ancestros de las enzimas: celeste (Tolueno metil-monooxigenasa), verde claro (Tolueno 2-monooxigenasa), rojo (Tolueno 4-monooxigenasa) y morado (Tolueno dioxigenasa).