

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Reconstrucción de rutas metabólicas de *Klebsiella*  
spp. aisladas de moscas de la fruta (Diptera:  
Tephritidae) con potencial para la degradación de  
plásticos por biología sintética**

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por  
Ana Lucía Vásquez Ibarra  
para optar al grado académico de Licenciada en Biotecnología Molecular

Guatemala,

2020



Reconstrucción de rutas metabólicas de *Klebsiella* spp. aisladas de moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) con potencial para la degradación de plásticos por biología sintética

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



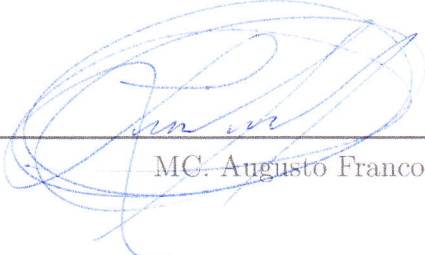
**Reconstrucción de rutas metabólicas de *Klebsiella*  
spp. aisladas de moscas de la fruta (Diptera:  
Tephritidae) con potencial para la degradación de  
plásticos por biología sintética**

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por  
Ana Lucía Vásquez Ibarra  
para optar al grado académico de Licenciada en Biotecnología Molecular

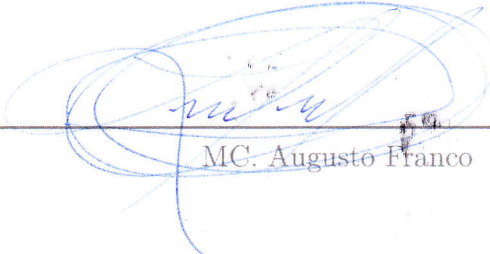
Guatemala,

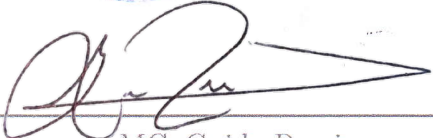
2020

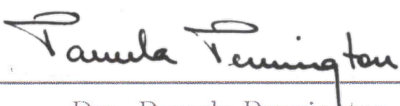
Vo.Bo.:

(f)   
MC. Augusto Franco

Tribunal Examinador:

(f)   
MC. Augusto Franco

(f)   
MC. Guido Rossi

(f)   
Dra. Pamela Pennington

Fecha de aprobación: Guatemala, 09 de diciembre de 2020.

La elaboración de la presente tesis surgió a partir del interés en la búsqueda de alternativas para el tratamiento de desechos plásticos como una forma de disminuir la contaminación del planeta. Esta investigación no se pudo haber realizado sin el apoyo del Centro de Estudios en Biotecnología de la Universidad del Valle de Guatemala y su colaboración con los miembros del Programa MOSCAMED el Dr. Pedro Rendón y la Ing. Dina Melgar.

Agradezco a mi directora de carrera, la Dra. Pamela Pennington por su ayuda y orientación al realizar el cambio de una tesis experimental a una basada en bioinformática, así como en el seguimiento de los avances de la tesis. También agradezco al M.C. Augusto Franco por haberme guiado durante todo el proceso de investigación y por siempre estar dispuesto a apoyarme en lo que necesitara y a la Dra. Dalia Lau-Bonilla por su apoyo en la fase experimental que realicé con anterioridad al cambio de accesibilidad al laboratorio. En el plano académico, también le doy las gracias a todos mis catedráticos porque si bien no apliqué algo de todos mis cursos en esta investigación puedo decir con certeza que en cada uno de ellos aprendí algo que me abrió la mente y que me será útil durante mi vida profesional.

En el plano personal agradezco a mis padres, Maristella Ibarra y Manuel Héctor Vásquez y a mi hermano, Manuel Alberto por su apoyo incondicional no solo durante esta investigación, sino también durante toda la carrera. Asimismo, agradezco a mis compañeros y amigos por haber estado conmigo durante todo el proceso de aprendizaje y porque hasta en los días más cansados me hicieron sonreír.

|   |             |
|---|-------------|
| <b>Prefacio</b>   | <b>III</b>  |
| <b>Lista de figuras</b>   | <b>VII</b>  |
| <b>Lista de cuadros</b>   | <b>VIII</b> |
| <b>Resumen</b>  | <b>IX</b>   |
| <b>Abstract</b>   | <b>X</b>    |
| <b>1. Introducción</b>  | <b>1</b>    |
| <b>2. Objetivos</b>   | <b>2</b>    |
| 2.1. Objetivo general . . . . .                                       | 2           |
| 2.2. Objetivos específicos . . . . .                                  | 2           |
| <b>3. Justificación</b>   | <b>3</b>    |
| <b>4. Marco teórico</b>   | <b>4</b>    |
| 4.1. Contaminación ambiental . . . . .                                | 4           |
| 4.1.1. Tipos de contaminación ambiental . . . . .                     | 4           |
| 4.1.2. Situación mundial . . . . .                                    | 5           |
| 4.1.3. Situación en América Latina . . . . .                          | 5           |
| 4.2. Polímeros sintéticos . . . . .                                   | 6           |
| 4.2.1. Usos . . . . .   | 6           |
| 4.2.2. Producción . . . . .   | 6           |
| 4.2.3. Tratamiento de desechos . . . . .                              | 8           |
| 4.3. Biorremediación . . . . .  | 9           |
| 4.3.1. Insectos con propiedades de degradación de plástico . . . . .  | 10          |
| 4.3.2. Microorganismos como herramienta para biodegradación . . . . . | 10          |
| 4.4. Rutas de degradación de plásticos . . . . .                      | 11          |
| 4.5. Reconstrucción de rutas metabólicas . . . . .                    | 11          |
| 4.6. Biología sintética . . . . .                                     | 12          |
| 4.6.1. Diseño de cebadores . . . . .                                  | 12          |
| <b>5. Antecedentes</b>  | <b>14</b>   |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>6. Metodología</b>  | <b>15</b> |
| 6.1. Sujetos de estudio . . . . .  | 15        |
| 6.2. Diseño, enfoque y tipo de investigación . . . . .                                     | 15        |
| 6.3. Criterios de inclusión y exclusión . . . . .  | 15        |
| 6.4. Hipótesis . . . . .   | 15        |
| 6.5. Procedimiento . . . . .   | 16        |
| <b>7. Resultados</b>   | <b>19</b> |
| 7.1. Identificación de genes de interés en los genomas de <i>Klebsiella spp.</i> . . . . . | 19        |
| 7.2. Reconstrucción de rutas metabólicas . . . . .   | 19        |
| 7.3. Diseño de cebadores . . . . .   | 26        |
| <b>8. Discusión</b>  | <b>29</b> |
| <b>9. Conclusiones</b>   | <b>34</b> |
| <b>10.Recomendaciones</b>  | <b>35</b> |
| <b>11.Bibliografía</b>   | <b>36</b> |
| <b>12.Anexos</b>   | <b>41</b> |
| A. Base de datos de genes relacionados a la degradación de plástico                        | 41        |
| B. Resultados de los alineamientos iniciales   | 48        |
| C. Alineamientos múltiples de proteínas y cuadro de uso de codones                         | 50        |
| D. Ubicación de los cebadores en las secuencias consenso                                   | 62        |

---

## Lista de figuras

---

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 1.  | Producción primaria mundial de plásticos (en millones de toneladas métricas) de acuerdo con el tipo de polímero de 1950 a 2015 . . . . .          | 7  |
| 2.  | Producción primaria mundial de plásticos (en millones de toneladas métricas) de acuerdo con el uso por sector industrial de 1950 a 2015 . . . . . | 8  |
| 3.  | Diagrama de flujo del procedimiento . . . . .   | 18 |
| 4.  | Ruta de degradación de tereftalato . . . . .  | 22 |
| 5.  | Grafo de las reacciones químicas involucradas en la degradación de nylon . . . . .  | 24 |
| 6.  | Matriz estequiométrica de las reacciones químicas involucradas en la degradación de nylon . . . . .   | 24 |
| 7.  | Grafo de reacciones químicas involucradas en la degradación de alcohol polivinílico . . . . .   | 25 |
| 8.  | Matriz estequiométrica de las reacciones químicas involucradas en la degradación de alcohol polivinílico . . . . .                                | 25 |
| 9.  | Esquema de ubicación celular de las reacciones de degradación de alcohol polivinílico y nylon . . . . .   | 26 |
| 10. | Representación de los productos de amplificación de los cebadores diseñados resultantes de una electroforesis en gel . . . . .                    | 28 |
| 11. | Ejemplo de las secciones con mayor conservación observadas en el alineamiento de secuencias múltiples de <i>NylA</i> . . . . .                    | 51 |
| 12. | Ejemplo de las secciones con mayor conservación observadas en el alineamiento de secuencias múltiples de <i>NylB</i> . . . . .                    | 51 |
| 13. | Ejemplo de las secciones con mayor conservación observadas en el alineamiento de secuencias múltiples de <i>NylC</i> . . . . .                    | 51 |
| 14. | Ejemplo de las secciones con mayor conservación observadas en el alineamiento de secuencias múltiples de <i>NylD</i> . . . . .                    | 52 |
| 15. | Ejemplo de las secciones con mayor conservación observadas en el alineamiento de secuencias múltiples de <i>ChnE</i> . . . . .                    | 52 |
| 16. | Ejemplo de las secciones con mayor conservación observadas en el alineamiento de secuencias múltiples de <i>PvaA</i> . . . . .                    | 52 |
| 17. | Ejemplo de las secciones con mayor conservación observadas en el alineamiento de secuencias múltiples de <i>Oph</i> . . . . .                     | 53 |
| 18. | Secuencia consenso de <i>nylA</i> . . . . .   | 55 |
| 19. | Secuencia consenso de <i>nylB</i> . . . . .   | 56 |
| 20. | Secuencia consenso de <i>nylC</i> . . . . .   | 57 |
| 21. | Secuencia consenso de <i>nylD</i> . . . . .   | 58 |
| 22. | Secuencia consenso de <i>chnE</i> . . . . .   | 59 |

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 23. | Secuencia consenso de <i>pvaA</i> . . . . .  | 60 |
| 24. | Secuencia consenso de <i>oph</i> . . . . .   | 61 |
| 25. | Ubicación de los cebadores 854F y 1,842R en la secuencia consenso de <i>nylA</i> . . . . .   | 62 |
| 26. | Ubicación de los cebadores 1,174F y 1,148R en la secuencia consenso de <i>nylB</i> . . . . . | 63 |
| 27. | Ubicación de los cebadores 424F y 842R en la secuencia consenso de <i>nylC</i> . . . . .     | 63 |
| 28. | Ubicación de los cebadores 211F y 331R en la secuencia consenso de <i>nylD</i> . . . . .     | 64 |
| 29. | Ubicación de los cebadores 1,348F y 1,453R en la secuencia consenso de <i>chnE</i> . . . . . | 64 |
| 30. | Ubicación de los cebadores 1,415 y 1.932R en la secuencia consenso de <i>pvaA</i> . . . . .  | 65 |
| 31. | Ubicación de los cebadores 684F y 711R en la secuencia consenso de <i>oph</i> . . . . .      | 65 |

---

## Lista de cuadros

---

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 1.  | Genes correspondientes a la degradación de nylon y alcohol polivinílico identificados parcialmente en los genomas de las tres cepas de <i>Klebsiella</i> . . . . .         | 20 |
| 2.  | Genes correspondientes a la degradación de ftalato, tereftalato, PBAT, PHA y PE identificados parcialmente en los genomas de las tres cepas de <i>Klebsiella</i> . . . . . | 21 |
| 3.  | Probabilidad de presencia de péptido de señalización . . . . .   | 23 |
| 4.  | Secuencia y dirección de los cebadores diseñados para los genes de interés . . . . .   | 27 |
| 5.  | Propiedades de los cebadores diseñados para los genes de interés . . . . .   | 27 |
| 6.  | Genes relacionados a la degradación de plástico identificados en la literatura (Parte 1)   | 42 |
| 7.  | Genes relacionados a la degradación de plástico identificados en la literatura (Parte 2)   | 43 |
| 8.  | Genes relacionados a la degradación de plástico identificados en la literatura (Parte 3)   | 44 |
| 9.  | Genes relacionados a la degradación de plástico identificados en la literatura (Parte 4)   | 45 |
| 10. | Genes relacionados a la degradación de plástico identificados en la literatura (Parte 5)   | 46 |
| 11. | Genes relacionados a la degradación de plástico identificados en la literatura (Parte 6)   | 47 |
| 12. | Genes cuyas secuencias parciales fueron identificadas en los genomas de las tres cepas de <i>Klebsiella</i> sin información de reacción disponible (Parte 1) . . . . .     | 48 |
| 13. | Genes cuyas secuencias parciales fueron identificadas en los genomas de las tres cepas de <i>Klebsiella</i> sin información de reacción disponible (Parte 2) . . . . .     | 49 |
| 14. | Codones de uso frecuente para bacterias del género <i>Klebsiella</i> (Parte 1) . . . . .   | 53 |
| 15. | Codones de uso frecuente para bacterias del género <i>Klebsiella</i> (Parte 2) . . . . .   | 54 |

El plástico es un material muy utilizado en nuestra sociedad que se ha vuelto uno de los principales contaminantes del agua. En los últimos cinco años se han identificado insectos con microbiota intestinal capaz de degradar plásticos, dentro de los géneros bacterianos presentes se encuentra *Klebsiella*. En Guatemala se cuenta con plantas de producción de moscas estériles para control de plagas. Recientemente aislamos y secuenciamos los genomas de tres cepas de *Klebsiella* presuntamente simbioses de estas moscas. Con el fin desarrollar biología sintética planteamos la hipótesis de la posible reconstrucción de rutas metabólicas de *Klebsiella* spp. aisladas de moscas de la fruta con potencial para la degradación de plásticos. Realizamos alineamientos con BLASTn de genes previamente reportados en otros microorganismos degradadores de plástico e identificamos los sustratos y productos de los genes de enzimas identificados con anterioridad. Identificamos secuencias parciales de más de 15 genes en cada cepa con el potencial de degradación de cinco polímeros, un monómero y un aditivo del proceso de fabricación, incluyendo el operón de degradación de tereftalato. Reconstruimos las rutas de degradación de nylon y de alcohol polivinílico y diseñamos cebadores degenerados para identificación de *nylA*, *nylB*, *nylC*, *nylD*, *chnE*, *pvaA* y *oph*. Una vez se conozca más información de la secuencia de los genes en las cepas de interés se podrían clonar los genes completos para aplicaciones de biología sintética como optimización de rutas metabólicas para el desarrollo de sistemas de biodegradación controlada de plásticos.

Plastic is a material of worldwide use that has become one of the foremost water pollutants. In the last five years, several insects with gut microbiota with the ability to degrade plastic have been reported, *Klebsiella* is one of the reported genera. In Guatemala there are fruit fly mass-rearing facilities for pest control. Recently, we isolated and sequenced the genomes of three *Klebsiella* strains presumably symbionts of the fruit flies. To develop synthetic biology, we stated the hypothesis of the possible reconstruction of plastic degradation metabolic pathways of the *Klebsiella* strains isolated from fruit flies. We performed BLASTn alignments of genes previously reported in other plastic degrading microorganisms and we identified the substrates and products of the enzymes encoded by the genes identified in the *Klebsiella* spp. genomes with the alignments. We identified partial sequences for more than 15 genes in each strain corresponding to the degradation of five polymers, one monomer and one additive used in the plastic production process. Among which, we found the terephthalate degradation operon. We reconstructed the degradation pathways of nylon and polyvinyl alcohol and we designed degenerate primers to identify *nylA*, *nylB*, *nylC*, *nylD*, *chnE*, *pvaA*, and *oph*. Once we identify more of the sequence of each gene, the cloning of the complete genes could be possible and could be used in synthetic biology applications such as metabolic pathway optimization to develop controlled plastic bio-degradation systems.

La producción de plástico inició en 1907 cuando se inventó el primer polímero sintético, la baquelita. En los 1920s se empezó a producir cloruro de polivinilo para productos comerciales debido a que se incrementó su plasticidad al mezclarlo con aditivos, así aumentando sus posibles usos. Para 1950 la producción anual de estos y otros tipos de plástico ya había alcanzado 2 millones de toneladas métricas. Se estima que la producción mundial de plásticos en el 2017 fue de 438 millones de toneladas métricas y que la mayor parte se produjo en China y otros países de Asia. Si las tendencias actuales continúan es posible que la producción anual para el 2050 sea de 1.1 mil millones de toneladas métricas. Esto haría que el total de producción acumulado alcance 34 mil millones de toneladas métricas de plásticos (Geyer, 2020).

Si bien la versatilidad y el bajo costo de los plásticos los hace materiales con aplicaciones en todos los sectores industriales, su uso genera una gran cantidad de desechos que en gran parte no se pueden reciclar o no se reciclan por el alto costo de los procesos actuales de reciclaje. Esto implica que el destino final de la mayoría de los plásticos es en rellenos sanitarios, vertederos o el ambiente natural. Es por esto por lo que actualmente se están buscando diferentes alternativas para solucionar este problema. Los diferentes enfoques que se están explorando incluyen la biodegradación por bacterias intestinales de insectos, como *Klebsiella* spp. (Geyer, 2020; Namazi, 2017; Urbanek y col., 2020).

Actualmente hay pocas rutas metabólicas identificadas para degradación de plásticos y ninguna correspondiente a *Klebsiella* spp., aunque con base en datos experimentales se ha reportado que este género de bacterias tiene capacidad de degradar plástico (Awasthi y col., 2017; Ghosh y col., 2019; Jamil y col., 2017). Por lo tanto, en esta investigación el objetivo fue utilizar procesamiento computacional para identificar genes de degradación de plástico utilizando datos biológicos producto de la secuenciación del genoma de tres cepas de *Klebsiella* presuntamente simbioses de moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae). Esto con el fin de reconstruir rutas metabólicas de degradación de plástico con potencial de optimización por biología sintética.

### 2.1. Objetivo general

Proponer posibles rutas metabólicas para degradación de plásticos por medio de biología sintética a partir de secuencias del genoma de tres cepas del género *Klebsiella*.

### 2.2. Objetivos específicos

- Identificar genes involucrados en la degradación de plásticos dentro de los genomas de las cepas de *Klebsiella*.
- Proponer rutas metabólicas involucradas en la degradación de plásticos a partir de los genes encontrados utilizando un método de reconstrucción de rutas metabólicas según grafos.
- Diseñar cebadores para la clonación y producción de proteínas a partir de genes relacionados a la degradación de plásticos.

El plástico se empezó a utilizar como material para fabricación de diferentes productos desde hace más de un siglo. En 1988 ya se producían 30 millones de toneladas de plástico anualmente. Se estima que en 2015 la producción global se encontraba entre 60 y 99 millones de toneladas métricas, principalmente porque la mayoría de los productos plásticos son ligeros, de bajo costo y duraderos, entonces su uso continuó en aumento. Si la producción de plástico sigue al mismo paso, para el 2060 se podrían alcanzar entre 155 y 265 millones de toneladas métricas al año, de las cuales por lo menos 10 millones de toneladas terminan en el océano cada año debido a la falta de manejo de los desechos sólidos de plástico (Lebreton y Andrady, 2019; Thakur y col., 2018; Vegter y col., 2014).

La mayoría del consumo de plástico (39.9%) se da en el empaquetado de distintos productos y los plásticos más utilizados en estos procesos son: polietileno, polipropileno, tereftalato de polietileno y poliestireno (Mielcarek y Masek, 2019). Las características de los diferentes tipos de plástico y las facilidades que proporcionan para la industria hacen que la disminución de su producción en un futuro cercano no se vea tan factible. Principalmente porque la industria global de plástico genera aproximadamente \$600 mil millones anualmente (Gourmelon, 2015).

El manejo de desechos plásticos es un gran problema para Guatemala, ya que, aunque hay sistemas de reciclaje, son limitados y no están disponibles en todo el país. El resultado de esto es que el destino final de la mayoría de los desechos plásticos es el relleno sanitario del país o distintos cuerpos de agua. Lo cual tiene un impacto negativo en el ambiente y en los habitantes Guatemala y otros países. El efecto en el medio ambiente de los desechos plásticos es mundial. Esto implica que debemos buscar alternativas para manejar los desechos plásticos y ya que los métodos tradicionales de reciclaje y tratamiento son costos y no tan beneficiosos para el medio ambiente, se puede buscar soluciones en la naturaleza (Gourmelon, 2015; Magnusson y col., 2019).

Dentro de estas alternativas se encuentra la biorremediación, la cual comprende el uso de microorganismos con propiedades de biodegradación de plásticos. El género de bacterias *Klebsiella* es uno de estos microorganismos. Sin embargo, no basta solo con identificar las bacterias degradadoras de plástico. También es necesario optimizar los procesos para reducir costos y que la alternativa sea viable económicamente. Para reducir costos es necesario determinar la forma en la que las bacterias degradan los plásticos, es decir, las rutas metabólicas que utilizan para esto. De esta forma se pueden identificar etapas y proteínas claves para poder modificar genéticamente a los microorganismos y así aumentar su tasa de degradación utilizando biología sintética.

### 4.1. Contaminación ambiental

Contaminar los componentes físicos y biológicos del sistema tierra/atmósfera de tal forma en la que los procesos ambientales normales se vean afectados de forma negativa es lo que se conoce como contaminación ambiental y es el resultado de las acciones de los humanos. La contaminación ambiental es un problema global serio con consecuencias tanto para países desarrollados como para países en vías del desarrollo. Cualquier químico, sustancia geoquímica, organismo o producto biológico o sustancia física que se liberada al ambiente por actividades antropogénicas y tenga el potencial de tener un efecto negativo se considera un contaminante. La naturaleza del contaminante y el componente ambiental al que afecta determinan los tipos de contaminación (Krishna y col., 2017; Pushpanathan y col., 2014; Rai, 2015).

#### 4.1.1. Tipos de contaminación ambiental

Según el componente ambiental afectado es posible categorizar a la contaminación ambiental en: aérea, acuífera, terrestre, auditiva, radioactiva y térmica. Los diferentes tipos de contaminación tienen efectos sobre diferentes organismos vivos, sin embargo, la contaminación aérea y la acuífera son las que se consideran una mayor amenaza para humanos, plantas, animales y en general, para todos los organismos vivos (Rai, 2015).

#### Contaminación de fuentes acuíferas

La contaminación ambiental de ecosistemas marinos afecta el crecimiento tanto de organismos procarionotas como de organismos eucariotas. Existe contaminación en ecosistemas costeros y en los océanos abiertos. La diferencia principal entre ambas es que los ecosistemas costeros suelen ser afectados principalmente por efluentes industriales y municipales y por pesticidas y fertilizantes utilizados en la agricultura, mientras que los océanos se ven afectados en su mayoría por la acumulación de material plástico. La ligereza y durabilidad por las que los plásticos son tan utilizados en la industria son precisamente las que lo hacen problemático para la vida silvestre (Hader y Erzinger, 2017; Sigler, 2014).

El proceso de fotodegradación hace que los plásticos se fragmenten, lo cual facilita su dispersión en el océano y es una de las razones por las que los encontramos en corrientes marinas rotativas. La contaminación por plástico es una amenaza para la fauna marina, desde zooplancton a cetáceos, aves y reptiles marinos. Dado que al encontrarse circulando, puede ser ingerida por los organismos o pueden quedarse atrapados en ella. Esto tiene impacto a nivel individual y a nivel de la red trófica, porque los plásticos pueden adsorber contaminantes orgánicos que se pueden transferir a los tejidos y órganos (M. Eriksen y col., 2014; Sigler, 2014).

Hoy en día se sabe que existen zonas gigantescas de acumulación de desechos plásticos flotantes en donde la concentración de plástico es de hasta cinco órdenes de magnitud mayor que la de las zonas en las que no hay acumulación. Las áreas de acumulación que se producen en las zonas de convergencia de los mayores giros oceánicos subtropicales son ocasionadas por los patrones de viento y su efecto en las corrientes de superficie de los océanos. Estos giros oceánicos son los del Atlántico Norte y Sur, del Pacífico Norte y Sur y del océano Índico. De las zonas de acumulación mencionadas, la más grande es la del Pacífico Norte y contiene por lo menos un tercio del total. Dentro de las zonas es posible encontrar desde macropásticos como bolsas de plástico, colillas de cigarro, fragmentos de plástico y contenedores de bebidas, hasta microplásticos como microperlas y plástico comprimido (pellets) (Barboza y col., 2019; Sheth y Shah, 2019).

#### **4.1.2. Situación mundial**

Los problemas mundiales de contaminación son problemas que afectan a todo el planeta Tierra, no solo a una gran cantidad de personas. Son el resultado de eventos aditivos interconectados, aunque puede que no afecten a todos al mismo tiempo o en el mismo nivel. Una de las preocupaciones más grandes a nivel mundial es la contaminación por plástico. Se puede encontrar hasta en las áreas costeras más remotas y se estima que cada año ingresan entre 6 y 12 millones de toneladas de plástico a los océanos. Este, como otros problemas mundiales de contaminación, es un tema complejo que involucra componentes políticos, sociales y económicos y para solucionarlo se requiere la cooperación de todos los países (Trevors, 2010; Vince y Hardesty, 2017).

La comunidad internacional reconoce a instrumentos como la Convención de las Naciones Unidas sobre el Derecho del Mar. Esta tiene como uno de sus objetivos integrar políticas para proteger y preservar el medio ambiente marino. Sin embargo, solamente dirige a los Estados a la creación de sus propias leyes y regulaciones en cuanto a la contaminación marina y a establecer un reglamento para la contaminación que proviene de los barcos. El problema es que cuando la contaminación sucede fuera de las áreas de jurisdicción nacional es difícil determinar quién es el responsable. Un ejemplo de esto son las zonas de acumulación en los giros oceánicos (Vince y Hardesty, 2017).

#### **4.1.3. Situación en América Latina**

América Latina es rica en recursos naturales. Tiene reservas de minerales y petróleo, la superficie forestada más grande de todos los continentes, tierras de calidad y la mayor proporción de tierra cultivable después de Norteamérica. A pesar de esto, América Latina tiene serios problemas ambientales desde antes de 1998. Los peores son la contaminación del aire, la deforestación, la erosión de la tierra y la contaminación del agua (Solbrig, 1998).

Una de las razones principales de la contaminación del agua son los desechos urbanos, que incluyen plásticos, partes de desechos domésticos y remanentes de material de construcción. Dentro de los contaminantes orgánicos presentes en mayor proporción se encuentran los ftalatos, que indican la enorme cantidad de contaminación plástica en el área. Los contaminantes inorgánicos del agua que resultan de diferentes actividades de la agricultura y de la industria llevan a la producción de más desechos plásticos por la necesidad de comprar agua embotellada, afectando aún más la calidad del

agua (Vammen y Vaux, 2019).

## 4.2. Polímeros sintéticos

Plástico es un término que se utiliza para polímeros sintéticos en general. Un polímero es una molécula que consiste en varias subunidades de la misma molécula o de moléculas similares enlazadas. La industria de los polímeros sintéticos está compuesta en su mayoría por monómeros petroquímicos llamados termoplásticos y otro grupo de plásticos llamados termoestables. Los termoplásticos incluyen el polietileno (PE), el polipropileno (PP), el nylon, el poliestireno (PS), el polietileno tereftalato (PET), las poliamidas (PA) y el politetrafluoroetileno (PTFE). Estos plásticos entran en esta categoría porque se derriten cuando se calientan y se endurecen cuando se enfrían. Mientras que los plásticos termoestables pasan por un cambio químico cuando se calientan y forman una red tridimensional que no es reversible. A diferencia de los termoplásticos, los plásticos termoestables no se pueden reciclar. Ejemplos de estos son los poliuretanos (PUR), el poliéster insaturado, la silicona, el epoxi, la melamina y las resinas acrílicas. Ambos tipos de plástico se pueden combinar para formar otros polímeros (Chaudhuri, 2016; Geyer, 2020; Nagalakshmaiah y col., 2019).

### 4.2.1. Usos

Los diferentes plásticos mencionados anteriormente y otros han reemplazado o sustituido parcialmente a muchos productos derivados de materiales naturales como papel, madera, hierro, vidrio, lana y algodón. Esto quiere decir que tienen aplicaciones en construcción, eléctrica, electrónica, transporte, empaquetado, vestimenta, entre otras y por lo tanto se pueden encontrar casi en todos los materiales de uso diario. Parte de la gran versatilidad de usos del plástico se debe a que las reacciones de polimerización se pueden modificar para obtener diferentes resultados. Por ejemplo, partiendo de fibras de polietileno de alto peso molecular es posible obtener un polímero diez veces más fuerte que el acero (Chaudhuri, 2016; Namazi, 2017).

### 4.2.2. Producción

La baquelita, el primer polímero sintético, fue desarrollada por el químico belga Leo Baekeland en 1907 y fue patentada en 1909. A partir de ese momento se siguieron desarrollando diferentes tipos de plástico, aunque la producción en masa no empezó hasta alrededor de los años 40 y 50. Principalmente, porque en este momento se dieron cuenta de que las aplicaciones de los plásticos eran ‘inexhaustibles’ como se expuso en la publicación ‘Plastics’ de 1941 de Yarsley y Couzens. Aunque los plásticos ya eran utilizados en una amplia variedad de productos, la producción mundial era de menos de un millón de toneladas al año (Thompson y col., 2009).

La popularidad del plástico se debe principalmente a los beneficios que trae para la sociedad. Al ser un material de bajo costo, fácil de formar, hidrofóbico, de alto módulo elástico y bio-inerte se puede utilizar en un amplio rango de productos de uso diario. Sus usos principales son en construcción y en empaquetado. El 42% de la producción anual de resina a nivel mundial se utiliza para empaquetado. El empaquetado no solo comprende solo películas de empaque transparente sino también poliestireno expandido, entre otros tipos de plástico. La ligereza y durabilidad de algunos de los plásticos de menor costo ha reemplazado al metal y a la madera utilizados en construcción. El 20% de la producción mundial corresponde a estas aplicaciones (Lebreton y Andrady, 2019).

Sin embargo, el uso de plástico tiene sus consecuencias. Una de estas es que para producir plástico es necesario utilizar petróleo y se estima que para el 2050 la manufactura y el procesamiento de plásticos va a ser responsable del 20% del petróleo consumido a nivel mundial y del 15% del

presupuesto anual de emisiones de carbono. Las mismas características que hacen del plástico un material tan utilizado lo hacen un problema para el medio ambiente. Los productos de empaquetados casi siempre son descartados con sus características funcionales prácticamente intactas. Esto quiere decir que se podrían reutilizar y reciclar. Sin embargo, en Estados Unidos solamente se recicla aproximadamente el 9.4% de los plásticos, principalmente por los costos de recolección y la falta de infraestructura adecuada (Lebreton y Andrady, 2019).

Cuando los plásticos no se reutilizan ni se reciclan, estos pueden terminar en los drenajes y al taparlos aumentan los riesgos de inundaciones locales. Si el manejo inadecuado de desechos se da cerca de áreas costeras o de áreas de navegación interna se aumenta la probabilidad de ingreso de plásticos a los ríos y a los océanos. Como se mencionó anteriormente, el efecto de los macropásticos y los microplásticos en los océanos tiene consecuencias graves para la fauna marina y también para los humanos (Lebreton y Andrady, 2019; Mannaart y col., 2019; Vegter y col., 2014).

Para el 2016 la producción anual de plásticos fue de 330 millones de toneladas métricas (Mt). Si se incluye la resina utilizada en algunas fibras textiles esta cifra se acerca a los 393 Mt. Continuando con las tendencias actuales, se considera que la producción de desechos plásticos va a ser de aproximadamente 380 Mt anuales. Es decir, que los desechos van a superar a la producción del 2016. Según diferentes estimaciones se considera que para el 2015 se había producido aproximadamente 6300 Mt de desechos plásticos. De este valor se recicló el 9%, se incineró el 12% y se acumuló en rellenos sanitarios o en el ambiente natural el 79% (Geyer y col., 2017; Lebreton y Andrady, 2019).

La producción de plástico varía entre países desarrollados y países en vías de desarrollo, pero las cantidades producidas no son iguales a las cantidades de desechos manejados de forma inadecuada. Los países en donde se produce la mayor cantidad de desechos plásticos incluyen a Alemania, Holanda, Irlanda y Estados Unidos. Su producción es alrededor de 10 veces más grande que la de países como India, Tanzania, Mozambique y Bangladesh (Rithcie y Roser, 2019).

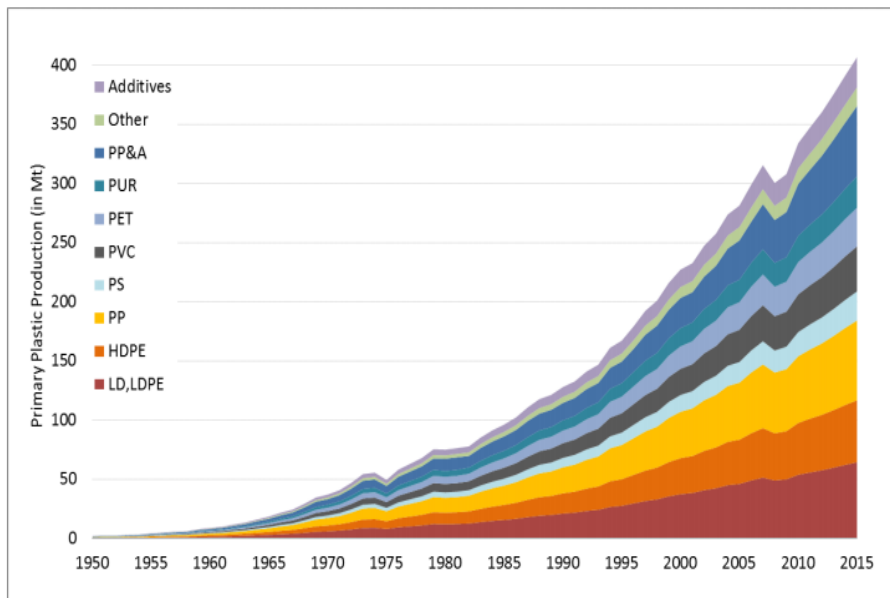


Figura 1: Producción primaria mundial de plásticos (en millones de toneladas métricas) de acuerdo con el tipo de polímero de 1950 a 2015. Donde se utilizan las abreviaciones de los tipos de plástico, HD corresponde a alta densidad y LD a baja densidad

(Geyer y cols., 2017)

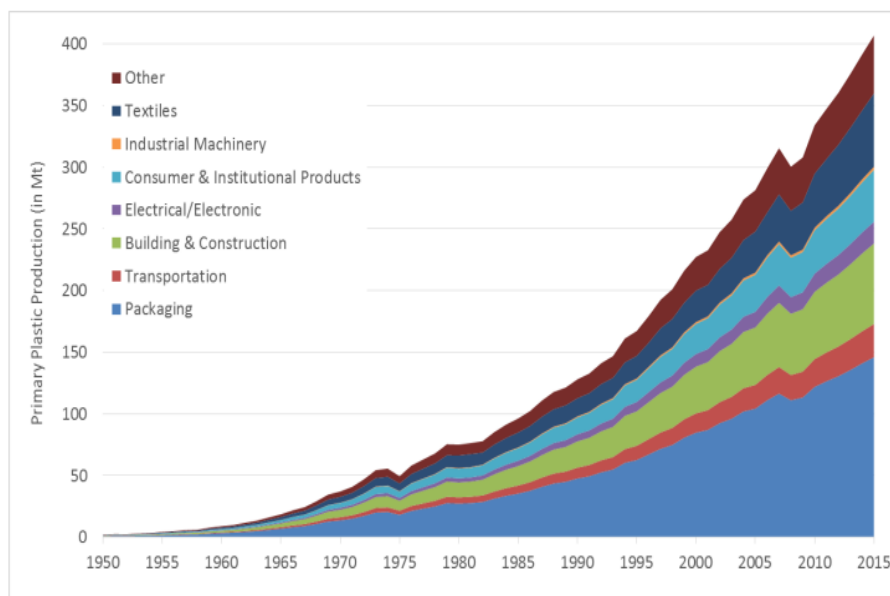


Figura 2: Producción primaria mundial de plásticos (en millones de toneladas métricas) de acuerdo con el uso por sector industrial de 1950 a 2015

(Geyer y cols., 2017)

A pesar de esto, los países que tienen la mayor producción de desechos son los que tienen sistemas e infraestructura de manejo de desechos más efectivos, como formas de reciclaje, incineración o rellenos sanitarios. Esto quiere decir que el plástico en riesgo de ingresar al ambiente natural es menor que en países de bajos y medianos ingresos que no manejan de forma adecuada sus desechos. Según cifras del 2010 se estima que en Guatemala se maneja de forma inadecuada el 36 % de los desechos plásticos. Sin incluir el plástico que los habitantes dejan en lugares inapropiados, como las calles (Rithcie y Roser, 2019).

Los grupos más grandes de plásticos sin fibras en cuanto a producción son el PE, el PP y el cloruro de polivinilo (PVC). Seguidos del PET, los PUR y el PS. En la Figura 1 se puede ver la distribución en el tiempo de la producción de plástico por tipo de polímero. En cuanto a la producción de plásticos para los diferentes sectores industriales, la mayor parte está dirigida al empaquetado, seguida por la construcción. Esto fue mencionado anteriormente y su distribución en el tiempo se puede ver en la Figura 2 (Geyer y col., 2017).

### 4.2.3. Tratamiento de desechos

El tratamiento de desechos plásticos ha recibido más atención en los últimos años debido a problemas ambientales y regulatorios ocasionados por las altas tasas de producción y la falta de conciencia de los consumidores. El aumento de los costos de los rellenos sanitarios y la reducción de espacios para ellos ha fomentado la búsqueda de alternativas para disponer estos desechos (Horodytska y col., 2019).

Los países en desarrollo suelen tener problemas de contaminación ambiental y de acumulación de desechos, incluyendo desechos plásticos, debido a la falta o ineficiencia de estrategias de recolección municipal. Esto hace que en muchos casos los habitantes depositen sus desechos directamente en ríos o canales. Sin embargo, existen sectores informales de recolección de materiales a cambio de

dinero. Los recolectores de desechos reciclables los toman de las calles y los venden a compañías de reciclaje locales. Una de las estrategias que están tomando algunos gobiernos latinoamericanos es integrar a estos recolectores a las estrategias de manejo de desechos formales para aumentar las tasas de reciclaje. Esto se podría implementar también con otras estrategias de tratamiento de desechos plásticos y no solo reciclaje (Horodytska y col., 2019).

A nivel mundial existen diferentes formas de tratamiento de desechos plásticos como reducción, reutilización, procesos de desecho a energía o WTE por sus siglas en inglés, reciclaje mecánico y químico y el método tradicional de los rellenos sanitarios. La incineración o combustión ya no se considera una alternativa viable porque resulta en emisiones tóxicas. Los métodos de reciclaje mecánico buscan convertir los desechos en nuevos productos utilizando separación, rectificación, lavados y extrusión, pero solamente puede reducir hasta el 20 % de los desechos plásticos generados. El problema con el reciclaje mecánico es que los procesos de recuperación de los desechos suelen ser más costosos que la producción de plásticos vírgenes. Es por esto que se deben buscar alternativas que minimicen los costos de tratamiento para compensar los costos de recuperación y que así el tratamiento sea lo suficientemente lucrativo para que se invierta en él (M. K. Eriksen y col., 2019; Miandad y col., 2016).

Actualmente, existen dos áreas principales de investigación para desechos plásticos. La primera es el reciclaje químico por medio de hidrólisis, metanólisis y glicólisis, junto con tecnologías de WTE como gasificación y pirólisis. La segunda área principal es la biorremediación. Ambas áreas se enfocan en optimizar los procesos para reducir costos (Miandad y col., 2016; Yang y col., 2015).

### 4.3. Biorremediación

La biorremediación es la eliminación de materiales no deseados de un sitio de interés por medio de fuentes biológicas como plantas, microorganismos o sustancias que provienen de ellos. Aunque su enfoque se basa en aprovechar procesos que ocurren naturalmente, es posible optimizar los procesos por ejemplo con ingeniería genética, para hacerlos más rápidos, eficientes y específicos. Si bien los métodos fisicoquímicos suelen ser más rápidos que los de biorremediación, los segundos son menos costosos, son fáciles, amigables con el medio ambiente, seguros y socialmente aceptados. En los últimos 20 años, se han descrito mecanismos para la mayoría de los contaminantes principales incluyendo hidrocarburos clorados, hidrocarburos poliaromáticos y metales pesados (Kumar y Bharadvaja, 2019; Lear y Lewis, 2012).

Es posible clasificar a la biorremediación de diferentes formas. Una de ellas se basa en el sitio o ubicación del tratamiento de los materiales de desecho. Según la esta clasificación la biorremediación puede ser *in situ* o *ex situ*. *In situ* se refiere a que la técnica se realiza en el lugar en donde se ubica la contaminación, mientras que *ex situ* se refiere a que se realiza en otra ubicación. En los procesos *in situ* no es necesario el transporte de lo que se quiere tratar y se pueden utilizar técnicas como la fitorremediación, el *bioventing* y el *biosparging*, pero la descontaminación toma más tiempo y es menos fácil de manejar. Estos procesos se realizan más que todo para tierra suelta (Kumar y Bharadvaja, 2019; Lear y Lewis, 2012).

Cuando las técnicas se realizan *ex situ* es necesario transportar el material de desecho o contaminado a otra ubicación, a pesar de esto puede ser más rápida y fácil de controlar que la *in situ*. El problema con esto es que los costos de manejo y transporte pueden ser altos y hacer que el proceso no sea viable económicamente. Dentro de las técnicas *ex situ* utilizadas se encuentran el uso de biorreactores, el compostaje y las biopilas (Pastorella y col., 2012).

La segunda forma de clasificar la biorremediación es con base en el agente biológico utilizado. Es decir, si se trabaja con plantas o microorganismos. Si se aplican plantas las técnicas se llaman fitorremediación y si se utilizan microorganismos se llama remediación microbiana. La remediación

microbiana puede ser aeróbica, anaeróbica o una combinación de ambas y puede ser influenciada por el tipo de organismo utilizado, el tipo de contaminante y las condiciones geológicas y químicas en los sitios de contaminación. En este tipo de remediación es posible utilizar hongos y bacterias (Kumar y Bharadvaja, 2019).

#### **4.3.1. Insectos con propiedades de degradación de plástico**

Por medio de la alimentación exclusiva con poliestireno se ha comprobado que los gusanos de la harina, las larvas del escarabajo *Tenebrio molitor* y *Tenebrio obscurus* son capaces de biodegradar poliestireno. También se ha reportado que los gusanos de cera son capaces de degradar películas de polietileno. En el artículo inicial que descubrió la degradación del poliestireno por las larvas de *Tenebrio molitor* se hizo una prueba de inhibición de los microorganismos del intestino de las larvas utilizando antibióticos. Al realizar esto, encontraron que la capacidad de las larvas de mineralizar el poliestireno disminuye con la supresión de las bacterias intestinales (Peng y col., 2019; Yang y col., 2015). Esto quiere decir, que las bacterias intestinales tienen un alto potencial para ser aprovechadas en procesos de biodegradación. Este es un campo de la biorremediación que no ha sido estudiado tan a fondo y, por lo tanto, todavía falta mucho por investigar.

#### **4.3.2. Microorganismos como herramienta para biodegradación**

La degradación es la modificación química de compuestos tóxicos a otros menos tóxicos o inocuos. La mineralización es la degradación completa del compuesto tóxico hasta obtener dióxido de carbono y agua. Se han reportado muchos microorganismos capaces de biodegradar diferentes contaminantes. Dentro de estos es posible encontrar una gran variedad de bacterias y hongos. Ya que las tasas de biodegradación dependen del estado fisiológico de los microorganismos y estos son sensibles a factores medio ambientales variables, se recomienda utilizar la inmovilización de los microorganismos para atenuar los impactos ambientales. Esto se realiza principalmente, cuando se busca implementar un método para tratar algún contaminante. Al trabajar con microorganismos el proceso de optimización suele ser más sencillo que con las plantas, porque la modificación genética de microorganismos es menos compleja que la de un eucariota superior. También resulta más costo efectivo trabajar con microorganismos porque requieren menos espacio y cuidado (Campocoso y Santiesteban, 2019; Dzionek y col., 2016; Pushpanathan y col., 2014).

Los mecanismos de biodegradación de plásticos son similares para bacterias y hongos microscópicos. Estos se basan en tres etapas principales: la unión del microorganismo a la superficie del polímero, el crecimiento del microorganismo utilizando el polímero como fuente de carbono y finalmente la degradación del polímero. La biodegradación empieza a suceder cuando el microorganismo secreta enzimas extracelulares que cortan el enlace principal y producen oligómeros, dímeros y monómeros que luego puede utilizar como fuente de carbono y energía. Algunos de estos compuestos de bajo peso molecular pueden ser asimilados por el microorganismo y asimilados a su ambiente interno. Es necesario explorar nuevas enzimas microbianas y rutas metabólicas para optimizar las condiciones en las que los polímeros se pueden degradar de forma eficiente (Ahmed y col., 2018; Alshehrei, 2017).

#### **Bacterias**

Las bacterias son capaces de realizar distintos procesos de biorremediación. Se han encontrado bacterias capaces de biodegradar plásticos en diferentes ambientes, por ejemplo, suelo, hábitats marinos fríos, aguas residuales e intestinos de insectos. Las bacterias reportadas por degradación de plásticos dependen del tipo de polímero. *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas stutzeri* y especies

del género *Vibrio* son capaces de degradar polipropileno. Diferentes cepas de *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Micrococcus* sp., *Arthrobacter* sp. y *Corynebacterium* sp. han demostrado potencial de degradación de poliuretano. Otras cepas de *Microbacterium* sp., *Paenibacillus urinalis*, *Bacillus* sp., y *Pseudomonas aeruginosa* pueden degradar poliestireno. En el caso de los polímeros sintéticos, como los mencionados anteriormente, hay una menor cantidad reportada de bacterias con capacidad de degradación que la que hay de bacterias degradadoras de polímeros naturales. Sin embargo, hay más cepas y especies de diferentes géneros de bacterias con capacidad de degradar polímeros sintéticos y naturales. Uno de estos géneros es *Klebsiella* (Devi y col., 2016; Johnston y col., 2019; Pathak y col., 2017; RaziyaFathima y col., 2016).

Diferentes cepas y especies de *Klebsiella* han demostrado capacidad de degradación de plásticos solas y también participación en procesos de degradación conjuntos, es decir en los que actúan diversos tipos de bacteria al mismo tiempo, como en los intestinos de insectos o en biopelículas. La especie *Klebsiella pneumoniae* ha demostrado la capacidad de degradar polietileno de alta y baja densidad. El poliestireno puede ser degradado por *K. pneumoniae* y cepas de *Klebsiella oxytoca*. La información acerca de biodegradación de plásticos por especies del género *Klebsiella* es limitada. Esto implica que todavía no se conoce a totalidad su potencial de degradación y tampoco los mecanismos y rutas por las cuales realizan las distintas degradaciones (Tang y col., 2017; Urbanek y col., 2020; Vatseldutt, 2004).

#### 4.4. Rutas de degradación de plásticos

La falta de conocimiento acerca de las rutas metabólicas implicadas en la degradación de plásticos por bacterias no aplica únicamente al género *Klebsiella*. Sin embargo, se han hecho avances en los últimos años. Se ha determinado que la degradación se da de forma extracelular e intracelular. La degradación extracelular se da por la presencia de enzimas como depolimerasas, hidrolasas, esterases, aminotransferasas lipasas y cutinasas. Las enzimas encontradas entran en las categorías mencionadas, pero son diferentes a las involucradas en otros procesos normales de la célula. En algunos casos la codificación para estas enzimas se encuentra en plásmidos accesorios (Danso y col., 2019; Wilkes y Aristilde, 2017).

El metabolismo intracelular es desconocido para la mayoría de los plásticos, pero se ha estudiado en casos como el estireno. Se sabe que su metabolismo puede suceder de dos formas: por el ataque de la cadena lateral del vinilo o de un anillo aromático inespecífico. Las tres enzimas clave del primer tipo de ataque son una estireno monooxigenasa, una isomerasa de óxido de estireno y una fenilacetaldehído deshidrogenasa. Los intermediarios generados en este proceso ingresan al ciclo de Krebs. Los genes para estas enzimas se encuentran conservados en el grupo de genes *styABC(D)*. El segundo ataque es catalizado por una 2,3-dioxigenasa y es seguido por la acción de una 2,3-dihidrodioldeshidrogenasa. Para PET se han identificado las hidrolasas PET hidrolasa y mono(2-hidroxietil) ácido tereftálicoasa (MHETasa), ambas de *Ideonella sakaiensis* También se ha reportado que las tres enzimas principales involucradas en la degradación de poliamidas son 6-aminohexanoato dímero cíclico hidrolasa (NylA), 6-aminohexanoato dímero lineal hidrolasa (NylB) y 6-aminohexanoato oligómero endohidrolasa (NylC), tres diferentes hidrolasas (Danso y col., 2019; Yoshida y col., 2016).

#### 4.5. Reconstrucción de rutas metabólicas

Una ruta metabólica es una red de reacciones químicas relacionadas catalizadas por enzimas que se encargan de producir o degradar uno o algunos metabolitos. La búsqueda de rutas metabólicas involucra encontrar la combinación correcta de enzimas para formar la ruta que conecta una molécula inicial con otra molécula final. El término reconstrucción de rutas metabólicas se refiere a el proceso

de anotar genes relevantes al metabolismo en el genoma, determinar la ruta metabólica o ambas. Es posible determinar una ruta metabólica a partir de anotaciones de genomas por la transferencia funcional de especies cuyas rutas ya han sido reconstruidas (Pitkänen y col., 2010; Qi y col., 2014; Wang y col., 2017).

El flujo general de trabajo para establecer rutas metabólicas *in silico* consiste en construcción de la base de datos, representación de la ruta metabólica, disminución de tamaño de la ruta, implementación del algoritmo de búsqueda y dar un ranking a las rutas para seleccionar la mejor ruta de interés. La representación de la ruta de reacciones puede ser un grafo o una matriz estequiométrica. El algoritmo de búsqueda puede ser basado en búsqueda de grafos, análisis de balance de flujo o búsqueda retro sintética. A pesar de estas variaciones, la mayoría de los métodos computacionales utilizados con estos fines coinciden en que toman en cuenta prerequisites como estequiometría, termodinámica, compatibilidad con el huésped y disponibilidad de enzimas (Fernández-Castané y col., 2014; Wang y col., 2017).

Existen diferentes herramientas utilizadas para diseño de rutas metabólicas. Las principales son basadas en grafos, en estequiometría o en retrosíntesis. Algunos ejemplos de herramientas basadas en grafos son ReTrace, PathComp, MetaRoute y Pathway Hunter Tool. PathTracer, CFP y optStoic son ejemplos de herramientas basadas en estequiometría y Simpheny, GEM-Path y PathPred son algunas de las herramientas basadas en retro síntesis. Cada una de estas utiliza una o varias bases de datos, pero la más utilizada es Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Todas las herramientas utilizan diferentes formas para podar rutas, diferentes algoritmos de búsqueda y formas de asignar el ranking a las rutas (Wang y col., 2017).

## 4.6. Biología sintética

La biología sintética es un campo en el que se utiliza ingeniería para realizar biomáquinas a partir de componentes estandarizados para que realicen funciones predefinidas. Esto se puede hacer con dos estrategias diferentes. La primera se enfoca en aprovechar la diversidad de partes existentes en la naturaleza para obtener composiciones sintéticas con propiedades predecibles y controlables. En la segunda estrategia se busca diseñar sistemas biológicos desde cero y sintetizar entidades biológicas artificiales que no se encuentran en la naturaleza. Los sistemas biológicos sintéticos se pueden diseñar para funcionar en ambientes libres de células o se pueden implementar en células vivas con el fin de explotar procesos celulares para aplicaciones deseadas (Ausländer y col., 2017).

La construcción y edición de secuencias de ADN para biología sintética inicia con el ensamblaje de los constructos de ADN diseñados para cumplir con un objetivo específico. El método de ensamblaje depende del objetivo y de la complejidad del constructo. Sin embargo, todos los métodos coinciden en la necesidad de cebadores para clonación. Cuando se trata de ensamblajes grandes se puede utilizar herramientas como Raven que realiza planeamiento jerárquico para el ensamblaje o como j5 que también realiza planeamiento jerárquico y produce cebadores altamente optimizados (Appleton y col., 2017).

### 4.6.1. Diseño de cebadores

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de amplificación de secuencias específicas de ADN. Los componentes básicos de una PCR son la plantilla de ADN, cebadores, nucleósidos trifosfato, ADN polimerasa y solución amortiguadora. El diseño de cebadores es un factor crítico tanto para la eficiencia como para la especificidad de la PCR. La especificidad es la frecuencia en la que se da la unión correcta entre el cebador y la plantilla de ADN y la eficiencia es el aumento de producto de cada ciclo de PCR. La aplicación es la que determina el balance ideal entre especificidad y eficiencia (Álvarez-Fernández, 2013; DeLong y Zhou, 2015).

Los parámetros que se deben considerar en el diseño de cebadores son: temperatura de desnaturalización, contenido guanina-citosina, longitud, secuencia y estructuras secundarias. La temperatura de desnaturalización es la temperatura a la cual la mitad de los cebadores se unieron a la plantilla de ADN. Esta se calcula con base en el contenido de cada nucleótido en el cebador. Para PCRs tradicionales lo ideal es que la temperatura de desnaturalización sea entre 52-58°C y que la temperatura de hibridación no sea más de 5°C diferente a la temperatura de desnaturalización. El contenido guanina-citosina debe ser entre 40 y 60%. La longitud depende del tamaño del segmento que se quiere amplificar. Para amplificar menos de 500 pares de bases los cebadores pueden de entre 16 y 18 nucleótidos, pero para amplificar productos de 5 kilo bases se necesitan cebadores de 24 nucleótidos (Álvarez-Fernández, 2013; DeLong y Zhou, 2015).

La secuencia del cebador también es importante porque de esto depende el funcionamiento de la ADN polimerasa. Es mejor tener cebadores con energía libre de Gibbs mayor a -9 kJ/mol debido a que mientras más grande es el valor de la energía libre de Gibbs es menor la probabilidad de que se formen estructuras secundarias de forma espontánea, baja estabilidad 3' y menos repeticiones de nucleótidos y de dinucleótidos. También es importante evadir la formación de estructuras secundarias como horquillas (*hairpins*) y la autocomplementariedad. Existen diferentes softwares para diseño de cebadores como Primer Premier (Singh y col., 1998), Primer-BLAST (Ye y col., 2012) y OligoAnalyzer (Owczarzy y col., 2008). Cada herramienta tiene diferentes opciones y algunas sirven no solo para el diseño del cebador en general, sino que también para predecir la formación de estructuras secundarias que puedan interferir con la amplificación (Álvarez-Fernández, 2013).

En el 2017 se realizaron aislamientos de muestras obtenidas del Programa MOSCAMED. La primera muestra se tomó de la dieta líquida de las moscas *Ceratitis capitata* producidas en la planta ubicada en “El Cerinal” Barberena, Santa Rosa, Guatemala. La dieta líquida consiste en una matriz 100% celulosa sumergida en agua con 11% de sacarosa. La muestra fue tomada de las torres de emergencia de adultos machos 96 horas luego de la emergencia. La segunda muestra corresponde la disección de *Anastrepha ludens* con una dieta basada en azúcar y levadura de la planta ubicada en San Miguel Petapa, Guatemala, Guatemala y la tercera muestra se obtuvo del intestino de un adulto macho *A. ludens* proveniente de una colonia silvestre mantenida en jaula de pantalla con frutas tropicales en San Miguel Petapa, Guatemala, Guatemala. De cada muestra se aislaron cepas de *Klebsiella* spp. en las instalaciones de la Universidad del Valle de Guatemala.

Ese mismo año se realizó en la Universidad del Valle de Guatemala el Megaproyecto “Innovación en nanotecnología, biotecnología y bioinformática para la producción masiva de insectos en Guatemala y el control de plagas agrícolas de la región” el cual se realizó por la necesidad de proporcionar una comprensión profunda de los diferentes procesos relacionados con el desarrollo y producción de moscas de la fruta estéril *Ceratitis capitata* y *Anastrepha ludens* y sus bacterias simbióticas del género *Klebsiella*. Dentro de este Megaproyecto se realizaron secuenciaciones de ADN de las cepas de *Klebsiella* spp. aisladas previamente para poder identificarlas. Para esto se utilizó el equipo MiniSeq de Illumina del laboratorio clínico DIRAD de Guatemala y se identificaron las tres cepas (Figueroa y Gavarrete, 2017). Sin embargo, al haber utilizado un equipo cuya finalidad es clínica, la identificación estaba limitada a aislados clínicos. Entonces luego de la finalización del Megaproyecto se enviaron las muestras a la compañía GENEWIZ de Estados Unidos para secuenciarlas de nuevo. En estas secuenciaciones se determinó que la cepa aislada de la primera muestra es *Klebsiella michiganensis* (GenBank: JACOE000000000.1). La segunda muestra se identificó como *Klebsiella* sp. Kpp (GenBank: JACOEC000000000.1) y la tercera como *Klebsiella* sp. Kps (GenBank: JACOED000000000.1).

Los datos de la segunda secuenciación de los aislados fueron utilizados en el 2020 en la tesis de maestría “Reconstrucción de rutas metabólicas de bacterias del género *Klebsiella* spp. como herramienta para mejorar el control biológico de la mosca *Ceratitis capitata* (Mosca mediterránea de la fruta)”. En la cual se identificaron rutas de metabolismo de nitrógeno de *Klebsiella* en las cuales las bacterias hacen que compuestos como el L-Glutamato y el amoníaco estén disponibles para la producción de proteínas durante la metamorfosis de las moscas (Franco, 2020).

#### 6.1. Sujetos de estudio

Secuencias del genoma de bacterias del género *Klebsiella* (GenBank: JACOEB000000000.1, JACOEC000000000.1 y JACOED000000000.1) y genes reportados correspondientes a enzimas relacionadas a degradación de plásticos.

#### 6.2. Diseño, enfoque y tipo de investigación

Investigación exploratoria con diseño no experimental y enfoque cualitativo.

#### 6.3. Criterios de inclusión y exclusión

Inclusión: enzimas que tienen un rol en la degradación de plásticos cuyo gen codificante ha sido identificado.

Exclusión: enzimas para las cuales todavía no está identificada la secuencia de su gen correspondiente.

#### 6.4. Hipótesis

Es posible reconstruir rutas metabólicas de *Klebsiella* spp. aisladas de moscas de la fruta con potencial para la degradación de plásticos.

## 6.5. Procedimiento

1. Identificación de enzimas y genes relacionados con la biodegradación de plásticos y posterior identificación de los genes en los genomas de *Klebsiella spp.*

- a) Se buscó en la literatura utilizando la base de datos “Plastics Microbial Biodegradation Database” (PMBD) y se buscó en la sección “genes” los genes identificados involucrados en la biodegradación de plásticos. Se revisaron todas las entradas para determinar si se contaba con la secuencia del gen, la especie o género de los organismos en los que fue identificado y la ruta posible de degradación. También se realizaron búsquedas fuera de la base de datos utilizando las palabras clave: biodegradación, biorremediación, plástico, despolimerización, secuencia, enzima, gen y bacteria. Se combinaron las palabras clave en inglés de diferentes formas para realizar las búsquedas.
- b) Se construyó una base de datos en Excel identificando gen, enzima, microorganismo, número de acceso, tipo de plástico y si había una ruta posible identificada.
- c) Se abrieron los archivos de contigos (*contigs*) de tres cepas diferentes ensamblados en una investigación previa realizada por Franco, 2020 y corresponden a *Klebsiella michiganensis* Kop (GenBank: JACOE000000000.1), *Klebsiella* sp. Kpp (GenBank: JACOEC000000000.1) y *Klebsiella* sp. Kps (GenBank: JACOED000000000.1) en Blast de NCBI para nucleótidos y se revisó la similitud de los alineamientos múltiples utilizando el algoritmo blastn. Para esto se utilizaron los archivos de los *contigs* como secuencias de consulta y los números de acceso con las regiones específicas como secuencia sujeto. El programa seleccionado fue blastn.
- d) Se definieron los genes con secuencias parciales de porcentaje de similitud a los *contigs* mayor al 60%. Aunque de acuerdo con la comisión enzimática a partir del 40% se considera que hay similitud funcional (Pearson, 2013).

2. Reconstrucción de rutas metabólicas utilizando un método con base en grafos

Para el flujo de trabajo se tomó como base el utilizado en “Reconstrucción de rutas metabólicas de bacterias del género *Klebsiella spp.* como herramienta para mejorar el control biológico de la mosca *Ceratitis capitata* (Mosca mediterránea de la fruta)” (Franco, 2020).

- a) Identificación de rutas metabólicas
  - 1) Se ingresaron los genes a los cuales corresponden las secuencias parciales identificadas por alineamiento en la base de datos de rutas metabólicas MetaCyc. Se utilizó esta base de datos porque contiene rutas involucradas en metabolismo primario y secundario, metabolitos asociados, reacciones, enzimas y genes de organismos de todos los dominios de la vida.
- b) Modelaje estequiométrico de las rutas metabólicas e identificación de péptidos señal
  - 1) Se representaron las rutas anteriores en una matriz estequiométrica utilizando los coeficientes estequiométricos obtenidos con MetaCyc.
  - 2) Se colocaron en las columnas de la matriz el número de reacciones y en las filas los metabolitos, es decir, los sustratos, productos y cofactores.
  - 3) Se analizaron las matrices estequiométricas con la herramienta CellNetAnalyzer.
  - 4) Se evaluó la presencia de péptidos de señalización en las enzimas involucradas en las rutas metabólicas reconstruidas utilizando la herramienta SignalP-5.0.

3. Diseño de cebadores

- a) Se diseñaron cebadores para clonación con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los genes encontrados en los genomas de *Klebsiella* fundamentales para la degradación de plásticos. Primero se realizaron alineamientos múltiples de secuencias de aminoácidos extraídas de UniProt para cada proteína utilizando Clustal W en la herramienta

genefisher2. También con genefisher2 se obtuvo una secuencia consenso degenerada de nucleótidos para cada proteína considerando la frecuencia de codones para el género *Klebsiella* obtenida de la base de datos de cuadros de utilización de codones (CoCoPUTs). Se introdujeron las secuencias degeneradas a la herramienta Geneious Prime en donde se diseñaron los cebadores. Se consideraron como ideales los siguientes parámetros para los cebadores de acuerdo con (Álvarez-Fernández, 2013; Delong y Zhou, 2015):

- Contenido Guanina-Citosina entre 40-60 %
  - Longitud entre 18 y 30 nucleótidos
  - Temperatura de desnaturalización entre 52 y 58°C.
  - Evitar repeticiones de 4 o más nucleótidos o dinucleótidos.
  - Degeneración de los cebadores menor a 128
- b) Se verificó que los cebadores no favorecieran la formación de horquillas y que tampoco fueran autocomplementarios. Para esto se evaluó la energía libre de Gibbs de las posibles estructuras secundarias formadas por los cebadores de acuerdo con (Álvarez-Fernández, 2013).

Para el análisis de los cebadores se utilizó la herramienta OligoAnalyzer de Integrated DNA Technologies (IDT). También se determinaron todas las combinaciones posibles para los cebadores utilizando un algoritmo diseñado por el Lic. Juan Pablo Pira (Pira, 2020) y se evaluó la especificidad de por lo menos cinco posibilidades utilizando la herramienta BLAST del NCBI. Se buscó que los cebadores no fueran específicos para secuencias correspondientes a otras proteínas en bacterias del género *Klebsiella*.

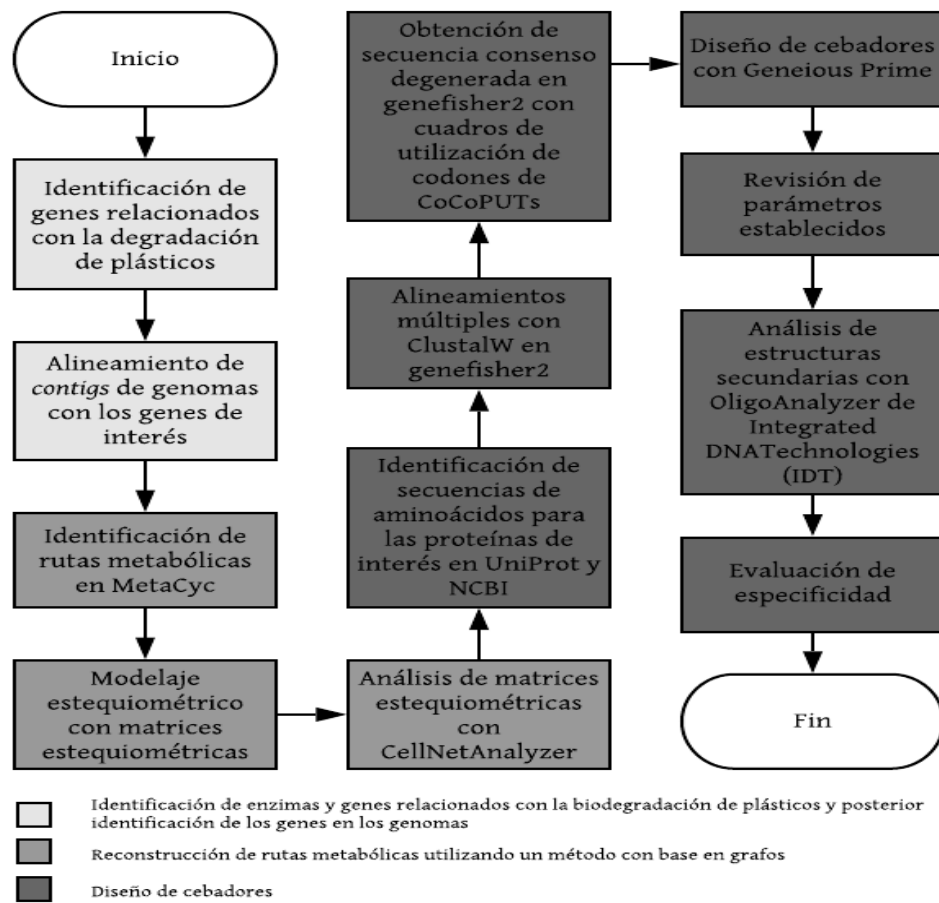


Figura 3: Diagrama de flujo del procedimiento

(Elaboración propia)

### 7.1. Identificación de genes de interés en los genomas de *Klebsiella spp.*

Para las cepas *Klebsiella michiganensis* Kop, *Klebsiella* sp. Kpp y *Klebsiella* sp. Kps se identificaron secuencias parciales de genes de degradación de los plásticos nylon, alcohol polivinílico (PVA), Poli butileno adipato tereftalato (PBAT), polietileno (PE) y polihidroxicanoato (PHA). También se identificaron secuencias parciales de genes para la degradación del monómero tereftalato y del aditivo ftalato (ver Cuadros 1 y 2). En el caso del tereftalato, las secuencias parciales son parte de un operón correspondiente a la producción de diferentes subunidades de una enzima de degradación de tereftalato que se encarga de la conversión de tereftalato a dihidroxiciclohexa-2,4-dieno-1,4-dicarboxilato. Sin embargo, como se puede ver en la Figura 4 no se logró identificar la ruta completa de degradación. En el Cuadro 2 se observa que para el tereftalato se identificaron tres secuencias parciales correspondientes a subunidades de la enzima tereftalato 1,2 dioxigenasa, *tphA1*, *tphA2* y *tphA3*, para el PBAT se identificó una arilesterasa, *are*, que realiza dos reacciones diferentes y para el PHA se identificó *phaZ*. En el Cuadro 1 se puede ver que para el nylon se identificaron secuencias parciales de cinco genes diferentes, *nylA*, *nylB*, *nylC*, *nylD* y *chnE* y para PVA se identificaron secuencias parciales de los genes *pvaA* y *oph*. En el Anexo B se pueden ver Cuadros con genes para los cuales se identificaron secuencias parciales dentro de los genomas de las cepas de interés que no se utilizaron para el resto de la investigación porque no se encontró información de los sustratos y productos correspondientes a las enzimas codificadas por los genes. En la Figura 4 se puede ver la ruta de degradación de tereftalato. Esta no se consideró en la reconstrucción de rutas metabólicas porque no se identificaron todos los genes necesarios para la producción de las enzimas utilizadas para llevarlo a cabo.

### 7.2. Reconstrucción de rutas metabólicas

Se reconstruyeron las rutas metabólicas completas de degradación de nylon y de PVA utilizando grafos (ver Figuras 5 y 7). A partir de estas y con datos obtenidos de la base de datos MetaCyc se

construyeron las matrices estequiométricas de las Figuras 6 y 8. El análisis de las matrices estequiométricas determinó que es igual de probable que se pueda seguir el camino de r1 a r6 que el camino de r3 a r6, en el caso de la degradación de nylon. Para la degradación de PVA se determinó que la probabilidad de seguir el camino de r1 a r2 es la misma que la de seguir el camino de r1 a r3. En ambos casos el camino depende de los metabolitos disponibles. Tanto en las Figuras 5 y 7 como en las Figuras 6 y 8 se pueden ver los metabolitos asociados a cada vértice. Ya que se identificaron secuencias parciales para los mismos genes en las tres cepas de *Klebsiella*, las rutas reconstruidas también aplican para las tres cepas. Para los demás materiales únicamente se identificó una reacción y por lo tanto no se lograron reconstruir más rutas. Considerando las posibles aplicaciones de biología sintética se determinó la presencia de péptidos de señalización en las enzimas involucradas en la degradación de nylon y de PVA (ver el Cuadro 3). Únicamente se encontraron péptidos señal para las enzimas correspondientes a los genes *pvaA* y *oph*. En la Figura 9 se puede ver un esquema que indica que las reacciones de la degradación de alcohol polivinílico suceden fuera de la célula debido a la secreción de las enzimas por el translocón Sec. Mientras que la degradación de nylon sucede dentro de la célula en el citoplasma.

Cuadro 1: Genes correspondientes a la degradación de nylon y alcohol polivinílico identificados parcialmente en los genomas de las tres cepas de *Klebsiella*

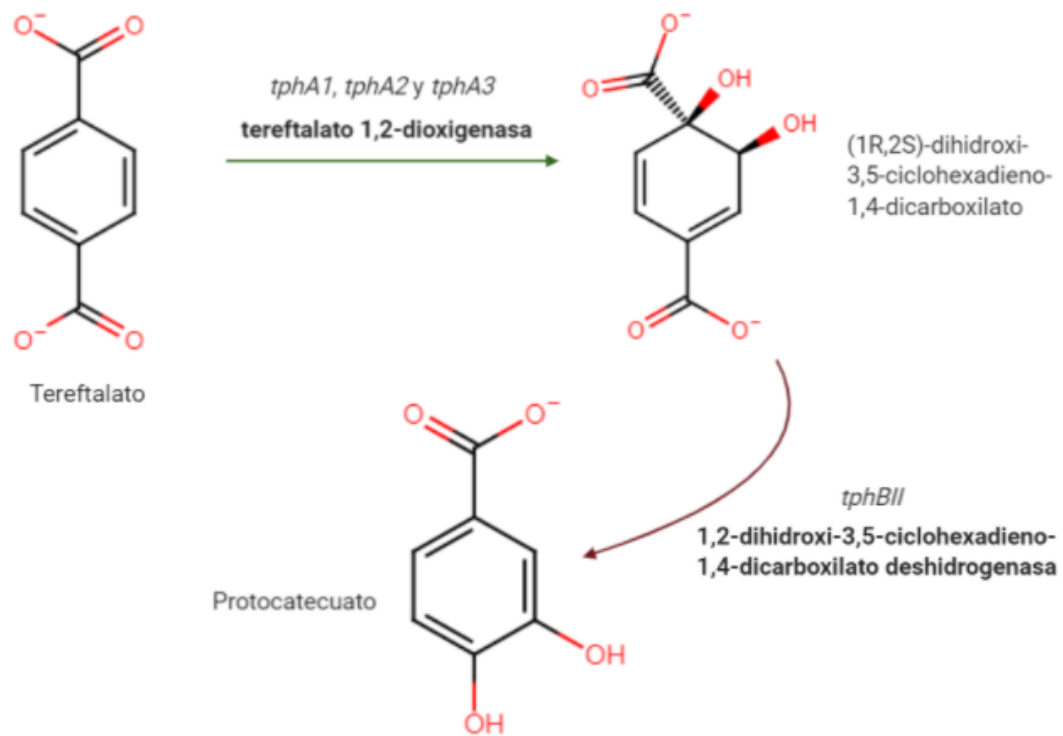
| Gen         | Enzima                                    | Material | No. de acceso y región (bp)            | No. EC    | Microorganismo                                   |
|-------------|---|----------|--|-----------|--|
| <i>nylA</i> | 6-aminohexanoato dímero cíclico hidrolasa | Nylon    | NC_007651.1<br>3604478<br>a<br>6055968 | 3.5.2.12  | <i>Burkholderia thailandensis</i><br><i>E264</i> |
| <i>nylB</i> | 6-aminohexanoato dímero lineal hidrolasa  | Nylon    | NC_003888.3<br>305537<br>a<br>306625   | 3.5.1.46  | <i>Streptomyces coelicolor</i>                   |
| <i>nylC</i> | 6-aminohexanoato oligómero endohidrolasa  | Nylon    | AB264778.2<br>3697<br>a<br>4764        | 3.5.1.117 | <i>Agromyces sp.</i><br><i>KY5R</i>              |
| <i>nylD</i> | 6-aminohexanoato aminotransferasa         | Nylon    | NC_000913.3<br>2792735<br>a<br>2794015 | 2.6.1.116 | <i>Escherichia coli</i><br><i>K-12 MG1655</i>    |
| <i>chnE</i> | 6-oxohexanoato deshidrogenasa             | Nylon    | AB006902.2<br>2237<br>a<br>3670        | 1.2.1.63  | <i>Acinetobacter sp.</i><br><i>NCIMB9871</i>     |
| <i>pvaA</i> | alcohol polivinílico deshidrogenasa       | PVA      | D50670.1                               | 1.1.2.6   | <i>Pseudomonas sp.</i><br><i>VM15C</i>           |
| <i>oph</i>  | alcohol polivinílico hidrolasa oxidada    | PVA      | AB190288.4                             | –         | <i>Pseudomonas sp.</i>                           |

\*Donde – significa que aún no se le ha asignado un número de la comisión de enzimas. En los casos en los que no se indica una región específica se utilizó toda la secuencia ubicada en el número de acceso correspondiente (Elaboración propia)

Cuadro 2: Genes correspondientes a la degradación de ftalato, tereftalato, PBAT, PHA y PE identificados parcialmente en los genomas de las tres cepas de *Klebsiella*

| Gen          | Producto   | Material    | No. de acceso y región (pb)     | No. EC     | Microorganismo                                |
|--------------|--|-------------|---------------------------------|------------|---|
| <i>tphA1</i> | tereftalato1,2-dioxigenasa componente oxigenasa subunidad alfa | Tereftalato | AB238678.1<br>3260<br>a<br>4962 | 1.14.12.15 | <i>Comamonas sp. E6</i>                       |
| <i>tphA2</i> | tereftalato1,2-dioxigenasa componente reductasa                | Tereftalato | AB238678.1<br>5916<br>a<br>6926 | 1.14.12.15 | <i>Comamonas sp. E6</i>                       |
| <i>tphA3</i> | tereftalato1,2-dioxigenasa componente oxigenasa subunidad beta | Tereftalato | AB238678.1<br>4959<br>a<br>5906 | 1.14.12.15 | <i>Comamonas sp. E6</i>                       |
| <i>are</i>   | arilesterasa   | PBAT        | KX002004.1                      | 3.1.8.1    | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes DSM 1045</i> |
| <i>are</i>   | arilesterasa   | PBAT        | KX002004.1                      | 3.1.1.2    | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes DSM 1045</i> |
| <i>alkB</i>  | alcano 1-monooxigenasa   | PE          | MK045309.1                      | 1.14.15.3  | <i>Paenibacillus sp. DK1</i>                  |
| <i>phtB</i>  | ftalato 3,4-dihidrodiol deshidrogenasa                         | Ftalato     | AY372763.1                      | 1.3.1.-    | <i>Mycobacterium sp. PAH2.135</i>             |
| <i>phaZ</i>  | poly (3-hidroxi octanoato) despolimerasa extracelular          | PHA         | U10470.1                        | 3.1.1.76   | <i>Pseudomonas fluorescens</i>                |

\*En los casos en los que no se indica una región específica se utilizó toda la secuencia ubicada en el número de acceso correspondiente (Elaboración propia)



Created in BioRender.com bio

Figura 4: Ruta de degradación de tereftalato. Donde la flecha verde significa que se identificó esa parte de la ruta y la flecha corinta significa que no se identificó. En negritas se puede ver el nombre de la enzima que cataliza la reacción y sobre eso en cursivas el nombre de los genes o el gen cuyos productos forman la enzima

(Elaboración propia)

Cuadro 3: Probabilidad de presencia de péptido de señalización

| Gen         | Enzima y No. de acceso                                      | Probabilidad de la presencia del péptido señal |          |         | Probabilidad de ausencia |
|-------------|---|--|----------|---------|--------------------------|
|             |   | Sec/SPI  | Sec/SPII | Tat/SPI |                          |
| <i>nylA</i> | 6-aminohexanoato dímero cíclico hidrolasa (Q2T577)          | 0.0081   | 0.0009   | 0.0331  | 0.9579                   |
| <i>nylB</i> | 6-aminohexanoato oligómero lineal exohidrolasa (A0A2S6XFB9) | 0.008  | 0.0017   | 0.0046  | 0.9858                   |
| <i>nylC</i> | 6-aminohexanoato oligómero endohidrolasa (Q1EPR5)           | 0.0239   | 0.0041   | 0.003   | 0.9690                   |
| <i>nylD</i> | 6-aminohexanoato aminotransferasa (P22256)                  | 0.0102   | 0.0014   | 0.0159  | 0.9726                   |
| <i>chnE</i> | 6-oxohexanoato deshidrogenasa (Q9R2F4)                      | 0.006  | 0.0013   | 0.0022  | 0.9906                   |
| <i>pvaA</i> | alcohol polivinílico deshidrogenasa (P77931)                | 0.7648   | 0.0023   | 0.228   | 0.0049                   |
| <i>oph</i>  | alcohol polivinílico hidrolasa oxidada (Q9LCQ7)             | 0.9048   | 0.0076   | 0.0867  | 0.0009                   |

\*Donde Sec/SPI es el péptido señal estándar transportado por el translocón Sec y cortado por la Señal Peptidasa I (Lep), Sec/SPII son los péptidos de señal de lipoproteínas transportados por el translocón Sec y cortados por la Señal Peptidasa II (Lsp) y Tat/SPI son los péptidos de señal Tat transportados por el translocón Tat y cortados por Lep. La probabilidad de ausencia se refiere a la probabilidad de que la secuencia no incluya péptidos de señalización. El número de acceso corresponde a la secuencia en UniProt  
(Elaboración propia)

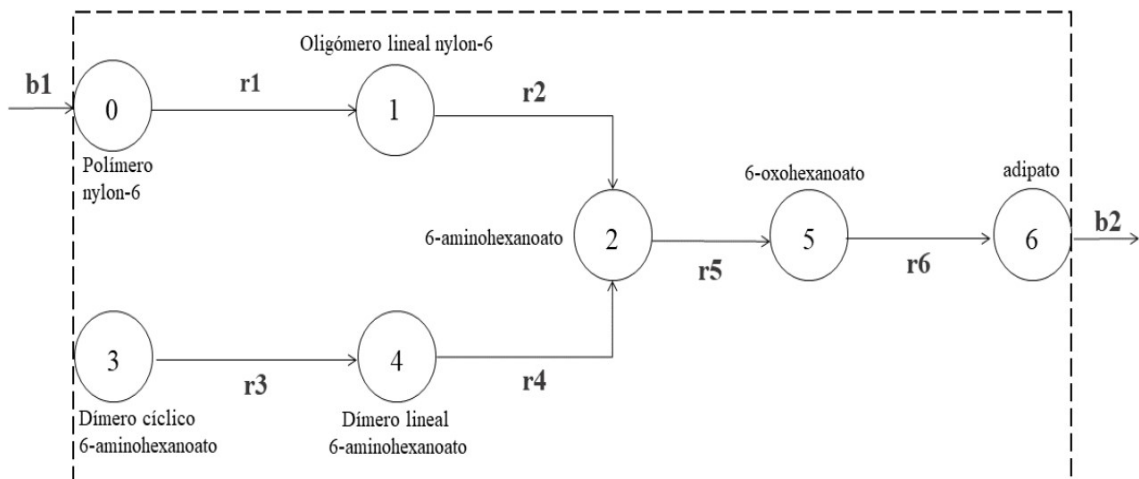


Figura 5: Grafo de las reacciones químicas involucradas en la degradación de nylon. Donde la numeración dentro de los círculos corresponde a los metabolitos (vértices), b1 corresponde al ingreso a la ruta de degradación, b2 a la salida de la ruta y r1, r2, r3, r4, r5 y r6 representan la conversión del sustrato al producto

(Elaboración propia)

| Vértice | $r1$ | $r2$ | $r3$ | $r4$ | $r5$ | $r6$ | $b1$ | $b2$ |                                    |
|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------------------------------|
| 0       | -1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | Polímero nylon-6                   |
| 1       | 1    | -1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | Oligómero lineal nylon-6           |
| 2       | 0    | 1    | 0    | 2    | -1   | 0    | 0    | 0    | 6-aminohexanoato                   |
| 3       | 0    | 0    | -1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | Dímero cíclico<br>6-aminohexanoato |
| 4       | 0    | 0    | 1    | -1   | 0    | 0    | 0    | 0    | Dímero lineal<br>6-aminohexanoato  |
| 5       | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | -1   | 0    | 0    | 6-oxohexanoato                     |
| 6       | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | -1   | Adipato                            |
| 7       | 0    | 0    | 0    | 0    | -1   | 0    | 0    | 0    | 2-oxoglutarato                     |
| 8       | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | L-glutamato                        |

Figura 6: Matriz estequiométrica de las reacciones químicas involucradas en la degradación de nylon. Los vértices o filas corresponden a los metabolitos involucrados en las reacciones que se pueden ver en las columnas de la matriz. Las columnas a la izquierda de la línea punteada indican las reacciones del flujo interno de la ruta y las columnas a la derecha indican las reacciones de flujo de intercambio de la ruta. Cada número indica el coeficiente estequiométrico del metabolito y reacción correspondiente

(Elaboración propia)

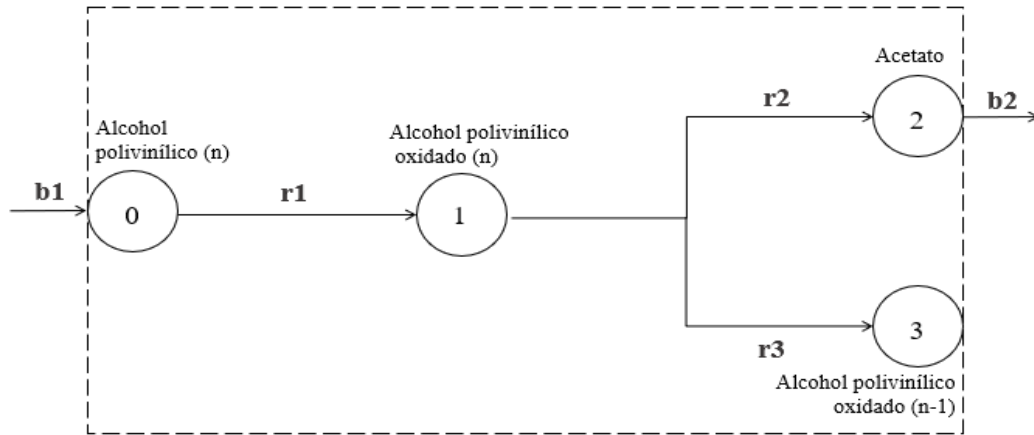


Figura 7: Grafo de reacciones químicas involucradas en la degradación de alcohol polivinílico. Donde la numeración dentro de los círculos corresponde a los metabolitos (vértices), b1 corresponde al ingreso a la ruta de degradación, b2 a la salida de la ruta y r1, r2 y r3 representan la conversión del sustrato al producto

(Elaboración propia)

| Vértice | $r1$ | $r2$ | $r3$ | $b1$ | $b2$ |   |                                    |
|---------|------|------|------|------|------|---|------------------------------------|
| 0       | -1   | 0    | 0    | 0    | 0    | } | Alcohol polivinílico (n)           |
| 1       | 1    | -1   | 0    | 0    | 0    |   | Alcohol polivinílico oxidado (n)   |
| 2       | 0    | 1    | 0    | 2    | -1   |   | Acetato                            |
| 3       | 0    | 0    | -1   | 0    | 0    |   | Alcohol polivinílico oxidado (n-1) |

Figura 8: Matriz estequiométrica de las reacciones químicas involucradas en la degradación de alcohol polivinílico. Los vértices o filas corresponden a los metabolitos involucrados en las reacciones que se pueden ver en las columnas de la matriz. Las columnas a la izquierda de la línea punteada indican las reacciones del flujo interno de la ruta y las columnas a la derecha indican las reacciones de flujo de intercambio de la ruta. Cada número indica el coeficiente estequiométrico del metabolito y reacción correspondiente

(Elaboración propia)

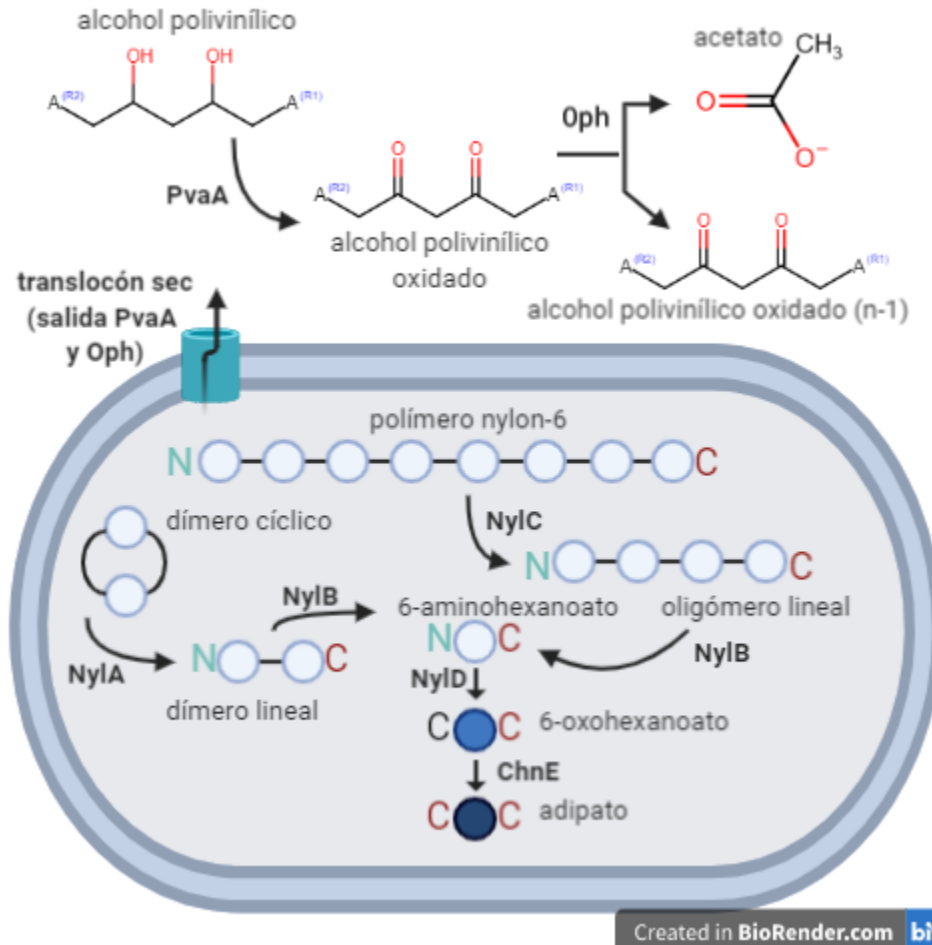


Figura 9: Esquema de ubicación celular de las reacciones de degradación de alcohol polivinílico y nylon. Donde la degradación del alcohol polivinílico (PVA) sucede en el exterior de la célula y la degradación del nylon en el citoplasma. Las enzimas utilizadas en la degradación de PVA son transportadas al exterior por medio del translocón sec. Los polímeros cortos de nylon y los oligómeros entran a la célula por transporte pasivo. La N en celeste representa una amina, la C roja representa un ácido carboxílico y la C negra un grupo aldehído. El cambio de color celeste a azul claro representa que hubo un cambio más allá de la hidrólisis y el color azul oscuro que le sigue representa que ocurrió otro cambio

(Elaboración propia)

### 7.3. Diseño de cebadores

Con base en la reconstrucción de las rutas metabólicas y el análisis de las matrices estequiométricas se diseñaron cebadores para la identificación y clonación de los genes *nylA*, *nylB*, *nylC*, *nylD* y *chnE* para la degradación de nylon y los genes *pvaA* y *oph* para la degradación de PVA como se puede ver en los Cuadros 4 y 5. En el Cuadro 4 se puede ver el nombre, la dirección y la secuencia de cada cebador. En el Cuadro 5 se puede ver la longitud, el contenido Guanina-Citosina (GC), la temperatura de desnaturalización, el tamaño del producto y la degeneración de cada cebador. En su mayoría se diseñaron cebadores degenerados. El par de cebadores con la mayor degeneración corresponde a los diseñados para el gen *nylB* y el único par de cebadores no degenerado es el del gen

*chnE*. En la Figura 10 se puede ver una representación gráfica de los productos de amplificación en una electroforesis en gel. La ubicación de los cada uno en su respectivo secuencia consenso se puede ver en el Anexo D. Ya que los cebadores se diseñaron considerando los codones de uso más frecuente del género *Klebsiella* estos aplican para las tres cepas de *Klebsiella* analizadas en la investigación.

Cuadro 4: Secuencia y dirección de los cebadores diseñados para los genes de interés

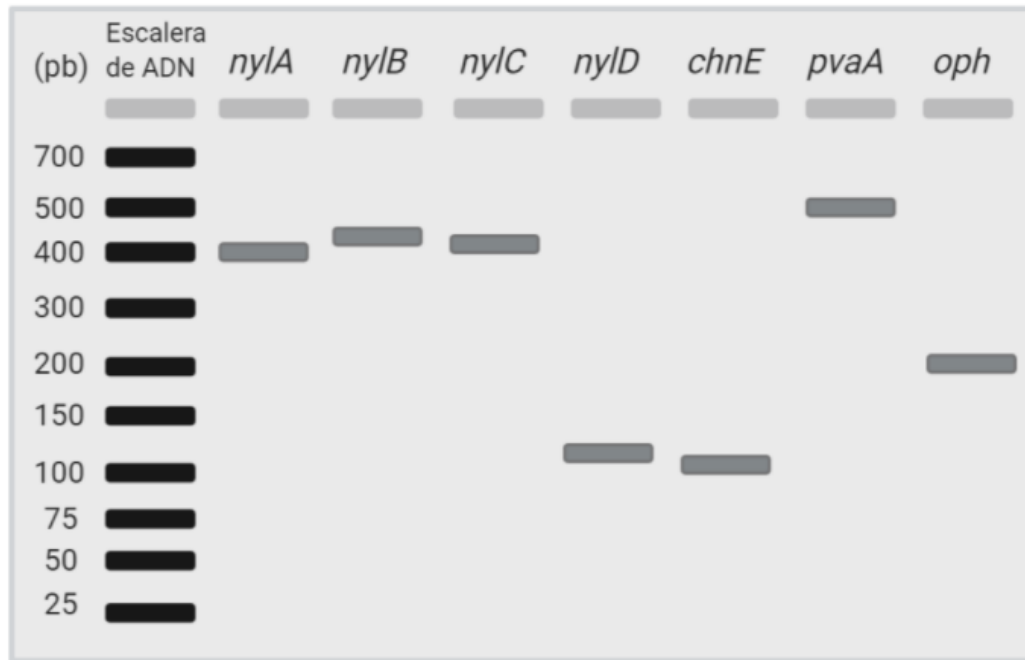
| Gen         | Dirección      | Nombre       | Secuencia (5'-3')      |
|-------------|----------------|--------------|------------------------|
| <i>nylA</i> | Hacia adelante | nylA-472 F   | GGCGTGCCGGBTBCTGMTSAAA |
|             | Reverso        | nylA-871 R   | TCGGTTTCAGGCCSACCA     |
| <i>nylB</i> | Hacia adelante | nylB-691 F   | GYGACCRRTSSRSCA        |
|             | Reverso        | nylB-1,174 R | SGCCVAAGCGSGCCRSRTC GC |
| <i>nylC</i> | Hacia adelante | nylC-424 F   | GTGAGCAGCGCSGTGATCTA   |
|             | Reverso        | nylC-842 R   | CTCATGCGCACRRTTGGTCAC  |
| <i>nylD</i> | Hacia adelante | nylD-211 F   | GGCAAYAGCTTYATCGAYCT   |
|             | Reverso        | nylD-331 R   | CCATRAAGCAGGTRTGGGTR   |
| <i>chnE</i> | Hacia adelante | chnE-1,348 F | AGCACCAGCAAAAAGCAG     |
|             | Reverso        | chnE-1,463 R | TTGCGCACCAGTTTTT       |
| <i>pvaA</i> | Hacia adelante | pvaA-1,415 F | TSSTGGYGGGCCAGAAAAGC   |
|             | Reverso        | pvaA-1,932 R | RTAGCCGCTRTRKACGWWCA   |
| <i>oph</i>  | Hacia adelante | oph-446 F    | TGRTSKMCCC GDWC        |
|             | Reverso        | oph-711 R    | GGYCATSRYGCCGCCBYGCT   |

\*Donde Y corresponde a timina (T) o citosina (C); R a guanina (G) o adenina(A); S a G o C; N a G, A, T o C; M a C o A; W a T o A; K a G o T; B a G, T o C; V a G, C o A; H a C, A o T y D a G, A o T. Se revisó que ninguna de las secuencias de los cebadores fuera específica a genes correspondientes a proteínas de bacterias del género *Klebsiella* (Elaboración propia)

Cuadro 5: Propiedades de los cebadores diseñados para los genes de interés

| Nombre       | Longitud (pb) | %GC  | Tm (°C)     | Producto (pb) | Degeneración |
|--------------|---------------|------|-------------|---------------|--------------|
| nylA-472 F   | 21            | 61.1 | 62.1 - 68.4 | 400           | 36           |
| nylA-871 R   | 18            | 61.1 | 61.2        |               | 2            |
| nylB-691 F   | 14            | 72.7 | 47.1 - 58.8 | 484           | 64           |
| nylB-1,174 R | 21            | 83.3 | 70.4 - 76.5 |               | 96           |
| nylC-424 F   | 20            | 60   | 62.6        | 419           | 2            |
| nylC-842 R   | 20            | 57.9 | 60.2 - 62.5 |               | 2            |
| nylD-211 F   | 20            | 47.1 | 53.0 - 60.7 | 121           | 8            |
| nylD-331 R   | 20            | 52.9 | 54.2 - 61.2 |               | 8            |
| chnE-1,348 F | 17            | 52.9 | 55.6        | 116           | 0            |
| chnE-1,463 R | 16            | 43.3 | 52.1        |               | 0            |
| pvaA-1,415 F | 20            | 63.2 | 62.7 - 65.5 | 518           | 8            |
| pvaA-1,932 R | 20            | 52.9 | 57.1 - 63.6 |               | 32           |
| oph-446 F    | 14            | 70   | 43.1 - 57.4 | 266           | 96           |
| oph-711 R    | 16            | 84.6 | 58.1 - 67.6 |               | 16           |

\*Para cada cebador se revisó que ninguna de las posibles estructuras secundarias tuviera energía libre de Gibbs menor a 0.9 kcal/mol. La ubicación de cada cebador en su gen correspondiente se puede ver en el Anexo D (Elaboración propia)



Created in BioRender.com bio

Figura 10: Representación de los productos de amplificación de los cebadores diseñados resultantes de una electroforesis en gel. Los pozos se ven en gris claro, las bandas de la escalera de color negro y las bandas de amplificación de las muestras en gris oscuro. En la parte superior de los pozos se puede ver la muestra correspondiente a cada uno. En el primer pozo se ve la escalera molecular de 700 pares de bases con la cual se comparan los productos de amplificación. Esta imagen se realizó considerando la información de los Cuadros 4 y 5

(Elaboración propia)

Discusión

---

Dentro de los genomas de *Klebsiella michiganensis* Kop, *Klebsiella* sp. Kpp y *Klebsiella* sp. Kps, cepas presuntamente simbioses de moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) se identificaron secuencias parciales de genes para degradación de nylon, PVA, PBAT, PE, PHA, tereftalato y ftalato. A partir de las secuencias parciales de los genes identificados e información de sustratos y productos se reconstruyeron las rutas de degradación de nylon y de PVA por lo cual se cumplió la hipótesis de la investigación. También se diseñaron cebadores degenerados para la identificación de los genes *nylA*, *nylB*, *nylC*, *nylD*, *chnE*, *pvaA* y *oph* necesarios para la de degradación de nylon y PVA.

Hay ciertos insectos que pueden ingerir y degradar plásticos y micro plásticos sin problemas, mientras que la presencia de estos en otros insectos disminuye el crecimiento y la capacidad de reproducción (Oliveira y col., 2019). La presencia de secuencias parciales de genes de degradación de plástico y de aditivos del proceso de fabricación sugiere que las larvas de las moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) tienen el potencial para degradar estos materiales, específicamente los indicados en los Cuadros 1 y 2, y no verse afectadas negativamente. Una posible explicación para esto es que las moscas de la fruta tienen una dieta rica en celulosa (Merli y col., 2018; Pascacio-Villafán y col., 2018), la cual es un polímero natural, pero ya que los plásticos también son polímeros solo que sintéticos, las bacterias simbioses de las moscas se pueden haber adaptado para aprovechar a estos nuevos polímeros como fuente de carbono. Tanto en *C. capitata* como en *A. ludens* se considera a *Klebsiella* como uno de los géneros dominantes de las respectivas microbiotas intestinales. Se ha reportado la presencia dominante de *Klebsiella* sp. en larvas, pupas, adultos machos y adultos hembras (Behar y col., 2005; Ventura y col., 2018). Como técnica para la mejora del rendimiento sexual de las moscas de la fruta estériles producidas en planta en ocasiones se las alimenta con bacterias del género *Klebsiella* y otros para que cumplan la función de probióticos (Ami y col., 2010).

La comprobación de la presencia de quitinasas producidas por las bacterias intestinales de los insectos del género Diptera combinada con la alta adaptabilidad de las bacterias también podría explicar la presencia de las secuencias parciales identificadas correspondientes a los genes de degradación (Indiragandhi y col., 2011). Para que pueda haber adaptabilidad se necesita exposición a los polímeros y en este caso las moscas y por lo tanto sus bacterias están expuestas a plásticos constantemente. Ya que estos se utilizan como una forma de exclusión física para proteger a los cultivos de las plagas (Sarwar, 2015). Todavía no hay evidencia de que las moscas de la fruta o sus larvas logren superar estas barreras físicas. Sin embargo, es posible que logren consumir parte del plástico

sin llegar a romperlo. De igual forma, todavía es necesaria evidencia experimental del potencial del insecto y sus larvas para la degradación de plástico.

Cabe mencionar que en los alineamientos iniciales con los genes encontrados en la literatura se identificaron secuencias parciales de 31 genes adicionales dentro de los genomas de interés (ver Cuadros 12 y 13 de la sección de Anexos). Sin embargo, estos no se incluyeron en la sección de Resultados ya que no se encontró información correspondiente a reacciones enzimáticas en la enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG) y, tampoco en la base de datos MetaCyc de BioCyc y sin esta información no se podía realizar la reconstrucción de rutas metabólicas. Los datos de los Cuadros 1 y 2 son importantes porque implican que las tres cepas de interés no solo tienen secuencias parciales de genes que codifican para la producción de enzimas para iniciar la degradación de ciertos plásticos, sino que en algunos casos cuentan con la capacidad de degradar diferentes compuestos intermediarios formados en el proceso de degradación. Al igual que con las larvas, todavía es necesaria evidencia experimental de la degradación de los plásticos mencionados de parte de las cepas de interés del género *Klebsiella*.

Otra limitación de la investigación ocasionada por la ausencia de información en la literatura es que se han identificado enzimas de forma experimental de las cuales se cuenta con la secuencia de aminoácidos de las proteínas. Sin embargo, aún no se conoce la secuencia de los genes responsables de la producción de las enzimas y por lo tanto no se incluyeron en la investigación. Por ejemplo, las enzimas polietileno tereftalato hidrolasa (PETasa) y monohidroxietil tereftalato hidrolasa (MHE-Tasa) utilizadas para la degradación de PET (Koshti y col., 2018). Esto quiere decir que aún no sabemos si las cepas de interés son capaces de producir estas enzimas y se tendría que realizar pruebas experimentales de degradación de cada plástico específico y en el caso de que la degradación sea posible se tendría que caracterizar las proteínas. La caracterización de proteínas sería necesaria para determinar si la degradación se está realizando por las mismas rutas y enzimas o si se están utilizando otras. En algunos casos esta ausencia de información de las secuencias no permitió la reconstrucción de las rutas metabólicas porque únicamente se logró realizar alineamientos con uno de los genes involucrados en la posible ruta de degradación.

Dentro de los materiales para los cuales se identificaron secuencias parciales de genes de degradación se encuentra el PHA, un polímero producido por bacterias en condiciones con pocos nutrientes con el fin de luego degradarlo para generar energía y que así pueda haber crecimiento microbiano (Ray y Kalia, 2017), por lo cual la probabilidad de encontrar secuencias de genes para la degradación de este material era alta. También se encontraron secuencias parciales de genes para degradación de PBAT, un polímero sintético clasificado como biodegradable para el cual hay diferentes estudios que han comprobado que este se degrada en la tierra y en sistemas acuáticos y que la degradación se da por la colonización de microorganismos. Por lo tanto, también era probable encontrar estas secuencias en las cepas de interés. Para el PBAT se encontró una secuencia parcial del gen que codifica para una arilesterasa que hidroliza poliésteres aromáticos y libera tereftalato (Bonilla y col., 2020; Haernvall y col., 2017; Palsikowski y col., 2018; Zumstein y col., 2018).

En procesos de biodegradación controlada se podría recuperar el tereftalato para comercializarlo para la producción de nuevos polímeros industriales como PET o PBAT o permitir que las bacterias lo incorporen para producir biomasa o que liberen dióxido de carbono. La venta del tereftalato podría tener un alto valor comercial ya que no se necesitaría más petróleo para la obtención de tereftalato. Esto también tendría beneficios ambientales porque reduciría la cantidad producida de gases de invernadero (Haernvall y col., 2017; Koshti y col., 2018; Semba y col., 2018; Zumstein y col., 2018).

Ya que también se identificaron secuencias parciales de genes para la degradación de tereftalato en las cepas de interés si se quisiera realizar la recuperación de tereftalato probablemente se tendrían que silenciar estos genes. A diferencia del tereftalato, los ftalatos no son monómeros de plásticos, sino que son adicionados a estos durante el proceso de fabricación para aumentar su flexibilidad y durabilidad (Boll y col., 2019). Se han realizado estudios en diferentes partes del mundo en los

cuales se han identificado ftalatos en recursos acuáticos, agua embotellada y agua del grifo. Esto es problemático por la alta toxicidad que tienen para el sistema endócrino humano (Abtahi y col., 2019; Katsikantami y col., 2016). La presencia de secuencias parciales de genes de degradación de ftalatos presentes en las cepas de interés sugiere que las bacterias podrían degradar estos compuestos y evitar su ingreso al ambiente acuático y su posterior consumo por los humanos y otros organismos para los cuales son dañinos.

El PVA es un polímero soluble en agua y se ha sabido por más de 80 años que distintos microorganismos lo pueden mineralizar. Diferentes estudios han reportado que la degradación suele ser realizada por bacterias Gram negativas. Ya que el género de bacterias *Klebsiella* se clasifica como Gram negativo, era altamente probable encontrar secuencias parciales para los dos genes involucrados en el metabolismo de este material, *pvaA* y *oph*, dentro de las cepas de interés (ver Cuadro 1). Hoy en día se utilizan diferentes combinaciones de PVA con otros polímeros como PE de baja densidad y de alta densidad o con polímeros naturales como almidón, para los cuales también se han reportado microorganismos con potencial para degradarlos (Ahmed y col., 2018; Anjana y col., 2020; Kawai y Hu, 2009; Raghul y col., 2014). Para determinar la capacidad de las cepas de interés para degradar estas combinaciones se tendría que realizar pruebas experimentales.

En la Figura 7 se puede ver que se logró reconstruir la ruta de degradación de PVA y se determinó con la matriz estequiométrica correspondiente (ver Figura 8) que es igual de probable que se siga el camino r1 a r2 a que se siga el camino de r1 a r3 porque el alcohol polivinílico oxidado con un monómero menos, es decir n-1 (vértice 3), es un metabolito intermediario y eventualmente se va a obtener acetato (vértice 2). Esto implica que al realizar ingeniería genética y posteriormente biología sintética se tendría que considerar la ruta completa. Por lo tanto, se diseñaron cebadores para los genes *pvaA* y *oph* (ver Cuadros 4 y 5). Los cebadores degenerados se diseñaron considerando el cuadro de uso de codones para *Klebsiella* de CoCoPUTS (Alexaki y col., 2019). La limitación de los cebadores diseñados es que ya que se diseñaron a partir de secuencias consenso degeneradas y cuadros de uso de codones entonces no hubo forma de evaluar completamente su especificidad y tampoco se tiene certeza de que al probarlos experimentalmente se unan a la secuencia de interés. Sin embargo, usar el Cuadro de codones de uso aumenta la probabilidad de que funcionen.

Se esperaba poder diseñar cebadores que permitieran la clonación de los genes completos identificados para la degradación de plásticos. Sin embargo, esto no se logró debido a que solo se identificaron secuencias parciales para los genes y únicamente se contaba con la secuencia de genes de otros géneros bacterianos. Entonces usar un diseño de cebadores universales hubiera sido muy específico y podría no haber sido exitoso experimentalmente en las cepas de interés. Es posible que solamente se identificaran secuencias parciales porque puede que en este caso los genes no estén altamente conservados entre géneros y que las secuencias parciales identificadas correspondan a las áreas de mayor conservación de los genes. Considerando esto y que no se identificaron en la literatura otras secuencias de nucleótidos de género más cercanos a *Klebsiella* se decidió diseñar cebadores degenerados a partir de secuencias de aminoácidos disponibles para las proteínas de interés.

Una vez se haya determinado de forma experimental la capacidad de degradación de las cepas de interés se podría hacer una PCR con los cebadores degenerados para comprobar la presencia de los genes de interés. En el caso de no lograr identificarlos se podría investigar proteínas homólogas para cada enzima en lugar de genes específicos para degradación de plástico y buscarlas dentro de los genomas de las cepas de interés. Con esto se podría realizar un árbol filogenético para encontrar la proteína más cercana a alguna presente en las cepas, aunque no haya sido relacionada previamente a la degradación de plásticos, y diseñar cebadores para poder clonar los genes enteros y utilizarlos en diferentes aplicaciones de ingeniería genética y biología sintética.

Dentro de los materiales para los cuales se encontraron secuencias parciales de genes de degradación también se encuentran plásticos sintéticos como el nylon y el PE, materiales para los cuales no se sabía si se iba a encontrar este tipo de genes porque son hidrofóbicos, de alta cristalinidad y no tienen grupos funcionales hidrolíticos (Taghavi y col., 2020). En el caso del PE únicamente se

identificó una secuencia parcial para un gen de degradación, *alkB* (ver Cuadro 2). El producto de este gen es la enzima necesaria para romper cadenas de alcanos y de PE entonces se sabe que tiene una función importante en la degradación de PE. Sin embargo, todavía no se conoce cómo funciona el proceso de degradación y por eso todavía no se han descrito las rutas metabólicas involucradas en él (Ru y col., 2020; Shahreza y col., 2019). Si bien todavía no se conoce la ruta de degradación de PE se podría evaluar el potencial de degradación de la enzima.

Para el nylon se identificaron secuencias parciales de cinco genes correspondientes a las enzimas necesarias para la conversión de polímeros de cadena corta de nylon-6 a adipato (ver Cuadro 1). Ya que el adipato es el precursor del nylon se podría recuperar para reciclarlo o se puede dejar que se incorpore al ciclo de Krebs para generar energía para el funcionamiento del microorganismo. El último paso en el cual se convierte 6-oxohexanoato a adipato es catalizado por la enzima 6-oxohexanoato deshidrogenasa, parte de las enzimas de metabolismo de ciclohexanol (Cheng y col., 2000; Danso y col., 2019). Esto quiere decir que hay enzimas cuya función original no está relacionada a la degradación de plásticos, pero igual están involucradas en el proceso y por lo tanto hay interacción entre las dos rutas metabólicas. Cabe mencionar que hasta el momento únicamente se ha descrito una enzima capaz de degradar polímeros de nylon de alto peso molecular. Esta enzima está clasificada como una peroxidasa dependiente de manganeso y viene de los hongos xilófagos *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* (Danso y col., 2019; Deguchi y col., 1997).

A partir de los genes a los que corresponden las secuencias parciales identificadas se reconstruyó la ruta de degradación de nylon y se determinó que la probabilidad de empezar la degradación con el polímero de cadena corta de nylon-6 (vértice 0) es igual a la de empezar el proceso con el dímero cíclico del 6-aminohexanoato (vértice 3) (ver Figuras 5 y 6 a y b). Lo cual, al igual que en el caso del PVA, significa que ambas opciones se deben considerar al intentar optimizar el proceso. En este caso también se diseñaron cebadores degenerados que se podrían utilizar luego de la verificación experimental de la degradación de plásticos de las bacterias (ver Cuadros 4 y 5). Para *pvaA* la degeneración es cero debido a que los codones de uso frecuente permitieron reducirla y encontrar una región más conservada que en los otros casos. De igual forma se podría hacer el análisis de proteínas homólogas que no estén relacionadas necesariamente con la degradación de plásticos.

En la Figura 9 se puede ver que la degradación de los polímeros de cadena corta de nylon-6 sucede dentro de la célula. Para que esto pueda suceder los compuestos, ya sea los polímeros de cadena corta, los oligómeros o los dímeros deben ingresar a la célula de alguna forma. Hay evidencia que apunta a que la forma de ingreso a la célula de estos compuestos y del monómero cíclico del nylon, la caprolactama o 6-aminohexanoato, es por transporte pasivo. La presencia de estos compuestos en la naturaleza y en los productos fabricados a base de nylon se debe a que la polimerización de la caprolactama es incompleta (Danso y col., 2019; Yeom y col., 2018).

Como se puede ver en el Cuadro 3 se identificaron péptidos de señalización en la alcohol polivinílico deshidrogenasa y en la alcohol polivinílico hidrolasa oxidada, pero no en las enzimas correspondientes a la degradación de nylon. Si bien los compuestos relacionados al nylon ingresan a la célula de igual forma se podría agregar péptidos señal a las enzimas de degradación de nylon por ingeniería genética para que sean secretadas o se podría trabajar con protoplastos o sistemas con extractos celulares enzimáticos para optimizar la degradación. En el caso de añadir péptidos señal se podría modificar un plásmido y agregar también el promotor de arabinosa para que las proteínas se secreten de forma selectiva en el sistema agregando arabinosa.

Con lo obtenido se puede ver el potencial que tienen las cepas analizadas para la degradación de plástico. Para poder realizar los procesos a escala industrial es necesario optimizar la biodegradación. Esto se podría lograr optimizando primero las cepas con biología sintética, en este caso se proponen las rutas de degradación de nylon y PVA como opción principal, y luego diseñando un sistema en el que se combinen cepas con diferentes capacidades de degradación. Ya sea con cepas que tengan partes diferentes de las rutas de degradación para que los procesos no sean tan demandantes metabólicamente o con cepas capaces de degradar diferentes tipos de plásticos. Dependiendo del diseño

y del propósito del sistema se podrían recuperar diferentes compuestos intermedios para darle un valor agregado al proceso y hacer que sea más rentable.

- Se identificaron secuencias parciales de genes reportados en la literatura por su potencial en la degradación de nylon, alcohol polivinílico, poli butileno adipatotereftalato, polietileno, poli hidroxialcanoato, tereftalato y ftalato dentro de los genomas de las cepas *Klebsiella michiganensis* Kop, *Klebsiella* sp. Kpp y *Klebsiella* sp. Kps, cepas presuntamente simbioses de moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae).
- Se propusieron rutas metabólicas involucradas en la degradación de nylon y alcohol polivinílico a partir de las secuencias parciales encontradas utilizando un método de reconstrucción de rutas metabólicas con base en grafos y, por lo tanto, podrían ser utilizadas en procesos de biodegradación controlada de estos materiales, una vez se haya comprobado la degradación de forma experimental.
- Se diseñaron cebadores degenerados para la posible clonación y producción de proteínas a partir de los genes *nylA*, *nylB*, *nylC*, *nylD*, *chnE*, *pvaA* y *oph* relacionados a la degradación de plásticos.

- Comprobar experimentalmente la capacidad de degradación de nylon, alcohol polivinílico, poli butileno adipato tereftalato, polietileno, polihidroxialcanoato, tereftalato y ftalato de las tres cepas de *Klebsiella* utilizadas en la investigación. Se podría utilizar medios de cultivo con cada material como única fuente de carbono y en el caso del nylon también se podría probar con el polímero como única fuente de nitrógeno.
- Realizar revisiones de la literatura a futuro para determinar si ya se encuentran disponibles secuencias codificantes para otras enzimas involucradas en la degradación de plástico o si ya se cuenta con información de los sustratos y productos de los genes identificados que no se lograron incluir en el proceso de reconstrucción para así poder reconstruir otras rutas. Considerando que las enzimas de degradación de nylon no tienen péptidos señal se podría diseñar un sistema enzimático con los genes correspondientes a estas enzimas, con secuencias para péptidos señal, y un promotor de arabinosa que permita la producción de las enzimas únicamente en el sistema de degradación. Para el alcohol polivinílico se podría realizar lo mismo sin tener que agregar los péptidos señal. Tanto para el nylon como para el alcohol polivinílico se podría diseñar un sistema de degradación ya sea con cepas individuales, en consorcio o en biopelículas, considerando la posibilidad de recuperación de metabolitos intermediarios o biomasa para obtener un método costo-efectivo de biodegradación de plásticos.
- Evaluar el funcionamiento de los cebadores diseñados para la identificación de los genes de forma experimental. Investigar genes homólogos para cada enzima que no estén necesariamente relacionados a la degradación de plásticos y realizar un árbol filogenético para determinar el gen homólogo más cercano a una de las cepas de interés para luego poder amplificar el gen completo y así poder realizar biología sintética con el fin de optimizar el proceso de degradación de nylon o PVA en las cepas del género *Klebsiella*.

- Abtahi, M., Dobaradaran, S., Torabbeigi, M., Jorfi, S., Gholamnia, R., Koolivand, A., Darabi, H., Kavousi, A. & Saeedi, R. (2019). Health risk of phthalates in water environment: occurrence in water resources, bottled water, and tap water, and burden of disease from exposure through drinking water in Tehran, Iran. *Environmental research*, 173, 469-479.
- Ahmed, T., Shahid, M., Azeem, F., Rasul, I., Shah, A. A., Noman, M., Hameed, A., Manzoor, N., Manzoor, I. & Muhammad, S. (2018). Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(8), 7287-7298.
- Alexaki, A., Kames, J., Holcomb, D. D., Athey, J., Santana-Quintero, L. V., Lam, P. V. N., Hamasaki-Katagiri, N., Osipova, E., Simonyan, V., Bar, H. Y col. (2019). Codon and Codon-Pair Usage Tables (CoCoPUTs): facilitating genetic variation analyses and recombinant gene design. *Journal of molecular biology*, 431(13), 2434-2441.
- Alshehrei, F. (2017). Biodegradation of synthetic and natural plastic by microorganisms. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 5(1), 8-19.
- Álvarez-Fernández, R. (2013). Explanatory chapter: PCR primer design, En *Methods in enzymology*. Elsevier.
- Ami, E. B., Yuval, B. & Jurkevitch, E. (2010). Manipulation of the microbiota of mass-reared Mediterranean fruit flies *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) improves sterile male sexual performance. *The ISME journal*, 4(1), 28-37.
- Anjana, K., Hinduja, M., Sujitha, K., Dharani, G. Y col. (2020). Review on plastic wastes in marine environment—Biodegradation and biotechnological solutions. *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110733.
- Appleton, E., Madsen, C., Roehner, N. & Densmore, D. (2017). Design automation in synthetic biology. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9(4), a023978.
- Ausländer, S., Ausländer, D. & Fussenegger, M. (2017). Synthetic biology—the synthesis of biology. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(23), 6396-6419.
- Awasthi, S., Srivastava, P., Singh, P., Tiwary, D. & Mishra, P. K. (2017). Biodegradation of thermally treated high-density polyethylene (HDPE) by *Klebsiella pneumoniae* CH001. *3 Biotech*, 7(5), 332.
- Barboza, L. G. A., Cózar, A., Gimenez, B. C., Barros, T. L., Kershaw, P. J. & Guilhermino, L. (2019). Macroplastics pollution in the marine environment, En *World seas: An environmental evaluation*. Elsevier.
- Behar, A., Yuval, B. & Jurkevitch, E. (2005). Enterobacteria-mediated nitrogen fixation in natural populations of the fruit fly *Ceratitis capitata*. *Molecular ecology*, 14(9), 2637-2643.

- Boll, M., Geiger, R., Junghare, M. & Schink, B. (2019). Microbial degradation of phthalates: biochemistry and environmental implications. *Environmental Microbiology Reports*, 12(1), 3-15. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12787>
- Bonilla, J., Paiano, R. B., Lourenço, R. V., Bittante, A. M. Q. & Sobral, P. J. (2020). Biodegradability in aquatic system of thin materials based on chitosan, PBAT and HDPE polymers: Respirometric and physical-chemical analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- Campocoso, A. T. & Santiesteban, H. H. L. (2019). *Fungal Bioremediation: Fundamentals and Applications*. CRC Press.
- Chaudhuri, U. R. (2016). *Fundamentals of petroleum and petrochemical engineering*. Crc Press.
- Cheng, Q., Thomas, S. M., Kostichka, K., Valentine, J. R. & Nagarajan, V. (2000). Genetic analysis of a gene cluster for cyclohexanol oxidation in *Acinetobacter* sp. strain SE19 by in vitro transposition. *Journal of Bacteriology*, 182(17), 4744-4751.
- Danso, D., Chow, J. & Streit, W. R. (2019). Plastics: Microbial Degradation, Environmental and Biotechnological Perspectives. *Applied and environmental microbiology*, AEM-01095.
- Deguchi, T., Kakezawa, M. & Nishida, T. (1997). Nylon biodegradation by lignin-degrading fungi. *Applied and Environmental microbiology*, 63(1), 329-331.
- Delong, R. K. & Zhou, Q. (2015). *Introductory experiments on biomolecules and their interactions*. Academic Press.
- Devi, R. S., Kannan, V. R., Natarajan, K., Nivas, D., Kannan, K., Chandru, S. & Antony, A. R. (2016). The role of microbes in plastic degradation. *Environ. Waste Manage*, 341.
- Dzionic, A., Wojcieszynska, D. & Guzik, U. (2016). Natural carriers in bioremediation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 19(5), 28-36.
- Eriksen, M., Lebreton, L. C., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borro, J. C., Galgani, F., Ryan, P. G. & Reisser, J. (2014). Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. *PLoS one*, 9(12), e111913.
- Eriksen, M. K., Christiansen, J., Daugaard, A. E. & Astrup, T. F. (2019). Closing the loop for PET, PE and PP waste from households: Influence of material properties and product design for plastic recycling. *Waste Management*, 96, 75-85.
- Fernández-Castané, A., Fehér, T., Carbonell, P., Pauthenier, C. & Faulon, J.-L. (2014). Computer-aided design for metabolic engineering. *Journal of biotechnology*, 192, 302-313.
- Figuerola, N. & Gavarrete, C. (2017). *Caracterización genética de cepas de Klebsiella spp. aislada de ambientes asociados a Ceratitis capitata (Weidemann), por medio de secuenciación de su genoma, extracción de plásmidos y Rep-PCR*. Tesis de licenciatura, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala.
- Franco, A. (2020). Reconstrucción de rutas metabólicas de bacterias del género *Klebsiella* spp. como herramienta para mejorar el control biológico de la mosca *Ceratitis capitata* (Mosca mediterránea de la fruta)". *Tesis de maestría, Universidad Estatal de Santa Cruz, Ilhéus, Brasil*.
- Geyer, R., Jambeck, J. & Law, K. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci Adv* 3 (7): 1–5.
- Geyer, R. (2020). Production, use, and fate of synthetic polymers, En *Plastic Waste and Recycling*. Elsevier.
- Ghosh, S., Qureshi, A. & Purohit, H. J. (2019). Microbial degradation of plastics: Biofilms and degradation pathways. *Contaminants in Agriculture and Environment: Health Risks and Remediation*, 1, 184.
- Gourmelon, G. (2015). Global plastic production rises, recycling lags. *New Worldwatch Institute analysis explores trends in global plastic consumption and recycling*. Recuperado de <http://www.worldwatch.org>, 208.
- Hader, D. & Erzinger, G. (2017). *Bioassays: Advanced Methods and Applications*. Elsevier.
- Haernvall, K., Zitzenbacher, S., Yamamoto, M., Schick, M. B., Ribitsch, D. & Guebitz, G. M. (2017). A new arylesterase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* can hydrolyze ionic phthalic polyesters. *Journal of biotechnology*, 257, 70-77.
- Horodytska, O., Cabanes, A. & Fullana, A. (2019). Plastic Waste Management: Current Status and Weaknesses.

- Indiragandhi, P., Anandham, R. & Sa, T. M. (2011). Functional significance of insect gut bacteria and their role in host insect processes, development, and crop production, En *Bacteria in Agrobiolgy: Plant growth responses*. Springer.
- Jamil, U., Umair, S., Zada, S., Khan, I., SAjjad, W., Rafiq, M., Shah, A. A. & Hasan, F. (2017). BIODEGRADATION OF POLYETHYLENE BY BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM KASHMIR CAVE, BUNER, PAKISTAN. *Journal of Cave Karst Studies*, 79(1).
- Johnston, B., Kowalczyk, M., Hill, D., Tchuénbou-Magaia, F., Jonah, I. & Radecka, I. (2019). From trash to treasure—turning plastic waste into biodegradable polymers using bacteria. *Access Microbiology*, 1(1A).
- Katsikantami, I., Sifakis, S., Tzatzarakis, M. N., Vakonaki, E., Kalantzi, O.-I., Tsatsakis, A. M. & Rizos, A. K. (2016). A global assessment of phthalates burden and related links to health effects. *Environment international*, 97, 212-236.
- Kawai, F. & Hu, X. (2009). Biochemistry of microbial polyvinyl alcohol degradation. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(2), 227.
- Koshti, R., Mehta, L. & Samarth, N. (2018). Biological recycling of polyethylene terephthalate: A mini-review. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(8), 3520-3529.
- Krishna, I. M., Manickam, V., Shah, A. & Davergave, N. (2017). *Environmental management: science and engineering for industry*. Butterworth-Heinemann.
- Kumar, L. & Bharadvaja, N. (2019). Enzymatic bioremediation: a smart tool to fight environmental pollutants, En *Smart Bioremediation Technologies*. Elsevier.
- Lear, G. & Lewis, G. D. (2012). *Microbial biofilms: current research and applications*. Horizon Scientific Press.
- Lebreton, L. & Andrady, A. (2019). Future scenarios of global plastic waste generation and disposal. *Palgrave Communications*, 5(1), 1-11.
- Magnusson, E., Klang, M. & Westlund, M. (2019). PET-bottles: From waste to resource. *KTH School of Industrial Engineering and Management*.
- Mannaart, M., Bentley, A., McCord, G. & Midavaine, J. (2019). Marine Litter at UNESCO World Heritage Marine Sites. *KIMO International: Archipelago, Scotland*.
- Merli, D., Mannucci, B., Bassetti, F., Corana, F., Falchetto, M., Malacrida, A. R., Gasperi, G. & Scolari, F. (2018). Larval diet affects male pheromone blend in a laboratory strain of the Medfly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of chemical ecology*, 44(4), 339-353.
- Miandad, R., Nizami, A., Rehan, M., Barakat, M., Khan, M., Mustafa, A., Ismail, I. & Murphy, J. (2016). Influence of temperature and reaction time on the conversion of polystyrene waste to pyrolysis liquid oil. *Waste Management*, 58, 250-259.
- Mielcarek, O. & Masek, A. (2019). BIODEGRADABLE AND BIO-BASED THERMOPLASTICS AS SUSTAINABLE MATERIALS FOR PACKAGING PRODUCTION. *WYDAWNICTWO POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ*, 114.
- Nagalakshmaiah, M., Afrin, S., Malladi, R. P., Elkoun, S., Robert, M., Ansari, M. A., Svedberg, A. & Karim, Z. (2019). Biocomposites: Present trends and challenges for the future, En *Green Composites for Automotive Applications*. Elsevier.
- Namazi, H. (2017). Polymers in our daily life. *BioImpacts: BI*, 7(2), 73.
- Oliveira, M., Ameixa, O. M. & Soares, A. M. (2019). Are ecosystem services provided by insects “bugged” by micro (nano) plastics? *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 113, 317-320.
- Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almabrazi, H. G., Pedersen, K. F., Lin, Y., Garretson, J., McEntaggart, N. O. Y col. (2008). IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic acids research*, 36(suppl\_2), W163-W169.
- Palsikowski, P. A., Kuchnier, C. N., Pinheiro, I. F. & Morales, A. R. (2018). Biodegradation in soil of PLA/PBAT blends compatibilized with chain extender. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(1), 330-341.
- Pascacio-Villafán, C., Guillén, L., Williams, T. & Aluja, M. (2018). Effects of larval density and support substrate in liquid diet on productivity and quality of artificially reared *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Journal of economic entomology*, 111(5), 2281-2287.

- Pastorella, G., Gazzola, G., Guadarrama, S. & Marsili, E. (2012). Biofilms: applications in bioremediation.
- Pathak, V. M. Y col. (2017). Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1), 15.
- Pearson, W. (2013). An Introduction to Sequence Similarity (“Homology”) Searching, Current Protocols in Bioinformatics/Editorial Board, Andreas D. Baxevanis. . .
- Peng, B.-Y., Su, Y., Chen, Z., Chen, J., Zhou, X., Benbow, M. E., Criddle, C. S., Wu, W.-M. & Zhang, Y. (2019). Biodegradation of polystyrene by dark (*Tenebrio obscurus*) and yellow (*Tenebrio molitor*) mealworms (Coleoptera: Tenebrionidae). *Environmental science & technology*, 53(9), 5256-5265.
- Pira, M. (2020). *Identificación de posibles genes en la solubilización de zinc por proteobacterias aisladas de rizósfera de caña de azúcar (Saccharum officinarum)*. Tesis de licenciatura, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala.
- Pitkänen, E., Rousu, J. & Ukkonen, E. (2010). Computational methods for metabolic reconstruction. *Current opinion in biotechnology*, 21(1), 70-77.
- Pushpanathan, M., Jayashree, S., Gunasekaran, P. & Rajendhran, J. (2014). Microbial bioremediation: a metagenomic approach, En *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. Elsevier.
- Qi, Q., Li, J. & Cheng, J. (2014). Reconstruction of metabolic pathways by combining probabilistic graphical model-based and knowledge-based methods, En *BMC proceedings*. Springer.
- Raghul, S., Bhat, S., Chandrasekaran, M., Francis, V. & Thachil, E. (2014). Biodegradation of polyvinyl alcohol-low linear density polyethylene-blended plastic film by consortium of marine benthic vibrios. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(7), 1827-1834.
- Rai, P. (2015). *Biomagnetic monitoring of particulate matter: in the Indo-Burma hotspot region*. Elsevier.
- Ray, S. & Kalia, V. C. (2017). Biological significance of degradation of polyhydroxyalkanoates, En *Microbial Applications Vol. 1*. Springer.
- RaziyaFathima, M., Praseetha, P. & Rimal, I. (2016). Microbial degradation of plastic waste: a review. *Chemical and Biological Sciences*, 4, 231-42.
- Rithcie, H. & Roser, M. (2019). Plastic Pollution. *OurWorldInData.org Recuperado de <http://www.worldwatch.org>*.
- Ru, J., Huo, Y. & Yang, Y. (2020). Microbial degradation and valorization of plastic wastes. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Sarwar, M. (2015). How to manage fruit fly (Family Tephritidae) pest damage on different plant host species by take up of physical control measures. *International Journal of Animal Biology*, 1(4), 124-129.
- Semba, T., Sakai, Y., Sakanishi, T. & Inaba, A. (2018). Greenhouse gas emissions of 100 % bio-derived polyethylene terephthalate on its life cycle compared with petroleum-derived polyethylene terephthalate. *Journal of Cleaner Production*, 195, 932-938.
- Shahreza, H., Sepahy, A. A., Hosseini, F. & Nejad, R. K. (2019). Molecular Identification of Pseudomonas Strains with Polyethylene Degradation Ability from Soil and Cloning of alkB Gene. *Archives of Pharmacy Practice*, 10(4).
- Sheth, J. & Shah, D. (2019). Marine Pollution from Plastics and Microplastics. *J Mar Biol Oceanogr*, 8, 1, 2.
- Sigler, M. (2014). The effects of plastic pollution on aquatic wildlife: current situations and future solutions. *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(11), 2184.
- Singh, V. K., Mangalam, A., Dwivedi, S. & Naik, S. (1998). Primer premier: program for design of degenerate primers from a protein sequence. *Biotechniques*, 24(2), 318-319.
- Solbrig, O. T. (1998). The Environmental Agenda in Latin America: The Issue of the 21 st Century.
- Taghavi, N., Singhal, N., Zhuang, W.-Q. & Baroutian, S. (2020). Degradation of plastic waste using stimulated and naturally occurring microbial strains. *Chemosphere*, 127975.
- Tang, Z.-L., Kuo, T.-A., Liu, H.-H. Y col. (2017). The study of the microbes degraded polystyrene. *Adv. Technol. Innov*, 2, 13-17.

- Thakur, S., Verma, A., Sharma, B., Chaudhary, J., Tamulevicius, S. & Thakur, V. K. (2018). Recent developments in recycling of polystyrene based plastics. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 13, 32-38.
- Thompson, R. C., Swan, S. H., Moore, C. J. & Vom Saal, F. S. (2009). Our plastic age. The Royal Society Publishing.
- Trevors, J. (2010). What is a Global Environmental Pollution Problem? Springer.
- Urbanek, A. K., Rybak, J., Wróbel, M., Leluk, K. & Mirończuk, A. M. (2020). A comprehensive assessment of microbiome diversity in *Tenebrio molitor* fed with polystyrene waste. *Environmental Pollution*, 114281.
- Vammen, K. & Vaux, H. (2019). A General Overview of Water Quality in the Americas. *Water Quality in the Americas*, 12.
- Vatseldutt, S. A. (2004). Isolation and characterization of polythene degrading bacteria from polythene dumped garbage. *Biotechnol Lett*, 53, 1181-1189.
- Vegter, A. C., Barletta, M., Beck, C., Borrero, J., Burton, H., Campbell, M. L., Costa, M. F., Eriksen, M., Eriksson, C., Estrades, A. & otros. (2014). Global research priorities to mitigate plastic pollution impacts on marine wildlife. *Endangered Species Research*, 25(3), 225-247.
- Ventura, C., Briones-Roblero, C. I., Hernández, E., Rivera-Orduña, F. N. & Zúñiga, G. (2018). Comparative analysis of the gut bacterial community of four *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae) based on pyrosequencing. *Current Microbiology*, 75(8), 966-976.
- Vince, J. & Hardesty, B. D. (2017). Plastic pollution challenges in marine and coastal environments: from local to global governance. *Restoration ecology*, 25(1), 123-128.
- Wang, L., Dash, S., Ng, C. Y. & Maranas, C. D. (2017). A review of computational tools for design and reconstruction of metabolic pathways. *Synthetic and systems biotechnology*, 2(4), 243-252.
- Wilkes, R. A. & Aristilde, L. (2017). Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges. *Journal of applied microbiology*, 123(3), 582-593.
- Yang, Y., Yang, J., Wu, W.-M., Zhao, J., Song, Y., Gao, L., Yang, R. & Jiang, L. (2015). Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: part 2. Role of gut microorganisms. *Environmental science & technology*, 49(20), 12087-12093.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13(1), 134.
- Yeom, S.-J., Kim, M., Kwon, K. K., Fu, Y., Rha, E., Park, S.-H., Lee, H., Kim, H., Lee, D.-H., Kim, D.-M. Y col. (2018). A synthetic microbial biosensor for high-throughput screening of lactam biocatalysts. *Nature communications*, 9(1), 1-12.
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y. & Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). *Science*, 351(6278), 1196-1199.
- Zumstein, M. T., Schintlmeister, A., Nelson, T. F., Baumgartner, R., Woebken, D., Wagner, M., Kohler, H.-P. E., McNeill, K. & Sander, M. (2018). Biodegradation of synthetic polymers in soils: Tracking carbon into CO<sub>2</sub> and microbial biomass. *Science advances*, 4(7), eaas9024.

---

## Base de datos de genes relacionados a la degradación de plástico

---

Base de datos construida utilizando información de “Plastics Microbial Biodegradation Database” y también información obtenida en búsquedas utilizando las palabras clave descritas en la sección de Metodología. Los genes indicados en esta base de datos fueron los que se utilizaron para los alineamientos con las secuencias de interés del género *Klebsiella*. Contiene el gen identificado, el producto del gen, el microorganismo al cual corresponde, el material al cual ha sido relacionado, el número de acceso del NCBI y la base de datos en la cual se ha identificado una ruta metabólica de degradación de la que forma parte el gen.

Cuadro 6: Genes relacionados a la degradación de plástico identificados en la literatura (Parte 1)

| Gen          | Producto  | Microorganismo  | Material                            | No. de acceso | Ruta posible |
|--------------|---|---|-------------------------------------|---------------|--------------|
| <i>nylA</i>  | 6-aminohexanoato<br>dímero cíclico hidrolasa                          | <i>Burkholderia<br/>thaailandensis E264</i>           | nylon                               | NC_007651.1   | MetaCyc      |
| <i>nylB</i>  | 6-aminohexanoato<br>oligómero hidrolasa                               | <i>Streptomyces<br/>coelicolor</i>                    | nylon                               | NC_003888.3   | MetaCyc      |
| <i>nylC</i>  | 6-aminohexanoato<br>oligómero hidrolasa                               | <i>Agromyces sp.<br/>KY5R</i>                         | nylon                               | AB264778.2    | MetaCyc      |
| <i>nylD</i>  | 6-aminohexanoato<br>aminotransferasa                                  | <i>Escherichia coli<br/>K-12 MG1655</i>               | nylon                               | NC_000913.3   | No aplica    |
| <i>chnE</i>  | 6-oxohexanoato<br>deshidrogenasa                                      | <i>Acinetobacter sp.<br/>NCIMB9871</i>                | nylon                               | AB006902.2    | No aplica    |
| <i>pvaA</i>  | alcohol polivinílico<br>deshidrogenasa                                | <i>Pseudomonas sp.<br/>VM15C</i>                      | alcohol<br>polivinílico             | D50670.1      | MetaCyc      |
| <i>oph</i>   | alcohol polivinílico<br>hidrolasa oxidada                             | <i>Pseudomonas sp.</i>                                | alcohol<br>polivinílico             | AB190288.4    | MetaCyc      |
| <i>tphA1</i> | tereftalato 1,2-dioxigenasa<br>componente 1 reductasa                 | <i>Comamonas sp. E6</i>                               | tereftalato                         | AB238678.1    | MetaCyc      |
| <i>tphA2</i> | tereftalato 1,2-dioxigenasa<br>subunidad alfa 1<br>oxigenasa terminal | <i>Comamonas sp. E6</i>                               | tereftalato                         | AB238678.1    | MetaCyc      |
| <i>tphA3</i> | tereftalato 1,2-dioxigenasa<br>subunidad beta 1<br>oxigenasa terminal | <i>Comamonas sp. E6</i>                               | tereftalato                         | AB238678.1    | MetaCyc      |
| <i>are</i>   | arilesterasa  | <i>Pseudomonas<br/>pseudoaicaligenes<br/>DSM 1045</i> | polibutileno adipato<br>tereftalato | KX002004.1    | No aplica    |
| <i>are</i>   | arilesterasa  | <i>Pseudomonas<br/>pseudoaicaligenes<br/>DSM 1045</i> | polibutileno adipato<br>tereftalato | KX002004.1    | No aplica    |

\*Donde Ruta posible"se refiere a la base de datos identificada que contiene información acerca de las rutas metabólicas de degradación del material especificado de la cual es parte el producto correspondiente. No aplica quiere decir que no se encontró la ruta con ese gen (Elaboración propia)

Cuadro 7: Genes relacionados a la degradación de plástico identificados en la literatura (Parte 2)

| Gen            | Producto   | Microorganismo                      | Material                | No. de acceso | Ruta posible |
|----------------|--|-------------------------------------|-------------------------|---------------|--------------|
| <i>phtB</i>    | ftalato 3,4-dihidrodíol deshidrogenasa                           | <i>Mycobacterium</i> sp. PAH2.135   | polihidroxicaleanoato   | AY372763.1    | No aplica    |
| <i>phaZ</i>    | poli (3-hidroxi-octanoato) despolimerasa                         | <i>Pseudomonas fluorescens</i>      | polihidroxicaleanoato   | U10470.1      | MetaCyc      |
| <i>phaZCac</i> | PHB despolimerasa  | <i>Comamonas acidovorans</i>        | polihidroxi-butilirato  | AB003186.1    | No aplica    |
| <i>pudA</i>    | éster carboxílico hidrolasa                                      | <i>Comamonas acidovorans</i>        | poliuretano             | AB009606.1    | No aplica    |
| <i>PlaA</i>    | PLA despolimerasa  | <i>Paenibacillus amylolyticus</i>   | ácido poliláctico       | AB093482.1    | No aplica    |
| <i>tphB</i>    | 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadieno-1,4-decarboxilato dehidrogenasa | <i>Comamonas testosteroni</i> YZW-D | tereftalato             | AY923836.1    | MetaCyc      |
| <i>tphBI</i>   | 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadieno-1,4-dicarboxilato dehidrogenasa | <i>Comamonas</i> sp. E6             | tereftalato             | AB238678.1    | No aplica    |
| <i>carEW</i>   | éster carboxílico hidrolasa                                      | <i>Bacillus</i> sp. K91             | diisobutilftalato       | KM098150.1    | No aplica    |
| <i>phtAa</i>   | ftalato dioxigenasa subunidad grande                             | <i>Rhodococcus</i> sp. JDC-11       | ftalato de dibutilo     | FJ528993.1    | No aplica    |
| <i>pbsA</i>    | PBS(A) despolimerasa   | <i>Acidovorax delafieldii</i> BS-3  | polibutileno succinato  | AB066349.1    | No aplica    |
| <i>cut1</i>    | cutinase 1   | <i>Thermobifida fusca</i> KW3       | polietileno tereftalato | HQ147787.1    | No aplica    |
| <i>est2</i>    | esterase   | <i>Thermobifida alba</i>            | polietileno tereftalato | AB445476.2    | No aplica    |

\*Donde Ruta posible" se refiere a la base identificada que contiene información acerca de las rutas metabólicas de degradación del material especificado de la cual es parte el producto correspondiente. No aplica quiere decir que no se encontró la ruta con ese gen (Elaboración propia)

Cuadro 8: Genes relacionados a la degradación de plástico identificados en la literatura (Parte 3)

| Gen               | Producto                                  | Microorganismo                                 | Material                | No. de acceso     | Ruta posible |
|-------------------|---|--|-------------------------|-------------------|--------------|
| <i>pvadh</i>      | alcohol polivinílico deshidrogenasa       | <i>Sphingopyxis sp. 113P3</i>                  | alcohol polivinílico    | AB190288.4        | MetaCyc      |
| <i>pvaB</i>       | alcohol polivinílico hidrolasa oxidada    | <i>Pseudomonas sp. VM15C</i>                   | alcohol polivinílico    | AB008494.1        | No aplica    |
| <i>FOQG_13916</i> | cutinasa                                  | <i>Fusarium oxysporum f. sp. raphani 54005</i> | polietileno tereftalato | JH658423.1        | No aplica    |
| <i>cut2</i>       | cutinasa 2                                | <i>Thermobifida cellulosilytica</i>            | polietileno tereftalato | HQ147786.1        | No aplica    |
| <i>ISF6_4831</i>  | PETasa                                    | <i>Ideonella sakaiensis 201-F6</i>             | polietileno tereftalato | NZ_BBYR01000074.1 | No aplica    |
| <i>cle1</i>       | Enzima similar a cutinasa                 | <i>Cryptococcus sp. S-2</i>                    | ácido poliláctico       | AB102945.1        | No aplica    |
| <i>pDS-PS</i>     | PHB despolimerasa                         | <i>Ralstonia pickettii</i>                     | polihidroxi butirato    | D25315.1          | No aplica    |
| <i>pucA</i>       | Poliuretanas A                            | <i>Pseudomonas chlororaphis</i>                | poliuretano             | EF175556.1        | No aplica    |
| <i>cut190</i>     | familia de proteinas alfa/beta hidrolasas | <i>Saccharomonospora viridis</i>               | polietileno tereftalato | AB728484.1        | No aplica    |
| <i>phaZ</i>       | PHB despolimerasa                         | <i>Schlegelella sp. KB1a</i>                   | polihidroxi butirato    | AY538710.1        | No aplica    |
| <i>phaZ</i>       | PHB despolimerasa                         | <i>Bacillus megaterium</i>                     | polihidroxi butirato    | AB258388.1        | No aplica    |
| <i>phaZ</i>       | PHB despolimerasa                         | <i>Caldimonas manganoxidans</i>                | polihidroxi butirato    | AB038647.1        | No aplica    |
| <i>phaZ</i>       | PHB despolimerasa                         | <i>Caldimonas manganoxidans</i>                | polihidroxi butirato    | AB079799.1        | No aplica    |
| <i>est1</i>       | esterase                                  | <i>Thermobifida alba</i>                       | polietileno tereftalato | AB445476.2        | No aplica    |
| <i>plaM4</i>      | PLA despolimerasa                         | Bacteria no cultivada                          | ácido poliláctico       | AB302136.1        | No aplica    |

\*Donde Ruta posible se refiere a la base identificada que contiene información acerca de las rutas metabólicas de degradación del material especificado de la cual es parte el producto correspondiente. No aplica quiere decir que no se encontró la ruta con ese gen (Elaboración propia)

Cuadro 9: Genes relacionados a la degradación de plástico identificados en la literatura (Parte 4)

| Gen          | Producto                             | Microorganismo                          | Material            | No. de acceso | Ruta posible |
|--------------|--------------------------------------|---|---------------------|---------------|--------------|
| <i>phaZ</i>  | PHA despolimerasa                    | <i>Pseudomonas alcaligenes</i>          | polihidroxiacanoato | AY370932.1    | No aplica    |
| <i>phaZ</i>  | PHB despolimerasa                    | <i>Azospirillum brasilense</i>          | polihidroxiubirato  | AF474374.1    | No aplica    |
| <i>phaZ</i>  | PHA despolimerasa                    | <i>Paracoccus denitrificans</i>         | polihidroxiacanoato | AB839772.1    | No aplica    |
| <i>ophA1</i> | Ftalato dioxigenasa reductasa        | <i>Burkholderia cepacia DBO1</i>        | ftalato             | AF095748.1    | No aplica    |
| <i>ophC</i>  | 4,5-dihidroxi-ftalato descarboxilasa | <i>Burkholderia cepacia DBO1</i>        | ftalato             | AF095748.1    | No aplica    |
| <i>ophA2</i> | Ftalato dioxigenasa                  | <i>Burkholderia cepacia DBO1</i>        | ftalato             | AF095748.1    | No aplica    |
| N.D.         | Ftalato dioxigenasa subunidad grande | <i>Mycobacterium sp. PAH2.135</i>       | ftalato             | AY372761.1    | No aplica    |
| N.D.         | Ftalato dihidrodiol deshidrogenasa   | <i>Mycobacterium sp. PAH2.135</i>       | ftalato             | AY372763.1    | MetaCyc      |
| N.D.         | Ftalato dioxigenasa subunidad grande | <i>Mycolicibacterium gilvum</i> PYR-GCK | ftalato             | AY372762.1    | No aplica    |
| N.D.         | Ftalato dihidrodiol deshidrogenasa   | <i>Mycolicibacterium gilvum</i> PYR-GCK | ftalato             | AY372764.1    | No aplica    |
| <i>pueA</i>  | Poliuretanasas esterasa A            | <i>Pseudomonas chlororaphis</i>         | poliuretano         | AF069748.1    | No aplica    |
| <i>pueB</i>  | Poliuretanasas B                     | <i>Pseudomonas chlororaphis</i>         | poliuretano         | AF188366.1    | No aplica    |
| <i>plaM7</i> | PLA despolimerasa                    | Bacteria no cultivada                   | ácido poliláctico   | AB302138.1    | No aplica    |
| <i>plaM9</i> | PLA despolimerasa                    | Bacteria no cultivada                   | ácido poliláctico   | AB302140.1    | No aplica    |

\*Donde Ruta posible" se refiere a la base identificada que contiene información acerca de las rutas metabólicas de degradación del material especificado de la cual es parte el producto correspondiente. No aplica quiere decir que no se encontró la ruta con ese gen. Donde N.D significa que no se ha designado un nombre para el gen (Elaboración propia)

Cuadro 10: Genes relacionados a la degradación de plástico identificados en la literatura (Parte 5)

| Gen               | Producto   | Microorganismo                   | Material                | No. de acceso | Ruta posible |
|-------------------|--|----------------------------------|-------------------------|---------------|--------------|
| <i>phaM5</i>      | PLA despolimerasa                                  | Bacteria no cultivada            | ácido poliláctico       | AB302137.1    | No aplica    |
| <i>phaM8</i>      | PLA despolimerasa                                  | Bacteria no cultivada            | ácido poliláctico       | AB302139.1    | No aplica    |
| <i>phaZPfu</i>    | Poly(3-hidroxitubirato) despolimerasa              | <i>Talaromyces funiculosus</i>   | polihidroxitubirato     | AB281621.1    | No aplica    |
| <i>phaZd</i>      | poly(3-hidroxitubirato) despolimerasa intracelular | <i>Cupriavidus necator H16</i>   | polihidroxitubirato     | AB206256.1    | No aplica    |
| N.D.              | PhaZd  | <i>Diaphorobacter sp. PCA039</i> | polihidroxitubirato     | FJ200367.2    | No aplica    |
| <i>phaZ</i>       | Poly(3-hidroxitubirato) despolimerasa              | <i>Alcaligenes faecalis</i>      | polihidroxitubirato     | U55775.1      | No aplica    |
| N.D.              | LCC  | <i>Diaphorobacter sp. PCA039</i> | polietileno tereftalato | FJ200367.2    | MetaCyc      |
| cut-2.KW3         | Cutinasa 1   | <i>Thermobifida fusca</i>        | polietileno tereftalato | FR727681.1    | No aplica    |
| Tcur_1278         | Triacilglicerol lipasa                             | <i>Thermomonospora curvata</i>   | polietileno tereftalato | NC_013510.1   | No aplica    |
| cut1              | Cutinasa 1   | <i>Thermobifida alba</i>         | polietileno tereftalato | HQ147784.1    | No aplica    |
| N.D.              | Serine hidrolasa                                   | <i>Thermobifida halotolerans</i> | polietileno tereftalato | JQ339742.1    | No aplica    |
| <i>lipIAF5-2</i>  | PET2   | Bacteria no cultivada            | polietileno tereftalato | EU660533.1    | No aplica    |
| <i>lipA</i>       | PET5   | <i>Oleispira antarctica RB-8</i> | polietileno tereftalato | FO203512.1    | No aplica    |
| N.D.              | PET6   | <i>Vibrio gazogenes</i>          | polietileno tereftalato | CP018835.1    | No aplica    |
| <i>AAW51_2473</i> | PET12  | <i>Polyangium brachysporum</i>   | polietileno tereftalato | NZ_CP011371.1 | No aplica    |
| <i>lip</i>        | Lipasa   | <i>Pseudomonas pelagia</i>       | poliamida               | KU695573.1    | No aplica    |
| <i>alkB</i>       | alcano monooxigenasa                               | <i>Paenibacillus sp. DK1</i>     | polietileno             | MK045309.1    | MetaCyc      |

\*Donde Ruta posible" se refiere a la base identificada que contiene información acerca de las rutas metabólicas de degradación del material especificado de la cual es parte el producto correspondiente. No aplica quiere decir que no se encontró la ruta con ese gen. Donde N.D significa que no se ha designado un nombre para el gen (Elaboración propia)

Cuadro 11: Genes relacionados a la degradación de plástico identificados en la literatura (Parte 6)

| Gen            | Producto                        | Microorganismo                       | Material                            | No. de acceso | Ruta posible |
|----------------|---------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|---------------|--------------|
| <i>estB3</i>   | Carboxilesterasa                | Bacteria no cultivada                | adipato-tereftalato de polibutileno | KX533504.1    | No aplica    |
| <i>estB11</i>  | Carboxilesterasa                | Bacteria no cultivada                | adipato-tereftalato de polibutileno | KX533505.1    | No aplica    |
| <i>estC5</i>   | Carboxilesterasa                | Bacteria no cultivada                | adipato-tereftalato de polibutileno | KX533506.1    | No aplica    |
| <i>estC7</i>   | Carboxilesterasa                | Bacteria no cultivada                | adipato-tereftalato de polibutileno | KX533507.1    | No aplica    |
| <i>estC9</i>   | Carboxilesterasa                | Bacteria no cultivada                | adipato-tereftalato de polibutileno | KX533508.1    | No aplica    |
| <i>estG4</i>   | Carboxilesterasa                | Bacteria no cultivada                | adipato-tereftalato de polibutileno | KX533509.1    | No aplica    |
| <i>phaZ</i>    | PHB despolimerasa               | <i>Comamonas testasteroni</i>        | polihidroxibutirato                 | AB000508.1    | No aplica    |
| <i>phaZpst</i> | PHB despolimerasa               | <i>Pseudomonas stutzeri</i>          | polihidroxibutirato                 | AB012225.1    | No aplica    |
| N.D.           | PHB despolimerasa               | <i>Ralstonia pickettii</i>           | polihidroxibutirato                 | J04223.2      | No aplica    |
| <i>paCLE1</i>  | Enzima similar a cutinasa       | <i>Pseudozyma antarctica</i>         | polibutileno succinato              | LC276896.1    | No aplica    |
| N.D.           | arilesterasa                    | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> | adipato-tereftalato de polibutileno | KX002004.1    | MetaCyc      |
| <i>pegA</i>    | polietilenglicol deshidrogenasa | <i>Sphingopyxis macrogoltabida</i>   | Polietilenglicol                    | AB196775.2    | MetaCyc      |

\*Donde Ruta posible"se refiere a la base identificada que contiene información acerca de las rutas metabólicas de degradación del material especificado de la cual es parte el producto correspondiente. No aplica quiere decir que no se encontró la ruta con ese gen. Donde N.D significa que no se ha designado un nombre para el gen (Elaboración propia)

## Resultados de los alineamientos iniciales

En esta sección se incluyen los genes para los cuales se identificaron secuencias parciales en los genomas de las tres cepas de interés de *Klebsiella* que no se encuentran en la sección de resultados debido a que no se encontró información de reacción en las bases de datos KEGG o MetaCyc de BioCyc (ver Cuadros 12 y 13).

Cuadro 12: Genes cuyas secuencias parciales fueron identificadas en los genomas de las tres cepas de *Klebsiella* sin información de reacción disponible (Parte 1)

| Gen              | Producto                          | Microorganismo                   | Material   | No. de acceso |
|------------------|-----------------------------------|----------------------------------|------------|---------------|
| <i>plaM4</i>     | ácido poliláctico despolimerasa   | Bacteria no cultivada            | PLA        | AB302136.1    |
| <i>plaM7</i>     | ácido poliláctico despolimerasa   | Bacteria no cultivada            | PLA        | AB302138.1    |
| <i>plaM9</i>     | ácido poliláctico despolimerasa   | Bacteria no cultivada            | PLA        | AB302140.1    |
| <i>plaM5</i>     | ácido poliláctico despolimerasa   | Bacteria no cultivada            | PLA        | AB302137.1    |
| <i>plaM8</i>     | ácido poliláctico despolimerasa   | Bacteria no cultivada            | PLA        | AB302139.1    |
| <i>PhaZd</i>     | polihidroxibutirato despolimerasa | <i>Cupriavidus necator H16</i>   | PHB        | FJ200367.2    |
| <i>cut-2.KW3</i> | cutinasa 1                        | <i>Thermobifida fusca</i>        | PET        | FR727681.1    |
| N.D              | serina hidrolasa                  | <i>Thermobifida halotolerans</i> | PET        | JQ339742.1    |
| <i>lip</i>       | lipasa                            | <i>Pseudomonas pelagia</i>       | PA o nylon | KU695573.1    |
| <i>EstB3</i>     | carboxilesterasa                  | Bacteria no cultivada            | PBAT       | KX533504.1    |

\*Donde N.D. significa no definido porque todavía no se cuenta con un nombre para el gen (Elaboración propia)

Cuadro 13: Genes cuyas secuencias parciales fueron identificadas en los genomas de las tres cepas de *Klebsiella* sin información de reacción disponible (Parte 2)

| Gen            | Producto                             | Microorganismo                     | Material | No. de acceso               |
|----------------|--------------------------------------|------------------------------------|----------|-----------------------------|
| <i>phaZCac</i> | polihidroxiacetato despolimerasa     | <i>Comamonas acidovorans</i>       | PHB      | AB003186.1                  |
| <i>pudA</i>    | éster carboxílico hidrolasa          | <i>Comamonas acidovorans</i>       | PU       | AB009606.1                  |
| <i>PlaA</i>    | ácido poliláctico despolimerasa      | <i>Paenibacillus amylolyticus</i>  | PLA      | AB093482.1                  |
| <i>carEW</i>   | éster carboxílico hidrolasa          | <i>Bacillus sp. K91</i>            | DiBP     | KM098150.1                  |
| <i>phtAa</i>   | ftalato dioxigenasa subunidad grande | <i>Rhodococcus sp. JDC-11</i>      | DBP      | FJ528993.1                  |
| <i>pbsA</i>    | polibuteno succinato A despolimerasa | <i>Acidovorax delafieldii BS-3</i> | PBS      | AB066349.1                  |
| <i>cut1</i>    | cutinasa 1                           | <i>Thermobifida fusca KW3</i>      | PET      | HQ147787.1                  |
| <i>cut2</i>    | cutinasa 2                           | <i>Thermobifida cellulolytica</i>  | PET      | HQ147786.1                  |
| <i>est1</i>    | esterasa 1                           | <i>Thermobifida alba</i>           | PET      | AB445476.2<br>1 a 891       |
| <i>est2</i>    | esterasa 2                           | <i>Thermobifida alba</i>           | PET      | AB445476.2<br>1398 a 2300   |
| <i>pvadh</i>   | alcohol polivinílico deshidrogenasa  | <i>Sphingopyxis sp. 113P3</i>      | PVA      | AB190288.4<br>3177 a 5141   |
| <i>cle1</i>    | enzima similar a cutinasa            | <i>Cryptococcus sp. S-2</i>        | PLA      | AB102945.1                  |
| <i>pDS-PS</i>  | polihidroxiacetato despolimerasa     | <i>Ralstonia pickettii</i>         | PHB      | D25315.1                    |
| <i>pueA</i>    | poliuretanas A                       | <i>Pseudomonas chlororaphis</i>    | PU       | EF175556.1<br>12720 a 14570 |
| <i>pueB</i>    | poliuretanas B                       | <i>Pseudomonas chlororaphis</i>    | PU       | EF175556.1<br>4551 a 6254   |
| <i>phaZ</i>    | poli(3-hidroxiacetato) despolimerasa | <i>Cupriavidus necator H16</i>     | PHA      | U10470.1                    |
| <i>phaZ</i>    | polihidroxiacetato despolimerasa     | <i>Caldimonas manganoxidans</i>    | PHB      | AY538710.1                  |
| N.D.           | ftalato dioxigenasa subunidad grande | <i>Mycobacterium sp. PAH2.135</i>  | ftalato  | AY372762.1                  |
| <i>phaZpst</i> | polihidroxiacetato despolimerasa     | <i>Pseudomonas stutzeri</i>        | PHB      | AB012225.1                  |
| <i>pegA</i>    | polietilenglicol deshidrogenasa      | <i>Sphingopyxis macrogoltabida</i> | PEG      | AB196775.2                  |

\*Donde N.D. significa no definido porque todavía no se cuenta con un nombre para el gen (Elaboración propia)

---

## Alineamientos múltiples de proteínas y cuadro de uso de codones

---

Para diseñar los cebadores a partir de una secuencia consenso se realizaron alineamientos de distintas secuencias de proteínas correspondientes a diferentes especies y géneros microbianos utilizando el algoritmo ClustalW dentro de la herramienta genefisher2. El número de secuencias utilizadas en los alineamientos varió dependiendo de la disponibilidad de secuencias. Los números de acceso de UniProt correspondientes a las secuencias utilizadas para los alineamientos de cada enzima son para nylA Q2T577, P13398, P13397, A0A5E9H055, A0A5E7HKL0, Q5LQG3, A0A5P9H1U0, A0A5E7CKW3, A0A5E7HCA9, A0A143QHT7, H8WBP3, A0A378NHD9, A0A150KFG1, A0A0H2WG49, A0A2K8PAY7 y A0A344UWX4; para nylB A0A2S6XFB9, F8GSN1, A0A127MZS5, A0A0P1FIN3, A0A375HUG8, A0A378GNR8, A0A377QTU2, A0A5E7S7Q7, A0A375J568, A0A5E7VVG3, A0A5C5WHT1, A0A533QHE6, A0A380R6R4, A0A1C6JX26, P07061 y W2UH15; para nylC Q1EPR5, Q79F77, Q57326, U2XM45, Q1EPR4 y Q14T92; nylD P22256, A0A4Y3N828, P63505, A0A098BQ68, A0A2S3ZZE3, H0QQG6, A0A4V6Y5T3, J7LYZ2, A0A024H0D4, A0A1F2PMJ1 y A0A4P7ST30; chnE Q9R2F4, K7XBT9, Q84H75, Q84H87, C0STX8 y Q6RXW0; pvaA P77931, Q588Z1, A0A5P9GR54 y A0A2U3LPZ5; y para oph Q9LCQ7, Q588Z2, A0A1W-6K795, A0A1V4WJI2, A0A0X8R4I9, A0A221UVE1, A0A1V5BRX0, A0A517S-HC2, A0A5E7YMU5, A0A2Z2NUM5, A0A5P9EMB1 y A0A517N-131. De las Figuras 11 a la 17 se pueden ver capturas de pantalla con ejemplos de las secciones más conservadas observadas en los alineamientos. Luego de obtener el alineamiento la herramienta genefisher2 proporcionó secuencias consenso con los codones de uso más frecuente del género *Klebsiella* como se puede ver en los Cuadros 14 y 15. Las secuencias obtenidas a partir de los alineamientos combinados con el cuadro de uso de codones se pueden ver en las Figuras 18 a 24.

|                                |   |     |
|--------------------------------|---|-----|
| tr A0A378NHD9 A0A378NHD9_MICLU | LDPTRTAGGSSGGAAVAVAAAGILPFAPGSDGGGSIRIPAAACGLVGLKPSRGELPM--DE | 240 |
| tr A0A5E9H055 A0A5E9H055_CARDV | WNHAYQAGGSSGGAGASVAAGMVPVIA5GSDAGGSIRIPASWTGTIGLKPSRGVLI----G | 256 |
| tr A0A150KFG1 A0A150KFG1_BACCO | WNPHFSPGGSSGGSAAVASGMVAVAGASDGGGSIRIPASFTSLTGLKPTRGRTPV-GPG   | 201 |
| tr A0A344UNX4 A0A344UNX4_9ACTN | WDPTRMAGGSSGGAAASVAAGEVPAQGSDDGGGSIRIPASCCGLVGLKPSRGRVSS-GPF  | 206 |
| tr Q2T577 Q2T577_BURTA         | WNLALSAGGSSGGAAAAVAAGIVPLAHATDAAGSIRVPAFTGLFGLKPTRGRISN-GPE   | 206 |
| tr Q5LQG3 Q5LQG3_RUEPO         | WDPSRTTGGSSGGAAAAVAAGVPMMAHANDGGGSIRIPAAACCGVGLKPSRGRTPL-GPD  | 197 |
| tr A0A5E7CKW3 A0A5E7CKW3_PSEFL | WNLAMSAGGSSGGAAAAVAAGIVPAHATDGGGSIRIPASYCGLVGLKPSRYRTPS-GPA   | 258 |
| tr A0A5E7HKL0 A0A5E7HKL0_PSEFL | WNLAMSAGGSSGGAAAAVAAGIVPAHATDGGGSIRIPASYCGLVGLKPSRYRTPS-GPA   | 258 |
| tr A0A5E7HCA9 A0A5E7HCA9_PSEFL | WNLAMSAGGSSGGAAAAVAAGIVPAHATDGGGSIRIPASYCGLVGLKPSRYRTPS-GPA   | 258 |
| tr A0A2K8PAY7 A0A2K8PAY7_STRLA | WDPGRTPGGSSGGAGAAVAAGMAPLAHAEDGGGSIRIPASCNGLVGLKPTRGLVARA-AV  | 210 |
| sp P13398 NYLA_FLASK           | WNLGRSVGGSSGGGAAVAAALSPVAHGNDAAAGSVRIPASVCGVGLKPTRGRISP-GPL   | 199 |
| sp P13397 NYLA_PSES8           | WNLGRSVGGSSGGGAAVAAALSPVAHGNDAAAGSVRIPASVCGVGLKPTRGRISP-GPL   | 199 |
| tr A0A0H2WG49 A0A0H2WG49_BURMA | WNLDHTPGGSSGGAAAAVAAGIVPLAHASDGGGSIRIPASCCGLFGLKPSRDPVLTWPV   | 202 |
| tr A0A5P9H1U0 A0A5P9H1U0_9RHOB | WDTSRTPGGSSGGSAVAAGIVPAHAGSDGGGSIRIPASNCGLVGLKPTRAMVPD-GPT    | 199 |
| tr A0A143QHT7 A0A143QHT7_9NOCA | WDRSRTPGGSSGGSAVAAGIAPVAGANDGGGSIRIPAAACGLVGLKPSRGLVPS-GPT    | 199 |
| tr H8WBP3 H8WBP3_MARHS         | WDTERTPGGSSGGGAAVAAAGIVPMAGANDGGGSIRIPAAAYNGLFGLKPSRGRISV-GPY | 200 |

Figura 11: Ejemplo de las secciones con mayor conservación observadas en el alineamiento de secuencias múltiples de NylA. Captura del alineamiento realizado con el algoritmo Clustal W en la herramienta genefisher2. Del lado izquierdo se puede ver la información de identificación de las secuencias alineadas.

|                                |   |     |
|--------------------------------|---|-----|
| tr A0A533QHE6 A0A533QHE6_9PROT | GLAARDQRLLLAGTRPLLSLMGAMAVAQGRLA-PDRSIRIHIPALGAQT----GLRKLSTI | 184 |
| tr W2UH15 W2UH15_9GAMM         | SFNPHAQHIWFSMSKSLASSAFGLLVEQKVK-LDKSPADYIPELKG-S----GFERVTI   | 185 |
| sp P07061 NYLB_FLASK           | GFAPDDRHLMSVSKSLCGTVVGLIDEGRID-PAQPVEYVPELAG-S----VYDGPVS     | 154 |
| tr F8GSN1 F8GSN1_CUPNN         | GFGPYQPHI WASMTKSVTGLLAAMLVEEGKLD-PQARLAQYVPELAG-N----PFGEATV | 198 |
| tr A0A375HUG8 A0A375HUG8_9BURK | GFDPHQPHI WASMTKSVTGLLAAMLVEEGKLD-PHARLAQYVPELAG-N----PFGEATV | 203 |
| tr A0A0P1FIN3 A0A0P1FIN3_THAGE | DFHPEAAHLGQSVSKSVIGALAGILHGEGLD-LAAPLEHIPELGT-T----GYATCTV    | 170 |
| tr A0A2S6XFB9 A0A2S6XFB9_9ACTN | GYEAHVPHNAAKSYLGLLAATLAHEGLD-RGAQVTTYVPELST-T----AFGDAQV      | 120 |
| tr A0A377QTU2 A0A377QTU2_9BURK | VLKESGQHGMASVTKSVMTGIIAALVAEGKLD-PGRKVAEYVPELAK-S----AFGDATV  | 200 |
| tr A0A375J568 A0A375J568_9BURK | ALDSHTPHIAMSVTKSVFVGLTAAALAAEGKLD-PAAPVTRYLPENAG-T----AYGDATV | 216 |
| tr A0A378GNR8 A0A378GNR8_9ENTR | GNTDRTLWTSRSVSKSVVSTLVGVALKEGKIHSDDLVTQYEPALKG-T----AWDGVTL   | 189 |
| tr A0A380R6R4 A0A380R6R4_9ENTR | GNSETSKWTSFSTGKSI VSTLIGVAVKEGKIKNINDPVTNYLPQMKG-T----AYDGVTV | 185 |
| tr A0A127MZ55 A0A127MZ55_9PSED | PTRAQTPHLAWSMSKSI MACVLGVAYGEGRFQ-LDDAVAQHFAPFAA-H-----PQVKM  | 137 |
| tr A0A5E7S7Q7 A0A5E7S7Q7_PSEFL | PTTAQTPHLTWSISKSLMVTLVGAYGEGLFK-LEDDPAKFYPLAK-H-----PQIKI     | 126 |
| tr A0A5E7VBG3 A0A5E7VBG3_PSEFL | PTTAETPHLTWSISKSLMAAVLVGAYGEGLFK-LGDPVAKFYPLQK-Y-----PDLTM    | 129 |
| tr A0A5C5WHT1 A0A5C5WHT1_9BACT | PESAEEKPHVLSLSKSFSTAVGLAVADGKLS-VDDHVLKFFPDAP-AEPSENLKAMRV    | 131 |
| tr A0A1C6JX26 A0A1C6JX26_9FIRM | GYGADSVFRLNSCKSFTGALVGIIEEGLIGGVDDQLATYFPQLAG-TEKQI----TI     | 149 |

Figura 12: Ejemplo de las secciones con mayor conservación observadas en el alineamiento de secuencias múltiples de NylB. Captura del alineamiento realizado con el algoritmo Clustal W en la herramienta genefisher2. Del lado izquierdo se puede ver la información de identificación de las secuencias alineadas.

|                        |   |     |
|------------------------|---|-----|
| tr U2XM45 U2XM45_9MICO | VGTAIEAEGPTGATVLSIPQGARTYVDRRGGAVGASGLYSFNHAIACLAGGSVYGLSAVAG | 103 |
| tr Q1EPR4 Q1EPR4_9MICC | VGSAHYEEGPTGATVIHIPAGARTAVDARGGAVGLSGGYDFNHAICLAGGASYGLEAGAG  | 119 |
| tr Q1EPR5 Q1EPR5_9MICO | IGAAHYEEGPTGATVIHIPAGARTAVDARGGAVGLSGGYDFNHAICLAGGASYGLEAGAG  | 119 |
| tr Q79F77 Q79F77_FLASP | IGAAHYEEGPTGATVIHIPAGARTAVDARGGAVGLSGGYDFNHAICLAGGAGYGLEAGAG  | 119 |
| tr Q57326 Q57326_9FLAO | IGAAHYEEGPTGATVIHIPAGARTAVDARGGAVGLSGGYDFNHAICLAGGAGYGLEAGAG  | 119 |
| tr Q14T92 Q14T92_9MICO | IGAAHYEEGPTGATVIHIPAGARTAVDARGGAVGLSGGYDFNHAICLAGGAGYGLEAGAG  | 70  |

Figura 13: Ejemplo de las secciones con mayor conservación observadas en el alineamiento de secuencias múltiples de NylC. Captura del alineamiento realizado con el algoritmo Clustal W en la herramienta genefisher2. Del lado izquierdo se puede ver la información de identificación de las secuencias alineadas.

|                                |   |     |
|--------------------------------|---|-----|
| sp P22256 GABT_ECOLI           | NPYSAGMGLMPGHVYRALYPCPLHGISE-----DDAIASIHRIKNDAAPEIDIAAIV   | 204 |
| tr A0A098BQ68 A0A098BQ68_9NOCA | QPYKHSFGPFAPEVYRAPMAYPYRWPS---GPDRAADEAFEQFRLLVDAQIGADQVACW | 233 |
| sp P63505 GABT_MYCBO           | MPYKSGFGPFAPEIYRAPLSYPYRDGLLDKQLATNGELAAARAIGVIDKQVGANLALV  | 227 |
| tr A0A1F2PMJ1 A0A1F2PMJ1_RHOER | MPYKSGFGPFAPEVYRVPMSPYREGLNVDGSKITGEQAAQRAITMIEKQVGAANTAAIL | 231 |
| tr A0A2S3ZZE3 A0A2S3ZZE3_ARTGL | MPYKTNFGPFAPEIYRVPMSPYFREE----A-DIKGEEARRAITMIEKQIGASSVAIV  | 226 |
| tr A0A4V6Y5T3 A0A4V6Y5T3_9MICC | MPYKTNFGPFAPEIYRVPMSPYFREE----NPAITGPEAAQRAITMIEKQIGAESVAII | 236 |
| tr A0A4Y3N828 A0A4Y3N828_PAEAU | MPYKTNFGPFAPEVYRPMSPYFREE----NPEITGAEAAKRAITMIEKQIGGDQVAII  | 231 |
| tr J7LYZ2 J7LYZ2_9MICC         | MPYKTNFGPFAPEVYRPMSPYFREE----NPEITGAEAAKRAITMIEKQIGGDQVAII  | 231 |
| tr A0A4P7ST30 A0A4P7ST30_9MICC | MPYKTNFGPFAPEVYRPMSPYFREE----NPQITGAEAAASRAISMIEKQIGGDQVAII | 231 |
| tr H0QQG6 H0QQG6_ARTGO         | MPYKTNFGPFAPEVYRPMSPYFREE----NPQITGAEAAKRAITMIEKQIGGDQVAII  | 231 |
| tr A0A024H0D4 A0A024H0D4_9MICC | MPYKTNFGPFAPEVYRPMSPYFREE----NPEITGAEAAKRAITMIEKQIGGDQVAII  | 231 |

Figura 14: Ejemplo de las secciones con mayor conservación observadas en el alineamiento de secuencias múltiples de NylD. Captura del alineamiento realizado con el algoritmo Clustal W en la herramienta genefisher2. Del lado izquierdo se puede ver la información de identificación de las secuencias alineadas.

|                        |   |     |
|------------------------|---|-----|
| tr Q9R2F4 Q9R2F4_9GAMM | KKTSPITRSEILRTFAKLAREKAAEIGRNITLDQGKPLKEAIAEVTVCAEHAHAEHAECCR | 119 |
| tr Q84H87 Q84H87_9MICC | RTTTLQRRAVLRTAEIHREQAEELAKLLTLEMGKPIAQARGEVELVASIYQHYADNLE    | 119 |
| tr K7XBT9 K7XBT9_9NOCA | RTTTLQRRAVLTRAEEIHREQAEELAKVLTLEMGKPIAQAKGEVALVASIYQFYADHVE   | 100 |
| tr Q84H75 Q84H75_9NOCA | RTTTLQRRAVLSRAAEIHREQADELAAALLTLEMGKPIQAKGEVALVASIYQYYADHAE   | 100 |
| tr C0STX8 C0STX8_9NOCA | RTTTLQRRAVLARAEEIHREQADELAAALLTLEMGKPIQAKGEVALVASIYQYYADHAE   | 100 |
| tr Q6RXW0 Q6RXW0_9NOCA | RTTTLQRRAVLARAEEIHREQADELAAALLTLEMGKPIQAKGEVALVASIYQYYADHAE   | 100 |

Figura 15: Ejemplo de las secciones con mayor conservación observadas en el alineamiento de secuencias múltiples de ChnE. Captura del alineamiento realizado con el algoritmo Clustal W en la herramienta genefisher2. Del lado izquierdo se puede ver la información de identificación de las secuencias alineadas.

|                                |  |     |
|--------------------------------|--|-----|
| tr A0A5P9GR54 A0A5P9GR54_9SPHN | PASAAGIRPEDLPDELELAWAFGFGAQRARSQPAVTREAIFIGSQSGRVYALDTKTGCAW | 119 |
| tr A0A2U3LPZ5 A0A2U3LPZ5_9BACT | PHP--GIQLADVSKLKLKWFAYSGGK-ANGPPTVIGSRVFTVSESGHVYALNAQTGCTY  | 109 |
| sp P77931 PVADH_PSESP          | PNP--GLTAADVPRLKVKWAFNYPGSK--NGQATVVGDRLFVTSMSGAVYALNAKTGCVY | 216 |
| sp Q588Z1 PVADH_SPHS1          | RKP--ALDVADIPKLLKWFQYYPGSK--NGQATVIGDRLFVTSMSGAVYALNAKTGCVY  | 223 |

Figura 16: Ejemplo de las secciones con mayor conservación observadas en el alineamiento de secuencias múltiples de PvaA. Captura del alineamiento realizado con el algoritmo Clustal W en la herramienta genefisher2. Del lado izquierdo se puede ver la información de identificación de las secuencias alineadas.

|                                |   |     |
|--------------------------------|---|-----|
| sp Q9LCQ7 OPH_PSESP            | KNDEGPDSSFFVAMVQCVGTKYKLDARRLFLGGISSGGTMTNRALLFRSNFWAGGLPISG  | 228 |
| sp Q588Z2 OPH_SPHS1            | KTDAGDDVRFLEAMVRCVGTQKWLDRKRLFLGGISAGGTMTNRALLFDFSEFWAGGMPISG | 215 |
| tr A0A0X8R4I9 A0A0X8R4I9_9SPHN | RQDAGPDARFFKAMVGCVATRWKLDKRYIYIGGISAGGTMTNRALLFDSHFVAGGMPISG  | 216 |
| tr A0A517SHC2 A0A517SHC2_9BACT | VRENPDDVKFIRLLDDLGAVLNVDQKRVFAAGMSNGGMMCYRLAAELSDRIAIAIAPVAG  | 166 |
| tr A0A1V4WJ12 A0A1V4WJ12_9DELT | MDNNVDDVAFRLTLEKVQRDHNVDKRFVFTGLANGGMMAYRAACELSDTIAAVAPVSG    | 177 |
| tr A0A1V5BRX0 A0A1V5BRX0_9DELT | MDNNVDDVAFRLALIEKVQRDHNVDKRFVFTGLANGGMMAYRAACELSDTIAAVAPVAG   | 206 |
| tr A0A221UVE1 A0A221UVE1_9FLAO | ENIGVDDVGFIEAIVERLKSQYQIDPDRIFTGMSNGGFMSTRLLCDRAELFRGGAILTA   | 120 |
| tr A0A517N131 A0A517N131_9BACT | HDKTIDDVAFLTAVRQVREYDAIDANRVFATGVSNGGFMQRLAIERPEIFSAAGVIA     | 179 |
| tr A0A222NUM5 A0A222NUM5_9GAMM | QQRGAGEPAIISALTRSVCTQYKLNPARVAVAGLSAGGAMALVLAEQYPENYAAVGVHSG  | 197 |
| tr A0A1W6K795 A0A1W6K795_9ALTE | RHEGAGEVEDLHQIAQAVESNYTIDANRRYITGLSSGGAMATVASVAHNEYWAAAAPASG  | 182 |
| tr A0A5E7YMU5 A0A5E7YMU5_9ALTE | RHEGAGEVEDLHQIAQAVESNYTIDANRRYITGLSSGGAMATVASVAHNEYWAAAAPASG  | 182 |
| tr A0A5P9EMB1 A0A5P9EMB1_9ALTE | RHEGAGEVEDLHQIAKAVEASFSIDPNRRFITGLSSGGAMTTVAAVTHNEYWAAAAPAAG  | 182 |

Figura 17: Ejemplo de las secciones con mayor conservación observadas en el alineamiento de secuencias múltiples de Oph. Captura del alineamiento realizado con el algoritmo Clustal W en la herramienta genefisher2. Del lado izquierdo se puede ver la información de identificación de las secuencias alineadas.

Cuadro 14: Codones de uso frecuente para bacterias del género *Klebsiella* (Parte 1)

| AmAcid | Codon | Number        | /1000 | Fraction .. |
|--------|-------|---------------|-------|-------------|
| Ser    | TCG   | 185397222.00  | 11.51 | 0.00        |
| Ser    | TCA   | 72783652.00   | 4.52  | 0.00        |
| Ser    | TCT   | 79962605.00   | 4.96  | 0.00        |
| Ser    | TCC   | 77577743.00   | 11.02 | 0.00        |
| Arg    | CGG   | 160740587.00  | 9.98  | 0.00        |
| Arg    | CGA   | 47567536.00   | 2.95  | 0.00        |
| Arg    | CGT   | 213883335.00  | 13.27 | 0.00        |
| Arg    | CGC   | 490345857.00  | 30.43 | 0.00        |
| Gln    | CAG   | 603465049.00  | 37.45 | 0.00        |
| Gln    | CAA   | 118927176.00  | 7.38  | 0.00        |
| His    | CAT   | 185282928.00  | 11.5  | 0.00        |
| His    | CAC   | 180830945.00  | 11.22 | 0.00        |
| Leu    | CTG   | 1116140662.00 | 69.27 | 0.00        |
| Leu    | CTA   | 50758369.00   | 3.15  | 0.00        |
| Leu    | CTT   | 135576089.00  | 8.41  | 0.00        |
| Leu    | CTC   | 244675783.00  | 15.19 | 0.00        |
| Pro    | CCG   | 33795.00      | 14.50 | 0.00        |
| Pro    | CCA   | 21237.00      | 9.11  | 0.00        |
| Pro    | CCT   | 22121.00      | 9.49  | 0.00        |
| Pro    | CCC   | 14379.00      | 6.17  | 0.00        |

\*Los identificadores de las columnas se encuentran en inglés debido a que ese es el formato que solicita genefisher2 para poder usarla en el programa. La información se obtuvo de la base de datos CoCoPUTs que se puede encontrar en el siguiente enlace: <https://hive.biochemistry.gwu.edu/review/codon2> (Elaboración propia)

Cuadro 15: Codones de uso frecuente para bacterias del género *Klebsiella* (Parte 2)

| AmAcid | Codon | Number       | /1000 | Fraction .. |
|--------|-------|--------------|-------|-------------|
| Gly    | GGG   | 228598684.00 | 14.19 | 0.00        |
| Gly    | GGA   | 100995161.00 | 6.27  | 0.00        |
| Gly    | GGT   | 215267268.00 | 13.36 | 0.00        |
| Gly    | GGC   | 667616717.00 | 41.44 | 0.00        |
| Glu    | GAG   | 421945390.00 | 26.19 | 0.00        |
| Glu    | GAA   | 449156937.00 | 27.88 | 0.00        |
| Asp    | GAC   | 378013119.00 | 23.46 | 0.00        |
| Asp    | GAT   | 435980818.00 | 27.06 | 0.00        |
| Val    | GTG   | 504510421.00 | 31.31 | 0.00        |
| Val    | GTA   | 114250664.00 | 7.09  | 0.00        |
| Val    | GTT   | 177340836.00 | 11.01 | 0.00        |
| Val    | GTC   | 333769522.00 | 20.72 | 0.00        |
| Ala    | GCG   | 676276811.00 | 41.97 | 0.00        |
| Ala    | GCA   | 142001697.00 | 8.81  | 0.00        |
| Ala    | GCT   | 174157812.00 | 10.81 | 0.00        |
| Ala    | GCC   | 675559999.00 | 41.93 | 0.00        |
| Arg    | AGG   | 28978545.00  | 1.80  | 0.00        |
| Arg    | AGA   | 30532786.00  | 1.90  | 0.00        |
| Ser    | AGT   | 77795368.00  | 4.83  | 0.00        |
| Ser    | AGC   | 347139594.00 | 21.55 | 0.00        |
| Lys    | AAG   | 223666445.00 | 13.88 | 0.00        |
| Lys    | AAA   | 402713125.00 | 24.99 | 0.00        |
| Asn    | AAT   | 201844214.00 | 12.53 | 0.00        |
| Asn    | AAC   | 350019929.00 | 21.72 | 0.00        |
| Met    | ATG   | 430109813.00 | 26.7  | 0.00        |
| Ile    | ATA   | 56201798.00  | 3.49  | 0.00        |
| Ile    | ATT   | 34839924.00  | 20.78 | 0.00        |
| Ile    | ATC   | 509463793.00 | 31.62 | 0.00        |
| Thr    | ACG   | 211005020.00 | 13.1  | 0.00        |
| Thr    | ACA   | 51973660.00  | 3.23  | 0.00        |
| Thr    | ACT   | 82724066.00  | 5.13  | 0.00        |
| Thr    | ACC   | 491680466.00 | 30.52 | 0.00        |
| Trp    | TGG   | 257179466.00 | 15.96 | 0.00        |
| End    | TGA   | 22185496.00  | 1.38  | 0.00        |
| Cys    | TGT   | 50716344.00  | 3.15  | 0.00        |
| Cys    | TGC   | 130468060.00 | 8.10  | 0.00        |
| End    | TAG   | 6556644.00   | 0.41  | 0.00        |
| End    | TAA   | 30653325.00  | 1.90  | 0.00        |
| Tyr    | TAT   | 230046195.00 | 14.28 | 0.00        |
| Tyr    | TAC   | 209094018.00 | 12.98 | 0.00        |
| Leu    | TTG   | 113975512.00 | 7.07  | 0.00        |
| Leu    | TTA   | 107200851.00 | 6.65  | 0.00        |
| Phe    | TTT   | 305471381.00 | 18.96 | 0.00        |
| Phe    | TTC   | 310680653.00 | 19.28 | 0.00        |

\*Los identificadores de las columnas se encuentran en inglés debido a que ese es el formato que solicita genefisher2 para poder usarla en el programa. La información se obtuvo de la base de datos CoCoPUTs que se puede encontrar en el siguiente enlace: <https://hive.biochemistry.gwu.edu/review/codon2> (Elaboración propia)

```

1  nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
61  nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
121 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnatarm
181 mysrgsgant abcksgrcyw bgacgcsabs gscctggscs avstgrtsss cmscrrmgar
241 stgagcvsss vvgarstgcy ggmggcccgs mtsgmcsrccr bssavnnnnn ngmccgtgaay
301 ccgrsstsaa acgcsrtsrt smwbcyscwb kwngmvrimg cssrvrrmnn nnnnnnnnnn
361 nnnnnnrvcg cgnnnnnnca sscsvrsgrc scgnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
421 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnytbgc cggcgtgccg
481 btbctgmtsa aagayctgrs cmhsgmbvts gmvvgcnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
541 swsccgahsr vvadbggcwg ccgcsygbtb vmngaynnnn nnchbsyggc gsscrrsnnn
601 rgcmcsytbr tsmgscgcyt bsrvgmvgcs ggcyybrtsm ysytbggcmr maccamcwcc
661 ccggarttbg gcctbmmvrc swyacccgar mssghgsygt kbggcnnnsc grsccgcaay
721 ccgtggrayc yrscccksas cscgggcccgc agcagcggcg gcrscgscgc sgcsgtggcs
781 gcsggcatsg tgccggtggc scrcgscavc gaygscggcg gcagcatccg catcccggcs
841 rsctdcwgcg gcctggtsgg cctgaaaccg asccgcgrcc gsrysmssvk snnnggscg
901 gmsshbrkcg avsssnnnn nkkgsybggc sygrscrtsg rvgrcgtgst grsccgcasc
961 gtgcgcgaya scgcsygtct sctggaygyg stsmrsggcc mbgavscggs srvsrsstwy
1021 tgsryscgcv cscygnnnnn nnnnnnnsys grvgvvtss rsscnnnnn nnnnnnnnnn
1081 nnnnnnvmbc csssvvcnn nctgcgcrts gscgtgstgm scnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1141 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn smbascysr hbggcnnngy sgygvysmb
1201 smggcgakss mggcsryssw grrnsvsrcc rycnnnshsc tgsmvrvsct gggccaygan
1261 gtggarsabn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1321 shbnnnnnng aysssgssv sytbmtbsvv gmbyaysbsm csrtswdskk brssrccvts
1381 gscrscsmga tssansrcsb sravsvghv mysggccgcn nnsysaccnn nnnnnnnnnn
1441 nnnnnnnnnr csygsqkmsw bswgarsgs gscmrcccr ysaccggsnn nnnnnnnnnn
1501 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnsrc gcsskssmgv ksydbnnnnn nnnnnnnnnn
1561 mmsrtggmvs vsyybttbga vsscnnnnnn twygaystgm tsctgasccc grysaysgcs
1621 nnncygmccs cvarmtsgg cnnnnnnnnn ctggmbvmsv rsnnnnnnst sgavnnnnnn
1681 crbrssryss ksnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1741 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnntwca cswgcygky baaystgasc
1801 ggccascgcn nnnnnnnnnn nnnngcsats agcstgccgm tssrycdsas crsrvcnnn
1861 nnnnnnnnnn nnnnngcct gccgrtsggc rtsmagttyr ysgcsssyyw bggcsrcgav
1921 gmcsksetgc tgsrsstggs crscagctg garsrgmcc ksscstgggy ssmbmgcccgc
1981 scsscsetgn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
2041 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
2101 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
2161 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
2221 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
2281 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn n

```

Figura 18: Secuencia consenso de *nylA*. Obtenida de la herramienta genefisher2 de la traducción reversa de los alineamientos de las proteínas especificadas al inicio del Anexo C utilizando los Cuadros 14 y 15

(Captura de pantalla obtenida de la herramienta Geneious Prime)

```

1  nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
61  nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
121 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnrysgcss hsgcrrrvrr snnnnnnnnn
181 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
241 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
301 wtssgsgavm wsvwbyssmc srysggcrys cbscvrvvcr gcnnnsmsvy ssgsscgtg
361 smgsssgmbr vvmwsmcssm snngmgbgss mksmybyybr csnnnnnnnn nnnnnnnnnn
421 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ngwbgacgms awbckssrsg rbrysyrcrs cgaygschtb
481 stgrtsmtsm rysrcggcmr vvtstrtskac garyrctayb bsgrbsssww brvcscgsab
541 rmcmgcaym tsvbswksag crtsasaaa agcbtbrysr gcmysstggy sgsctrgsyg
601 gwbgvvgarg gcmwvmtsra hcysgabnnn smbsyssygr mvcabtwynn nnnnnnsys
661 ccgswgstgr mvggcaccgc sywysvssrb gygacrtss rscabstgct gsabaksrms
721 abcnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnngg cstgrrbtrb
781 mrbgargret acsmkabsm bmmvrssvwn dkbrrsnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
841 nnnnnnnnnn nnnnnnnnat gcksmmbrks cssgvsnnnn nnnnnnnncc sgrcrvcwts
901 babgabtucc tgrvsvsssw bcmssmvrmb gscvrvscsg gcvmvnnnnn nnnnnnnnnn
961 nnnttymrct aymrcascgg srccrsggan stgctggsck sgryscrgvv vcrsrtsrys
1021 ggcnnnvwmv scywbgccga nywbcygwgs rmvvrmtst kbrvcvsmt sggcrysgrv
1081 mrbgmcgsst dbddbmcsgw bgmcmrcrms nnggcaycg wngtbgscrg crgcgcvts
1141 wacvbsascy ygcgcgaysy ggcscgcttb ggcswgmtsr tcksvrcnn nnnnggcnnn
1201 sgskdbrrcg rccrsgagmt smkscgsvv rvckkggtsr mcgwbryssb snnnnnncsb
1261 gcsgrcaayc rcgmsvrhw bgmssrcgvs nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1321 nnnnnnnnnn nnnnnnnnkg srkstaysgc krcmwbttgt ggvksmrcnn nnnnnnnnnn
1381 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1441 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnr ssttyrysgc smksggcvws
1501 ywbggccagr kbmtstwert srwccsvvs smvranmtgg tgrtsgtgmd vtwbrcnnn
1561 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

```

Figura 19: Secuencia consenso de *nylB*. Obtenida de la herramienta genefisher2 de la traducción reversa de los alineamientos de las proteínas especificadas al inicio del Anexo C utilizando los Cuadros 14 y 15

(Captura de pantalla obtenida de la herramienta Geneious Prime)

```

1 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ngtggacccg
61 gccccgcgcc tggcsnnncc gccggtgttc ggcggcccg nnnnnggcaa ygacgcctty
121 gacctggygc cggcgcgcag caccggccgc garatgctgc gcttygaytt yccgggctg
181 agcrtsggcr ccgcsayta ygargarggc ccgaccggcg csaccgtgat ccayatcccg
241 gcsggcgcs cgcaccgcs gtggaygcscgc ggcggcgcs tgggcctgag cggcggctay
301 gayttyaayc aygcsatctg cctggcsggc ggcgcsrgct ayggcctgga rgcsggcgcs
361 ggcgtgagcg rcgcsctgct ggarcgctg garyaycgca ccggcttygc sgarsygcag
421 ctggtgagca gcgcsctgat ctaygaytty agcgcscgca gcaccgcsgt gtayccggay
481 aaagcsctgg gccgcgcs sctggartty gcsgtgccg gcgarttycc gcagggccgc
541 gcsggcgcs gcatgagcgc sagcgcsggc aaagtggayt gggaycgcac cgaratcacc
601 ggccagggcg csgcsttycg ccgcctgggc gaygtgcgca tcctggcsgt ggtggtgccg
661 aayccggtgg gcgtgatcrt ggaycgcgcs ggcrsrtsg tgcgcgcaa ytaygaycs
721 cagaccggcg tgcgcccga yccggtgtty gaytaycagg argcsttygc sgarcagstg
781 ccgccggtga ccgaggcsg caayaccacc atcagcgsa tcgtgaccaa ygtgcatg
841 agcccgggtg arctgaayca gttygcsaaa caggtgcaya gcagcatgca ycgccgcatc
901 cagccgttyc ayaccgayat ggayggcgay accctgttyg csgtgaccac cgaygaratc
961 gayctgccga ccacccggg cagcagccgc ggcgcctga gcgtgaaygc saccgcsctg
1021 ggcgcsatcg csagcgargt gatgtgggay gcsgtgctgg argcgscaa a

```

Figura 20: Secuencia consenso de *nylC*. Obtenida de la herramienta genefisher2 de la traducción reversa de los alineamientos de las proteínas especificadas al inicio del Anexo C utilizando los Cuadros 14 y 15

(Captura de pantalla obtenida de la herramienta Geneious Prime)

```

1  nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnngcg arygavmtr kstwccgcnn nnnnnnctg
61  gagcagaaac gccrcrtsvw brscgmnttc ccgggcccga rmagcswsgm gctgrccsag
121 cgccgcrvvg csgygggtggc srscggcggtg gcsagcrgcs tgccgggtgtw ygyggmsgac
181 gcsagcggcg gcatcatssr sgaygtggay ggcaayagct tyatcgayct gggcagcggc
241 atcgcsgtga ccagcgtggg cgmccagcgay ccggccgtgg tggvcgcsgt gmavgmgsmg
301 gtggmgcayt tyaccayac ctgcttyatg gtgaccccggt aygarggcta ygtggmggtg
361 gcsagcagc tgaaysrvct gaccccgggc rmccaygmga aacgcaccgt gctgttyaay
421 agcggcgcs gcsagcgtga raaygcsgtg aaartsgcsc gcctggcsac cggccgcrac
481 gcsagcggcg csttygayca ygcsstayca ggccgcacca ayctgacat ggcscgtgac
541 gcsaaarsca tgccgtayaa aaccrrctty ggcccgttyg cscggarrt staycgcryg
601 ccgatgagct ayccgtwygc cgagnnnnnn nnnnnngarr acccggavat caccggcgmg
661 gaggcsgcsm avcgcgcsat caccatgatc ganaaacagr tccggcgscnn ngacmabgtg
721 gcsagcater tsatcgarcc gatccagggc garggcggt tyatcgtgcc ggcsgagggc
781 ttyctgccgg ccctgrscgm stggkscaam gavaahggcr tsgtgtyat cgcsgaygar
841 gtgcagascg gcttykscg caccggcgmg tggtygcsr ksrancayga rggcnnnnnn
901 nnnngtgggtc cggaymtsac caccatgcs aaaggcatcg csgggcgcm t gccgctgrsc
961 gcsrtsaccg gccgcgcsa nctgmtggay gcsagcayc cggcgccct gggcgccacc
1021 tayggcgga ayccgggtggc stgcgcs gcsctggcsr scatcrrhac catssarsag
1081 babgayctga wgrccgcgc scrcmacatc grvgmvmvmtsg ygmvsgrcmr mctgcscgmv
1141 ctgsmgrmv avswbssnn nnnnnnnnnn nnnnnngtgr tsgggcgayrt scggcgccgc
1201 ggcgcsatgm tggcsatcga rctgggtgvar scggcnnnn nnnnnnnnas caamraaccg
1261 rayscgavs ygaccraagm grtsgcsgcc gmstgcctgv mvgmgggct gatsatcctg
1321 acctgcccga cctayggca ygtgatccgc ctgctgccgc cgctgrtsat cagcgaygag
1381 ctgctgmwgc abggcctgga ngtgctggsc gmcgcsatcm rmgcsvmcgc snnnnnnnnn

```

Figura 21: Secuencia consenso de *nylD*. Obtenida de la herramienta *genefisher2* de la traducción reversa de los alineamientos de las proteínas especificadas al inicio del Anexo C utilizando los Cuadros 14 y 15

(Captura de pantalla obtenida de la herramienta *Geneious Prime*)

```

1 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnatg
61 ggcgtgtaya ccaccaycga yccggygacc ggcgangagr tsgcscagta yccggaratc
121 agcgaygcs agctggayga nctgatcgrm mgcagcgcs csgcstaycg cagctggcgc
181 accaccmcsc tggarcagcg ccgcgcsctg ctgrscgcg cgcsgarat ccaycgcgar
241 caggcsgang arctggcsm vctgctgacc ctggaratgg gcaaaccgat crcccaggcs
301 aamggcgarg tggcstggt ggcsagcatc taycagtayt aygcsgayca ysyggargar
361 twymtsgcsg aygarcsst ggacatgcc ggcnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
421 agsggcaccg csgtgggtgc caccgarscg atcggccgc tgggtggcgt gatgccgtgg
481 aaytayccgt wytaycaggt ggcscgctty gscgscgca ayatcgcst gggcaayacc
541 atcatcctga aacaygcsc caaytgccc cagagcgsc tggcsatcga rcgctgctg
601 accgargcsg gcctgccgga cggcgtgtay nnnnnnnnnn nnnnnstgaa ygcsttyatc
661 agcagcgsc aggtggcsm crsrtsgc gaycscgcr tscagggcgt gaggctgacc
721 ggcagcgara aagcsggcag cgcsgtggc gargtggcsg gccgccayat gaaaaaatgc
781 gtgctggarc tgggcccag cgayccgtty atcgtgctgg rcgaygcsga yrtsgaygcs
841 gscgcrscg cscsgtgggt sggccgctg ggcaayggc gccaggcstg caccgcsagc
901 aaacgcttyc tsgtggagga rcsgtgtay gangarttyg tgrsaaatt ystggayggc
961 atgrccrgct ggcagccgrg cgayccgrc rcccgrva ccaaactggg cccgctgrsc
1021 agcsscrscg scgtgganga rctggaygar ctggtgcagg aygcsgtgag ccrcggcgcs
1081 raastgctgm ysggcccra ygccccgac grvamrggc cstaytaycc gccgaccgtg
1141 ctggyggcg tgaccccsa natgcgcs twymacgarg arctgttygg cccggtggys
1201 gtggtgyayc gcgtgggcag cmtggaygar gcsatcgans yggcsaayga yagcccgtty
1261 ggcctgagca gcagcgtgtt yaccagcay ccgsavaahg csgaycgcgt ggcsgargar
1321 ctggarrccg gcatggtgt gatcaayagc accagcaaaa gcagcccgga yctgccgtty
1381 ggcggcgtga aasgcagcg cktbggccgc garctggcsm gctwyggctt yraygartty
1441 gcsaayaaa aactggtgca caayccgrc ggcaamnnn

```

Figura 22: Secuencia consenso de *chnE*. Obtenida de la herramienta genefisher2 de la traducción reversa de los alineamientos de las proteínas especificadas al inicio del Anexo C utilizando los Cuadros 14 y 15

(Captura de pantalla obtenida de la herramienta Geneious Prime)

```

1  nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
61  nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
121 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
181 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
241 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
301 nnnrhvsmgh wbsscsvvgc cctgvvbsnv vhwrvnhdnv hssygmksrs ccdsbvcswg
361 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
421 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
481 nnnnnnnnnv vbvantggaa ysgctgggrc vserrnvhv mbaayrscer ctwycagcss
541 vmnnnnnnns cggscmtsiv bsyggmggay vtsmssvrhc tgraastgrm vtgggcstty
601 vvbtywmscg gcrscmarn nnnnmrcrgc cmgscgrccg tgryssgerr nssectstty
661 rysrscagcv hvagcggcgv cgtgtaygcs ctgrayrccm araccggctg crystrbtgg
721 mscywygmnr scsvvgscsm gryscgcavc rscsygvhbr tsshgvmssk scgsvnggc
781 sbseccgnnn nndhcgcsvy stwyttyrge gaykdnvmnr mvrbsgygbd bgcsstggay
841 gcssdvaccg gcmrmcwgck stggammamm vnrtsrals mbcabccgrn csbsmvsats
901 accggcagcm ysrysywbyr bsrnrrcmvm mtstwygtgc cgrtsrscag cvbsrmmrww
961 gygwkcgcen mbrwnshbvm btrbmggtgc tgcammtyc ggggrscst grysgcmts
1021 gaygscvbsr vcggcarmry smwvtggmrm hssyrbrbrs yssvvannn nccgsvsmmr
1081 btbvrmmwra mcarmvbsgg cmvmsabats ydbgsccegr scggcgscvs srtstggrks
1141 rccccgaccr tsgaysvrm vcgcvrmmts vtstaygygg scaccrgcra narctayasc
1201 rrsnygvvbh mcranrdnas cgayrscrts rtggcshtbg anvysgmnav mggcvvvgwg
1261 crstggwyer wbcagvysmy svmvrccgay rmcrrbrwbr hbkscyrsnv vcvsnnnnnn
1321 nnnnnnnnns ssaaytgccc gvrnmvnbwb ggcccggayt tyrvchtbgg crvcvsscyy
1381 atsywbsdbv vhwysmggr cggcvrvsmg dwbmtsstgg ygggccagaa aagcggcrhg
1441 rtswwbgscm tsgayccgsm barcvrhggc vvvvwmstt ggvdvsscmr vsygrgcmhg
1501 ggcrgcdnm wbggcggcrt ssantkbggc aysgcsrcg aygvcsvvam hstgtrbgyg
1561 sssrtsrscg ayannnnnrk srhcvbshdn rmvnnnnnnn nsssmrvcc gggcvtshvb
1621 gcsytbsrbm yssvrmcgg crmvvhnshg tggvvcbbm ysnnnnnnsm gsvnnnnvmmv
1681 tgcvrckrgr dbvmbhdbwn ntgcmwbvrb gcsbwbagcs mgscgvtsas cgygayscg
1741 ggcsygrtst tyrscggcrs chhbrayggc cayyrbcksg cstwyrvcas cvvrmcggc
1801 rmvrtsmst ggranbkbra naccrvcnm vvvvbskdbm mnaccstgrv cggcrhvmmv
1861 gcsndhggcg gcrksmtsga yggcgscggc sygryrsg csggcggcat gstgwwcgtg
1921 mayagcggct ayannrrmyk cnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ngrvnmssm
1981 ggcaayrtsc tgmtsgygtw ymgerwrrah gksmrm

```

Figura 23: Secuencia consenso de *pvaA*. Obtenida de la herramienta genefisher2 de la traducción reversa de los alineamientos de las proteínas especificadas al inicio del Anexo C utilizando los Cuadros 14 y 15

(Captura de pantalla obtenida de la herramienta Geneious Prime)

```

1  nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
61  nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnntkcrwsc tsnnnaksrc svgcswsgys
121 sksstsnnna csmysmgssy svyssysscs vrsqcgccm dsygmwbsb grmvnnnnnn
181 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnskss csdkssysgm bnnnnnnnnn
241 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn rwbsabrgcc ksrnvqgcnn nkmchwrrts
301 bwbstgccgs csrrbnnnvr bassnnnnnn nnnnnnccgg ygysgvtgsy gmtgryssks
361 macgkskrvr gcvvsamcnn nrmcmdbrrc gygvysmrcr dcdgsggcnn nnnnaacgmc
421 rhvvsbgmcs avbanggctw yatsstgrts kmcccgdwcv kcaccdgcnn nnnnnnnnnn
481 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnam bkdrmwbhvb
541 tggrrckhck gsydcgvssv cnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nmayranrrc
601 gbsgrcgang tggvkwymt svrnsmgmts ryssrvdvsg tgsrvrscva byabamhvtS
661 gaysssaahc gcvkstwyry srscggcmts agrvcggcg gcrysatgrc cwmcskssyq
721 sygbksnnnn nnnnngaryw bwgjbmgcgs rbcgygnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
781 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nrmcrwbqmc vsrksrsss ksrssbkbva bkdbsssrsv
841 dsrsmvysk bshcnnnms sgtarmvks stgvwsdkcs rcrksvsvs sgansyswvb
901 shbcmgnnnw ahmhbrkcss sswgmtsgks mtsmhsdwbk rgvrscrbbv vnnnnnnnnn
961 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nsrnnnnnn cwymwryvsv ysdckrcss cmbsrschyb
1021 yrgrysvvsv gsaacksctd crscrsvrdv sygrmbkksr kscmbkwbkc byrbmrcrrh
1081 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1141 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nrvcsrbbgc
1201 caywhbtggs ygsrsqksra nmmynnnnnn kkcmmmbmrcb bsrmbvdvsv brysnnsbs
1261 rrvmhbmssd mnvssrrcrt smystggran ttyttcmwmm vccabmssms ssannnnnnn
1321 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1381 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1441 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1501 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1561 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1621 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1681 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1741 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1801 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1861 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1921 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1981 nnnnnnnnnn nn

```

Figura 24: Secuencia consenso de *oph*. Obtenida de la herramienta genefisher2 de la traducción reversa de los alineamientos de las proteínas especificadas al inicio del Anexo C utilizando los Cuadros 14 y 15

(Captura de pantalla obtenida de la herramienta Geneious Prime)







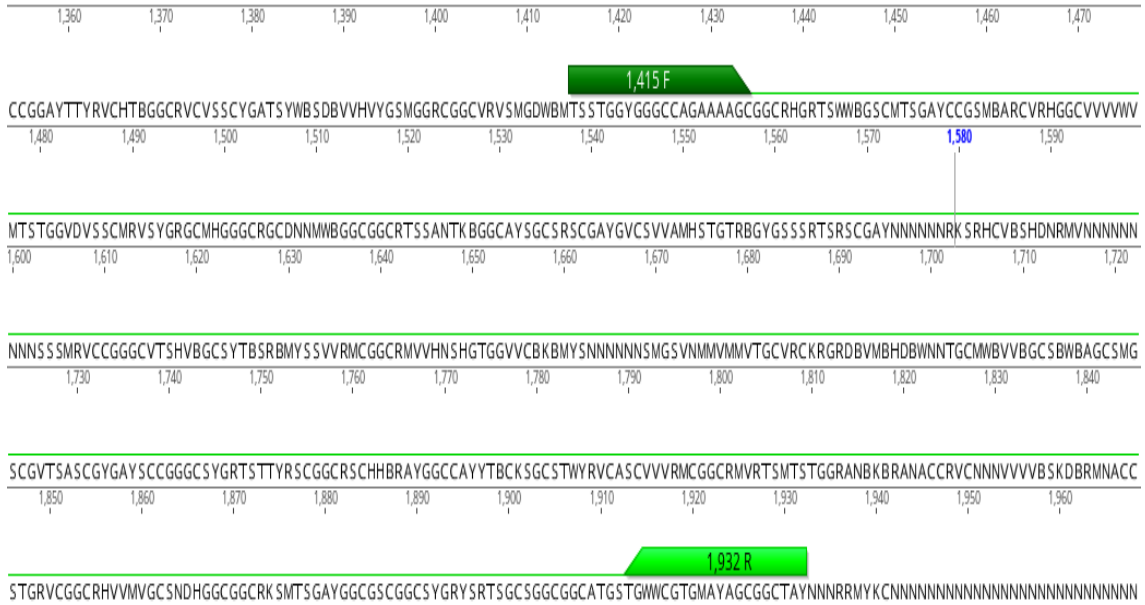


Figura 30: Ubicación de los cebadores 1,415 y 1.932R en la secuencia consenso de *pvaA*. La captura de pantalla se obtuvo de la herramienta Geneious Prime. Los números arriba de los nucleótidos en cada imagen corresponden al número de pares de bases y las letras corresponden a las abreviaturas de los nombres de las bases nitrogenadas o las bases degeneradas. Es decir, que Y corresponde a timina (T) o citosina (C); R a guanina (G) o adenina(A); S a G o C; N a G, A, T o C; M a C o A; W a T o A; K a G o T; B a G, T o C; V a G, C o A; H a C, A o T y D a G, A o T.

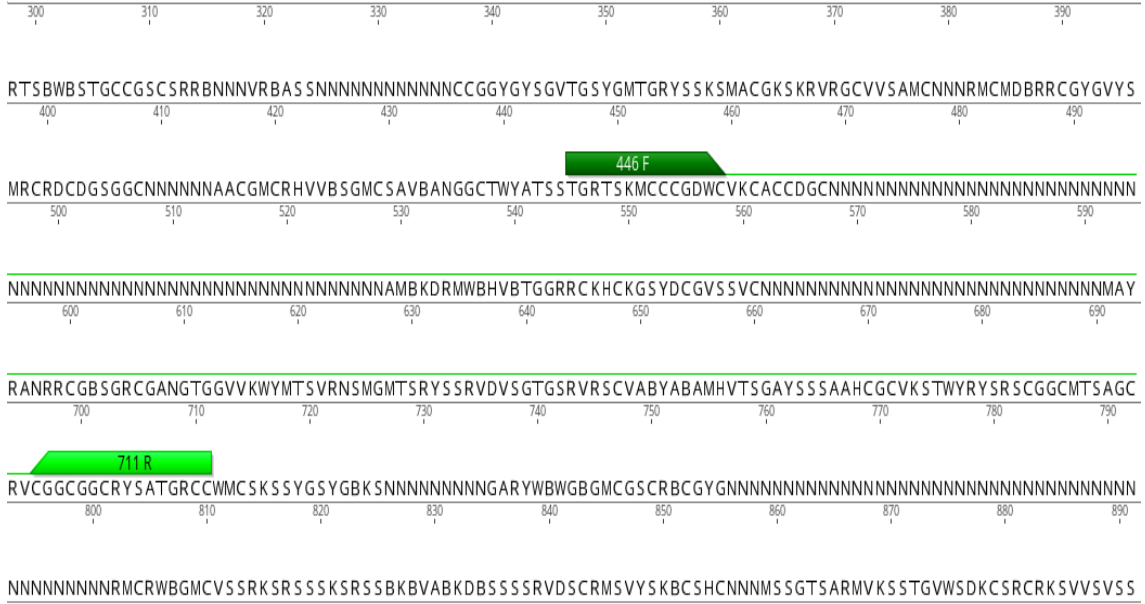


Figura 31: Ubicación de los cebadores 684F y 711R en la secuencia consenso de *oph*. La captura de pantalla se obtuvo de la herramienta Geneious Prime. Los números arriba de los nucleótidos en cada imagen corresponden al número de pares de bases y las letras corresponden a las abreviaturas de los nombres de las bases nitrogenadas o las bases degeneradas. Es decir, que Y corresponde a timina (T) o citosina (C); R a guanina (G) o adenina(A); S a G o C; N a G, A, T o C; M a C o A; W a T o A; K a G o T; B a G, T o C; V a G, C o A; H a C, A o T y D a G, A o T.