UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

Identificación de la ruta metabólica para producción industrial de calcita por hidrólisis de urea en *Lysinibacillus sphaericus* mediante análisis computacional genético de *Sporosarcina, Bacillus* y *Lysinibacillus* spp.

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por
Ana Marcela Morales Valenzuela
para optar al grado académico de Licenciado en Biotecnología Molecular

Guatemala,
2020

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

Identificación de la ruta metabólica para producción industrial de calcita por hidrólisis de urea en *Lysinibacillus sphaericus* mediante análisis computacional genético de *Sporosarcina, Bacillus* y *Lysinibacillus* spp.

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por
Ana Marcela Morales Valenzuela
para optar al grado académico de Licenciado en Biotecnología Molecular

Guatemala,
2020

Vo.Bo.:

(f) _____

MSc. Julio Roberto Matute

Tribunal Examinador:

(f) _____

MSc. Julio Roberto Matute

(f) _____

MSc. Luis Augusto Franco

(f) _____

Dra. Pamela Marie Pennington

Fecha de aprobación: Guatemala, 7 de diciembre de 2020.

Prefacio

El presente trabajo de graduación es parte de un proyecto en conjunto del Centro de Estudios en Biotecnología CEB de la Universidad del Valle de Guatemala con Cementos Progreso. Como consecuencia de la pandemia causada por COVID-19, cambié el enfoque de esta tesis de un trabajo de laboratorio a un trabajo llevado a cabo con herramientas computacionales y conocimiento de bioinformática. Este cambio de enfoque me permitió profundizar en el uso y conocimiento de estas herramientas. Este trabajo permite entender el metabolismo de las bacterias capaces de producir calcita para poder optimizar este proceso y escalar su uso a nivel industrial en forma de bioconcreto.

Me gustaría dar las gracias a mi asesor, Julio Matute por su excelente orientación y soporte durante todo el proceso de realización de mi trabajo. También me gustaría dar las gracias a Augusto Franco, ya que sin su cooperación no habría sido capaz de llevar a cabo este análisis. También me gustaría agradecer a la Doctora Pamela Pennington por su apoyo y orientación durante la realización de este trabajo.

También debo dar un agradecimiento especial a mi familia, en especial a mis padres, por su acompañamiento en la realización de este trabajo, por acompañarme y motivarme durante el tiempo que dediqué a realizarlo y por su confianza en esta tesis y en mí. A mis compañeros de promoción, en especial a mis amigos Nala, Estefani y Javier, por la motivación y apoyo que me mostraron para llevar a cabo este trabajo y las conversaciones que manteníamos para mantenernos inspirados y con ganas en esta carrera.

Índice

Prefacio III

Lista de figuras VI

Lista de cuadros VII

Resumen VIII

Abstract IX

1. Introducción 1

2. Objetivos 2
2.1. Objetivo general . . . 2
2.2. Objetivos específicos . . . 2

3. Justificación 3

4. Marco teórico 4
4.1. Biomineralización . . . 4
4.1.1. Mecanismos de biomineralización . . . 4
4.2. Precipitación de calcita . . . 5
4.3. Metabolismos implicados en la precipitación de calcita . . . 6
4.3.1. Hidrólisis de urea . . . 6
4.3.2. Amonificación de aminoácidos . . . 7
4.3.3. Desnitrificación . . . 7
4.3.4. Fotosíntesis . . . 8
4.4. Aplicaciones de la biomineralización y precipitación de calcita . . . 8
4.4.1. Remoción de metales pesados . . . 8
4.4.2. Bioconsolidación de suelos . . . 9
4.4.3. Secuestro de dióxido de carbono . . . 9
4.4.4. Otras áreas de aplicación para biomineralización . . . 9
4.5. Bioconcreto . . . 10
4.6. Género *Lysinibacillus* . . . 10
4.6.1. *Lysinibacillus sphaericus* . . . 11
4.7. Modelado de rutas metabólicas . . . 11
4.7.1. Modelado estequiométrico . . . 12
4.7.2. Teoría de grafos . . . 12

4.7.3. Análisis del modo elemental 12

5. Metodología **13**
5.1. Sitio de estudio 14
5.2. Sujetos de estudio 14
5.3. Enfoque, diseño y tipo de investigación 14
5.4. Tipo y tamaño de muestra 14
5.5. Criterios de inclusión y exclusión 14
5.6. Variables 14
5.7. Hipótesis 15
5.7.1. Hipótesis de investigación: 15
5.8. Bioética 16
5.9. Materiales y métodos 17

6. Resultados **20**
6.1. Búsqueda de genes de *Lysinibacillus, Sporosarcina* y *Bacillus* involucrados en la precipitación de calcita 20
6.2. Identificación de genes y operones de *Lysinibacillus sphaericus* involucrados en la precipitación de calcita 21
6.3. Elaboración de grafos de rutas metabólicas para precipitación de carbonato de calcio en *L. sphaericus* 21
6.4. Elección del modelo más eficiente para la ruta metabólica de precipitación de calcita en *L. sphaericus.* 23

7. Análisis de resultados **25**

8. Conclusiones **28**

9. Recomendaciones **29**

10. Bibliografía **30**

11. Anexos **33**
11.1. Genes involucrados en los procesos metabólicos para producción de calcita 33
11.2. Alineamientos con el genoma de *L. sphaericus* 34
11.3. Reconstrucción de la ruta metabólica para precipitación de calcita 41

Lista de figuras

1. Tipos de polimorfismos de carbonato de calcio. 5
2. Micrografía electrónica de barrido de suelo consolidado por MICP 9
3. Morfología de *L. sphaericus* bajo distintas condiciones 11

4. Esquema de metodología 13

5. Matriz estequiométrica del proceso de hidrólisis de urea para producción de calcita en *L. sphaericus* 22
6. Grafo del proceso de hidrólisis de urea para precipitación de calcita por *L. sphaericus* 22
7. Representación gráfica de la ruta más eficiente para producción de calcita en *L. sphaericus* 24

8. Alineamiento para localización del gen *ureC* 34
9. Alineamiento para localización del gen *ureB* 35
10. Alineamiento para localización del gen *ureA* 35
11. Alineamiento para localización del gen *ureE* 36
12. Alineamiento para localización del gen *ureF* 37
13. Alineamiento para localización del gen *ureG* 38
14. Alineamiento para localización del gen *ureD* 39
15. Alineamiento para localización del gen *nikE* 40
16. Alineamiento para localización del gen *ytiB* 40
17. Metabolismo del nitrógeno de *L. sphaericus* involucrado en la producción de calcita 41
18. Representación gráfica de la ruta P1 42
19. Representación gráfica de la ruta P2 42
20. Representación gráfica de la ruta P3 43
21. Representación gráfica de la ruta P4 43
22. Representación gráfica de la ruta P5 44
23. Representación gráfica de la ruta P6 44
24. Representación gráfica de la ruta P7 45
25. Representación gráfica de la ruta P8 45
26. Representación gráfica de la ruta P9 46

Lista de cuadros

1. Variables para la identificación de genes de *Lysinibacillus sphaericus* involucrados en la precipitación de calcita 14
2. Variables para la elaboración de grafos de rutas metabólicas para precipitación de carbonato de calcio en *L. sphaericus*. 14
3. Variables para la elección del modelo idóneo para la ruta metabólica de precipitación de calcita en *L. sphaericus*. 15

4. Genes reportados previamente que son necesarios para la precipitación de calcita por hidrólisis de urea. 20
5. Ubicación en el genoma de *Lysinibacillus sphaericus* de los genes reportados en hidrólisis de urea para precipitación de calcita 21
6. Rutas descritas mediante análisis de modos elementales como solución al sistema metabólico de hidrólisis de urea de *L. sphaericus* 23
7. Genes de interés para posible modificación genética para la precipitación de calcita por hidrólisis de urea. 23

8. Búsqueda de genes de *Lysinibacillus, Sporosarcina* y *Bacillus* involucrados en la hidrólisis de urea 33
9. Búsqueda de genes de *Lysinibacillus, Sporosarcina* y *Bacillus* involucrados en la precipitación de calcita 34
10. Codificación de metabolitos en grafo de hidrólisis de urea para precipitación de calcita en *L. sphaericus* 41
11. Codificación de rutas metabólicas en grafo de hidrólisis de urea para precipitación de calcita en *L. sphaericus* 41

Resumen

El concreto es fundamental para la industria de construcción, pero tiene el problema de sufrir fracturas que comprometen su resistencia. Una alternativa biotecnológica para su reparación es suplementar la mezcla de concreto con microorganismos capaces de producir calcita, formando bioconcreto, que tiene la capacidad de autorreparar las grietas. En un estudio previo, se aislaron bacterias de los géneros *Sporosarcina, Bacillus* y *Lysinibacillus* del suelo de una planta de producción de cemento, capaces de precipitar calcita. El presente estudio utilizó métodos genómicos para analizar la biomineralización en *Lysinibacillus sphaericus* para facilitar su aplicación industrial. Para ello, se identificaron genes responsables del proceso de producción de calcita por hidrólisis de urea en los géneros mencionados anteriormente, en literatura publicada. Luego, con el software CellNetAnalyzer, se pudo realizar un análisis de reconstrucción de rutas metabólicas, de forma que se observó la ruta más eficiente para la biomineralización en *L. sphaericus*. Se observó que las enzimas esenciales para llevar a cabo este proceso son la ureasa y la anhidrasa carbónica, que permiten la degradación de urea hacia carbonato para la formación de calcita en el exterior celular. Para la optimización de producción de calcita por *L. sphaericus*, se recomienda desarrollar un medio de cultivo que brinde las condiciones óptimas para la enzima ureasa, que contenga una fuente de urea y calcio, un elevado pH y, si es posible, llevar a cabo una modificación genética para producir un aumento de actividad enzimática por parte de la ureasa.

Abstract

Concrete is an essential for the construction industry; however, it is prone to fractures that compromise its strength or resistance. A biotechnological alternative to expensive repairs is to supplement the concrete mix with microorganisms capable of producing calcite, forming the so-called "bio-concrete", which has the ability to self-repair cracks. In a previous study, bacteria of the genera *Sporosarcina, Bacillus*, and *Lysinibacillus* were isolated from soil samples of a cement production plant, and it was found that they are capable of precipitating calcite. This study used genomic methods to analyze the biomineralization mechanism in *Lysinibacillus sphaericus*, to facilitate its industrial application. The genes responsible for the process of calcite production by urea hydrolysis in the genera mentioned above were identified in published literature. Through the use of the CellNetAnalyzer software, a reconstruction analysis of the metabolic pathways was performed, and from there, the most efficient pathway for the biomineralization of *L. sphaericus* was identified. It was observed that the essential enzymes for this process are: urease and carbonic anhydrase; which allow the degradation of urea to carbonate, for the formation of calcite in the cell exterior. For the optimization of calcite production by *L. sphaericus*, it is recommended to develop a culture medium that provides optimal conditions for the enzyme urease, containing a source of urea and calcium, a high pH and, if possible, carrying out a genetic modification to produce an increase in enzymatic activity by urease.

CAPÍTULO 1

Introducción

En la industria existen dos materiales estructurales relevantes debido a su uso mayoritario en construcciones: el concreto y el acero. El concreto es una mezcla de varios componentes, entre ellos el cemento. El cemento en sí es una mezcla de calcita en forma de piedra caliza y arcillas calcinadas (Neville y Brooks, 1987). A nivel funcional, el concreto tiene la desventaja que es propenso a fracturas y formación de grietas con el desgaste del tiempo. Estas grietas son indeseables, no solo porque comprometen la dureza y resistencia de la estructura de concreto, sino también permiten el paso del agua, la cual corroe la estructura de acero que da soporte al concreto. Este desgaste del material lleva a una serie de gastos de mantenimiento y reparación (Seifan, Samani, y Berenjian, 2016).

Una alternativa para la reparación y prevención de formación de grietas en concreto es la utilización de microorganismos con capacidad de biomineralización. Estos microorganismos son capaces, mediante distintas rutas metabólicas, como, por ejemplo: hidrólisis de urea, de la producción de carbonato de calcio en forma de calcita. La acumulación de este mineral al entrar en contacto con el agua que penetra por las grietas permite sellar estas fisuras. Al sellar las grietas, se aumenta la impermeabilidad del concreto, alargando la vida útil de la estructura y restableciendo la integridad y dureza del material (Stabnikov, Jian, Ivanov, y Li, 2013). Una de las bacterias con capacidad de precipitación de calcita, mediante hidrólisis de urea es *Lysinibacillus sphaericus* (Gomez-Garzon, Hernández-Santana, y Dussan, 2017).

Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio es identificar la ruta metabólica más eficiente en *L. sphaericus* para la producción de calcita, por hidrólisis de urea, mediante el análisis computacional de rutas en *Sporosarcina, Bacillus* y *Lysinibacillus* spp. Esta identificación permitirá establecer un precedente para futuras investigaciones cuyo objetivo sea realizar la modificación genética o metabólica de *L. sphaericus* o bien su aplicación en consorcios para su utilización industrial en estructuras de bioconcreto.

CAPÍTULO 2

Objetivos

2.1. Objetivo general

Identificar la ruta metabólica más eficiente en *Lysinibacillus sphaericus* para la producción a nivel industrial de calcita por hidrólisis de urea mediante análisis computacional genético de *Sporosarcina, Bacillus* y *Lysinibacillus* spp.

2.2. Objetivos específicos

- Generar, a partir de estudios previos, un listado de genes de *Sporosarcina, Bacillus* y *Lysinibacillus* spp. involucrados en los procesos de hidrólisis de urea asociados con la precipitación de calcita.
- Localizar, por medio de alineamiento de secuencias, los operones clave para la precipitación de calcita en el genoma reportado de *Lysinibacillus sphaericus*.
- Elaborar los grafos y modelar estequiométricamente las rutas metabólicas de precipitación de calcita; a partir de los genes clave encontrados en el genoma de la cepa de *L.sphaericus* reportado por Yan, Xiao y Zhang en 2017(Yan, Xiao, y Zhang, 2017).
- Calcular las posibles rutas de los metabolitos intermedios de la ruta metabólica de precipitación de calcita en *L. sphaericus*, según el análisis de modos elementales.
- Comparar los genes en la ruta metabólica más eficiente de precipitación de calcita para *L. sphaericus* con posibles rutas en *Sporosarcina* y *Bacillus* spp como posibles objetivos de optimización del proceso de biomineralización.

CAPÍTULO 3

Justificación

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) define a la biotecnología como: "La aplicación de la ciencia y la tecnología a los organismos vivos, así como a partes, productos y modelos de los mismos, para alterar materiales vivos o no, con el fin de producir conocimientos, bienes o servicios" (OECD, 2005). La biomineralización es un ejemplo de un proceso metabólico con potencial biotecnológico. La producción de calcita como producto de este proceso, tiene gran potencial para la industria de construcción. Uno de los problemas que enfrenta dicha industria es la formación de grietas en el concreto. Se puede resolver este problema mediante carbonato de calcio en forma de calcita, producida por microorganismos como *Lysinibacillus sphaericus*. Las rajaduras, en estructuras de concreto que ocurren con el tiempo, conllevan un alto costo de reparación. En ocasiones se utiliza lechada química como sustituto de cemento, pero esta alternativa tiene la desventaja de utilizar compuestos altamente tóxicos. La producción de calcita por *L. sphaericus* provee una alternativa novedosa para la reparación de grietas de forma más económica y sostenible.

Es posible optimizar el proceso metabólico de interés en un microorganismo para ser aplicado a la industria. Esto se logra mediante ingeniería genética o metabólica sobre el microorganismo, de forma que se expresen, silencien o inserten genes que beneficien la producción del metabolito deseado por la industria, así como con el diseño de vías bioquímicas que no existen en el mundo natural o con el rediseño de las vías existentes. La optimización puede darse también en la formación de consorcios de microorganismos. Para poder realizar cualquiera de estas metodologías, es necesario conocer a fondo los procesos metabólicos involucrados en la producción del metabolito específico. Para cumplir este objetivo, se cuenta con la reconstrucción de rutas metabólicas con herramientas computacionales. Este proceso nos permite dilucidar y comprender los mecanismos bioquímicos y genéticos involucrados en la producción de dicho metabolito. Esta reconstrucción generará, entre otros, un listado con estos genes y sus roles en la precipitación de calcita sentando un precedente para futuras investigaciones en la aplicación industrial de este microorganismo.

CAPÍTULO 4

Marco teórico

4.1. Biomineralización

Biomineralización es un proceso regulado por organismos vivos en el cual se combinan materia orgánica e inorgánica para la precipitación de minerales. La finalidad de este proceso en organismos es la formación de tejido duro para protección y soporte. El primer libro con un reporte sobre este proceso fue publicado en 1924 por W. J. Schmidt y en la actualidad se conocen hasta 62 diferentes minerales de distintos cationes creados por medio de este proceso. La biomineralización es un proceso ampliamente asociado con las matrices extracelulares y dispone de 6 pasos clave desde la delimitación de un espacio celular para el proceso de nucleación, hasta la detención del proceso. Los pasos intermedios constan de formación de matriz para la nucleación, la supersaturación de iones para asegurar la nucleación de un sólido inorgánico, el control de nucleación mediante agentes o aditivos y el control de formación del mineral, finalizando con la detención del proceso cuando se alcanza el límite del espacio delimitado (Chen y cols., 2019; Weiner y Dove, 2003; Achal, Mukherjee, Kumari, y Zhang, 2015).

Anteriormente, el proceso de biomineralización era conocido como calcificación. Esta denominación se mantuvo hasta los 1980s. La utilización del término calcificación se debe a la predominancia de minerales con calcio, siendo estos el 50 % de los biominerales conocidos. Los biominerales con calcio son los más abundantes de los biominerales, tanto en número como en distribución a través de los diferentes organismos vivos. Sin embargo, el término se extendió a biomineralización con la adición de biominerales de otros cationes tales como fosfatos, sulfatos, sulfitos y minerales clorados (Evans, 2019; Weiner y Dove, 2003).

4.1.1. Mecanismos de biomineralización

Se conocen tres mecanismos de biomineralización: mineralización controlada biológicamente (BCM por sus siglas en ingles); mineralización inducida biológicamente (BIM); y mineralización mediada biológicamente (BMM) (Castro-Alonso y cols., 2019).

En la BCM, la actividad metabólica del organismo controla la nucleación, la composición, la localización y la morfología de los biominerales producidos. La mineralización controlada biológicamente puede ser un mecanismo intracelular, extracelular o intercelular. El proceso intercelular se

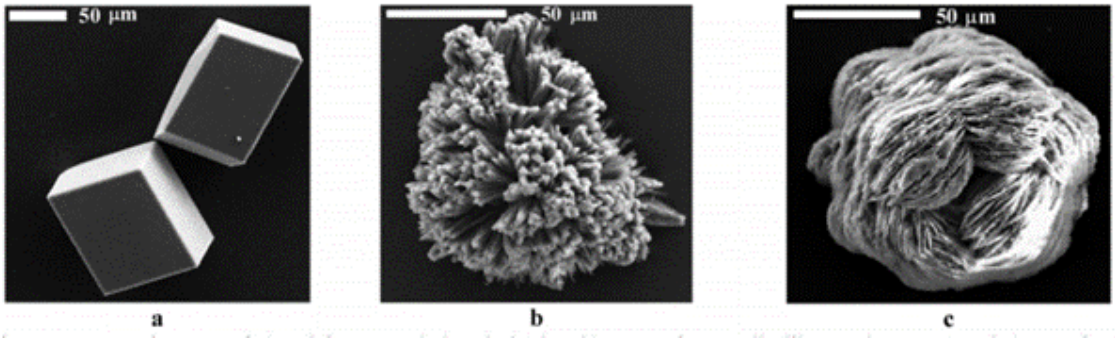
logra mediante comunicación intercelular con macromoléculas orgánicas de exopolisacáridos (EPS) o vesículas. Un ejemplo de BCM es la formación de huesos en mamíferos (Castro-Alonso y cols., 2019).

En la mineralización inducida biológicamente, la precipitación de los minerales es indirecta y ocurre debido a la interacción entre subproductos del metabolismo del organismo con iones presentes en el medio ambiente. En este mecanismo, la participación de las células del organismo en la nucleación o localización es limitada. Los minerales generados por BIM son conocidos por su baja cristalinidad y morfología y su amplio rango de tamaños. Un ejemplo de BIM es la formación de estromatolitos calcáreos y esteras microbianas. En la mineralización mediada biológicamente la formación de minerales es resultado de la interacción de matrices orgánicas con compuestos orgánicos e inorgánicos. En BMM no se necesita la actividad biológica extracelular o intracelular. Un ejemplo de BMM es la formación de cristales en la matriz extracelular sin necesidad de actividad biológica directa (Castro-Alonso y cols., 2019).

4.2. Precipitación de calcita

En el proceso de biomineralización, se pueden expresar ocho polimorfos de carbonato de calcio, de estos ocho, tres son en estado puro en su mayoría: calcita, aragonito y vaterita. En la Figura 1, se pueden observar las estructuras de polimorfos de carbonato de calcio con fotografías a través de microscopio electrónico de barrido. Se puede apreciar la estructura cuboidea rectangular de calcita, la cual la convierte en el polimorfo más estable de carbonato de calcio. Junto con aragonito y dolomita, la calcita forma el 15 % de los sedimentos terrestres. Las formas cristalinas características de la calcita son prisma, romboedro y escalenoedro. La dureza de la calcita tiene un 3/10 en la escala Mohs. La calcita ha sido ampliamente utilizada en la industria de construcción en la forma de piedra caliza y mármol. Actualmente, se utiliza la calcita en las presentaciones mezcladas de caliza y mármol para la producción de cemento y hormigón (Dietrich, 2013).

Figura 1: Tipos de polimorfismos de carbonato de calcio.



Descripción: Fotografías tomadas a través de microscopio electrónico de barrido. a) Calcita b) Aragonito c) Vaterita (Hernández-Hernández y cols., 2008)

La biomineralización, que tiene como productos finales compuestos carbonatados, puede dar cualquiera de los distintos 8 polimorfos de carbonato de calcio, pero en su mayoría se obtienen calcita, aragonito, vaterita, y sus polimorfos hidratados como monohidrocalcita o hexahidrocalcita, e, inclusive, se puede obtener carbonato de calcio amorfo. El polimorfo de $CaCO_3$ obtenido depende del microorganismo utilizado, su concentración y actividad ureasa. También depende de factores externos como pH, temperatura y concentraciones de urea y calcio. La fuente de calcio utilizada también puede afectar el polimorfo de carbonato de calcio obtenido. Con acetato de calcio se obtiene vaterita en su mayoría, al igual que con lactato de calcio. Se ha demostrado que, con cloruro de calcio,

se obtiene una menor absorción de agua y una mayor producción de calcita que con acetato de calcio o con nitrato de calcio (Chaparro-Acuña, Becerra-Jiménez, Martínez-Zambrano, y Rojas-Sarmiento, 2018; Anbu, Kang, Shin, y So, 2016).

La precipitación de calcita inducida por microbios o MICP por sus siglas en inglés es el proceso de biomineralización o formación de cristales de carbonato de calcio de forma biológica. Ocurre a partir de una solución saturada, tanto de iones de calcio, como de productos metabólicos de carbonato. El proceso se lleva a cabo cuando la célula del microorganismo secreta $CO_3{}^{2}$- y reacciona con iones de calcio que se encuentran en el ambiente, llevando a la precipitación de calcita insoluble. La precipitación de calcita es un proceso extracelular, aunque estudios recientes han encontrado que ocurre este proceso de forma intracelular en cianobacteria y *Achromatium oxaliferum*(Castro-Alonso y cols., 2019; Anbu y cols., 2016; Chaparro-Acuña y cols., 2018).

La precipitación de calcita es un proceso que puede ocurrir a través del seguimiento de distintos procesos metabólicos dependiendo del microorganismo que esté produciendo el mineral. Se ha demostrado precipitación de calcita en rutas metabólicas como fotosíntesis, hidrólisis de urea, oxidación anaeróbica de sulfitos y formación de polímeros extracelulares. A pesar de todas estas rutas metabólicas, la más ampliamente distribuida y mejor estudiada con la precipitación de carbonato de calcio es la hidrólisis de urea. La actividad de ureasa influencia el proceso de formación de minerales mediante los parámetros de pH, concentración de carbonos inorgánicos disueltos (DIC), concentración de iones de calcio y sitios de nucleación (Castro-Alonso y cols., 2019; Anbu y cols., 2016; Chaparro-Acuña y cols., 2018).

4.3. Metabolismos implicados en la precipitación de calcita

El proceso de precipitación de calcita ha sido estudiado desde distintas rutas metabólicas en la búsqueda de mejoramiento de este proceso con finalidades industriales. Se ha encontrado que rutas metabólicas tales como hidrólisis de urea, amonificación de aminoácidos, desnitrificación, reducción anaeróbica de sulfitos y fotosíntesis se encuentran implicadas en el proceso de formación de carbonato de calcio. De estas rutas, la hidrólisis de urea es la ruta metabólica menos compleja, y la que demuestra una mayor precipitación de calcita (entre 20 % y 80 % más que el resto de las rutas metabólicas); por lo tanto, es la vía más estudiada y aplicada en la industria (J. Wang, Soens, Verstraete, y De Belie, 2014).

4.3.1. Hidrólisis de urea

La hidrólisis de urea es una serie de reacciones mediadas por la ureasa (EC 3.5.1.5) y la anhidrasa carbónica (EC 4.2.1.1). La hidrólisis de urea es un proceso que ocurre en dos etapas mediadas por la ureasa. En la primera etapa, un mol de urea se hidroliza a amoniaco y carbamato (reacción 1). En la fase siguiente el carbamato se hidroliza a amoniaco y ácido carbónico (reacción 2). La anhidrasa carbónica convierte el ácido carbónico en bicarbonato (reacción 3) y los moles de amoniaco se convierten en amonio por hidrólisis (reacción 4). Luego, el bicarbonato busca estabilidad y reacciona dando lugar al ion carbonato y agua, utilizando los iones hidrógeno de la conversión a bicarbonato y los iones hidroxilo de la hidrólisis de amoniaco (reacción 5). Los iones hidroxilo restantes aumentan el pH del medio. Por último, el ion carbonato creado reacciona con un ion de calcio formando carbonato de calcio (reacción 6). El amonio y carbonato son liberados del citoplasma celular y al entrar en contacto con los iones de calcio, atraídos por la carga negativa de la superficie celular, se forma el precipitado de carbonato de calcio de forma extracelular (Dhami, Alsubhi, Watkin, y Mukherjee, 2017; Chou, Aydilek, Seagren, y Maugel, 2008; Castro-Alonso y cols., 2019).

$$CO(NH_2)_2 + H_2O \rightarrow NH_2COOH + NH_3 \quad (1)$$

$$NH_2COOH + H_2O \rightarrow NH_3 + H_2CO_3 \text{ (2)}$$

$$H_2CO_3 \leftrightarrow HCO_3^- + H^+ \text{ (3)}$$

$$2NH_3 + 2H_2O \rightarrow 2NH_4^+ + 2OH^- \text{ (4)}$$

$$HCO_3^- + H^+ + 2OH^- \rightarrow CO_3^{2-} + 2H_2O \text{ (5)}$$

$$Ca^{2+} + CO_3^{2-} \rightarrow CaCO_3 \text{ (6)}$$

Las ureasas (EC 3.5.1.5) pertenecen a la superfamilia de las amilohidrolasas y fosfotriesterasas. Son metaloenzimas citoplasmáticas con níquel en su centro activo. Por otro lado, la anhidrasa carbónica (EC 4.2.1.1) es también una metaloenzima, pero utiliza zinc en lugar de níquel en su centro activo (Nelson y Cox, 2018).

La enzima ureasa se encuentra conformada por tres subunidades codificadas por los genes *ureC, ureB* y *ureA*. Estas conforman la holoenzima ureasa. Los genes *ureD, ureF* y *ureG* conforman el complejo UreDFG. Tres complejos UreDFG se unen al complejo UreABC para la incorporación de níquel al centro activo de la holoenzima y así formar una ureasa madura. Finalmente, el gen *ureE* conforma un donador de níquel que coloca el níquel en el centro de la enzima y desacopla los complejos de las proteínas accesorias para formar así una ureasa activa (Ma, Pang, Luo, Lu, y Lin, 2020).

4.3.2. Amonificación de aminoácidos

Otro mecanismo utilizado por microorganismos para la precipitación de calcita es la amonificación de aminoácidos. Primero se metabolizan los distintos aminoácidos con oxígeno molecular, obteniendo amoniaco, dióxido de carbono y agua (reacción 7). El amoniaco, producido con la reacción anterior, se hidroliza, dando lugar a amonio y a iones hidroxilo (reacción 8). El dióxido de carbono reacciona con los iones hidroxilo dando lugar a carbonato (reacción 9). El carbonato al encontrarse con calcio en la superficie celular da lugar a precipitación de carbonato de calcio (reacción 10) (Li, Fu, Zhang, Achal, y Kawasaki, 2015; Castro-Alonso y cols., 2019).

$$\text{Aminoácidos} + O_2 \rightarrow NH_3 + CO_2 + H_2O \text{ (7)}$$

$$NH_3 + H_2O \rightarrow NH_4 + OH^- \text{ (8)}$$

$$CO_2 + OH^- \rightarrow HCO_3^- \text{ (9)}$$

$$Ca^{2+} + HCO_3^- \rightarrow CaCO_3 + H^+ \text{ (10)}$$

4.3.3. Desnitrificación

El proceso de desnitrificación lleva a tener precipitación de calcita como resultado a la oxidación de materia orgánica con NO^{3-} como aceptor final de electrones. El ambiente alcalino necesario para la producción del mineral se crea porque la célula consume los iones de hidrógeno en presencia de iones de Calcio. El proceso de desnitrificación es menos eficiente que la hidrólisis de urea para la precipitación de calcita. La desnitrificación se inhibe debido a acumulación de subproductos tóxicos para la célula, tales como nitrito y óxido nitroso (Zhu y Dittrich, 2016; Ersan, Boon, y De Belie, 2018).

4.3.4. Fotosíntesis

Se ha demostrado la capacidad de precipitación de calcita en microorganismos autotróficos tales como cianobacterias y microalgas. Estos microorganismos son los responsables de la producción de carbonato de calcio en ambientes acuáticos. El proceso MICP por fotosíntesis ocurre por el intercambio constante entre bicarbonato y carbonato. El bicarbonato se difunde por membrana hacia el interior celular y se disocia en el citosol por actividad enzimática de la anhidrasa carbónica. Esta disociación conlleva un aumento del pH, lo cual induce la precipitación de calcita al entrar en contacto el carbonato con iones de calcio. La fotosíntesis requiere un constante y directo contacto con dióxido de carbono y luz solar, por lo que no es la técnica utilizada en la industria de construcción (Rajasekar, Loo Chin Moy, y Wilkinson, 2017; Achal y cols., 2015).

4.4. Aplicaciones de la biomineralización y precipitación de calcita

El proceso de precipitación de carbonato de calcio inducido por microorganismos (MICP) es una tecnología efectiva y amigable al medio ambiente con distintas aplicaciones. La formación de calcita y otros minerales por medio de biomineralización puede ser utilizada para resolver problemas ambientales como: remoción de metales pesados, bioconsolidación de suelos y secuestro de dióxido de carbono. La biomineralización tiene aplicaciones industriales también como producción de bioconcreto para construcción o bien construcción de espacios de almacenamiento para compuestos orgánicos tóxicos como los bifenilos policlorados (PCBs)(Anbu y cols., 2016).

4.4.1. Remoción de metales pesados

El aumento de actividades antropogénicas desde la Revolución Industrial ha llevado a un aumento de la concentración de metales pesados en afluentes de agua y suelos, e inclusive en los tejidos de animales y plantas. Los seres vivos necesitan de algunos metales pesados en bajas concentraciones para su supervivencia. Sin embargo, en altas concentraciones estos metales resultan tóxicos. El mayor problema de los metales pesados es la bioacumulación. Existen tratamientos tradicionales para metales pesados tales como la adsorción, precipitación química, tratamientos electroquímicos y evaporación. Estos tratamientos tradicionales son ineficientes porque se necesita una alta concentración de químicos para llevarlos a cabo, lo cual genera contaminación adicional. Otra desventaja es que se necesita un alto gasto de energía y su costo es elevado, lo cual no los hace una alternativa atractiva a la industria para el tratamiento de desechos (Anbu y cols., 2016; Chaparro-Acuña y cols., 2018).

Se han descubierto, además, alternativas de tratamientos con la utilización de microorganismos para la remoción de metales pesados. Entre las alternativas biológicas, se encuentran fitorremediación, biocoagulación, biolixiviación o bien bioinmovilización. Estas alternativas han probado ser ineficientes hasta cierto grado debido a su alto costo, la alta cantidad de tiempo que toman para mostrar efecto y la devolución final de los metales pesados inmovilizados o bien coagulados al medio ambiente, de forma que no hubo una eficiencia en la remoción (Anbu y cols., 2016; Chaparro-Acuña y cols., 2018).

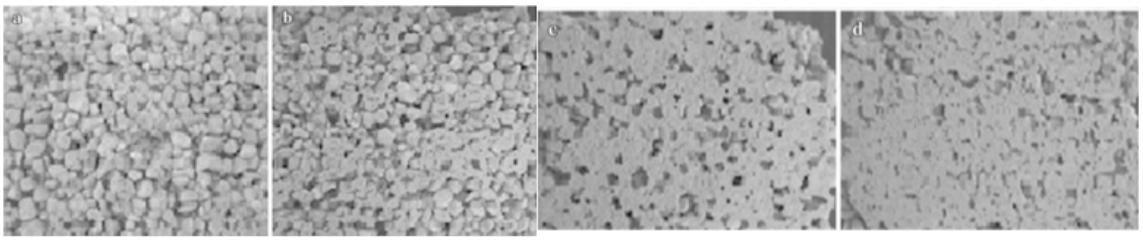
La remoción de metales pesados con MICP puede ocurrir mediante precipitación directa, donde se forma carbonato metálico, o por co-precipitación, en la que metales tales como Cu^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+} y Fe^{2+} pueden ser incorporados en la estructura reticular de la calcita en lugar de Ca^{2+} por medio de sustitución de cationes divalentes. Esto ocurre cuando el metal pesado se adhiere a la superficie del mineral por medio del intercambio de iones entre metal pesado y calcio. Se ha demostrado que el plomo y mercurio pueden ser removidos del suelo por medio de este

mecanismo. La utilización de MICP para remoción de metales pesados del suelo presenta la ventaja de la formación de cristales de manera que los metales quedan en estado insoluble, atrapados en la red de calcita. Estos depósitos de metal y calcita limitan la lixiviación de metales al entorno, lo que evita la bioacumulación de estos. La remoción de metales pesados necesita un microorganismo tolerante a la toxicidad de estos elementos y con actividad ureasa para la producción de calcita (Eltarahony, Zaki, y Abd-El-Haleem, 2020; Anbu y cols., 2016; Chaparro-Acuña y cols., 2018; Torres-Aravena y cols., 2018).

4.4.2. Bioconsolidación de suelos

La bioconsolidación de suelos es la forma de la ingeniería geotécnica de estabilizar y prevenir la erosión de suelos y de aumentar su estabilidad. Tradicionalmente, se realiza la bioconsolidación por medio de adición de químicos al suelo. La técnica conservadora tiene la problemática de ser contaminante, por los químicos que usa. Es una técnica costosa y la distribución de los químicos es poco uniforme y requiere de equipo especializado, normalmente costosos. La precipitación de calcita inducida por microorganismos ha probado ser una técnica valiosa para la bioconsolidación de suelos: tiene un menor costo que la adición de químicos. En la Figura 2 se puede observar mediante micrografía electrónica de barrido como disminuye la porosidad del suelo tratado con *L. sphaericus*, mostrando una superficie más regular y estable. Al disminuir la porosidad del suelo, MICP ofrece la ventaja de disminuir su impermeabilidad y aumentarla dureza del suelo tratado (Carmona, Oliveira, y Lemos, 2016; Canakci, Sidik, y Kilic, 2015).

Figura 2: Micrografía electrónica de barrido de suelo consolidado por MICP



Descripción: Micrografía electrónica de barrido que muestra el suelo bioconsolidado de *L. sphaericus* WJ-8. a Agua, b Medios YAU, c solo célula vegetativa, d célula vegetativa y espora (Anbu y cols., 2016).

4.4.3. Secuestro de dióxido de carbono

Este aumento de dióxido de carbono, debido al desarrollo industrial, tiene como consecuencia el calentamiento global. Actualmente, se estima que tenemos una concentración de 400ppm de dióxido de carbono causado por la industria y esta cantidad aumenta a una tasa de 2ppm/año (Schmidt, 2017). El aumento de concentración de dióxido de carbono en la atmósfera se debe a prácticas como la quema de combustibles fósiles, la producción de cemento y la deforestación tropical. Aunque la captura de dióxido de carbono es un proceso que se da en la naturaleza, este se suele medir en una escala de tiempo geológico. Por ello, se ha intentado aplicar la biomineralización como técnica de captura de CO2 utilizando anhidrasa carbónica modificada genéticamente para alcanzar una mejor tasa de conversión y obtener calcita en el proceso (Dhami, Reddy, y Mukherjee, 2014).

4.4.4. Otras áreas de aplicación para biomineralización

La precipitación de calcita inducida por microorganismos ha probado tener distintas aplicaciones en la industria. Por ejemplo, la calcita obtenida de *Geobacillus thermoglucosidasius* ha demostrado

utilidad como relleno de caucho y plásticos, partículas fluorescentes en tinta y marcadores estacionarios para transferencia Western, entre otras aplicaciones para bioquímica (Yoshida, Higashimura, y Saeki, 2010; Okwadha y Li, 2011).

Los aceites de transformadores eléctricos contienen bifenilos policlorados (PCB), compuestos orgánicos altamente tóxicos, que son una preocupación ambiental y para la salud humana. Aunque existen diversas técnicas de tratamiento para PCBs, estos son tratamientos de encapsulación y no de eliminación. MICP provee una alternativa para crear áreas selladas para la contención de PCBs de forma que no se tenga lixiviación de estos compuestos orgánicos al suelo (Okwadha y Li, 2011).

4.5. Bioconcreto

El cemento es utilizado como material de construcción para fortalecer el suelo. Pero la producción de cemento tiene un alto impacto ambiental en cada etapa de su producción. A nivel global, la producción de cemento conlleva el 5 % del total de energía industrial y es responsable del 8.6 % de dióxido de carbono producido por actividades antropogénicas (Miller, Horvath, y Monteiro, 2016). La alternativa al cemento para fortalecer el suelo es la utilización de una lechada química. La lechada química se compone de silicato de sodio, cloruro de calcio, hidróxido de calcio, acrilatos y acrilamidas. Sus componentes, hacen que la lechada química sea un proceso altamente costoso y tóxico, tanto para el ser humano, como para el ambiente (Stabnikov y cols., 2013).

La precipitación de calcita inducida por microorganismos permite sellar las fracturas de apertura fina ($<100\mu$m) de una estructura, mejorar la resistencia del material y aumentar la durabilidad de este (Tobler, Minto, El Mountassir, Lunn, y Phoenix, 2018). Todo esto debido a que disminuye la adsorción de agua del material. En 1990, JP Adolphe y su equipo patentaron la técnica de restauración de piedra ornamental con MICP bajo el nombre de "biodeposición", esta patente expiró en 2010 (Adolphe, Loubière, Paradas, y Soleilhavoup, 1990). Actualmente, se denomina a este material bioconcreto. El bioconcreto es definido como concreto preparado con microorganismos con la capacidad de precipitar carbonato de calcio, esto con finalidad de sellar las grietas que puedan ir apareciendo en el cemento. A esta facultad se le llama autocuración, y es lo que hace al bioconcreto una alternativa atractiva al cemento tradicional. El bioconcreto no solo se repara a sí mismo (permitiendo una reducción de gastos de reparación), sino que su fabricación es más sostenible que el cemento tradicional (Stabnikov y cols., 2013; Seifan y cols., 2016). Asimismo, reduce la permeabilidad del cemento, disminuyendo su desgaste por congelación y descongelación. Además, participa en la protección de superficies de concreto contra el ingreso de sustancias nocivas (Anbu y cols., 2016; Chaparro-Acuña y cols., 2018; Castro-Alonso y cols., 2019).

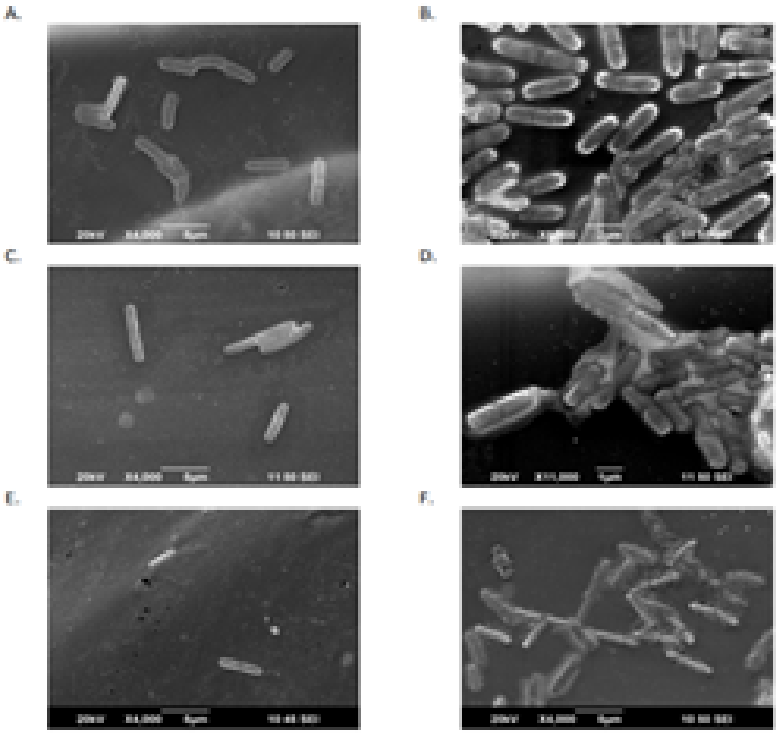
4.6. Género *Lysinibacillus*

El género *Lysinibacillus* era inicialmente designado como *Bacillus*. Pertenecen a la familia *Bacillaceae* y al filo Firmicutes. Las bacterias pertenecientes a este género son Gram positivas, ubicuas, móviles, aeróbicas o anaeróbicas facultativas. Son bacilos con forma de varilla y forman endosporas. Se reconocen 26 especies reportadas en este género. Este género ha despertado interés en investigación porque ha demostrado capacidades como biopesticida, biorremediación, capacidad antimicrobiana y baja patogenicidad en humanos. La especie más estudiada de este género es *L. sphaericus* (Kayath y cols., 2019).

4.6.1. *Lysinibacillus sphaericus*

L. sphaericus es una bacteria mesófila y anaerobia facultativa. En la Figura 3 se puede visualizar la morfología de bacilo con forma de varilla de tres cepas de *L. sphaericus* en condiciones de exposición y no exposición a plomo. Ha demostrado utilidad en industria de control de plagas mediante su capacidad de biopesticida. *L. sphaericus* es altamente toxica para larvas de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus*, ambos vectores para enfermedades tropicales, como el dengue. Además, *L. sphaericus* ha demostrado tolerancia a metales pesados, siendo posible su utilización para biorremediación y remoción de metales como níquel, hierro, mercurio y arsénico. *L. sphaericus* es capaz de precipitar calcita, lo cual la convierte en una especie de interés para estudios con aplicaciones de biomineralización, incluyendo bioconcreto (Farrugia, Borg, Ferrara, y Buhagiar, 2019; Gomez-Garzon y cols., 2017).

Figura 3: Morfología de *L. sphaericus* bajo distintas condiciones



Descripción: Cambios morfológicos para *L. sphaericus* CBAMS (A y B), Ot4b31 (C y D) y 3(III)7 (E y F) crecidos en presencia (B, D y F) y ausencia (A, C y E) de plomo (Bojaca Bautista, 2014).

4.7. Modelado de rutas metabólicas

Una ruta metabólica es una red de reacciones químicas que explican la transformación de una molécula inicial a una molécula final, mostrando los metabolitos intermedios creados durante las reacciones químicas del proceso y a las enzimas que catalizan las reacciones químicas intermedias. Las rutas metabólicas tienen como componentes a distintas enzimas, cofactores, sustratos y productos. Con ayuda de las rutas metabólicas, se pueden dilucidar mecanismos esenciales de la fisiología celular del organismo de interés (Qi, Li, y Cheng, 2014).

La reconstrucción o modelado computacional de rutas metabólicas permite la comprensión más detallada de las rutas metabólicas y encontrar mecanismos moleculares de interés según el organismo y área de investigación. La utilización de herramientas computacionales para la reconstrucción de mecanismos biológicos facilita su estudio y acelera investigaciones en áreas como farmacia, evolución y biotecnología. Mediante la reconstrucción *in silico* de rutas metabólicas se identifican genes esenciales, la distribución de recursos y/o el rendimiento de esa ruta. Para la reconstrucción de rutas metabólicas se cuentan con distintas estrategias dependiendo de los datos iniciales disponibles en cada estudio. Las rutas metabólicas se pueden reconstruir con herramientas computacionales siguiendo modelos matemáticos como la teoría de grafos y modelado estequiométrico (Franco, 2020; Seo y Lewin, 2009).

4.7.1. Modelado estequiométrico

Un sistema metabólico se puede definir como un sistema lineal de ecuaciones e inecuaciones con los flujos metabólicos o reacciones químicas como variables. Para realizar este análisis matemático del metabolismo se supone que las concentraciones de los metabolitos del sistema son constantes. El objetivo de definir una ruta metabólica como un sistema matemático es determinar el espacio de soluciones, es decir las reacciones químicas que ocurren en esta ruta metabólica y encontrar la ruta más eficiente o la más lógica utilizada por el organismo de interés (Peters y cols., 2019).

4.7.2. Teoría de grafos

A partir del modelo estequiométrico de cierta ruta metabólica se puede formar un grafo de dicha ruta. Un grafo es un término matemático para un conjunto de puntos llamados vértices o nodos con líneas que unen pares de vértices llamadas ramas. La teoría de grafos es una teoría matemática desarrollada por Leonhard Euler en el siglo XVIII como una rama de topología algebraica. Los grafos según esta teoría son utilizados para representar un proceso o relación funcional. La teoría de grafos permite una abstracción matemática de las rutas metabólicas representando las enzimas como ramas y a los metabolitos como nodos. Esta abstracción facilita el estudio de las rutas metabólicas, de forma que se pueden apreciar de forma gráfica simplificada y por lo tanto facilitar su análisis por modo elemental (Bocanegra Silva, s.f.; Cardozo, Gómez, y Parras, 2009).

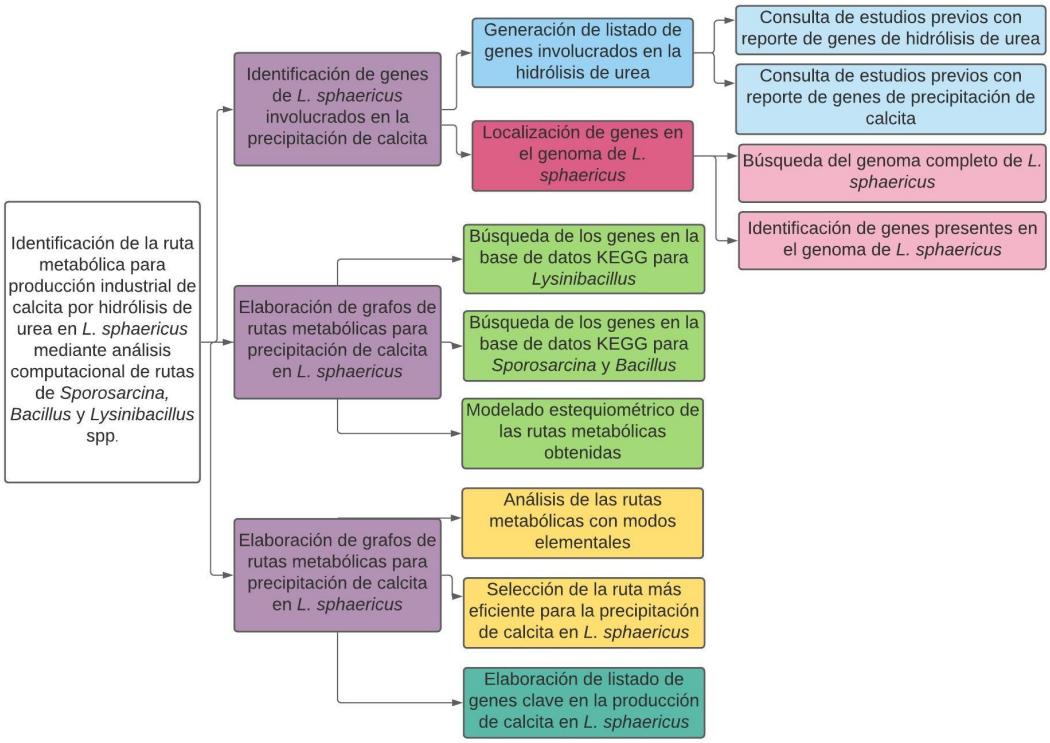
4.7.3. Análisis del modo elemental

Los modos elementales son un conjunto de vías con todas las posibles distribuciones de flujo que la red puede lograr inherentemente. Este conjunto es representativo de las vías posibles dentro de una ruta metabólica y se calcula mediante la matriz estequiométrica de esta. Como una herramienta para la bioquímica, el análisis del modo elemental descompone una ruta metabólica compleja en rutas organizadas. Estas rutas organizadas representan el uso mínimo de reacciones químicas manteniendo el funcionamiento del metabolismo celular como unidad independiente. En caso de que alguna reacción del modo elemental fuera eliminada, esta ruta dejaría de funcionar. El análisis del modo elemental permite entender fácilmente la fisiología celular e igualmente simplifica la implementación de ingeniería metabólica en la ruta estudiada. Este análisis aplicado al metabolismo celular nos permite visualizar que ruta metabólica, representada por cada modo elemental, seguirá un microorganismo. Un microorganismo elige la vía más corta hacia el producto de la ruta, esto debido a que representa un costo energético menor. Por ello modo elemental a seleccionar para este estudio será el que conlleve una menor serie de pasos, es decir la ruta metabólica más eficiente hacia la producción de calcita (Franco, 2020; Trinh, Wlaschin, y Srienc, 2009; Schuster, Hilgetag, Woods, y Fell, 2002; Wang, Dash, Ng, y Maranas, 2017).

CAPÍTULO 5

Metodología

Figura 4: Esquema de metodología



Descripción: Diagramación de metodología acorde a objetivos específicos. El objetivo específico 1 se encuentra en color azul, el objetivo específico 2 en color rojo, el objetivo específico 3 en verde, el 4 en amarillo y el objetivo 5 en turquesa. Fuente: Autoría propia.

5.1. Sitio de estudio

El estudio se llevó a cabo en la ciudad de Guatemala, Guatemala.

5.2. Sujetos de estudio

Los sujetos de estudio son los genes de *Lysinibacillus sphaericus* involucrados en la ruta metabólica de producción de calcita mediante hidrólisis de urea y que se encuentran en el genoma reportado por Yan, Xiao y Zhang en 2017.

5.3. Enfoque, diseño y tipo de investigación

Esta investigación tuvo un enfoque de modelo cualitativo, y un diseño no experimental.

5.4. Tipo y tamaño de muestra

Se usaron secuencias de genes involucrados en la ruta metabólica de producción de calcita extraídas de bases de datos seleccionadas de manera discrecional.

5.5. Criterios de inclusión y exclusión

Se excluyeron los genes que no tienen relación con la ruta metabólica de precipitación de calcita por hidrólisis de urea y aquellos genes que, perteneciendo a esta ruta metabólica, no se encuentren en el genoma de *Lysinibacillus sphaericus*. Se incluyeron los genes reportados en literatura previa, que se encuentraron en el genoma de *L. sphaericus* y pertenecen a la ruta metabólica de precipitación de calcita por hidrólisis de urea.

5.6. Variables

Cuadro 1: Variables para la identificación de genes de *Lysinibacillus sphaericus* involucrados en la precipitación de calcita

Variable	Definición	Tipo	Unidades de medición
Reporte para hidrólisis de urea	El gen se encuentra reportado como parte de ruta metabólica de hidrólisis de urea	Cualitativo	Si/No
Reporte para precipitación de calcita	El gen se encuentra reportado como parte de ruta metabólica de precipitación de calcita	Cualitativo	Si/No
Pertenencia al genoma de *L. sphaericus*	El gen se encuentra en el genoma de *L. sphaericus*	Cualitativo	Si/No
Nombre del gen	Nombre del gen que pasó por los filtros aplicados	Cualitativo	-
Código del gen	Código de identificación para NCBI, EBI y DDBJ	Cualitativo	-

Cuadro 2: Variables para la elaboración de grafos de rutas metabólicas para precipitación de carbonato de calcio en *L. sphaericus*.

Variable	Definición	Tipo	Unidades de medición
Nombre del gen	Nombre del gen que pasó por los filtros aplicados	Cualitativo	-
Pertenencia del metabolito a ruta metabólica de precipitación de calcita	El metabolito se encuentra como parte de la ruta metabólica de precipitación de calcita	Cualitativo	Si/No
Pertenencia de la enzima a ruta metabólica de precipitación de calcita	La enzima se encuentra como parte de la ruta metabólica de precipitación de calcita	Cualitativo	Si/No
Pertenencia del cofactor a la ruta metabólica de precipitación de calcita	El cofactor se encuentra como parte de la ruta metabólica de precipitación de calcita	Cualitativo	Si/No

Cuadro 3: Variables para la elección del modelo idóneo para la ruta metabólica de precipitación de calcita en *L. sphaericus*.

Variable	Definición	Tipo	Unidades de medición
Número de reacciones químicas	Número de reacciones químicas involucrados en el modo elemental	Cuantitativo	Cantidad de reacciones químicas.
Nombre de enzima	Nombre de enzima que participa en la ruta metabólica señalada	Cualitativo	-
Nombre de cofactor	Nombre del cofactor que participa en la ruta metabólica señalada	Cualitativo	-
Nombre del gen	Nombre del gen que se encuentra involucrado en la ruta metabólica señalada	Cualitativo	-
Código del gen	Código de identificación para NCBI del gen que se encuentra involucrado en la ruta metabólica señalada	Cualitativo	-

5.7. Hipótesis

5.7.1. Hipótesis de investigación:

Es posible la identificación de la ruta metabólica más eficiente en *L. sphaericus* para producción de calcita por hidrólisis de urea mediante análisis computacional genético de *Sporosarcina, Bacillus* y *Lysinibacillus* spp. con la finalidad de optimizar la producción industrial.

- Hipótesis nula 1:
  - No existen genes reportados de diferentes rutas metabólicas para *Sporosarcina, Bacillus* y *Lysinibacillus* spp. involucrados en los procesos de hidrólisis de urea para precipitación de calcita.
- Hipótesis alternativa 1:
  - Existen genes reportados de diferentes rutas metabólicas para *Sporosarcina, Bacillus* y *Lysinibacillus* spp. involucrados en los procesos de hidrólisis de urea para precipitación de calcita.
- Hipótesis nula 2:
  - No es factible elaborar los grafos de las rutas metabólicas de precipitación de calcita a partir de los genes clave encontrados en los genomas reportados de *L. sphaericus*.
- Hipótesis alternativa 2:
  - Es factible elaborar los grafos de las rutas metabólicas de precipitación de calcita a partir de los genes clave encontrados en los genomas reportados de *L. sphaericus*.
- Hipótesis nula 3:
  - No se pueden representar las posibles rutas metabólicas de precipitación de calcita en *L. sphaericus* en modelos estequiométricos bioquímicos.
- Hipótesis alternativa 3:
  - Se pueden representar las posibles rutas metabólicas de precipitación de calcita en *L. sphaericus* en modelos estequiométricos bioquímicos.
- Hipótesis nula 4:
  - El análisis de modos elementales no permite calcular las posibles rutas de los metabolitos intermedios de la ruta metabólica de precipitación de calcita en *L. sphaericus*.

- Hipótesis alternativa 4:
  - El análisis de modos elementales permite calcular las posibles rutas de los metabolitos intermedios de la ruta metabólica de precipitación de calcita en *L. sphaericus*.

- Hipótesis nula 5:
  - La comparación de las rutas metabólicas analizadas por modos elementales no permite encontrar la ruta más eficiente de precipitación de calcita en *L. sphaericus*.

- Hipótesis alternativa 5:
  - La comparación de las rutas metabólicas analizadas por modos elementales permite encontrar la ruta más eficiente de precipitación de calcita en *L. sphaericus*.

- Hipótesis nula 6:
  - La generación del listado de los genes involucrados en el camino seleccionado de precipitación de calcita en *L. sphaericus* no proporciona posibles blancos de modificación genética para producción de calcita a nivel industrial

- Hipótesis alternativa 6:
  - La generación del listado de los genes involucrados en el camino seleccionado de precipitación de calcita en *L. sphaericus* proporciona posibles blancos de modificación genética para producción de calcita a nivel industrial

- Hipótesis nula 7:
  - La generación del listado de los genes involucrados en el camino seleccionado de precipitación de calcita en *L. sphaericus* no permite modelar posibles consorcios con *Sporosarcina, Bacillus* y *Lysinibacillus* spp. para producción de calcita a nivel industrial.

- Hipótesis alternativa 7:
  - La generación del listado de los genes involucrados en el camino seleccionado de precipitación de calcita en *L. sphaericus* permite modelar posibles consorcios con *Sporosarcina, Bacillus* y *Lysinibacillus* spp. para producción de calcita a nivel industrial.

5.8. Bioética

Para llevar a cabo este estudio se contó con la autorización del departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala. No se requirió de una revisión de bioética para este estudio. La elección de los géneros de bacterias que se usaron en este estudio se fundamentó en cepas productoras de calcita obtenidas en los terrenos de Cementos Progreso S.A. y analizadas por el Centro de Estudios en Biotecnología (CEB) de la Universidad del Valle de Guatemala. Se contó con la aprobación de ambas instituciones para la realización de este estudio. Cabe mencionar que la metodología que se empleó para poder cumplir con los objetivos descritos anteriormente, son de mi conocimiento o conté con asesores que conocen a profundidad los métodos a realizar.

5.9. Materiales y métodos

1. Identificación de genes de *Lysinibacillus sphaericus* involucrados en la precipitación de calcita

   I Generación de listado de genes involucrados en hidrólisis de urea en los géneros *Sporosarcina, Bacillus* y *Lysinibacillus*

   1) Consulta de estudios previos con reporte de genes de hidrólisis de urea
   Se realizó una búsqueda de literatura con reporte de genes de hidrólisis de urea de la siguiente forma:
   - Se buscó en estudios previos almacenados en literatura en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) y Google Scholar con las palabras clave en inglés "hidrólisis de urea" (ureolysis), "genes", además de *"Lysinibacillus", "Sporosarcina"* o *"Bacillus"* unidos por el operador lógico "AND".
   - Los términos de búsqueda variaron dependiendo de los resultados de las búsquedas anteriores, de forma que se adaptaron a encontrar una mayor cantidad y mejor calidad de resultados.
   - Se generó un listado de los genes reportados en dichos estudios, con sus códigos de acceso a GenBank de NCBI, EBI y DDBJ.
   Se utilizó una adaptación de la metodología descrita por (Dalmer y Clugston, 2019; Johns y cols., 2014).

   2) Consulta de estudios previos con reporte de genes en precipitación de carbonato de calcio
   Se realizó una búsqueda de literatura con reporte de genes de precipitación de carbonato de calcio de la siguiente forma:
   - Se buscó en estudios previos almacenados en literatura en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) y Google Schoolar con las palabras clave en inglés "precipitación de carbonato de calcio", "genes", además de *"Lysinibacillus", "Sporosarcina"* o *"Bacillus"* unidos por el operador lógico "AND".
   - Los términos de búsqueda variaron dependiendo de los resultados de las búsquedas anteriores, de forma que se adaptaron a encontrar una mayor cantidad y mejor calidad de resultados.
   - Se generó un listado de los genes reportados en dichos estudios con su código de acceso a GenBank de NCBI, EBI y DDBJ Se utilizó una adaptación de la metodología descrita por (Dalmer y Clugston, 2019; Johns y cols., 2014).

   II Localización de genes en el genoma de *Lysinibacillus sphaericus*

   1) Búsqueda de genoma completo de *Lysinibacillus sphaericus*
   Se realizó la búsqueda del genoma completo de *Lysinibacillus sphaericus*:
   - Se ingresó a la página de inicio de NCBI mediante el enlace
   https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
   - Se escribió en la barra de búsqueda las palabras *Lysinibacillus sphaericus*
   - Se buscó en la base de datos llamada genomas.
   - Se selecciónó la opción de genoma, que únicamente presenta un resultado según esta búsqueda. Este resultado corresponde al publicado por Yan, Xiao y Zhang en 2017.
   Se utilizó una adaptación de la metodología descrita por (Altschul, Gish, Miller, Myers, y Lipman, 1990).

   2) Identificación de genes presentes en el genoma de *Lysinibacillus sphaericus*
   - Se realizó un alineamiento local con la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, por sus siglas en inglés) (Altschul y cols., 1990).
   - Se introdujo el código o secuencia de cada gen descrito en el listado previamente generado, como secuencia de consulta, y se realizó el alineamiento con el parámetro de "Secuencias muy similares" y con parámetros estándar en la puntuación de la alineación, según Franco, 2020.
   Se utilizó la metodología descrita por (Altschul y cols., 1990).

2. Elaboración de grafos de rutas metabólicas para precipitación de carbonato de calcio en *L. sphaericus*.

   I Búsqueda de los genes en la base de datos KEGG para *Lysinibacillus*

   Para llevar a cabo la elaboración de grafos de rutas metabólicas se siguió el siguiente procedimiento basado en la metodología descrita por (Franco, 2020; Kanehisa y Goto, 2000).

   - Se ingresó a la base de datos Enciclopedia Kyoto para Genes y Genomas (KEGG, por sus siglas en inglés) con el siguiente enlace:

   https://www.genome.jp/kegg/?sess=ebfe2ad23e021e38540f798c803dd061 (Kanehisa y Goto, 2000; Kanehisa, 2019).

   - Se utilizó como datos de entrada los nombres de los genes identificados con el alineamiento anterior

   - Se buscó los genes en las rutas obtenidas por la herramienta KEGG obteniendo un gráfico final con la información general del metabolismo de *Lysinibacillus sphaericus*

   - Se extrajo un subgrafo con la información relacionada con los genes identificados en la precipitación de calcita en *L. sphaericus*.

   II Búsqueda de los genes en la base de datos KEGG para *Sporosarcina* y *Bacillus*

   Para llevar a cabo la elaboración de grafos de rutas metabólicas se siguió el siguiente procedimiento basado en la metodología descrita por (Franco, 2020; Kanehisa y Goto, 2000):

   - Se ingresó a la base de datos Enciclopedia Kyoto para Genes y Genomas (KEGG, por sus siglas en inglés) con el siguiente enlace:

   https://www.genome.jp/kegg/?sess=ebfe2ad23e021e38540f798c803dd061

   - Se utilizó como datos de entrada los nombres de los genes identificados con la consulta de estudios previos

   - Se buscaron los genes en las rutas obtenidas por la herramienta KEGG obteniendo un gráfico final con la información general del metabolismo de *Sporosarcina* y *Bacillus* spp.

   III Modelado estequiométrico de las rutas metabólicas obtenidas Para modelar matemáticamente las rutas metabólicas de precipitación de calcita se siguió el siguiente procedimiento basado en la metodología descrita por (Franco, 2020; Trinh y cols., 2009):

   - Se anotaron los coeficientes obtenidos por la base de datos KEGG para cada metabolito de las reacciones involucradas en la precipitación de calcita en *L. sphaericus*.

   - Se anotaron los metabolitos (sustratos, productos y cofactores) en las filas de una matriz.

   - Se anotaron las reacciones como las columnas de la matriz.

   - Se resolvió la matriz, por lo que si es posible para *L. sphaericus* realizar esta ruta metabólica.

3. Elección de la ruta metabólica más eficiente para precipitación de calcita en *L. sphaericus*.

   I Análisis de las rutas metabólicas con modos elementales.

   - Se analizó la información obtenida por los modelos estequiométricos con la herramienta CellNetAnalyzer (CNA) expresando los resultados en forma de modo elemental (EM por sus siglas en inglés) (Klamt, Saez-Rodriguez, y Gilles, 2007; Klamt y von Kamp, 2011).

   Se utilizó la metodología descrita por (Franco, 2020).

   II Selección de la ruta más eficiente para precipitación de calcita en *L. sphaericus*

   - Se analizaron los resultados obtenidos mediante el análisis de modos elementales y se clasificaron según el número de pasos de reacción.

   - Se seleccionó la ruta metabólica más eficiente debido a que es la que representa menor gasto energético para la célula.

   Se utilizó la metodología descrita por (Wang y cols., 2017).

III Elaboración de listado de genes clave en la producción de calcita en *L. sphaericus*

- Se enlistaron las enzimas que participan en la ruta metabólica más eficiente para la producción de calcita en *L. sphaericus*.

- Se enlistaron los genes que conforman dichas enzimas.

IV Elaboración de listado comparativo con *Sporocina* y *Bacillus* spp.

- Se enlistaron los genes reportados en precipitación de calcita por hidrólisis de urea en *Sporocina* y *Bacillus* con sus códigos de identificación en NCBI, EBI y DDBJ

- Se compararon los subgrafos de rutas metabólicas de precipitación de calcita en los géneros *Sporosarcina, Bacillus* y *Lysinibacillus* spp. en búsqueda de complementación entre grafos por producción de diversos metabolitos.

CAPÍTULO 6

Resultados

6.1. Búsqueda de genes de *Lysinibacillus, Sporosarcina* y *Bacillus* involucrados en la precipitación de calcita

Según la búsqueda bibliográfica realizada, la enzima reportada para la hidrólisis de urea es la ureasa, como se observa en el Cuadro No. 4. Esta enzima se encuentra formada por los genes *ureC, ureB* y *ureA* principalmente, con el acompañamiento de los genes *ureE, ureF, ureG* y *ureD*. Todos estos genes se encuentran en los tres géneros en los cuales se realizó la búsqueda. Adicionalmente, en el género *Bacillus* se reportaron los genes *ureI* y *nikT*. El gen *ureI* conforma un transportador de urea y el gen *nikT* conforma un transportador de níquel. También, se encontró del gen *ytiB* que conforma una proteína similar a la anhidrasa carbónica en los tres géneros. En los Cuadros No. 8 y No. 9, en la sección de Anexos, se puede observar los resultados de búsqueda bibliográfica con las referencias en las cuáles se encontró el reporte de estos genes.

Cuadro 4: Genes reportados previamente que son necesarios para la precipitación de calcita por hidrólisis de urea.

Nombre del gen	**Proteína que codifica**	**Género en el que se reportó**
ureC, ureB y ureA	Ureasa (subunidades α, β y γ)	*Lysinibacillus, Bacillus* y *Sporosarcina*
ureE, ureF, ureG y ureD	Proteínas accesorias de ureasa (UreE, UreF, UreG y UreD)	*Lysinibacillus Bacillus* y *Sporosarcina*
ureI	Transportador de urea	*Bacillus*
nikT	Transportador de níquel	*Bacillus*
ytiB	Proteína similar a la anhidrasa carbónica	*Lysinibacillus, Bacillus* y *Sporosarcina*

Leyenda Cuadro 4: En este cuadro se muestran los nombres de los genes reportados para el proceso de hidrólisis de urea para precipitación de calcita, la proteína que codifica cada gen; así como el género de bacteria en el que se encontró reporte de dicho gen. Fuente: Autoría propia

6.2. Identificación de genes y operones de *Lysinibacillus sphaericus* involucrados en la precipitación de calcita

Se localizaron las secuencias de los genes descritos en el Cuadro No. 4. Se encontró la ubicación y longitud de los genes *ureC, ureB, ureA, ureE, ureF, ureG* y *ureD*. También, se encontró el gen *ytiB*. No se encontró el gen *ureI* ni *nikT* en *L. sphaericus*. Como transportador de níquel se encontró que *L. sphaericus* utiliza el transportador NikE para introducir níquel al citoplasma. Se puede observar en el Cuadro No. 5 la ubicación y longitud de dichos genes; adicionalmente en las Figuras No. 7 a No. 15 localizadas en la sección de anexos, se puede observar una captura de pantalla de los alineamientos realizados.

Cuadro 5: Ubicación en el genoma de *Lysinibacillus sphaericus* de los genes reportados en hidrólisis de urea para precipitación de calcita

Nombre del gen	**Ubicación en el genoma (bases)**	**Longitud del gen (bases)**
ureC	1066603 a 1068318	1716
ureB	2673111 a 2672746	366
ureA	1065921 a 1066223	303
ureE	1068371 a 1068817	447
ureF	1068891 a 1069499	609
ureG	1069517 a 1070146	630
ureD	1070139 a 1070945	807
nikE	1334892 a 1334086	807
ytiB	312264 a 311704	561

Leyenda cuadro No.5: En este cuadro se muestran los nombres de los genes reportados para el proceso de hidrólisis de urea; así como su ubicación en el genoma de *Lysinibacillus sphaericus* y su longitud de acuerdo con la herramienta BLAST de NCBI. Fuente: Autoría propia

6.3. Elaboración de grafos de rutas metabólicas para precipitación de carbonato de calcio en *L. sphaericus*

Se representó el sistema metabólico como una matriz estequiométrica, que se observa en la Figura No. 5. La matriz estequiométrica es una alusión matemática al sistema metabólico que nos permite corroborar matemáticamente la posibilidad de que una ruta se lleve a cabo dentro del sistema. Los metabolitos implicados en el sistema metabólico se encuentran en las filas de la matriz y las reacciones químicas en las columnas. El cero "0" en la matriz representa la ausencia de dicho metabolito en la reacción especificada. Un número negativo implica que el metabolito se encontraba como reactivo de la reacción mientras que un número positivo implica que el metabolito es el producto de dicha reacción. En la Figura No. 6 Se observa la representación gráfica del sistema metabólico descrito en la matriz de la Figura No.5. El sistema metabólico se obtuvo con reacciones químicas del metabolismo del nitrógeno que se observa en la Figura No. 17 en la sección de Anexos y la codificación de los metabolitos y reacciones se encuentra descrita en los Cuadros No. 10 y No. 11 en la sección de Anexos.

La matriz estequiométrica de la Figura No. 5 nos presenta como metabolitos de salida al ortofosfato y al carbonato y como metabolitos de entrada a dióxido de carbono y urea. También se puede apreciar que la interacción de los metabolitos se da uno a uno, es decir por cada molécula de metabolito consumido se produce una molécula de cada producto de la reacción. En la Figura No. 6 se pueden apreciar estos resultados de forma gráfica, lo cual facilita su análisis de interacción entre los metabolitos.

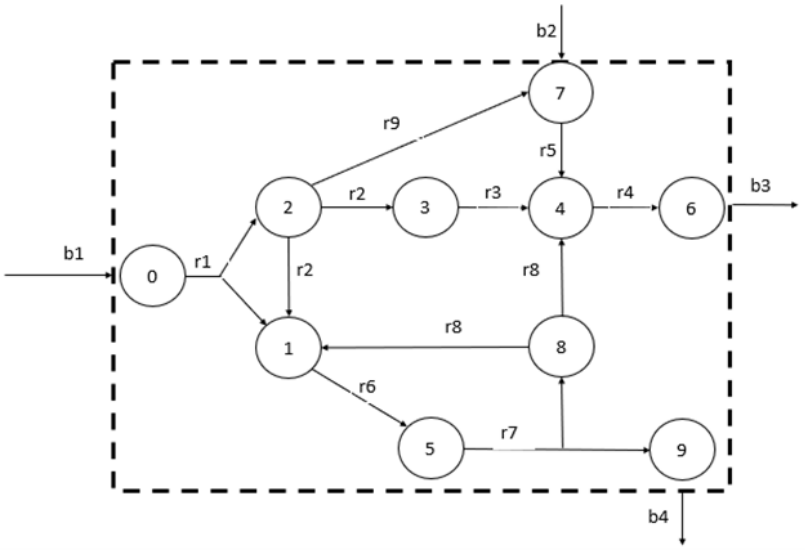
Figura 5: Matriz estequiométrica del proceso de hidrólisis de urea para producción de calcita en *L. sphaericus*

Vértice	r1	r2	r3	r4	r5	r6	r7	r8	r9	b1	b2	b3	b4	
0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	Urea
1	1	1	0	0	0	-1	0	1	1	0	0	0	0	Amoniaco
2	1	-1	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	Carbamato
3	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Ácido carbónico
4	0	0	1	-1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	HCO_3^-
5	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	Amonio
6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	.1	0	Carbonato
7	0	0	0	0	-1	0	-1	0	1	0	1	0	0	CO_2
8	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	Carbamoil-P
9	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-1	Ortofosfato

S =

Leyenda Figura No. 5: En esta figura se muestran las reacciones involucradas en el proceso de hidrólisis de urea y los metabolitos involucrados en dicha reacción mediante una representación estequiométrica. Las columnas b1 y b2 representan la entrada al proceso de los metabolitos descritos y las columnas b3 y b4 representan la salida de estos metabolitos de esta red metabólica. Fuente: Autoría propia

Figura 6: Grafo del proceso de hidrólisis de urea para precipitación de calcita por *L. sphaericus*



Leyenda Figura No.6: En esta figura se muestran las reacciones involucradas en el proceso de hidrólisis de urea y los metabolitos involucrados en dicha reacción mediante una representación gráfica. Las aristas codificadas con la letra b representan las entradas y salidas de metabolitos al sistema metabólico. Las aristas codificadas con la letra r representan las reacciones químicas que ocurren dentro del sistema metabólico y los vértices con números representan a los metabolitos del sistema. Fuente: Autoría propia.

Como resultado del análisis Modos Elementales, se obtuvieron nueve distintas rutas mediante las cuáles se resuelve la matriz estequiométrica reportada en la Figura No. 5. Las nueve distintas rutas pueden observarse descritas en el Cuadro No. 6, además de representadas gráficamente en las Figuras No. 17 a No. 25. De estas nueve rutas, cinco (P1, P2, P3, P6 y P7) tienen como metabolito de salida a carbonato, mientras que las cuatro rutas restantes (P4, P5, P8 y P9) tienen como metabolito de salida el ortofosfato. Y de las nueve rutas, ocho tienen a urea como metabolito inicial, mientras que P3 tiene como metabolito inicial dióxido de carbono.

Cuadro 6: Rutas descritas mediante análisis de modos elementales como solución al sistema metabólico de hidrólisis de urea de *L. sphaericus*

Código	**Ruta interna**
P1	0 ->1 ->5 ->8 ->4 ->6
P2	0 ->2 ->3 ->4 ->6
P3	7 ->4 ->6
P4	0 ->1 ->5 ->9
P5	0 ->2 ->1 ->5 ->9
P6	0 ->2 ->1 ->5 ->8 ->4 ->6
P7	0 ->2 ->7 ->4 ->6
P8	0 ->1 ->5 ->8 ->1 ->5 ->9
P9	0 ->2 ->1 ->5 ->8 ->1 ->5 ->9

Leyenda Cuadro No.6: En este cuadro se muestran las posibles rutas de acuerdo con el análisis de modos elementales realizado a la matriz estequiométrica del sistema metabólico de hidrólisis de urea para producción de calcita. El código P proviene de pathway son las distintas rutas descritas numeradas para su diferenciación. En la columna de "ruta interna" se muestran los números de reacciones implicados en esa ruta metabólica. Fuente: Autoría propia.

6.4. Elección del modelo más eficiente para la ruta metabólica de precipitación de calcita en *L. sphaericus.*

Según las rutas analizadas en el Cuadro No. 6, se pueden identificar enzimas que participan en el proceso de producción de calcita por hidrólisis de urea. En el Cuadro No. 7 se enlistan los genes que conforman las enzimas de las rutas observadas como posibles objetivos de modificación genética para aumentar la producción de calcita en *L. sphaericus*.

Cuadro 7: Genes de interés para posible modificación genética para la precipitación de calcita por hidrólisis de urea.

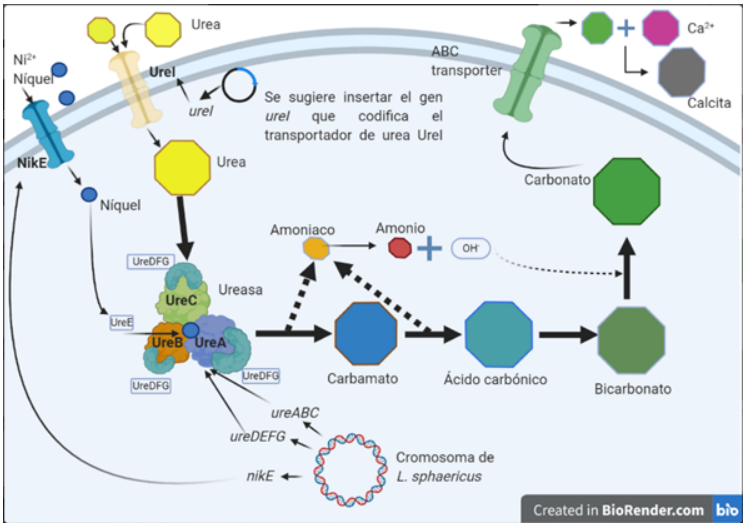
Nombre del gen	**Proteína que codifica**	Presencia en *L. sphaericus*
ureC, ureB y *ureA*	Ureasa (subunidades alfa,beta y gamma)	+
ureE, ureF, ureG y *ureD*	Proteínas accesorias de ureasa (UreE, UreF, UreG y UreD)	+
ureI	Transportador de urea	-

Leyenda Cuadro No.7: En este cuadro se muestran los nombres de los genes de interés para modificación genética para precipitación de calcita, la proteína que codifica cada gen; así como si se encuentra o no en *Lysinibacillus sphaericus*. Fuente: Autoría propia.

En la Figura No. 7 se puede observar de forma gráfica la ruta más eficiente para la producción de calcita en

Lysinibacillus sphaericus según el análisis de modos elementales realizado en el sistema metabólico descrito en la Figura No. 6. Además, se observan los posibles objetivos de modificación genética de acuerdo con las enzimas requeridas para llevar a cabo dicha ruta.

Figura 7: Representación gráfica de la ruta más eficiente para producción de calcita en *L. sphaericus*



Leyenda Figura No. 7: En esta figura se observa la ruta más eficiente para la producción de calcita por *L. sphaericus* con los metabolitos involucrados en esta ruta, además de los genes que conforman la ureasa como posibles objetivos de optimización de dicha ruta. Fuente: Autoría propia.

CAPÍTULO 7

Análisis de resultados

El objetivo principal de este trabajo fue identificar la ruta metabólica más eficiente en *Lysinibacillus sphaericus* para la producción de calcita a nivel industrial, por hidrólisis de urea; mediante análisis computacional genético de especies pertenecientes a los géneros de *Sporosarcina, Bacillus* y *Lysinibacillus*. Para poder llevar a cabo este análisis, se diagramó un grafo, que se puede observar en la Figura No. 6 en la sección de Resultados, como la representación del sistema metabólico que utiliza *Lysinibacillus sphaericus* durante la hidrólisis de urea para precipitación de calcita.

El análisis de modos elementales dio como resultado nueve distintas rutas solución a la matriz estequiométrica. Estas rutas pueden observarse en el Cuadro No. 6 y apreciarse gráficamente en las Figuras No. 18 a No. 26, en la sección de Anexos. Durante el análisis, se descartaron las rutas que pudieran conformar un ciclo de metabolitos dado que no se encontraban en el universo de soluciones de la matriz estequiométrica, según la metodología de Franco, 2020.

Dentro de las nueve rutas que son solución a la matriz estequiométrica, cinco son de interés, porque el metabolito de salida en estas rutas es carbonato. Las otras cuatro rutas tienen como metabolito de salida ortofosfato, por lo que no son de interés para la producción de carbonato de calcio de *Lysinibacillus sphaericus*. La reacción que lleva a la producción de ortofosfato (r7) es una reacción reversible catalizada por la enzima Carbamoil-fosfato sintasa (6.3.4.16). Como reacción reversible se puede formular un medio tal, con una combinación de pH, temperatura y concentración mayor de carbamoil-fosfato que de amonio para que la enzima utilizara el ortofosfato para producción de amonio y de esta forma se integrara de nuevo al sistema metabólico de producción de carbonato de calcio (Keleti, 1986).

Sin embargo, esta acción no sería recomendable para optimizar la producción de calcita debido a que se utilizaría carbamoil-fosfato como sustrato para producción de amonio en lugar de producción de bicarbonato por parte de la reacción catalizada por la enzima carbamato quinasa (r8), que busca la producción final de carbonato. Es decir, para volver a introducir el ortofosfato al sistema metabólico se tendría que utilizar como sustrato un metabolito esencial para otra ruta del sistema que si forma carbonato. Además, se tiene que considerar las condiciones óptimas de la carbamoil-fosfato sintasa para llevar a cabo esta reacción inversa, que dichas condiciones podrían variar de las condiciones óptimas de la ureasa, enzima que lleva a cabo la hidrólisis de urea, y por lo tanto esencial para la producción de carbonato por esta vía.

Es posible bloquear la reacción r7 del sistema metabólico de *L. sphaericus* al modificar genéticamente la carbamoil-fosfato sintasa, de forma que no utilizara el amonio para producir carbamoil-fosfato y ortofosfato. Esta disrupción de ruta llevaría a una acumulación de amonio en el citoplasma celular de *L. sphaericus*. Esta bacteria tiene capacidad nitrificante a una tasa de 5µg/hora, por lo cuál podría utilizar el amonio acumulado

al oxidarlo hacia nitrato (Martínez y Dussán, 2018). En caso la producción de amonio por hidrólisis de urea fuera menor a la tasa de nitrificación, sería una modificación favorable, de lo contrario se contaría con una acumulación de amonio. Dicha acumulación no es óptima para la producción de carbonato de calcio debido a que impediría el aumento de pH causado por la reacción r6, al favorecer la reacción inversa por la concentración elevada de los productos. Para el uso en la industria, la concentración de amonio en el bioconcreto no es oportuna, debido a la toxicidad del amonio para las personas. Por lo cual, antes de realizar una modificación genética sobre la carbamoil-fosfato sintasa recomendaría un estudio de análisis de la producción de amonio por parte de la ruta de hidrólisis de urea.

De las cinco rutas restantes que se obtuvieron, una utiliza como metabolito de entrada dióxido de carbono y, dado que el objetivo de este estudio es identificar la ruta de producción de carbonato de calcio mediante hidrólisis de urea, esta ruta prueba no adaptarse al objetivo, pero esta ruta codificada como P3 podría ser de interés para producción de carbonato a partir de otro metabolito en caso la urea no se encuentre disponible para dicho proceso. Las cuatro rutas restantes que son de interés para este estudio se encuentran codificadas en el Cuadro No. 8 como P1, P2, P6 y P7.

La ruta codificada como P1 cuenta con cinco reacciones químicas desde la urea hasta carbonato, P2 cuenta con cuatro reacciones, al igual que P7 y P6 cuenta con seis. Una célula viva elige la ruta más eficiente hacia un metabolito según el menor gasto de energía, y por lo tanto el menor esfuerzo de producción (Wang y cols., 2017). Si se trabaja con el supuesto de que una menor cantidad de reacciones representa un menor gasto energético, *Lysinibacillus sphaericus* utiliza, para la producción de carbonato, las rutas con codificación P2 y P7. Para poder comprobar este supuesto se recomienda realizar un análisis de entalpías de las reacciones químicas involucradas en dichas rutas.

Entre la ruta P2 (Figura No. 19) y la ruta P7 (Figura No. 24) hay dos reacciones químicas distintas. La ruta P2 utiliza r2 y r3 y la ruta P7 utiliza r5 y r9. La reacción r2 es la única reacción reversible dentro de las cuatro diferencias, lo cual la convierte en una reacción dependiente de las condiciones del medio para que pueda ocurrir, pero dichas condiciones son dadas por el sistema metabólico en el momento de aumentar el pH por el equilibrio entre amoniaco producido y amonio. Sin embargo, la reacción 5 involucra a la proteína similar a la anhidrasa carbónica como enzima adicional, a diferencia de las otras tres reacciones que ocurren de forma espontánea. Para optimizar la producción de un metabolito se formula el medio de cultivo que favorezca a la enzima, por lo que se prefiere la ruta P2 a la ruta P7, a manera de que se utilicen las condiciones óptimas para la actividad de la ureasa en el medio de cultivo y no se tengan que modificar dichas condiciones por las condiciones adecuadas para la enzima similar a anhidrasa carbónica.

La ureasa desenvuelve un papel esencial en la ruta P2. Es la enzima que cataliza la primera reacción de la ruta, sin la cual no se podría producir carbonato; por lo que se considera como un blanco de modificación genética para la optimización de producción de carbonato en *L. sphaericus*, como se observa en el Cuadro No. 9. De acuerdo con el Cuadro No. 5, los genes involucrados en la formación de la ureasa se encuentran en el genoma de *L. sphaericus*, lo que comprueba la ruta P2, porque la bacteria produce ureasa y puede ser aplicada para la producción de carbonato de calcio. Se pueden observar los alineamientos realizados para la ubicación de dichos genes en las Figuras No. 8 a 16, localizadas en la sección de Anexos.

Entre otras modificaciones genéticas que pueden optimizar el proceso de producción de carbonato de calcio, se encuentra el gen *ureI* reportado en el género *Bacillus* como transportador de urea al interior celular. *L. sphaericus* introduce la urea al citoplasma a través de un transportador ABC de aminoácidos de cadena ramificada (Gomez-Garzon y cols., 2017). Con la inserción del gen *ureI* al genoma de *L. sphaericus* se podría optimizar el proceso de producción de carbonato debido a que la urea estaría más disponible para la ureasa y se podría realizar un mejor proceso de precipitación de carbonato de calcio. Estas modificaciones genéticas posibles para la optimización de carbonato de calcio en *L. sphaericus* y la ruta codificada como P2 se observa de forma gráfica en la Figura No. 7.

Las modificaciones genéticas a las enzimas involucradas en otras rutas descritas por el sistema que no sean P2 o P7 son posibles. Sin embargo, no se mostraría un aumento en la producción de carbonato por parte de *L. sphaericus* como resultado de dichas modificaciones ya que estas rutas simplemente no son utilizadas porque involucran un mayor gasto energético que P2 o P7. También es necesario considerar que, al bloquearlas genéticamente podríamos incurrir en obstaculizar otros procesos metabólicos celulares necesarios para mantener viva a *L. sphaericus*, lo cual contrarrestaría la precipitación de carbonato de calcio por la falta de un sitio de nucleación entre carbonato y calcio.

Otra manera de optimizar el proceso de producción de carbonato de calcio mediante hidrólisis de urea en *Lysinibacillus sphaericus* es la optimización del medio de cultivo de las células. Para su aplicación industrial, las células deben encontrarse en forma de esporas y encapsuladas con los componentes necesarios para la producción de carbonato de calcio. Para poder esporular a las células de *L. sphaericus*, se deben producir en un medio rico en calcio y hierro (Ryu, Lee, Cha, y Park, 2020). Luego de esporuladas, estas células pueden encapsularse junto a un medio rico en urea y calcio para facilitar el proceso de producción de carbonato de calcio.

Dentro de las condiciones que se deben tomar en cuenta en el medio de *Lysinibacillus sphaericus* para optimizar la producción de carbonato de calcio, es la carga negativa de la membrana, ya que es necesario atraer al calcio para formar carbonato de calcio en la membrana celular. Para aumentar la carga negativa se puede introducir al medio $CaCl_2$ (Ma y cols., 2020). Se ha observado una mejor actividad de ureasa en un medio pobre en nitrógeno, en el cual la actividad de la ureasa aumenta hasta 25 veces más que en un medio rico en nitrógeno. Dado que el mismo sistema eleva el pH como producto de las reacciones no es necesario la utilización de niveladores de pH en exceso, pero sí se recomienda un control del pH para llevar a cabo estas reacciones espontáneas.

Como la presencia de níquel es necesaria para la actividad de la ureasa, se recomienda una concentración mínima entre 5µM y 10µM de níquel en el medio, considerando que el níquel en exceso puede ser tóxico. Otra forma indirecta de aumentar la actividad de ureasa es la presencia de Na_2EDTA, Ba^{2+} y citrato (2-20 mM) y es recomendable evitar la presencia de iones de litio, magnesio, zinc o yodo, ya que inhiben la actividad de la ureasa (Al-Thawadi, 2011).

Como se puede observar en el Cuadro No. 4 y, de forma más extensa en el Cuadro No. 10, los géneros *Bacillus* y *Sporosarcina* cuentan con los mismos genes reportados para la hidrólisis de urea, para precipitación de carbonato y, de acuerdo con la Enciclopedia Kyoto de Genes y Genomas (KEGG), con el mismo metabolismo del nitrógeno. Entonces, se llega a la conclusión de que utilizan la misma ruta descrita para *L. sphaericus* para la producción de calcita. Por ello, no es recomendable realizar consorcios entre estos géneros a nivel industrial, porque generaría competencia entre las bacterias por la urea. En caso de competencia por urea, *L. sphaericus*, sería capaz de seguir produciendo carbonato por la vía codificada como P3 utilizando la proteína similar a la anhidrasa carbónica. Ya que existe la posibilidad de continuar con la producción de carbonato aún en ausencia de urea no se recomienda una modificación genética a la anhidrasa carbónica de *L. sphaericus*. Así mismo, se recomienda realizar un análisis de las ureasas de *Sporosarcina, Bacillus* y *Lysinibacillus* para realizar una comparación de la actividad enzimática de las tres ureasas y obtener un respaldo estadístico de la capacidad de cada ureasa por género y demostrar que género se beneficiaría de una competencia por la urea.

CAPÍTULO 8

Conclusiones

1. De acuerdo con la búsqueda bibliográfica realizada, *Sporosarcina, Bacillus* y *Lysinibacillus* utilizan los mismos genes en el proceso de producción de calcita por hidrólisis de urea.
2. *Lysinibacillus sphaericus* es capaz de producir calcita por hidrólisis de urea debido a la presencia comprobada por medio de alineamientos de los genes involucrados en este proceso.
3. El sistema metabólico utilizado por *L. sphaericus* para producción de calcita se puede representar como un grafo y se modeló de forma estequiométrica para la generación de una matriz matemática.
4. Se calcularon nueve posibles rutas metabólicas dentro del sistema metabólico de *L. sphaericus* para producción de calcita de acuerdo con el análisis de modos elementales y a las soluciones de la matriz generada.
5. Se estableció la ruta metabólica más eficiente para la optimización de producción de calcita en *L. sphaericus* de acuerdo con los resultados del análisis de modos elementales y a las enzimas involucradas en este proceso.
6. Se estableció que *Sporosarcina* y *Bacillus* utilizan la misma ruta metabólica para producción de calcita por hidrólisis de urea, y un consorcio entre los tres géneros generaría competencia por la urea como metabolito inicial, disminuyendo la productividad del proceso.

CAPÍTULO 9

Recomendaciones

1. Se recomienda mejorar el análisis de modos elementales realizado por CellNetAnalyzer introduciendo los valores de concentración de metabolitos en el programa.
2. Se recomienda la introducción del gen *ureI* en *L. sphaericus* para un mejor acceso a la urea por parte de la ureasa, con menor gasto energético.
3. Se recomienda conformar el medio de cultivo con cloruro de calcio para aumentar la negatividad de la membrana y facilitar la atracción de los iones de calcio, para la formación de calcita.
4. Se recomienda realizar un análisis entre ureasas de distintas especies para observa cual es la ureasa más robusta con un sustento estadístico.
5. En caso se considere una modificación genética sobre la enzima carbamoil-fosfato sintasa, se recomienda un estudio de análisis de la producción de amonio por parte de la hidrólisis de urea.
6. Se recomienda realizar un análisis de entalpías de las reacciones químicas involucradas en las posibles rutas del sistema metabólico.
7. Se recomienda la esporulación de *L. sphaericus* para facilitar su aplicación a la industria de construcción.
8. Se recomienda realizar el análisis de sinergia entre la ruta de hidrólisis de urea junto con la ruta codificada como P3, para ver si la combinación mejora la producción, o sí compiten entre ellas.
9. Se recomienda realizar pruebas de producción de carbonato de calcio en laboratorio con la introducción del gen *ureI* en *L. sphaericus* previo al escalamiento a nivel industrial.

CAPÍTULO 10

Bibliografía

Achal, V., Mukherjee, A., Kumari, D., y Zhang, Q. (2015). Biomineralization for sustainable construction–a review of processes and applications. *Earth-science reviews*, *148*, 1–17.

Adolphe, J., Loubière, J., Paradas, J., y Soleilhavoup, F. (1990). Procédé de traitement biologique d'une surface artificielle. *European patent 90400G97. 0 (after French patent 8903517, 1989)*.

Al-Thawadi, S. M. (2011). Ureolytic bacteria and calcium carbonate formation as a mechanism of strength enhancement of sand. *J. Adv. Sci. Eng. Res*, *1*(1), 98–114.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, *215*(3), 403–410.

Anbu, P., Kang, C.-H., Shin, Y.-J., y So, J.-S. (2016). Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. *Springerplus*, *5*(1), 1–26.

Bocanegra Silva, J. L. (s.f.). Análisis comparativo de las redes metabólicas de metatranscriptomas edáficos de la rizósfera de solanum phureja en tres diferentes estados fenológicos. *Facultad de Ciencias*.

Bojaca Bautista, V. A. (2014). *Lysinibacillus sphaericus-adaptaciones moleculares como respuesta a la exposicion a plomo* (Tesis de Master no publicada). Bogotá-Uniandes.

Canakci, H., Sidik, W., y Kilic, I. H. (2015). Effect of bacterial calcium carbonate precipitation on compressibility and shear strength of organic soil. *Soils and Foundations*, *55*(5), 1211–1221.

Cardozo, O. D., Gómez, E. L., y Parras, M. A. (2009). Teoría de grafos y sistemas de información geográfica aplicados al transporte público de pasajeros en resistencia (argentina). *Revista Transporte y Territorio*(1), 89–111.

Carmona, J. P., Oliveira, P. J. V., y Lemos, L. J. (2016). Biostabilization of a sandy soil using enzymatic calcium carbonate precipitation. *Procedia engineering*, *143*, 1301–1308.

Castro-Alonso, M. J., Montañez-Hernandez, L. E., Sanchez-Muñoz, M. A., Macias Franco, M. R., Narayanasamy, R., y Balagurusamy, N. (2019). Microbially induced calcium carbonate precipitation (micp) and its potential in bioconcrete: Microbiological and molecular concepts. *Frontiers in Materials*, *6*, 126.

Chaparro-Acuña, S. P., Becerra-Jiménez, M. L., Martínez-Zambrano, J. J., y Rojas-Sarmiento, H. A. (2018). Soil bacteria that precipitate calcium carbonate: mechanism and applications of the process. *Acta Agronómica*, *67*(2), 277–288.

Chen, Y., Feng, Y., Deveaux, J. G., Masoud, M. A., Chandra, F. S., Chen, H., ... Feng, L. (2019). Biomineralization forming process and bio-inspired nanomaterials for biomedical application: a review. *Minerals*, *9*(2), 68.

Chou, C.-W., Aydilek, A., Seagren, E., y Maugel, T. (2008). Bacterially-induced calcite precipitation via ureolysis. *American Society of Microbiology*.

Dalmer, T. R., y Clugston, R. D. (2019). Gene ontology enrichment analysis of congenital diaphragmatic hernia-associated genes. *Pediatric research*, *85*(1), 13–19.

Dhami, N. K., Alsubhi, W. R., Watkin, E., y Mukherjee, A. (2017). Bacterial community dynamics and biocement formation during stimulation and augmentation: implications for soil consolidation. *Frontiers in microbiology*, *8*, 1267.

Dhami, N. K., Reddy, M. S., y Mukherjee, A. (2014). Synergistic role of bacterial urease and carbonic anhydrase in carbonate mineralization. *Applied biochemistry and biotechnology*, *172*(5), 2552–2561.

Dietrich, R. V. (2013). Calcite. *Encyclopædia Britannica*, *1*.

Eltarahony, M., Zaki, S., y Abd-El-Haleem, D. (2020). Aerobic and anaerobic removal of lead and mercury via calcium carbonate precipitation mediated by statistically optimized nitrate reductases. *Scientific reports*, *10*(1), 1–20.

Ersan, Y. C., Boon, N., y De Belie, N. (2018). Granules with activated compact denitrifying core (acdc) for self-healing concrete with corrosion protection functionality. En *Final conference of rilem tc 253-mci: Microorganisms-cementitious materials interactions* (Vol. 123, pp. 475–484).

Evans, J. S. (2019). The biomineralization proteome: Protein complexity for a complex bioceramic assembly process. *Proteomics*, *19*(16), 1900036.

Farrugia, C., Borg, R. P., Ferrara, L., y Buhagiar, J. (2019). The application of lysinibacillus sphaericus for surface treatment and crack healing in mortar. *Frontiers in Built Environment*, *5*, 62.

Franco, L. (2020). *Reconstrucción de rutas metabólicas de bacterias del género klebsiella spp. como herramienta para mejorar el control biológico de mosca ceratitis capitata (medfly)* (Tesis de Master no publicada). Brasil-Universidad Estatal de Santa Cruz.

Gomez-Garzon, C., Hernández-Santana, A., y Dussan, J. (2017). A genome-scale metabolic reconstruction of lysinibacillus sphaericus unveils unexploited biotechnological potentials. *PLoS One*, *12*(6), e0179666.

Hernández-Hernández, A., Rodríguez-Navarro, A. B., Gómez-Morales, J., Jiménez-López, C., Nys, Y., y García-Ruiz, J. M. (2008). Influence of model globular proteins with different isoelectric points on the precipitation of calcium carbonate. *Crystal Growth and Design*, *8*(5), 1495–1502.

Johns, N., Tan, B., MacMillan, M., Solheim, T., Ross, J., Baracos, V., ... Fearon, K. (2014). Genetic basis of interindividual susceptibility to cancer cachexia: selection of potential candidate gene polymorphisms for association studies. *Journal of genetics*, *93*(3), 893–916.

Kanehisa, M. (2019). Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Science*, *28*(11), 1947–1951.

Kanehisa, M., y Goto, S. (2000). Kegg: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, *28*(1), 27–30.

Kayath, A. C., Mbozo, V., Brice, A., Nicaise, M., Kaya-Ongoto, M., y Nguimbi, E. (2019, 01). The genus lysinibacillus: Versatile phenotype and promising future. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, *8*. doi: 10.21275/ART20194281

Keleti, T. (1986). Two rules of enzyme kinetics for reversible michaelis-menten mechanisms. *FEBS letters*, *208*(1), 109–112.

Klamt, S., Saez-Rodriguez, J., y Gilles, E. D. (2007). Structural and functional analysis of cellular networks with cellnetanalyzer. *BMC systems biology*, *1*(1), 1–13.

Klamt, S., y von Kamp, A. (2011). An application programming interface for cellnetanalyzer. *Biosystems*, *105*(2), 162–168.

Li, M., Fu, Q.-L., Zhang, Q., Achal, V., y Kawasaki, S. (2015). Bio-grout based on microbially induced sand solidification by means of asparaginase activity. *Scientific reports*, *5*, 16128.

Ma, L., Pang, A.-P., Luo, Y., Lu, X., y Lin, F. (2020). Beneficial factors for biomineralization by ureolytic bacterium sporosarcina pasteurii. *Microbial cell factories*, *19*(1), 1–12.

Martínez, S. A., y Dussán, J. (2018). Lysinibacillus sphaericus plant growth promoter bacteria and lead phytoremediation enhancer with canavalia ensiformis. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, *37*(1), 276–282.

Miller, S. A., Horvath, A., y Monteiro, P. J. (2016). Readily implementable techniques can cut annual co2 emissions from the production of concrete by over 20 %. *Environmental Research Letters*, *11*(7), 074029.

Nelson, D. L., y Cox, M. M. (2018). *Princípios de bioquímica de lehninger-7*. Artmed Editora.

Neville, A. M., y Brooks, J. J. (1987). *Concrete technology*. Longman Scientific & Technical England.

OECD, A. (2005). A framework for biotechnology statistics. *Organisation for Economic Co Operation and Development, Paris*.

Okwadha, G. D., y Li, J. (2011). Biocontainment of polychlorinated biphenyls (pcbs) on flat concrete surfaces by microbial carbonate precipitation. *Journal of environmental management*, *92*(10), 2860–2864.

Peters, K., Bradbury, J., Bergmann, S., Capuccini, M., Cascante, M., de Atauri, P., ... others (2019). Phenomenal: processing and analysis of metabolomics data in the cloud. *Gigascience*, *8*(2), giy149.

Qi, Q., Li, J., y Cheng, J. (2014). Reconstruction of metabolic pathways by combining probabilistic graphical model-based and knowledge-based methods. En *Bmc proceedings* (Vol. 8, p. S5).

Rajasekar, A., Loo Chin Moy, C., y Wilkinson, S. (2017). Micp and advances towards eco-friendly and economical applications. En *Iop conference series: Earth and environmental science* (Vol. 78).

Ryu, Y., Lee, K.-E., Cha, I.-T., y Park, W. (2020). Optimization of bacterial sporulation using economic nutrient for self-healing concrete. *Journal of Microbiology*, 1–9.

Schuster, S., Hilgetag, C., Woods, J. H., y Fell, D. A. (2002). Reaction routes in biochemical reaction systems: algebraic properties, validated calculation procedure and example from nucleotide metabolism. *Journal of mathematical biology*, *45*(2), 153–181.

Seifan, M., Samani, A. K., y Berenjian, A. (2016). Bioconcrete: next generation of self-healing concrete. *Applied microbiology and biotechnology*, *100*(6), 2591–2602.

Seo, S., y Lewin, H. A. (2009). Reconstruction of metabolic pathways for the cattle genome. *BMC systems biology*, *3*(1), 33.

Stabnikov, V., Jian, C., Ivanov, V., y Li, Y. (2013). Halotolerant, alkaliphilic urease-producing bacteria from different climate zones and their application for biocementation of sand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *29*(8), 1453–1460.

Tobler, D. J., Minto, J. M., El Mountassir, G., Lunn, R. J., y Phoenix, V. R. (2018). Microscale analysis of fractured rock sealed with microbially induced caco3 precipitation: influence on hydraulic and mechanical performance. *Water Resources Research*, *54*(10), 8295–8308.

Torres-Aravena, Á. E., Duarte-Nass, C., Azócar, L., Mella-Herrera, R., Rivas, M., y Jeison, D. (2018). Can microbially induced calcite precipitation (micp) through a ureolytic pathway be successfully applied for removing heavy metals from wastewaters? *Crystals*, *8*(11), 438.

Trinh, C. T., Wlaschin, A., y Srienc, F. (2009). Elementary mode analysis: a useful metabolic pathway analysis tool for characterizing cellular metabolism. *Applied microbiology and biotechnology*, *81*(5), 813.

Wang, Dash, S., Ng, C. Y., 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.

Wang, J., Soens, H., Verstraete, W., y De Belie, N. (2014). Self-healing concrete by use of microencapsulated bacterial spores. *Cement and concrete research*, *56*, 139–152.

Weiner, S., y Dove, P. M. (2003). An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Reviews in mineralogy and geochemistry*, *54*(1), 1–29.

Yan, W., Xiao, X., y Zhang, Y. (2017). Complete genome sequence of lysinibacillus sphaericus lmg 22257, a strain with ureolytic activity inducing calcium carbonate precipitation. *Journal of biotechnology*, *246*, 33–35.

Yoshida, N., Higashimura, E., y Saeki, Y. (2010). Catalytic biomineralization of fluorescent calcite by the thermophilic bacterium geobacillus thermoglucosidasius. *Applied and environmental microbiology*, *76*(21), 7322–7327.

Zhu, T., y Dittrich, M. (2016). Carbonate precipitation through microbial activities in natural environment, and their potential in biotechnology: a review. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *4*, 4.

CAPÍTULO 11

Anexos

11.1. Genes involucrados en los procesos metabólicos para producción de calcita

Cuadro 8: Búsqueda de genes de *Lysinibacillus, Sporosarcina* y *Bacillus* involucrados en la hidrólisis de urea

Nombre del gen	**Proteína que codifica**	Especie en la que se encuentra	Referencia del reporte	Código NCBI	Código DDBJ	Código EBI
ureC	Ureasa subunidad alfa	*Lysinibacillus sphaericus*	Yan, Xiao y Zhang, 2017	CP0175601	CP0175601	PRJNA315681
ureB	Ureasa subunidad beta	*Lysinibacillus sphaericus*	Yan, Xiao y Zhang, 2017	CP0175601	CP0175601	PRJNA315681
ureA	Ureasa subunidad gamma	*Lysinibacillus sphaericus*	Yan, Xiao y Zhang, 2017	CP0175601	CP0175601	PRJNA315681
ureE	Proteína accesoria de Ureasa UreE	*Lysinibacillus sphaericus*	Yan, Xiao y Zhang, 2017	CP0175601	CP0175601	PRJNA315681
ureF	Proteína accesoria de Ureasa UreF	*Lysinibacillus sphaericus*	Yan, Xiao y Zhang, 2017	CP0175601	CP0175601	PRJNA315681
ureG	Proteína accesoria de Ureasa UreG	*Lysinibacillus sphaericus*	Yan, Xiao y Zhang, 2017	CP0175601	CP0175601	PRJNA315681
ureD	Proteína accesoria de Ureasa UreD	*Lysinibacillus sphaericus*	Yan, Xiao y Zhang, 2017	CP0175601	CP0175601	PRJNA315681
ureC	Ureasa subunidad alfa	*Lysinibacillus fusiformis*	Zhao, et. al., 2015	NZ_JRBA010000081	CP0108201	CP0108201
ureB	Urreasa subunidad beta	*Lysinibacillus fusiformis*	Zhao, et. al., 2015	NZ_JRBA010000081	CP0108201	CP0108201
ureA	Ureasa subunidad gamma	*Lysinibacillus fusiformis*	Zhao, et. al., 2015	NZ_JRBA010000081	CP0108201	CP0108201
ureE	Proteína accesoria de Ureasa UreE	*Lysinibacillus fusiformis*	Zhao, et. al., 2015	NZ_JRBA010000081	CP0108201	CP0108201
ureF	Proteína accesoria de Ureasa UreF	*Lysinibacillus fusiformis*	Zhao, et. al., 2015	NZ_JRBA010000081	CP0108201	CP0108201
ureG	Proteína accesoria de Ureasa UreG	*Lysinibacillus fusiformis*	Zhao, et. al., 2015	NZ_JRBA010000081	CP0108201	CP0108201
ureD	Proteína accesoria de Ureasa UreD	*Lysinibacillus fusiformis*	Zhao, et. al., 2015	NZ_JRBA010000081	CP0108201	CP0108201
ureC	Ureasa subunidad alfa	*Bacillus cereus*	Mols y Abee, 2008	BCK_170402	AE0171941	AE0171941
ureB	Ureasa subunidad beta	*Bacillus cereus*	Mols y Abee, 2008	BCK_170352	AE0171941	AE0171941
ureA	Ureasa subunidad gamma	*Bacillus cereus*	Mols y Abee, 2008	BCE_36642	AE0171941	AE0171941
ureE	Proteína accesoria de Ureasa UreE	*Bacillus cereus*	Mols y Abee, 2008	BCK_170452	AE0171941	NCA642581
ureF	Proteína accesoria de Ureasa UreF	*Bacillus cereus*	Mols y Abee, 2008	BCK_170502	AE0171941	NCA642581
ureG	Proteína accesoria de Ureasa UreG	*Bacillus cereus*	Mols y Abee, 2008	BCK_170552	AE0171941	NCA642581
ureD	Proteína accesoria de Ureasa UreD	*Bacillus cereus*	Mols y Abee, 2008	BCK_170602	AE0171941	NCA642581
ureI	Transportador de urea	*Bacillus cereus*	Mols y Abee, 2008	FOC91_RS09785	AE0171941	KZD26351
nikT	Transportador de níquel	*Bacillus cereus*	Mols y Abee, 2008	AE0171951	AE0171941	AE0171941
ureC	Ureasa subunidad alfa	*Sporosarcina pasteurii*	Ma, et. al., 2020	SRR87277073	CAA551731	U293681
ureB	Ureasa subunidad beta	*Sporosarcina pasteurii*	Ma, et. al., 2020	SRR87277073	CAA551731	U293681
ureA	Ureasa subunidad gamma	*Sporosarcina pasteurii*	Ma, et. al., 2020	SRR87277073	CAA551731	U293681
ureE	Proteína accesoria de Ureasa UreE	*Sporosarcina pasteurii*	Ma, et. al., 2020	SRR87277073	CAA551731	U293681
ureF	Proteína accesoria de Ureasa UreF	*Sporosarcina pasteurii*	Ma, et. al., 2020	SRR87277073	CAA551731	U293681
ureG	Proteína accesoria de Ureasa UreG	*Sporosarcina pasteurii*	Ma, et. al., 2020	SRR87277073	CAA551731	U293681
ureD	Proteína accesoria de Ureasa UreD	*Sporosarcina pasteurii*	Ma, et. al., 2020	SRR87277073	CAA551731	U293681

1. Código de acceso hace referencia al reporte del genoma completo de la especie donde se encuentra reportado el gen.
2. Todos los registros de genes para este genoma se han descontinuado debido a un cambio en el alcance de los genomas procarióticos en Gene-NCBI
3. Las proteínas codificadas por genes se clasificaron en una clasificación filogenética por la base de datos de COG (Clusters of Orthologous Groups)

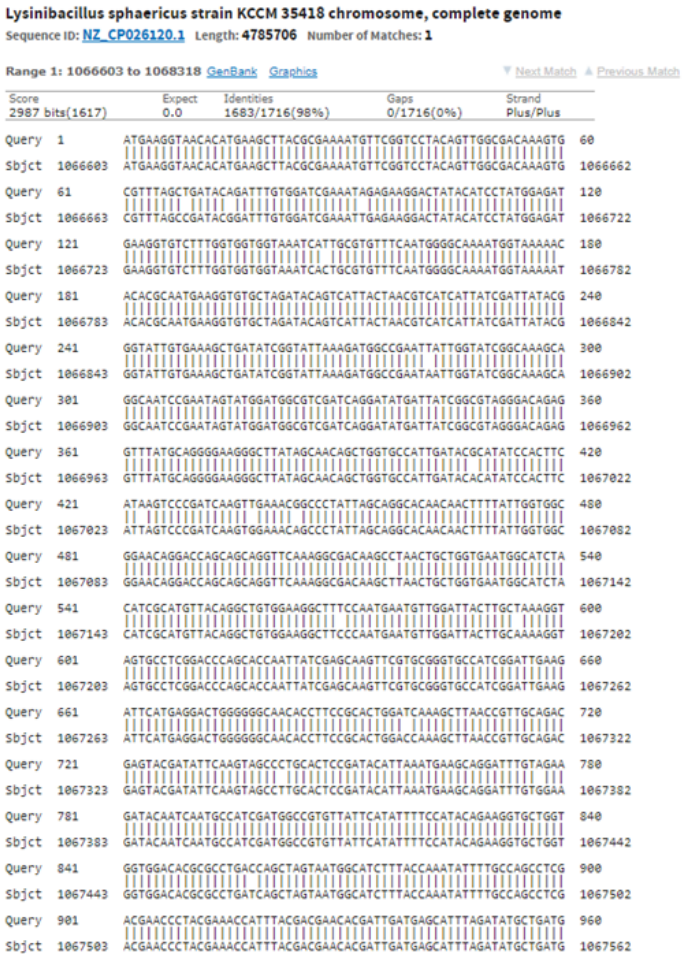
Cuadro 9: Búsqueda de genes de *Lysinibacillus, Sporosarcina* y *Bacillus* involucrados en la precipitación de calcita

Nombre del gen	Proteína que codifica	Especie en la que se encuentra	Referencia del reporte	Código NCBI	*Código DDBJ*	*Código EBI*
Anhidrasa carbónica gamma	Proteína parecida a anhidrasa carbónica	*Lysinibacillus sphaericus*	Yan, Xiao y Zhang, 2017	CP0175601	CP0175601	PRJNA315681
Anhidrasa carbónica gamma	Proteína parecida a anhidrasa carbónica	*Bacillus coagulans*	Johnson, et. al. 2015	BF29_RS05700	BF29_RS05700	AE0171941
Anhidrasa carbónica gamma	Proteína parecida a anhidrasa carbónica	*Sporosarcina pasteurii*	Kim, et. al., 2016	SRR87277072	CAA551731	U293681

1. Código de acceso hace referencia al reporte del genoma completo de la especie donde se encuentra reportado el gen.
2. Las proteínas codificadas por genes se clasificaron en una clasificación filogenética por la base de datos de COG (Clusters of Orthologous Groups)

11.2. Alineamientos con el genoma de *L. sphaericus*

Figura 8: Alineamiento para localización del gen *ureC*



Lysinibacillus sphaericus strain KCCM 35418 chromosome, complete genome

Sequence ID: NZ_CP026120.1 Length: 4785706 Number of Matches: 1

Range 1: 1066603 to 1068318 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2987 bits(1617)	0.0	1683/1716(98%)	0/1716(0%)	Plus/Plus

```
Query  1        ATGAAGGTAACACATGAAGCTTACGCGAAAATGTTCGGTCCTACAGTTGGCGACAAAGTG  60
Sbjct  1066603  ATGAAGGTAACACATGAAGCTTACGCGAAAATGTTCGGTCCTACAGTTGGCGACAAAGTG  1066662

Query  61       CGTTTAGCTGATACAGATTTGTGGATCGAAATAGAGAAGGACTATACATCCTATGGAGAT  120
Sbjct  1066663  CGTTTAGCCGATACGGATTTGTGGATCGAAATTGAGAAGGACTATACATCCTATGGAGAT  1066722

Query  121      GAAGGTGTCTTTGGTGGTGGTAAATCATTGCGTGTTTCAATGGGGCAAAATGGTAAAAAC  180
Sbjct  1066723  GAAGGTGTCTTTGGTGGTGGTAAATCACTGCGTGTTTCAATGGGGCAAAATGGTAAAAAT  1066782

Query  181      ACACGCAATGAAGGTGTGCTAGATACAGTCATTACTAACGTCATCATTATCGATTATACG  240
Sbjct  1066783  ACACGCAATGAAGGTGTGCTAGATACAGTCATTACTAACGTCATCATTATCGATTATACG  1066842

Query  241      GGTATTGTGAAAGCTGATATCGGTATTAAAGATGGCCGAATTATTGGTATCGGCAAAGCA  300
Sbjct  1066843  GGTATTGTGAAAGCTGATATCGGTATTAAAGATGGCCGAATAATTGGTATCGGCAAAGCA  1066902

Query  301      GGCAATCCGAATAGTATGGATGGCGTCGATCAGGATATGATTATCGGCGTAGGGACAGAG  360
Sbjct  1066903  GGCAATCCGAATAGTATGGATGGCGTCGATCAGGATATGATTATCGGCGTAGGGACAGAG  1066962

Query  361      GTTTATGCAGGGGAAGGGCTTATAGCAACAGCTGGTGCCATTGATACGCATATCCACTTC  420
Sbjct  1066963  GTTTATGCAGGGGAAGGGCTTATAGCAACAGCTGGTGCCATTGATACACATATCCACTTC  1067022

Query  421      ATAAGTCCCGATCAAGTTGAAACGGCCCTATTAGCAGGCACAACAACTTTTATTGGTGGC  480
Sbjct  1067023  ATTAGTCCCGATCAAGTGGAAACAGCCCTATTAGCAGGCACAACAACTTTTATTGGTGGC  1067082

Query  481      GGAACAGGACCAGCAGCAGGTTCAAAGGCGACAAGCCTAACTGCTGGTGAATGGCATCTA  540
Sbjct  1067083  GGAACAGGACCAGCAGCAGGTTCAAAGGCGACAAGCTTAACTGCTGGTGAATGGCATCTA  1067142

Query  541      CATCGCATGTTACAGGCTGTGGAAGGCTTTCCAATGAATGTTGGATTACTTGCTAAAGGT  600
Sbjct  1067143  CATCGCATGTTACAGGCTGTGGAAGGCTTCCCAATGAATGTTGGATTACTTGCAAAAGGT  1067202

Query  601      AGTGCCTCGGACCCAGCACCAATTATCGAGCAAGTTCGTGCGGGTGCCATCGGATTGAAG  660
Sbjct  1067203  AGTGCCTCGGACCCAGCACCAATTATCGAGCAAGTTCGTGCGGGTGCCATCGGATTGAAG  1067262

Query  661      ATTCATGAGGACTGGGGGGCAACACCTTCCGCACTGGATCAAAGCTTAACCGTTGCAGAC  720
Sbjct  1067263  ATTCATGAGGACTGGGGGGCAACACCTTCCGCACTGGACCAAAGCTTAACCGTTGCAGAC  1067322

Query  721      GAGTACGATATTCAAGTAGCCCTGCACTCCGATACATTAAATGAAGCAGGATTTGTAGAA  780
Sbjct  1067323  GAGTACGATATTCAAGTAGCCTTGCACTCCGATACATTAAATGAAGCAGGATTTGTGGAA  1067382

Query  781      GATACAATCAATGCCATCGATGGCCGTGTTATTCATATTTTCCATACAGAAGGTGCTGGT  840
Sbjct  1067383  GATACAATCAATGCCATCGATGGCCGTGTTATTCATATTTTCCATACAGAAGGTGCTGGT  1067442

Query  841      GGTGGACACGCGCCTGACCAGCTAGTAATGGCATCTTTACCAAATATTTTGCCAGCCTCG  900
Sbjct  1067443  GGTGGACACGCGCCTGATCAGCTAGTAATGGCATCTTTACCAAATATTTTGCCAGCCTCG  1067502

Query  901      ACGAACCCTACGAAACCATTTACGACGAACACGATTGATGAGCATTTAGATATGCTGATG  960
Sbjct  1067503  ACGAACCCTACGAAACCATTTACGACGAACACGATTGATGAGCATTTAGATATGCTGATG  1067562
```

Figura 9: Alineamiento para localización del gen *ureB*

Lysinibacillus sphaericus C3-41, complete genome

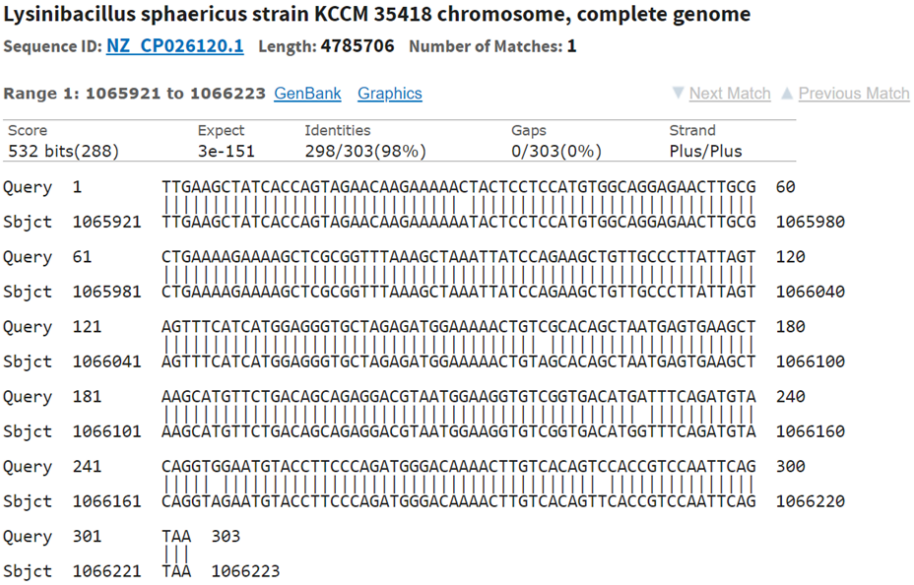
Sequence ID: CP000817.1 **Length:** 4639821 **Number of Matches:** 1

Range 1: 2672746 to 2673111 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
204 bits(518)	5e-58	Compositional matrix adjust.	122/122(100%)	122/122(100%)	0/122(0%)	+1

```
Query  1        MIPGEIRPKKGVIEINVGRATKKVLVANTGDRPIQVGSHFHFIEVNRFLEFNREDAIGMH  60
                MIPGEIRPKKGVIEINVGRATKKVLVANTGDRPIQVGSHFHFIEVNRFLEFNREDAIGMH
Sbjct  2672746  MIPGEIRPKKGVIEINVGRATKKVLVANTGDRPIQVGSHFHFIEVNRFLEFNREDAIGMH  2672925

Query  61       LNIPSGTAVRfepgeekevelvefggkQHVFGLNKLTEGSTHHKDEILDKAIEGGFKGAE  120
                LNIPSGTAVRFEPGEEKEVELVEFGGKQHVFGLNKLTEGSTHHKDEILDKAIEGGFKGAE
Sbjct  2672926  LNIPSGTAVRFEPGEEKEVELVEFGGKQHVFGLNKLTEGSTHHKDEILDKAIEGGFKGAE  2673105

Query  121      EK  122
                 EK
Sbjct  2673106  EK  2673111
```

Figura 10: Alineamiento para localización del gen *ureA*



Lysinibacillus sphaericus strain KCCM 35418 chromosome, complete genome

Sequence ID: NZ_CP026120.1 **Length:** 4785706 **Number of Matches:** 1

Range 1: 1065921 to 1066223 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
532 bits(288)	3e-151	298/303(98%)	0/303(0%)	Plus/Plus

```
Query  1        TTGAAGCTATCACCAGTAGAACAAGAAAAACTACTCCTCCATGTGGCAGGAGAACTTGCG  60
                ||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1065921  TTGAAGCTATCACCAGTAGAACAAGAAAAAATACTCCTCCATGTGGCAGGAGAACTTGCG  1065980

Query  61       CTGAAAAGAAAAGCTCGCGGTTTAAAGCTAAATTATCCAGAAGCTGTTGCCCTTATTAGT  120
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1065981  CTGAAAAGAAAAGCTCGCGGTTTAAAGCTAAATTATCCAGAAGCTGTTGCCCTTATTAGT  1066040

Query  121      AGTTTCATCATGGAGGGTGCTAGAGATGGAAAAACTGTCGCACAGCTAATGAGTGAAGCT  180
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct  1066041  AGTTTCATCATGGAGGGTGCTAGAGATGGAAAAACTGTAGCACAGCTAATGAGTGAAGCT  1066100

Query  181      AAGCATGTTCTGACAGCAGAGGACGTAATGGAAGGTGTCGGTGACATGATTTCAGATGTA  240
                |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct  1066101  AAGCATGTTCTGACAGCAGAGGACGTAATGGAAGGTGTCGGTGACATGGTTTCAGATGTA  1066160

Query  241      CAGGTGGAATGTACCTTCCCAGATGGGACAAAACTTGTCACAGTCCACCGTCCAATTCAG  300
                ||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  1066161  CAGGTAGAATGTACCTTCCCAGATGGGACAAAACTTGTCACAGTTCACCGTCCAATTCAG  1066220

Query  301      TAA  303
                 |||
Sbjct  1066221  TAA  1066223
```

Figura 11: Alineamiento para localización del gen *ureE*

Lysinibacillus sphaericus strain KCCM 35418 chromosome, complete genome

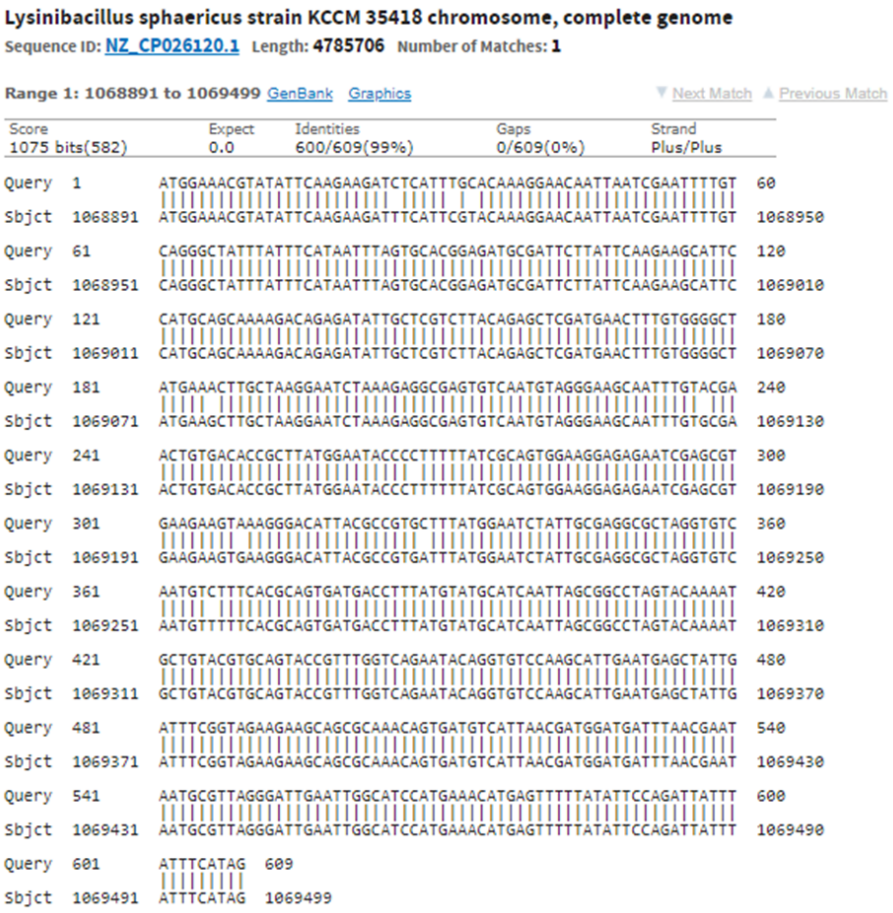
Sequence ID: NZ_CP026120.1 **Length:** 4785706 **Number of Matches:** 1

Range 1: 1068371 to 1068817 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
798 bits(432)	0.0	442/447(99%)	0/447(0%)	Plus/Plus

```
Query  1        ATGTTAATCGAAAAAATTATTGGGAATATTGCCCACGAAGAAGAACATCAGCAAAAGACA  60
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||
Sbjct  1068371  ATGTTAATCGAAAAAATTATTGGGAATATTGCCCACGAAGAAGAACATCAACAAAAGACA  1068430

Query  61       ACAGAATGGATTGAGCTAGAATGGGAGGAATTAAGCAAACGAATTCTTCGCACAGAAACA  120
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1068431  ACAGAATGGATTGAGCTAGAATGGGAGGAATTAAGCAAACGAATTCTTCGCACAGAAACA  1068490

Query  121      GATCAAGGTACAGACATTGCTTTACGACTAGAAGGCGATGAACCATTAAAATATGGTGAT  180
                |||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1068491  GATCAAGGTACAGACATTGCTTTACGACTAGAAGGTGATGAACCATTAAAATATGGTGAT  1068550

Query  181      TTATTATTTGAGGATGATCACCTTCGTATAGCAATTCGTACAAAATTAGAGCCTGTCATT  240
                |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||
Sbjct  1068551  TTATTATTTGAGGATGATCACCTTCGTATAGCAATTCGTACAAAATTAGAGACTGTCATT  1068610

Query  241      GTTATTACGCCCAAAGACATGCATGAAATGGGAAAATCAGCTTTCGAATTAGGAAATCGC  300
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1068611  GTTATTACGCCCAAAGACATGCATGAAATGGGAAAATCAGCTTTCGAATTAGGAAATCGT  1068670

Query  301      CATACGCCTTGCCTAATTGAAAACAATGAAATCATCGTACGAGCAGATCATACGATAAAT  360
                ||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1068671  CATACGCCTTGCCTCATTGAAAACAATGAAATCATCGTACGAGCAGATCATACGATAAAT  1068730

Query  361      CCATTATTAGATGAAATAGGGGTGCACTATGAAACAACAGAAAGACGTTTCAAGCAGCCA  420
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1068731  CCATTATTAGATGAAATAGGGGTGCACTATGAAACAACAGAAAGACGTTTCAAGCAGCCA  1068790

Query  421      TTCAAATACCGTGGACACTCTCACTAA  447
                |||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1068791  TTCAAATACCGTGGACACTCTCACTAA  1068817
```

Figura 12: Alineamiento para localización del gen *ureF*



Lysinibacillus sphaericus strain KCCM 35418 chromosome, complete genome

Sequence ID: NZ_CP026120.1 Length: 4785706 Number of Matches: 1

Range 1: 1068891 to 1069499 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1075 bits(582)	0.0	600/609(99%)	0/609(0%)	Plus/Plus

```
Query  1        ATGGAAACGTATATTCAAGAAGATCTCATTTGCACAAAGGAACAATTAATCGAATTTTGT  60
                ||||||||||||||||||||||||| ||||| | ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1068891  ATGGAAACGTATATTCAAGAAGATTTCATTCGTACAAAGGAACAATTAATCGAATTTTGT  1068950

Query  61       CAGGGCTATTTATTTCATAATTTAGTGCACGGAGATGCGATTCTTATTCAAGAAGCATTC  120
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1068951  CAGGGCTATTTATTTCATAATTTAGTGCACGGAGATGCGATTCTTATTCAAGAAGCATTC  1069010

Query  121      CATGCAGCAAAAGACAGAGATATTGCTCGTCTTACAGAGCTCGATGAACTTTGTGGGGCT  180
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1069011  CATGCAGCAAAAGACAGAGATATTGCTCGTCTTACAGAGCTCGATGAACTTTGTGGGGCT  1069070

Query  181      ATGAAACTTGCTAAGGAATCTAAAGAGGCGAGTGTCAATGTAGGGAAGCAATTTGTACGA  240
                |||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||
Sbjct  1069071  ATGAAGCTTGCTAAGGAATCTAAAGAGGCGAGTGTCAATGTAGGGAAGCAATTTGTGCGA  1069130

Query  241      ACTGTGACACCGCTTATGGAATACCCCTTTTTATCGCAGTGGAAGGAGAGAATCGAGCGT  300
                |||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1069131  ACTGTGACACCGCTTATGGAATACCCTTTTTTATCGCAGTGGAAGGAGAGAATCGAGCGT  1069190

Query  301      GAAGAAGTAAAGGGACATTACGCCGTGCTTTATGGAATCTATTGCGAGGCGCTAGGTGTC  360
                ||||||||  ||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1069191  GAAGAAGTGAAGGGACATTACGCCGTGATTTATGGAATCTATTGCGAGGCGCTAGGTGTC  1069250

Query  361      AATGTCTTTCACGCAGTGATGACCTTTATGTATGCATCAATTAGCGGCCTAGTACAAAAT  420
                |||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1069251  AATGTTTTTCACGCAGTGATGACCTTTATGTATGCATCAATTAGCGGCCTAGTACAAAAT  1069310

Query  421      GCTGTACGTGCAGTACCGTTTGGTCAGAATACAGGTGTCCAAGCATTGAATGAGCTATTG  480
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1069311  GCTGTACGTGCAGTACCGTTTGGTCAGAATACAGGTGTCCAAGCATTGAATGAGCTATTG  1069370

Query  481      ATTTCGGTAGAAGAAGCAGCGCAAACAGTGATGTCATTAACGATGGATGATTTAACGAAT  540
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1069371  ATTTCGGTAGAAGAAGCAGCGCAAACAGTGATGTCATTAACGATGGATGATTTAACGAAT  1069430

Query  541      AATGCGTTAGGGATTGAATTGGCATCCATGAAACATGAGTTTTTATATTCCAGATTATTT  600
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1069431  AATGCGTTAGGGATTGAATTGGCATCCATGAAACATGAGTTTTTATATTCCAGATTATTT  1069490

Query  601      ATTTCATAG  609
                |||||||||
Sbjct  1069491  ATTTCATAG  1069499
```

Figura 13: Alineamiento para localización del gen *ureG*

Lysinibacillus sphaericus strain KCCM 35418 chromosome, complete genome

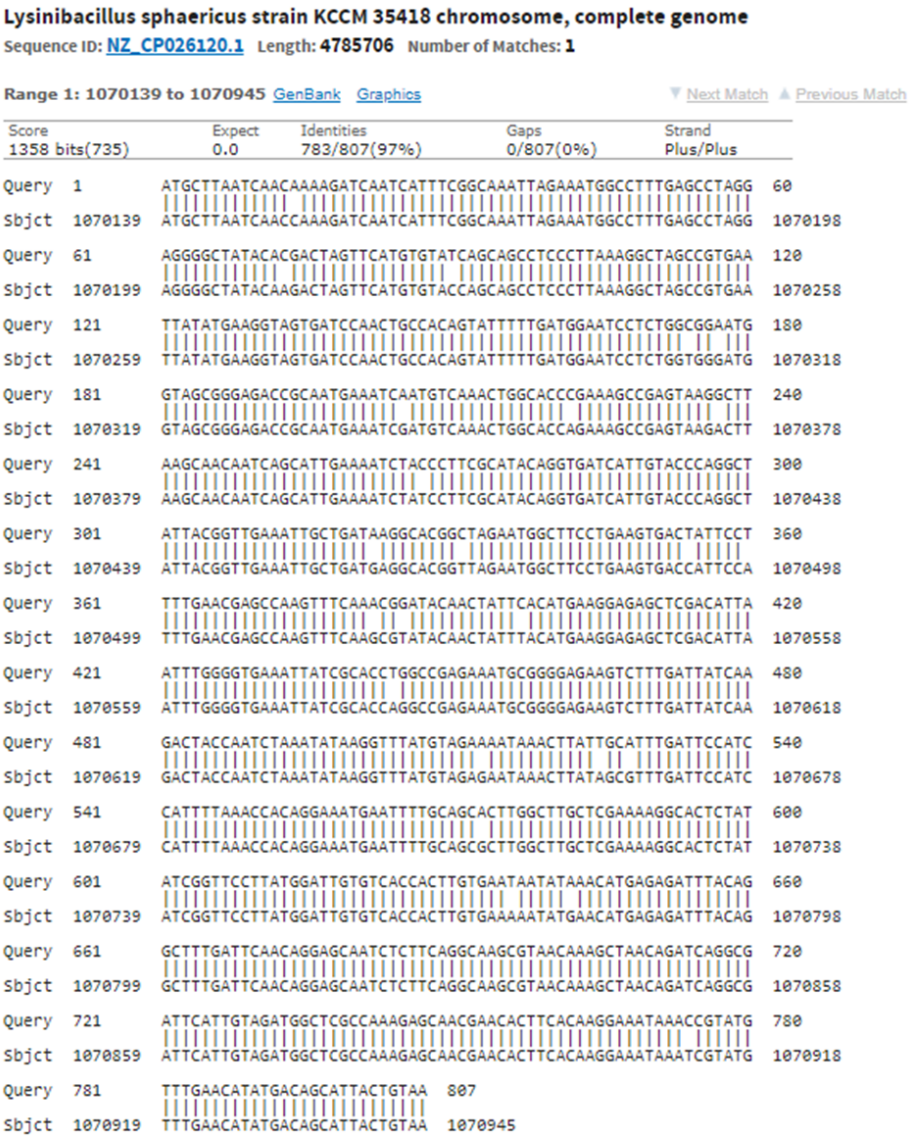
Sequence ID: NZ_CP026120.1 **Length:** 4785706 **Number of Matches:** 1

Range 1: 1069517 to 1070146 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1125 bits(609)	0.0	623/630(99%)	0/630(0%)	Plus/Plus

```
Query  1        ATGAAACCAATCCGTATTGGTATCGGCGGCCCAGTTGGGTCAGGAAAAACATCTTTAGTA  60
               ||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1069517  ATGAAACCAATACGTATTGGTATCGGCGGCCCAGTTGGGTCAGGAAAAACATCTTTAGTA  1069576

Query  61       GATCAATTAACACGTGTGATGCATGAGCATTATCATGTAGCCGTTATCACAAATGATATT  120
               |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct  1069577  GATCAATTAACACGTGTGATGCATGAGCATTATCATGTAGCGGTTATCACAAATGATATT  1069636

Query  121      TATACAAGGGAAGACGCTCAATATTTAATAACGAATGGTGTTTTAGAGGAAGAGCGTATT  180
               |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1069637  TATACAAGAGAAGACGCTCAATATTTAATAACGAATGGTGTTTTAGAGGAAGAGCGTATT  1069696

Query  181      ATTGGGGTGGAAACAGGTGGTTGTCCTCATACAGCTATTCGTGAGGATGCATCGATGAAT  240
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1069697  ATTGGGGTGGAAACAGGTGGTTGTCCTCATACAGCTATTCGTGAGGATGCATCGATGAAT  1069756

Query  241      TTTGCAGCGATTGATGATTTAAATAAACGCTTCCAAGATTTAGATATTATTTTCATTGAA  300
               |||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1069757  TTTGCAGCGATTGATGATTTAAATAAACGTTTCCAAGATTTAGATATTATTTTCATTGAA  1069816

Query  301      AGTGGTGGCGATAATCTATCTGCAACATTTAGTCCTGAGCTAGTGCATGGCTATATTTAC  360
               ||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1069817  AGTGGTGGCGATAATTTATCTGCAACATTTAGTCCTGAGCTAGTGCATGGCTATATTTAC  1069876

Query  361      GTAATTGATGTGGCAGAAGGACAGGATATCCCACGTAAAGGCGGTCCAGCGCTAACGCGT  420
               |||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||
Sbjct  1069877  GTAATTGATGTGGCAGAAGGACAGGATATCCCACGTAAAGGTGGTCCAGCGCTAACGCGT  1069936

Query  421      TCAGACTTACTACTAATCAATAAAACATCATTGGCGCCTCATGTTGGGGTTGATCTAGAA  480
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1069937  TCAGACTTACTACTAATCAATAAAACATCATTGGCGCCTCATGTTGGGGTTGATCTAGAA  1069996

Query  481      ATAATGGATCAGGATGTGaaaaaaTGCGTGGTGGCCGTCCCTATATTTTTGCAGATGTT  540
               |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct  1069997  ATAATGGATCAGGATGTGAAAAAAATGCGTGGTGGCCGTCCATATATTTTTGCAGATGTT  1070056

Query  541      CGTTCACAAACGAATGTAGATAAGGTGGTTGAATGGATTCAGCACCATATGCTACTTGAA  600
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1070057  CGTTCACAAACGAATGTAGATAAGGTGGTTGAATGGATTCAGCACCATATGCTACTTGAA  1070116

Query  601      GGTGCCGAAGCTGTTGACAACCATGCTTAA  630
               ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1070117  GGTGCCGAAGCTGTTGACAACCATGCTTAA  1070146
```

Figura 14: Alineamiento para localización del gen *ureD*



Lysinibacillus sphaericus strain KCCM 35418 chromosome, complete genome

Sequence ID: NZ_CP026120.1 Length: 4785706 Number of Matches: 1

Range 1: 1070139 to 1070945 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1358 bits(735)	0.0	783/807(97%)	0/807(0%)	Plus/Plus

```
Query  1        ATGCTTAATCAACAAAAGATCAATCATTTCGGCAAATTAGAAATGGCCTTTGAGCCTAGG  60
               ||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1070139  ATGCTTAATCAACCAAAGATCAATCATTTCGGCAAATTAGAAATGGCCTTTGAGCCTAGG  1070198

Query  61       AGGGGCTATACACGACTAGTTCATGTGTATCAGCAGCCTCCCTTAAAGGCTAGCCGTGAA  120
               |||||||||||| |||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1070199  AGGGGCTATACAAGACTAGTTCATGTGTACCAGCAGCCTCCCTTAAAGGCTAGCCGTGAA  1070258

Query  121      TTATATGAAGGTAGTGATCCAACTGCCACAGTATTTTTGATGGAATCCTCTGGCGGAATG  180
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| || |||||
Sbjct  1070259  TTATATGAAGGTAGTGATCCAACTGCCACAGTATTTTTGATGGAATCCTCTGGTGGGATG  1070318

Query  181      GTAGCGGGAGACCGCAATGAAATCAATGTCAAACTGGCACCCGAAAGCCGAGTAAGGCTT  240
               |||||||||||||||||||||| |||||||||||||| |||||||||||||| |||||||
Sbjct  1070319  GTAGCGGGAGACCGCAATGAAATCGATGTCAAACTGGCACCAGAAAGCCGAGTAAGACTT  1070378

Query  241      AAGCAACAATCAGCATTGAAAATCTACCCTTCGCATACAGGTGATCATTGTACCCAGGCT  300
               |||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1070379  AAGCAACAATCAGCATTGAAAATCTATCCTTCGCATACAGGTGATCATTGTACCCAGGCT  1070438

Query  301      ATTACGGTTGAAATTGCTGATAAGGCACGGCTAGAATGGCTTCCTGAAGTGACTATTCCT  360
               |||||||||||||||||||| |||||||| |||||||||||||||||||||| |||||||
Sbjct  1070439  ATTACGGTTGAAATTGCTGATGAGGCACGGTTAGAATGGCTTCCTGAAGTGACCATTCCA  1070498

Query  361      TTTGAACGAGCCAAGTTTCAAACGGATACAACTATTCACATGAAGGAGAGCTCGACATTA  420
               |||||||||||||||||||| || |||||||||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1070499  TTTGAACGAGCCAAGTTTCAAGCGTATACAACTATTTACATGAAGGAGAGCTCGACATTA  1070558

Query  421      ATTTGGGGTGAAATTATCGCACCTGGCCGAGAAATGCGGGGAGAAGTCTTTGATTATCAA  480
               |||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1070559  ATTTGGGGTGAAATTATCGCACCAGGCCGAGAAATGCGGGGAGAAGTCTTTGATTATCAA  1070618

Query  481      GACTACCAATCTAAATATAAGGTTTATGTAGAAAATAAACTTATTGCATTTGATTCCATC  540
               |||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||| || ||||||||||||
Sbjct  1070619  GACTACCAATCTAAATATAAGGTTTATGTAGAGAATAAACTTATAGCGTTTGATTCCATC  1070678

Query  541      CATTTTAAACCACAGGAAATGAATTTTGCAGCACTTGGCTTGCTCGAAAAGGCACTCTAT  600
               |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1070679  CATTTTAAACCACAGGAAATGAATTTTGCAGCGCTTGGCTTGCTCGAAAAGGCACTCTAT  1070738

Query  601      ATCGGTTCCTTATGGATTGTGTCACCACTTGTGAATAATATAAACATGAGAGATTTACAG  660
               |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct  1070739  ATCGGTTCCTTATGGATTGTGTCACCACTTGTGAAAAATATGAACATGAGAGATTTACAG  1070798

Query  661      GCTTTGATTCAACAGGAGCAATCTCTTCAGGCAAGCGTAACAAAGCTAACAGATCAGGCG  720
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1070799  GCTTTGATTCAACAGGAGCAATCTCTTCAGGCAAGCGTAACAAAGCTAACAGATCAGGCG  1070858

Query  721      ATTCATTGTAGATGGCTCGCCAAAGAGCAACGAACACTTCACAAGGAAATAAACCGTATG  780
               |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct  1070859  ATTCATTGTAGATGGCTCGCCAAAGAGCAACGAACACTTCACAAGGAAATAAATCGTATG  1070918

Query  781      TTTGAACATATGACAGCATTACTGTAA  807
               |||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1070919  TTTGAACATATGACAGCATTACTGTAA  1070945
```

Figura 15: Alineamiento para localización del gen *nikE*

Lysinibacillus sphaericus strain KCCM 35418 chromosome, complete genome

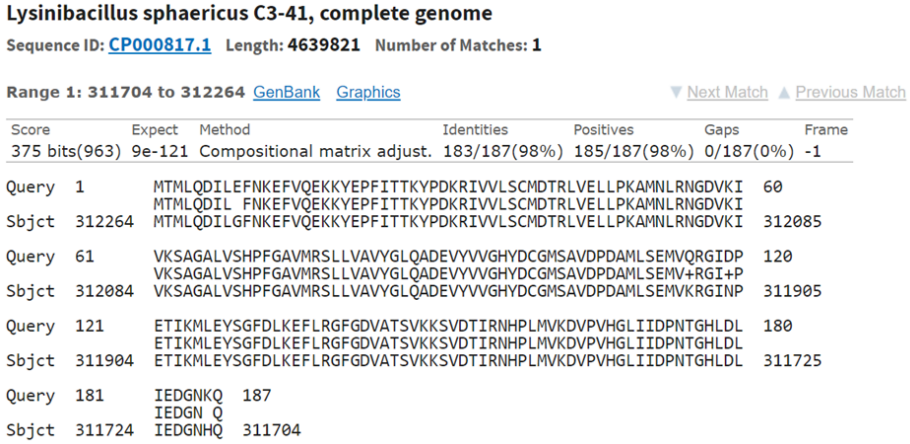
Sequence ID: NZ_CP026120.1 **Length:** 4785706 **Number of Matches:** 1

Range 1: 1334086 to 1334892 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1363 bits(738)	0.0	784/807(97%)	0/807(0%)	Plus/Minus

```
Query  1        GTGAAAAGATTGAAGCTACTAGAAGTGAGAAATATTGAGAAGAACTATGCACATAGACCG  60
                ||||||| |||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1334892  GTGAAAAAATTGAAGCTACTAGAAGTGAGATATATTGAGAAGAACTATGCACATAGACCG  1334833

Query  61       TTCATATTCAAGCGAAGACAGGAAACTCCTGTATTACAGAAAGTATCATTTTCACTTCAG  120
                |||||||||||||||||||||||   | ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1334832  TTCATATTCAAGCGAAGACAGGATGCCCCTGTATTACAGAAAGTATCATTTTCACTTCAG  1334773

Query  121      GAGGGGGAATGCTTAGGGATTGTTGGACAAAGTGGCTCAGGAAAAAGCACATTGGGCCGA  180
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1334772  GAGGGGGAATGCTTAGGGATTGTTGGACAAAGTGGCTCAGGAAAAAGCACATTGGGCCGA  1334713

Query  181      ATTATATTAGGGATGGAAAGGCCAACAGCCGGTGAGCTTCTATTTCAAGGGGTTAATCTT  240
                |||||||||| |||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct  1334712  ATTATATTAGGAATGGAAAGGCCAACAGCCGGTGAGATTCTATTTCAAGGGGTTAATCTT  1334653

Query  241      TATGATGCCACTAGCCAACAGaaaaaaaTGATACGGAGAGATTTACAAGCAGTCTTTCAA  300
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1334652  TATGATGCCACTAGCCAACAGAAAAAAATGATACGGAGAGATTTACAAGCAGTCTTTCAA  1334593

Query  301      AATAGCTATCATTCATTAAATCCAAAGCACAACATTTTTCAAATTTTAGAGGAACCATAC  360
                |||||||||||||||||||||||||||||| | |||||||||||||||||||||||| |||
Sbjct  1334592  AATAGCTATCATTCATTAAATCCAAAGCAGACCATTTTTCAAATTTTAGAGGAACCGTAC  1334533

Query  361      CTAAATTTCGAGCATTATAGCTCAGCTGAGAGACATTATAAGGTAAAGGAATTACTTGAT  420
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1334532  CTAAATTTCGAGCATTATAGCTCAGCTGAGAGACATTATAAGGTAAAGGAATTACTTGAT  1334473

Query  421      CATGTAGAGTTAGAAAAATCTATTGCTGAAAAGTATCCTTCCCAGCTAAGTGGGGGACAA  480
                |||||||||||||| ||||||||| | |||||||||| |||||||| || || ||||||
Sbjct  1334472  CATGTAGAGTTAGACAAATCTATTACCGAAAAGTATCCCTCCCAGCTTAGCGGAGGACAA  1334413

Query  481      CAACAGCGTGTTAACATTGCAAGAGCGCTTGCCTTACATCCAAAATTAATAGTTTTAGAT  540
                |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||| |||||||||
Sbjct  1334412  CAACAGCGTGTTAACATTGCAAGAGCGCTTGCCTTACACCCAAAATTAATTGTTTTAGAT  1334353

Query  541      GAAGCCATTAGTAGTTTAGATATGATTTTGCAAAAACATATCATTCAATTACTACAGACA  600
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1334352  GAAGCCATTAGTAGTTTAGATATGATTTTGCAAAAACATATCATTCAATTACTACAGACA  1334293

Query  601      CTACAAAAGGATTTGCAACTTGCCTACATTTTCATCTCTCATGACCTACAGGCTACACGC  660
                |||||||||||||||||||||||| |||||||||| |||||||||||||||||||||||
```

Figura 16: Alineamiento para localización del gen *ytiB*



Lysinibacillus sphaericus C3-41, complete genome

Sequence ID: CP000817.1 **Length:** 4639821 **Number of Matches:** 1

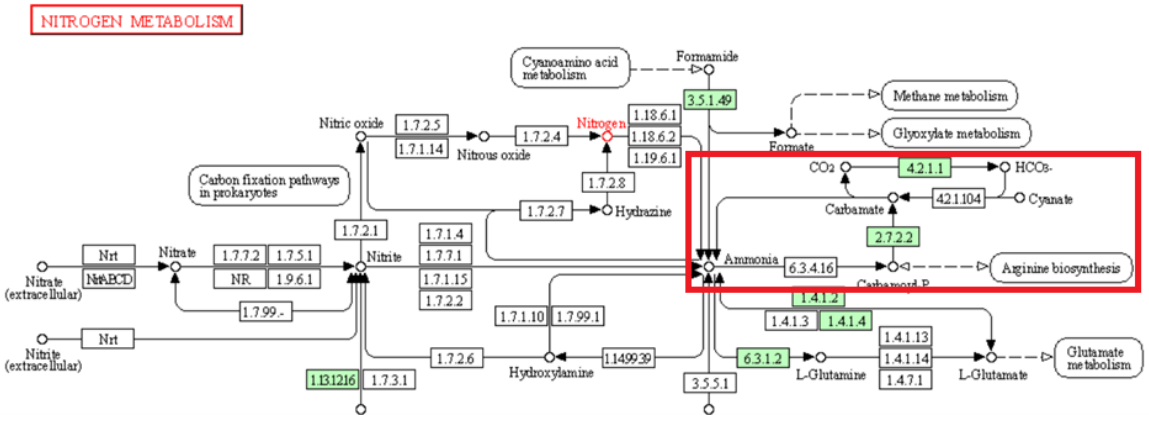
Range 1: 311704 to 312264 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
375 bits(963)	9e-121	Compositional matrix adjust.	183/187(98%)	185/187(98%)	0/187(0%)	-1

```
Query  1       MTMLQDILEFNKEFVQEKKYEPFITTKYPDKRIVVLSCMDTRLVELLPKAMNLRNGDVKI  60
               MTMLQDIL FNKEFVQEKKYEPFITTKYPDKRIVVLSCMDTRLVELLPKAMNLRNGDVKI
Sbjct  312264  MTMLQDILGFNKEFVQEKKYEPFITTKYPDKRIVVLSCMDTRLVELLPKAMNLRNGDVKI  312085

Query  61      VKSAGALVSHPFGAVMRSLLVAVYGLQADEVYVVGHYDCGMSAVDPDAMLSEMVQRGIDP  120
               VKSAGALVSHPFGAVMRSLLVAVYGLQADEVYVVGHYDCGMSAVDPDAMLSEMV+RGI+P
Sbjct  312084  VKSAGALVSHPFGAVMRSLLVAVYGLQADEVYVVGHYDCGMSAVDPDAMLSEMVKRGINP  311905

Query  121     ETIKMLEYSGFDLKEFLRGFGDVATSVKKSVDTIRNHPLMVKDVPVHGLIIDPNTGHLDL  180
               ETIKMLEYSGFDLKEFLRGFGDVATSVKKSVDTIRNHPLMVKDVPVHGLIIDPNTGHLDL
Sbjct  311904  ETIKMLEYSGFDLKEFLRGFGDVATSVKKSVDTIRNHPLMVKDVPVHGLIIDPNTGHLDL  311725

Query  181     IEDGNKQ  187
               IEDGN Q
Sbjct  311724  IEDGNHQ  311704
```

11.3. Reconstrucción de la ruta metabólica para precipitación de calcita

Figura 17: Metabolismo del nitrógeno de *L. sphaericus* involucrado en la producción de calcita



Cuadro 10: Codificación de metabolitos en grafo de hidrólisis de urea para precipitación de calcita en *L. sphaericus*

Nombre del compuesto	Fórmula	Código
Urea	CH_4N_2O	0
Amoniaco	NH_3	1
Carbamato	NH_2COOH	2
Ácido carbónico	H_2CO_3	3
Bicarbonato	HCO_3^-	4
Amonio	NH_4^+	5
Carbonato	CO_3^{2-}	6
Dióxido de Carbono	CO_2	7
Carbamoil fosfato	$CH_2NO_5P^{2-}$	8
Ortofosfato	PO_4^{3-}	9

Cuadro 11: Codificación de rutas metabólicas en grafo de hidrólisis de urea para precipitación de calcita en *L. sphaericus*

Código	Reacción	Enzima
r1	$CH_4N_2O + H_2O -> NH_3 + NH_2COOH$	Ureasa
r2	$NH_2COOH + H_2O -> NH_3 + H_2CO_3$	-
r3	$H_2CO_3 <==> HCO_3^- + H^+$	-
r4	$HCO_3^- + H^+ + 2OH^- -> CO_3^{2-} + 2H_2O$	-
r5	$CO_2 + H_2O -> HCO_3^- + H^+$	Proteína similar a la anhidrasa carbónica
r6	$NH_3 + H_2O <==> NH_4^+ + OH^-$	-
r7	$NH_4^+ + CO_2 + H_2O <==> PO_4^{3-} + CH_2NO_5P^{2-}$	Carbamoil-P sintasa
r8	$CH_2NO_5P^{2-} + H_2O <==> NH_3 + HCO_3^-$	Carbamato quinasa
r9	$NH_2COOH -> CO_2 + NH_3$	-

Figura 18: Representación gráfica de la ruta P1

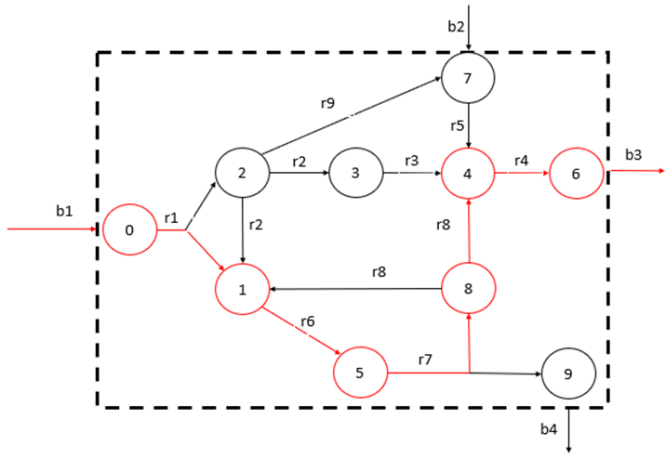


Figura 19: Representación gráfica de la ruta P2

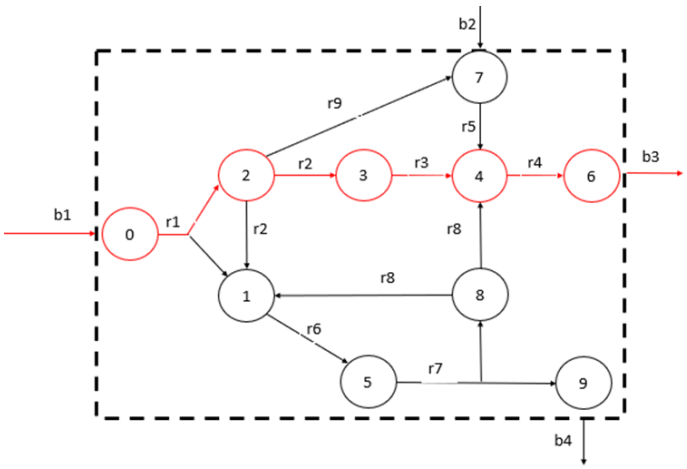


Figura 20: Representación gráfica de la ruta P3

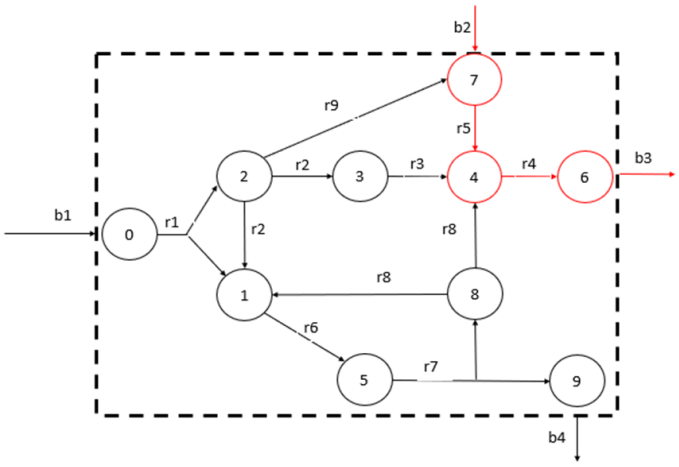


Figura 21: Representación gráfica de la ruta P4

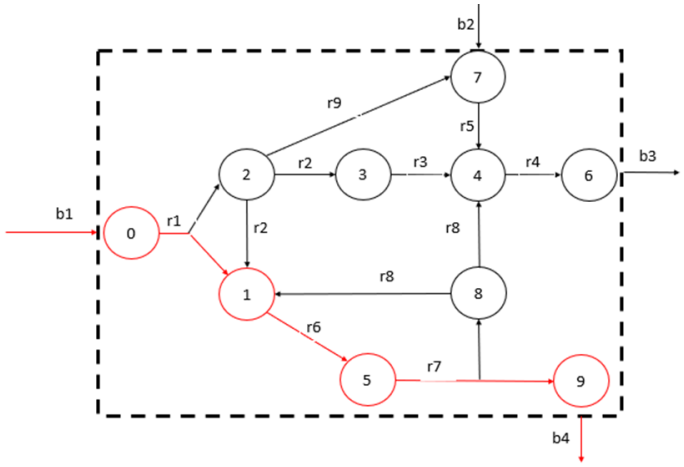


Figura 22: Representación gráfica de la ruta P5

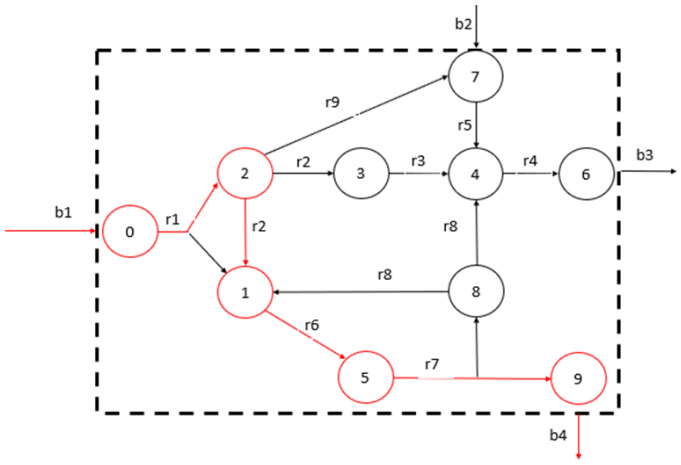


Figura 23: Representación gráfica de la ruta P6

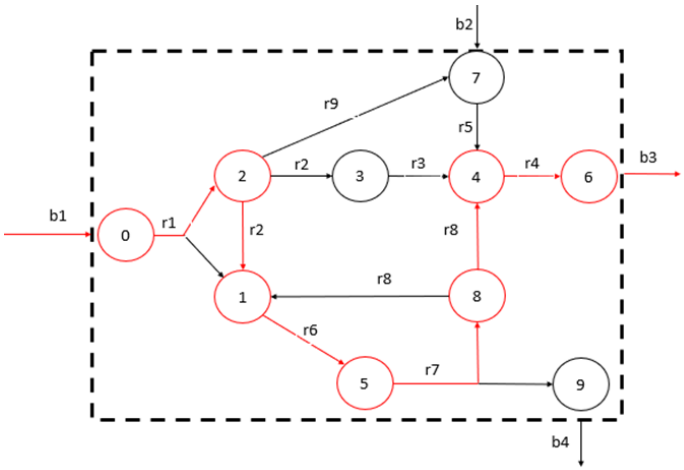


Figura 24: Representación gráfica de la ruta P7

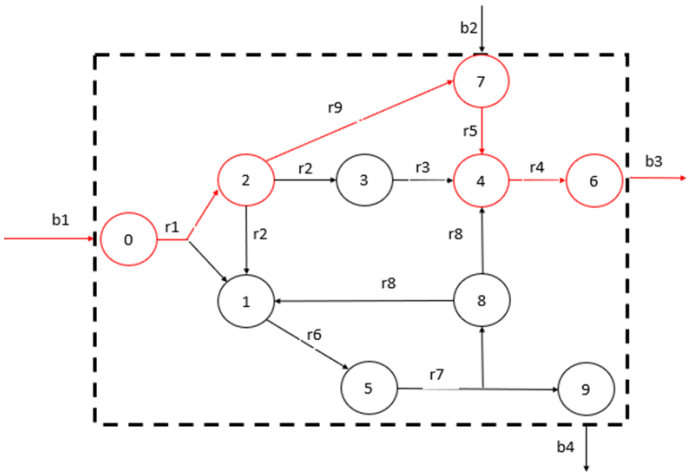


Figura 25: Representación gráfica de la ruta P8

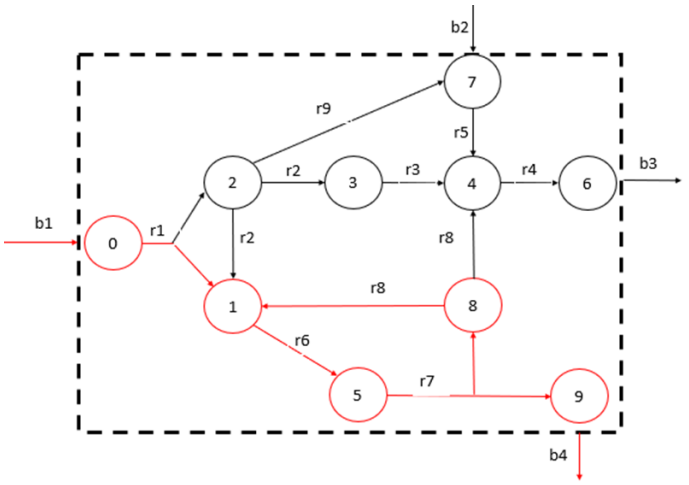


Figura 26: Representación gráfica de la ruta P9