

# BIORREMEDIACIÓN DE PLÁSTICOS. ¿QUÉ NOS APORTA LA PROTEÓMICA?

## PLASTIC BIORREMEDIATION. WHAT CAN PROTEOMICS BRING US?



Trabajo de fin de grado

**EVA ABIZANDA PARDO**

Tutorizado por:

Ana María Rodríguez Pérez y Juan Ramón Hernández Fernaud.

Grado en Biología. Junio 2021.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>4</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>6</b>
<b>3. PLÁSTICOS</b> .....	<b>6</b>
3.1 <i>PLÁSTICOS NO BIODEGRADABLES</i> .....	7
3.2 <i>PLÁSTICOS BIODEGRADABLES</i> .....	9
<b>4. BIODEGRADACIÓN</b> .....	<b>11</b>
4.1 <i>BIODEGRADACIÓN AERÓBICA Y ANAERÓBICA</i> .....	14
4.2 <i>FACTORES QUE AFECTAN A LA BIODEGRADACIÓN</i> .....	15
4.3 <i>MECANISMOS DE BIODEGRADACIÓN Y ENZIMAS INVOLUCRADAS</i> .....	15
<b>5. PROTEÓMICA</b> .....	<b>17</b>
5.1 <i>INTRODUCCIÓN</i> .....	17
5.2 <i>ASPECTOS TÉCNICOS</i> .....	19
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>25</b>
<b>7. CONCLUSIONS</b> .....	<b>25</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA:</b> .....	<b>26</b>

## **RESUMEN**

Los plásticos son polímeros orgánicos, de uso común en nuestra vida diaria, cuya producción mundial está aumentando a ritmos vertiginosos. Una vez cumplen su función, son desechados, quedando como residuos contaminantes en el medio ambiente. Estos plásticos pueden ser de dos tipos: biodegradables y no biodegradables. Los plásticos no biodegradables son derivados del petróleo y otros hidrocarburos y constituyen la mayor parte de los plásticos convencionales. Por su lado, los plásticos biodegradables son aquellos que pueden ser degradados a CO<sub>2</sub> y agua por la acción de la actividad biológica, en un periodo de tiempo razonable. El proceso de biodegradación es complejo y se ve afectado por múltiples factores. Comienza con la formación de un “biofilm” sobre la superficie del plástico (biodeterioro), seguido de la liberación de enzimas extracelulares por los microorganismos que reducen el peso molecular de los polímeros (biofragmentación). Los oligómeros y monómeros generados son incorporados al interior celular (asimilación), resultando en la liberación de moléculas simples (mineralización). La complejidad de estas rutas hace difícil su estudio, sin embargo, la proteómica basada en la espectrometría de masas, como herramienta para identificar, cuantificar y localizar las proteínas expresadas en una célula, se presenta como una herramienta prometedora para la investigación de nuevos microorganismos degradadores de plásticos, sus rutas metabólicas y enzimas clave.

**Palabras clave:** plásticos – microorganismos – biodegradación – proteómica

## ABSTRACT

Plastics are organic polymers, which are part of our daily life. Plastic world production is increasing at vigorous rates, and once plastic function is over, they are discarded, remaining as pollutants in the environment. Plastics are classified in two major types: biodegradable and non-biodegradable. Non-biodegradable plastics constitute most of conventional plastics and are petroleum and other hydrocarbons products. On the other hand, biodegradable plastics are degraded to CO<sub>2</sub> and water by biologic activity, taking a sensible time frame. The plastic biodegradation is a complex process affected by multiple factors. It begins with the formation of the biofilm on the surface (biodeterioration). Followed by the microorganism secretion of different extracellular enzymes that reduce the polymer molecular weight (biofragmentation). The oligomers and monomers released are incorporated into the cell (assimilation), resulting in the final production of simple molecules (mineralization). The complexity of these pathways makes them difficult to study. However, mass spectrometry-based proteomics, used to identify, quantify, and locate the proteins expressed by a cell, is suggested as a powerful tool to investigate new microorganisms with plastic degradation capabilities, their metabolic routes, and key enzymes.

**Key words:** plastics – microorganisms – biodegradation - proteomics

## 1. INTRODUCCIÓN

Los plásticos son polímeros orgánicos ampliamente utilizados en todos los aspectos de nuestras vidas debido a su bajo coste, alta maleabilidad, impermeabilidad, durabilidad y facilidad de fabricación (Wei y Zimmerman, 2017; Prokić et al., 2019). Su producción global ha ido en incremento desde los inicios de su producción industrial, en la década de 1950. En el año 2019, la producción mundial de plásticos alcanzó los 368 millones de toneladas, 58 de los cuales fueron producidos en Europa (PlasticsEurope, 2020). Se estima que, hoy en día, se han producido unos 8300 millones de toneladas de plásticos y se espera una producción anual de 1100 toneladas para 2050. A pesar de estas expectativas de producción de cara al futuro, los últimos datos muestran un ligero descenso en la producción de plásticos, probablemente ralentizada durante el 2020 por

la pandemia de la COVID-19. No obstante, la tasa de producción ha comenzado de nuevo a remontar en la segunda mitad del año 2020 (PlasticsEurope, 2020).

Una vez cumplida su función, los plásticos se desechan, convirtiéndose en residuos que pueden seguir generalmente tres vías, variando la calidad de estos tratamientos de un país a otro: acumulación en vertederos, recuperación para producir energía mediante incineración o reciclado (PlasticsEurope, 2020). Todas estas formas de tratamiento tienen sus inconvenientes, ya sea por el espacio requerido, por la generación de sustancias tóxicas o por el pretratamiento que necesitan. No obstante, el principal problema lo representan aquellos plásticos que escapan a estos sistemas de gestión de residuos y llegan a introducirse en el entorno natural, con importantes efectos en el medio ambiente (Lear et al., 2021). Se calcula que, actualmente, el 76% de los plásticos producidos terminan en vertederos o entran al medio natural, estimándose en torno a 700 millones de toneladas la cantidad de desechos plásticos que se introducirán en el medio natural en el año 2040 (Lear et al., 2021). De estos, tan solo el 1% de los plásticos introducidos en el medio marino, aquellos que permanecen flotando durante un periodo de tiempo corto, podrán ser recuperados (Oberbeckman y Labrenz, 2020).

El principal problema asociado a la entrada de residuos plásticos en el medio natural se debe a que, actualmente, la mayoría de los plásticos de uso común son polímeros sintéticos que se obtienen a partir de combustibles fósiles, los cuales son muy resistentes a la degradación. Debido a su recalcitrancia los residuos plásticos, generados durante décadas, se han ido acumulando en grandes cantidades, con el consiguiente impacto negativo sobre los ecosistemas, sobre todo en los océanos (Worm et al, 2017). No cabe duda de que los plásticos se han convertido en un problema medioambiental de primera magnitud, lo que ha despertado un creciente interés entre la comunidad científica y la industria para desarrollar materiales plásticos biodegradables que puedan sustituir a los plásticos convencionales (Prokić et al., 2019). Otro foco de interés se centra en la búsqueda de microorganismos capaces de atacar y degradar los polímeros plásticos, dando lugar a una intensa investigación en el campo de la biorremediación. Actualmente, se cree que en torno a 400 especies de bacterias y hongos son capaces de degradar ciertos plásticos, encontrándose la mayor parte de estos organismos entre las Proteobacterias, las Actinobacterias y los Firmicutes (Lear et al., 2021). A pesar de la rápida evolución de las investigaciones en la degradación microbiana, aún queda mucho

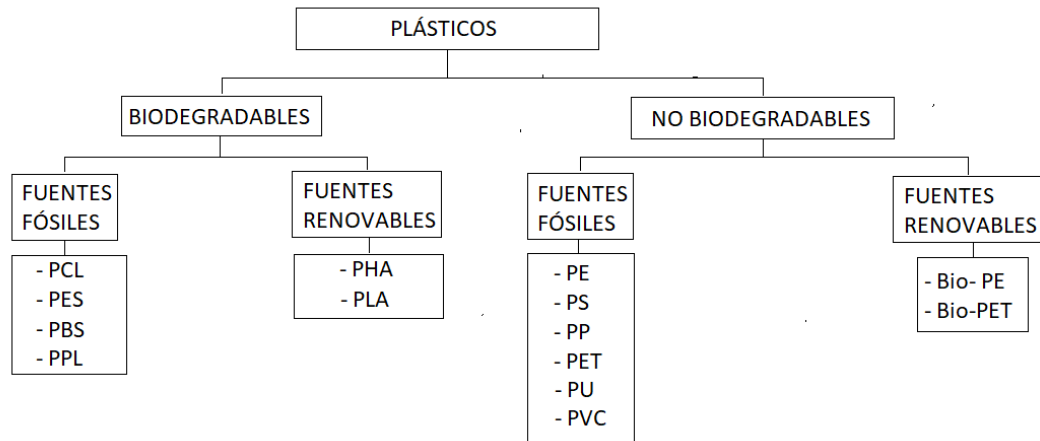
camino por recorrer identificando nuevas especies degradadoras de plásticos y sus mecanismos.

## 2. OBJETIVOS

El objeto del presente trabajo es obtener una visión global de los plásticos, los microorganismos que los degradan y sus actividades, a fin de identificar las problemáticas principales del campo de estudio e intentar encontrar soluciones metodológicas que nos ayuden a comprender mejor los procesos involucrados en su biodegradación. Para ello, exploraremos las posibilidades que ofrece la proteómica, basada en la espectrometría de masas, para investigar microorganismos y su habilidad para degradar plásticos. Revisaremos la aportación de los trabajos publicados, hasta la fecha, que combinen ambos aspectos, biodegradación de plásticos y proteómica. Y aunando estos dos campos, propondremos experimentos de proteómica clave, que consideramos darán un impulso al conocimiento de la biodegradación de los plásticos y sus mecanismos.

## 3. PLÁSTICOS

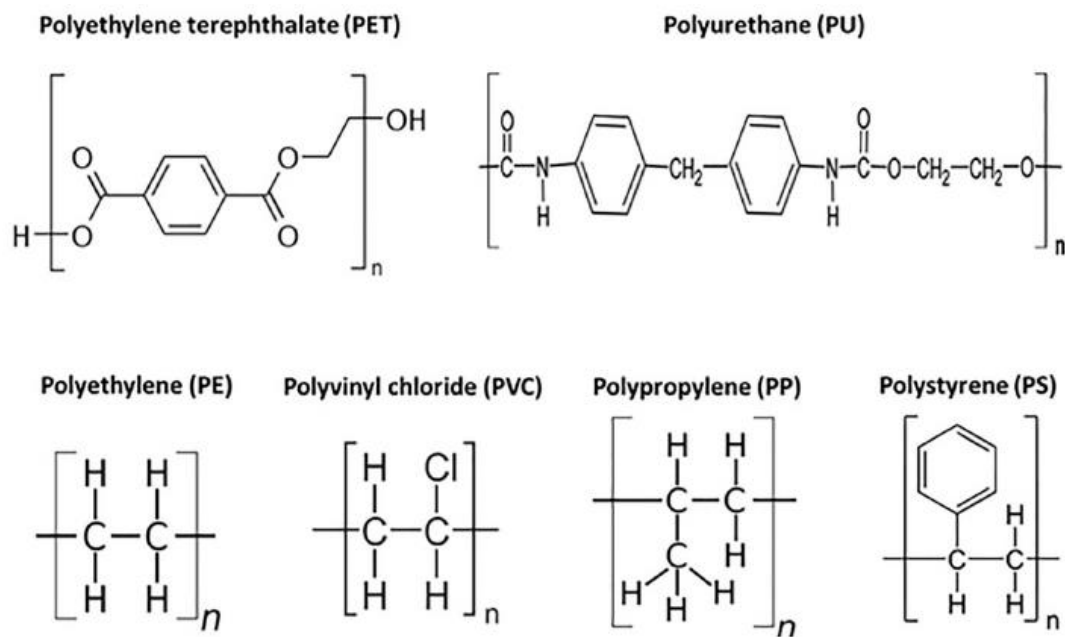
El término plástico engloba un amplio rango de polímeros orgánicos, generalmente derivados de hidrocarburos como el petróleo (Ahmed et al., 2018). Están formados por repeticiones de monómeros (pequeñas moléculas de estructura química sencilla), normalmente pertenecientes a una única especie que, al unirse entre sí, forman largas cadenas conocidas como **polímeros** (Brydson, 1999). Considerando la diversidad existente en la composición química de los diferentes tipos de plásticos, el estudio de su degradación se puede considerar un campo de investigación multidisciplinar y complejo. La clasificación de los plásticos en base a su composición química es fundamental para estudiar con precisión su potencial para ser reciclados, recuperados del medio o incluso degradados por la actividad biológica (Ahmed et al., 2018). Desde un punto de vista ambiental, las clasificaciones más recientes dividen a los plásticos en dos grandes categorías según su biodegradabilidad: plásticos biodegradables y no biodegradables. Ambos tipos de plásticos pueden, a su vez, clasificarse en función de que su producción sea o no sostenible, es decir, que se obtengan a partir de fuentes renovables o de fuentes fósiles (Figura 1).



**Figura 1.** Clasificación de los plásticos en base a su biodegradabilidad (biodegradables y no biodegradables) y origen (de fuentes fósiles o renovables). PCL = policaprolactona; PES = succinato de polietileno; PBS = succinato de polibutileno; PPL = poli- $\beta$ -propiolactona. PHA = polihidroxialcanoatos; PLA = ácido poliláctico. PE = polietileno; PS = poliestireno; PP = polipropileno; PET = polietileno tereftalato; PU = poliuretano; PVC = cloruro de polivinilo.

### 3.1 PLÁSTICOS NO BIODEGRADABLES

La mayor parte de los plásticos convencionales son polímeros no biodegradables obtenidos de derivados del petróleo y otros hidrocarburos (Figura 2). En Europa, estos plásticos supusieron más del 80% de la demanda de plásticos en el año 2019 (PlasticsEurope, 2020).



**Figura 2.** Estructura de los principales tipos de plásticos no biodegradables (Mohanán et al., 2020).

Entre los plásticos no biodegradables podemos citar el polietileno (PE), una poliolefina muy utilizada como material de embalaje y envasado. Se trata de un polímero formado por largas cadenas, obtenidas mediante la polimerización de monómeros de etileno (Tokiwa et al., 2009). Una de las características del PE es que se trata de un plástico muy hidrofóbico debido a los puentes de hidrógeno que unen fuertemente sus cadenas, lo que dificulta su biodegradación (Lambert y Wagner, 2017). No obstante, aunque se considera que el PE es un plástico no biodegradable, los oligómeros de PE de bajo peso molecular sí pueden ser degradados parcialmente por algunos microorganismos (Tokiwa et al., 2009). Con propiedades similares al anterior, aunque algo más resistente, tenemos el polipropileno (PP) cuya potencial degradación por microorganismos ha sido escasamente estudiada, pues existen pocas referencias bibliográficas al respecto (Mohanán et al., 2020). Más resistente aún a la biodegradación encontramos el poliestireno (PS), un polímero aromático formado por monómeros de estireno. Al igual que el PE y el PP, el PS posee un esqueleto carbono-carbono especialmente resistente a las enzimas que, sumado a su naturaleza aromática, hace que este plástico sea muy resistente al ataque microbiano (Mohanán et al., 2020).



A diferencia de los plásticos mencionados anteriormente, que están formados exclusivamente por carbono e hidrógeno, el cloruro de polivinilo (PVC) incorpora cloro en su estructura. El PVC es resultado de la polimerización del cloruro de vinilo y es un material muy utilizado en la construcción, a pesar de ser un compuesto considerado potencialmente cancerígeno para el ser humano. Algunos estudios han mostrado que este plástico es sensible a la fotodegradación, no obstante, su biodegradación se ha descrito en muy pocos estudios y microorganismos (Mohanani et al., 2020). Otros polímeros sintéticos de amplio uso son los poliuretanos (PU), cuyas cadenas principales contienen enlaces tipo uretano (-NH-CO-O-). Los poliuretanos son copolímeros formados por alcoholes con dos o más grupos hidroxílicos (polioles) que se combinan con isocianatos (di o triisocianatos), los cuales parece que no es posible su biodegradación completa (Tokiwa et al., 2009). Por último, entre los plásticos más recalcitrantes encontramos el polietileno tereftalato (PET), un poliéster aromático formado por la polimerización de ácido tereftálico y etilenglicol (Mohanani et al., 2020). A pesar de su resistencia a la biodegradación, cabe señalar que se ha descrito recientemente una bacteria (*Idionella sakaiensis*) que es capaz de mineralizar el PET, utilizando este polímero como única fuente de carbono y energía (Yoshida et al., 2016).

Actualmente, algunos de estos plásticos pueden producirse a partir de fuentes renovables. Por ejemplo, el Bio-PE se sintetiza a partir de bioetanol obtenido mediante la fermentación de la glucosa. En el caso del Bio-PET, el etilenglicol utilizado en su síntesis se obtiene a partir de biomasa vegetal (Iwata, 2015). Este tipo de plásticos tienen un gran interés desde el punto de vista medioambiental como sustitutos de sus equivalentes de origen petroquímico, pues, aunque son resistentes a la biodegradación, su producción es, en comparación, más sostenible (Lambert y Wagner, 2017).

### 3.2 PLÁSTICOS BIODEGRADABLES

Los plásticos biodegradables son aquellos que pueden ser degradados a CO<sub>2</sub> y agua por la acción de los microorganismos en un periodo de tiempo razonable (Iwata, 2015). Actualmente, se han descrito en torno a 72 tipos diferentes de plásticos que pueden ser degradados por microorganismos (Lear et al., 2021). Dentro de los plásticos biodegradables, encontramos polímeros de origen petroquímico como la policaprolactona (PCL), un poliéster sintético parcialmente cristalino (Tokiwa et al., 2009) formado por unidades de metileno y grupos éster (Lambert y Wagner, 2017). Este

polímero se sintetiza mediante polimerización por apertura de anillo de la  $\epsilon$ -caprolactona (Lambert y Wagner, 2017) y puede ser degradado por lipasas y esterases a diferentes tasas según su peso molecular y grado de cristalización (Tokiwa et al., 2009). Otro poliéster quimiosintético destacable es la poli- $\beta$ -propiolactona (PPL), cuyas unidades estructurales son similares a las de otros polímeros biodegradables como la PCL y el polihidroxibutirato, este último procedente de fuentes renovables (Tokiwa et al., 2009). También de origen petroquímico encontramos el succinato de polibutileno (PBS), un poliéster alifático obtenido por condensación de ácido succínico y 1,4-butanodiol que puede ser degradado por una gran diversidad de microorganismos (Tokiwa et al., 2009). El succinato de polietileno (PES) es otro poliéster sintético alifático, cuya degradabilidad es muy dependiente de las condiciones ambientales. Este polímero se puede sintetizar mediante polimerización por apertura del anillo de anhídrido succínico con óxido de etileno o por policondensación del ácido succínico con etilenglicol (Tokiwa et al., 2009).

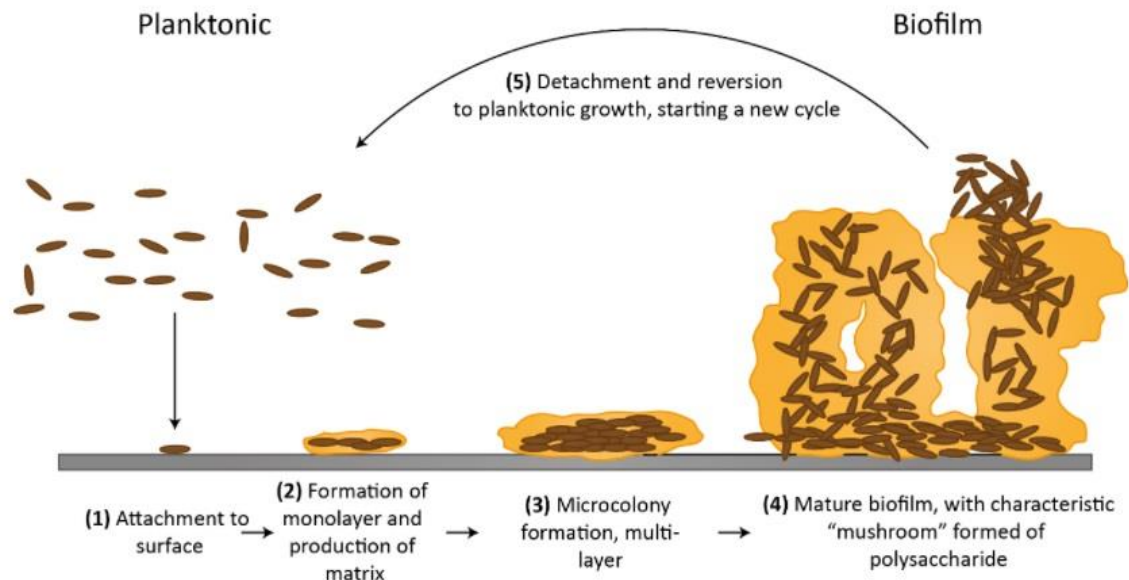
Por último, los plásticos compuestos por polímeros biodegradables obtenidos de fuentes renovables son los que mayor interés están despertando hoy en día, por razones obvias. En este grupo, podemos incluir los polihidroxialcanoatos (PHA), poliésteres naturales producidos por distintos grupos de bacterias a partir de azúcares y lípidos (Ahmed et al., 2018). La mayor parte son poliésteres lineales, en los que el grupo carboxilo y el grupo hidroxilo de monómeros vecinos forman un enlace éster. Los PHAs se acumulan intracelularmente y sirven a las bacterias que los sintetizan como reserva de carbono y energía, siendo el que las bacterias producen con más frecuencia del tipo polihidroxibutirato (PHB; Lambert y Wagner, 2017). Finalmente, cabe mencionar en este grupo al ácido poliláctico (PLA), un termoplástico biodegradable y biocompatible cuya molécula precursora, el ácido láctico, se obtiene por fermentación microbiana de azúcares procedentes de fuentes renovables, como almidón de maíz o caña de azúcar (Ahmed et al., 2018). La síntesis de PLA, a partir de ácido láctico, puede hacerse de dos maneras: directamente, por policondensación del ácido láctico, o de forma indirecta, mediante polimerización por apertura del anillo de la lactida, en la que previamente se ha transformado el ácido láctico (Tokiwa et al., 2009). Aunque el PLA se considera un plástico biodegradable, cabe señalar que el ácido láctico que constituye la base de este polímero puede existir en dos formas isoméricas: D-láctico y L-láctico, y

que solo la isoforma L del polímero se considera biodegradable (Lambert y Wagner, 2017).

#### **4. BIODEGRADACIÓN**

La adherencia de microorganismos a la superficie de los plásticos y su posterior colonización constituyen la primera fase del proceso de biodegradación (Tokiwa et al., 2009). Una vez los plásticos son liberados al ambiente, especialmente en los sistemas acuáticos, son rápidamente colonizados por comunidades microbianas, creándose un nuevo nicho ecológico conocido como “Plastisfera” (Erni-Cassola et al., 2019; Wright et al., 2020). Los microorganismos forman biofilms sobre la superficie del plástico, cuya composición y desarrollo está influenciada por muchos factores (Dussud et al., 2018). Entre ellos, la localización y las condiciones ambientales asociadas, parecen ser los principales factores que dan forma a la comunidad, además de otros como el tipo de sustrato y las propiedades de la superficie a colonizar (Rogers et al., 2020). Estos biofilms son capaces de resistir a condiciones adversas durante largos periodos de tiempo, gracias al desarrollo de estructuras tridimensionales complejas formadas por la liberación de sustancias poliméricas extracelulares (Wright et al., 2020).

La colonización de los plásticos ocurre en tres fases diferentes (Figura 3): primero, la superficie es ocupada por bacterias generalistas pioneras que forman la primera capa del biofilm inicial mediante su unión reversible; segundo, durante la fase de crecimiento los recursos y el espacio se vuelven limitantes, forzando a los microorganismos a organizarse en nichos específicos, favoreciendo a aquellos capaces de degradar el polímero plástico; por último, en la fase de maduración los organismos degradadores se liberan nuevamente en busca de otros sustratos y son superados por otros microorganismos (Dussud et al., 2018; Oberbeckmann et al., 2018; Wright et al., 2020).



**Figura 3.** Representación esquemática de la formación de biofilms (Hollman et al., 2020).

Diversos estudios han descrito la capacidad de biodegradar plástico de algunas cepas microbianas, tanto de bacterias como de hongos, capaces de usar el plástico como fuente de carbono y energía. Basándonos en estas observaciones, podemos definir la biodegradación como la asimilación y mineralización de polímeros, resultando en la conversión total o parcial del carbono orgánico en  $\text{CO}_2$  (en anaerobiosis,  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$ ) y biomasa por medio de la actividad de los microorganismos (Ahmed et al., 2018; Jacquinet al., 2019; Wright et al., 2020). Cabe considerar que, dada la gran heterogeneidad existente en los materiales plásticos, resulta evidente pensar que estos materiales serán degradados por una diversidad equivalente de microorganismos. Sumado a esta complejidad inicial, y aunque se han descrito cepas microbianas que, por sí mismas, son capaces de degradar algunos tipos de plásticos en cultivo puro, en los ambientes naturales los plásticos son normalmente degradados por consorcios microbianos, en los que diferentes especies de microorganismos cooperan en el proceso de degradación (Marten et al., 2003; Bhardwaj et al., 2013).

La biodegradación de los plásticos es, por tanto, un proceso llevado a cabo por hongos y bacterias, en el que se producen cambios en las propiedades de estos polímeros tales como la fuerza de tensión, color, forma, estructura química y peso molecular. Esta biodegradación requiere que los microorganismos metabolicen los componentes orgánicos del polímero mediante la acción de enzimas extracelulares e

intracelulares (Jayasekara et al., 2005; Zumstein et al., 2018; Fesseha y Abebe, 2019). Durante la degradación, el polímero es convertido primero a sus monómeros, que son posteriormente mineralizados. Dada la insolubilidad en agua de las moléculas de los polímeros y el tamaño de estas, los microorganismos no son capaces de incorporarlos directamente al interior celular, por lo que primero tienen que transformarlos fuera de las células, mediante la secreción de enzimas extracelulares. Cuando la masa molecular de los polímeros es lo suficientemente reducida, pueden ser transportados al interior de los microorganismos y entrar en las rutas metabólicas. (Mueller, 2006; Shah et al., 2008).

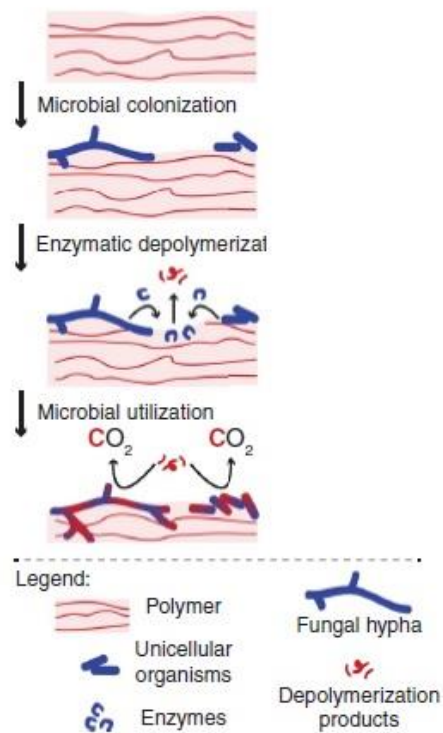
La degradación de polímeros sintéticos y naturales sigue un esquema básico similar, pudiendo ser esquematizados en varias etapas: biodeterioro, biofragmentación, asimilación y mineralización (Figura 4; Marten et al., 2003; Shah et al., 2008; Zumstein et al., 2018).

**Biodeterioro:** consiste en la formación inicial del biofilm sobre el plástico y una degradación superficial que modifica las propiedades mecánicas, físicas y químicas del sustrato plástico. Se produce un deterioro físico leve, por la generación de grietas que debilitan las propiedades del plástico, y un deterioro químico, por ejemplo, por modificación del pH, que cambia la microestructura de la matriz del polímero.

**Biofragmentación:** es la fase de degradación más profunda. En ella los microorganismos colonizadores liberan enzimas extracelulares, cuya actuación lleva a la reducción del peso molecular de los polímeros. El resultado de esta etapa es la generación de intermediarios solubles, en forma de oligómeros y monómeros derivados de la destrucción del material plástico sólido capa por capa, que ahora sí pueden ser asimilados por las células.

**Asimilación:** los intermediarios solubles son incorporados al interior de las células para ser usados como fuente de carbono y energía, lo que permite la formación de nuevas estructuras celulares y, en consecuencia, el crecimiento de las poblaciones microbianas.

**Mineralización:** es la última etapa que resulta en la liberación de moléculas simples ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  y  $\text{H}_2\text{O}$ ). En una situación ideal, en la que el polímero fuera completamente descompuesto en ambientes aeróbicos, los productos finales serían tan básicos como el  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y biomasa.



**Figura 4.** Fases de la biodegradación de plásticos (Zumstein et al., 2018).

A los procesos de biodegradación por microorganismos o biótica, hay que sumarle la degradación no biológica o abiótica. La degradación abiótica produce la rotura de los plásticos en fragmentos de menor tamaño, debilita la estructura de los polímeros, provoca la pérdida de aditivos tales como plastificantes y crea una superficie más hidrofílica en el plástico lo que, en su conjunto, mejora su biodisponibilidad para microorganismos degradadores. La alteración de las propiedades fisicoquímicas de los plásticos o meteorización ocurre debido a la incidencia natural de múltiples factores físicos y/o químicos, entre los que podemos encontrar la luz UV, el oxígeno, temperaturas elevadas o la acción mecánica, entre otros muchos (Lucas et al., 2008; Krueger et al., 2015; Wei y Zimmerman, 2017; Jacquin et al., 2019; Rogers et al., 2020).

#### 4.1 BIODEGRADACIÓN AERÓBICA Y ANAERÓBICA

Los polímeros pueden ser degradados en ambientes microbianos por degradación aeróbica, anaeróbica o una combinación de ambas. Los microorganismos aeróbicos usan el oxígeno como aceptor de electrones, obteniéndose como productos

finales CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. Por su parte, la biodegradación anaeróbica utiliza aceptores diferentes del oxígeno como el nitrato, sulfato, hierro, etc., dando lugar a la producción de CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y otros subproductos, en función del aceptor de electrones utilizado. (Jayasekara et al., 2005; Fesseha y Abebe, 2019). Cabe señalar que los procesos aeróbicos rinden mucha más energía y son capaces de soportar una población mayor que los procesos anaeróbicos, ya que el oxígeno es un aceptor de electrones más eficiente (Gu, 2003).

#### 4.2 FACTORES QUE AFECTAN A LA BIODEGRADACIÓN

La biodegradabilidad de los polímeros está gobernada por diferentes factores interrelacionados, entre los que se incluyen principalmente las características del polímero, las condiciones ambientales en las que se lleva a cabo la degradación y el tipo de microorganismo. Las características del polímero juegan un papel vital en su degradación, tales como su composición, la presencia de grupos funcionales en su estructura, peso molecular o grado de cristalinidad. Aquellos polímeros que poseen enlaces fácilmente hidrolizables (enlaces tipo éster o amida), menor peso molecular y ausencia de cadenas laterales son más fáciles de degradar, debido a su accesibilidad y la correlación existente entre la reducción del peso molecular y el aumento de la solubilidad, lo que facilita la asimilación por los microorganismos. En cuanto a la cristalinidad, las regiones amorfas del polímero son más fácilmente degradadas que los dominios cristalinos, en los que el material queda protegido frente al ataque enzimático. Todos estos factores se encuentran afectados, en gran medida, por las condiciones ambientales en las que se encuentra el plástico, que pueden facilitar la meteorización de sus materiales y, por tanto, incrementar su susceptibilidad a la biodegradación. De igual forma, las condiciones ambientales determinan la eficacia del microorganismo degradador, donde la temperatura, disponibilidad de agua o incluso la relación C/N en el ambiente podrían ser factores críticos para una biodegradación óptima. (Marten et al., 2003; Mueller, 2006; Bhardwaj et al., 2013; Wei y Zimmerman, 2017; Fesseha y Abebe, 2019).

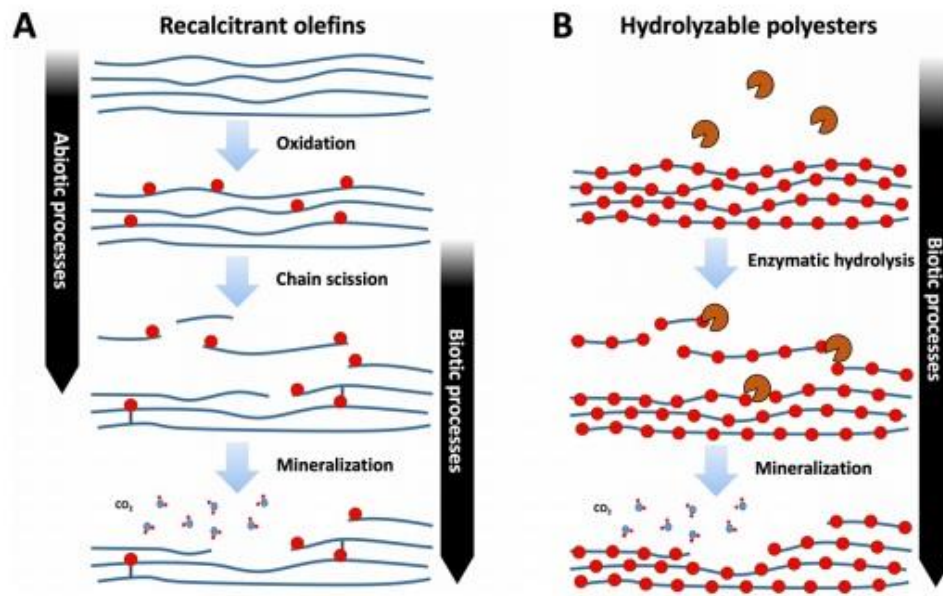
#### 4.3 MECANISMOS DE BIODEGRADACIÓN Y ENZIMAS INVOLUCRADAS

La degradación de los plásticos sintéticos es un proceso lento, en el que intervienen reacciones enzimáticas de oxidación y/o hidrólisis. Como se ha indicado

anteriormente, los polímeros plásticos están formados por cadenas demasiado largas para atravesar la membrana celular y ser utilizadas como fuente de carbono y energía. Por ello, los microorganismos necesitan producir enzimas extracelulares que rompen los sustratos en sus monómeros y oligómeros para, una vez en el interior celular, continuar la degradación por medio de enzimas intracelulares (Ghose et al., 2013; Fessehay Abebe, 2019).

El tipo de enzimas extracelulares involucradas en el ataque inicial al polímero varía con las especies microbianas, incluso entre cepas de la misma especie, y fundamentalmente, con el tipo de plástico (Bhardwaj et al., 2013). Además, es importante tener en cuenta que su rango de acción queda limitado a la superficie del plástico, pues no pueden penetrar en el material (Gu, 2003; Mueller, 2006) y estas enzimas suelen seguir mecanismos de acción catalítica que requieren de la unión al sustrato (Shah et al., 2008). Desde el punto de vista de las actividades enzimáticas, los plásticos pueden ser clasificados en dos grandes grupos: plásticos hidrolizables y no hidrolizables, siendo los primeros los más susceptibles a la biodegradación. Los plásticos hidrolizables, como PET, PURs y todos los poliésteres biodegradables, poseen enlaces de tipo éster o amida, que pueden ser atacados por varias hidrolasas extracelulares como lipasas, esterasas, proteasas o ureasas, responsables de catalizar la rotura de estos enlaces mediante hidrólisis. En los plásticos no hidrolizables, tales como PE, PP, PS y PVC, el ataque microbiano se ve dificultado por la ausencia de grupos reactivos en su estructura química. En esta situación, los procesos de meteorización abiótica (foto y termo-oxidación) cobran mayor importancia, facilitando el posterior ataque enzimático. Las enzimas involucradas en este caso son oxidasas como, por ejemplo, mono y dioxigenasas, que incorporan respectivamente uno o dos átomos de oxígeno y forman grupos alcohol o peroxi que promueven la rotura de las cadenas poliméricas, facilitando su biodegradación. Finalmente, algunas enzimas (por ejemplo, lacasas y diversas peroxidases) involucradas en la degradación de materiales aparentemente no relacionados, como la lignina, también parecen contribuir a la degradación de los plásticos no hidrolizables (Lucas et al., 2008; Wei y Zimmerman, 2017; Wright et al., 2020) (Figura 5).





**Figura 5.** Pasos requeridos para la degradación de plásticos no hidrolizables (olefinas recalcitrantes) (A) e hidrolizables (poliésteres) (B). Las líneas azules representan las cadenas de los polímeros y los círculos rojos simbolizan los átomos de oxígeno. Las enzimas hidrolíticas están representadas en marrón (Wright et al., 2020).

## 5. PROTEÓMICA

### 5.1 INTRODUCCIÓN

Las células y sus funciones están bajo el control preciso de diversos mecanismos de regulación a diferentes niveles, que abarcan desde la regulación de la expresión génica (transcripción), tasa de síntesis de proteínas (traducción) y degradación de proteínas, entre otros muchos. A estos mecanismos básicos hay que sumarle, por una parte, la variabilidad añadida por el procesado o splicing de las secuencias de ARN dando lugar a múltiples isoformas y, por otra, las modificaciones post-traduccionales que pueden añadir o quitar funciones (actividad enzimática, interacciones, formación de complejos activos, etc.) de forma instantánea y precisa, sin necesidad de alterar sus

niveles de expresión. Está bien establecido que las proteínas son las biomoléculas funcionales básicas para cualquier función y, por tanto, conocer su actividad es esencial para entender los mecanismos celulares durante los procesos de biodegradación. Por tanto, en adición a otros datos a nivel de sistema que incluyen la genómica, transcriptómica y metabolómica, la proteómica nos proporciona datos moleculares que permiten capturar una imagen de la actividad e interacción de las comunidades microbianas, fundamental para entender los procesos de biodegradación de plásticos.

Bajo el término proteómica podemos englobar todas aquellas tecnologías que identifican, cuantifican y/o localizan las proteínas que expresa una célula. El proteoma, definido como todas las proteínas que se expresan en una célula, varía constantemente adaptándose a las nuevas condiciones celulares y del medio. El estudio comparativo de la adaptación del proteoma en el espacio y el tiempo a perturbaciones externas es el principal objeto de estudio de la proteómica y ofrece un gran potencial para entender las respuestas de los microorganismos a la presencia de plásticos y cómo se enfrentan a ellos. Por ello, consideramos que la proteómica se presenta como una herramienta fundamental para localizar y/o entender las rutas metabólicas y enzimas activadas en presencia de plásticos, ayudando a investigar cómo estos son transformados o degradados y alcanzar un conocimiento básico para conseguir la biorremediación de los plásticos eficiente y efectiva (Cao et al., 2009; Dessai et al., 2009; Wilmes et al., 2009; San Miguel-Hernández et al., 2009; Zhu et al., 2021).

La proteómica ha contribuido con éxito en tres campos principales en biodegradación: (i) el estudio de la respuesta bacteriana a los contaminantes ambientales; (ii) identificación de proteínas/enzimas clave involucradas en el metabolismo de estos compuestos; y (iii) análisis de la estructura de la comunidad microbiana durante el proceso de biodegradación in situ (Chauhan et al., 2010). Considerando los avances realizados hasta el momento actual, la proteómica nos ofrece capacidades ilimitadas para investigar cualquier tipo de proteoma y proteína, desde las secretadas a las intracelulares, en cualquier organismo o mezcla de ellos, del que poseamos su secuencia de ADN, dejando en manos de los investigadores grandes oportunidades para entender la biodegradación de los plásticos.

## 5.2 ASPECTOS TÉCNICOS

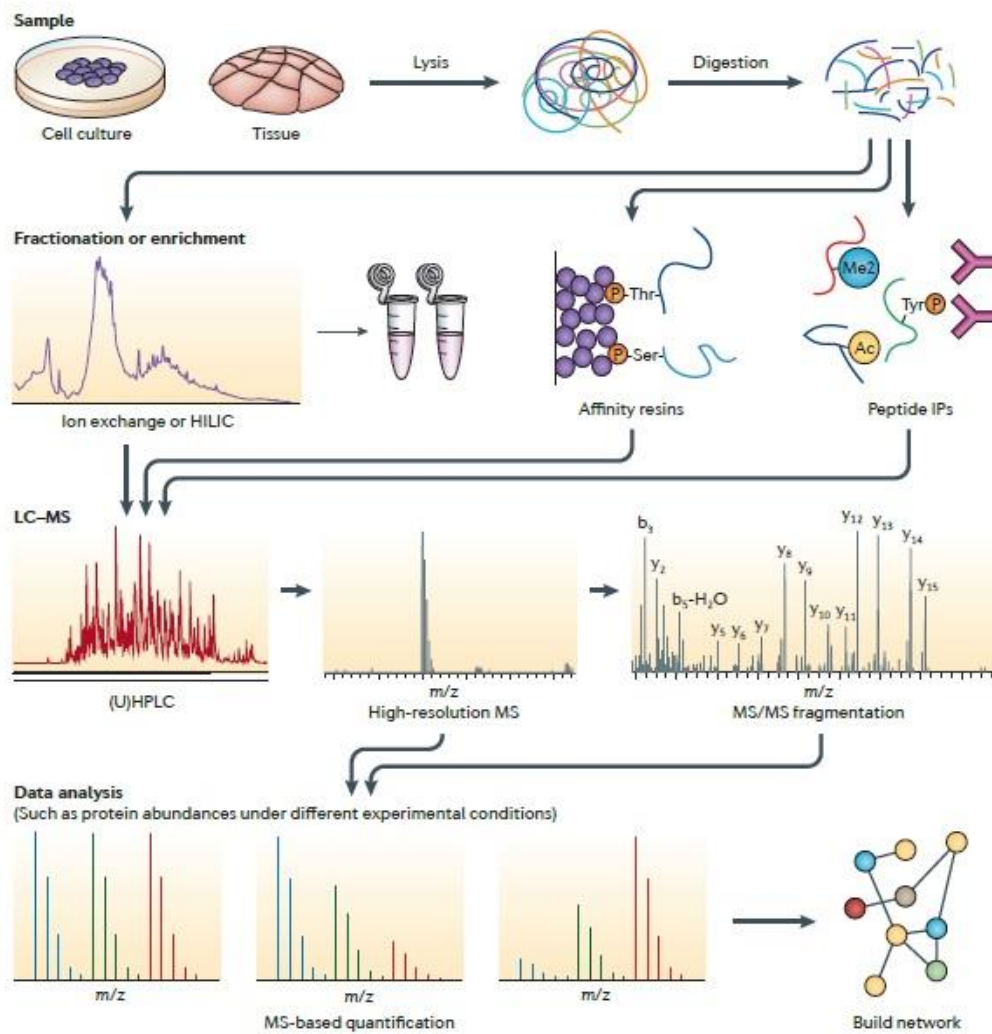
El concepto moderno de la proteómica se encuentra estrechamente ligado a la espectrometría de masas. Esta asociación debe su éxito, en gran parte, al desarrollo de las herramientas de espectrometría de masas que permiten, de forma masiva, identificar y cuantificar miles de proteínas y sus modificaciones postraduccionales. La adquisición masiva de datos ha obligado al desarrollo paralelo y asociación obligada de métodos complejos de análisis de datos, proceso por el que se asignan los datos numéricos observados en el instrumento a la identificación de proteínas, empleando algoritmos estadísticos (San Miguel-Hernández et al., 2009; Altelaar et al., 2012).

El protocolo básico de proteómica parte de una muestra de células de la que extraemos las proteínas de interés, pudiendo ser una fracción (intra o extracelular) o el proteoma al completo. A continuación, y a fin de reducir la complejidad de las proteínas, estas se dividen en fragmentos pequeños o péptidos, digiriendo las muestras, normalmente con tripsina (corta sobre la lisina y la arginina, resultando en péptidos de aproximadamente 10-15 aminoácidos). De esta forma, obtenemos fragmentos o péptidos que son más fáciles de manejar por los equipos y de interpretar por los programas de identificación. Pero fragmentar las proteínas, al mismo tiempo incrementa la complejidad de la muestra de modo exponencial, y es por lo que los equipos de masas actuales combinan cromatografías de alta resolución (UPLC) en forma de columnas capilares (5  $\mu\text{m}$  de diámetro), que son capaces de reducir la complejidad de las muestras dando tiempo a los equipos de masas a analizar decenas de péptidos por segundo. Ambas partes combinadas, la cromatografía (UPLC) y los espectrómetros de masas (MS) forman el tándem UPLC-MS que permite el análisis de miles de moléculas (péptidos) a la hora, haciendo posible la identificación y cuantificación de aproximadamente 3000-4000 proteínas en tan solo una hora de análisis. Una vez identificados y cuantificados los péptidos de nuestra muestra, el puzle se reconstruye informáticamente, uniendo todos los péptidos pertenecientes a una misma proteína, asignando una identidad y cantidad a la unidad (Figura 6).

De forma simplificada, los estudios de proteómica básicos son equivalentes a realizar miles de western blots al mismo tiempo, con la ventaja de no necesitar un conocimiento previo de la proteína que estamos buscando. El análisis identifica y cuantifica aleatoriamente todas las proteínas que los instrumentos son capaces de

detectar, existiendo una correlación directa entre el tiempo de análisis y el número de identificaciones totales. Es decir, a más tiempo empleemos en el análisis, más proteínas identificaremos (por supuesto existe un límite marcado por la calidad de la muestra y el número de proteínas totales contenidas en ella).

El objeto fundamental de la proteómica por espectrometría de masas es la cuantificación relativa de proteínas y esta puede dividirse en dos categorías principales: cuantificación con marcaje (SILAC, TMT, iTRAQ, etc.) y sin marcaje (Label free quantification, LFQ). En las muestras marcadas, los péptidos derivados de la digestión de las proteínas provenientes de las diferentes condiciones experimentales se etiquetan, con moléculas químicas distinguibles en el espectro de masas, y se mezclan en una única muestra en estadios tempranos del protocolo. De esta forma, se minimizan los errores causados por la manipulación del investigador y durante el análisis en el espectro de masas, puesto que todo el proceso se realiza sobre una muestra y simultáneamente sobre todas las condiciones experimentales. Una vez analizadas en el espectrómetro de masas, en una única carrera, es fácil distinguir la procedencia de los péptidos en base a su marcaje inicial. Marcar las muestras, aunque incrementa el coste inicial por la inversión en tiempo y las propias etiquetas químicas, compensan la inversión final con la reducción significativa del tiempo de análisis en los instrumentos, el cual suele ser el factor económico más importante. En comparación, las aproximaciones sin marcaje son las más populares por su simplicidad, bajo coste inicial y versatilidad, al no requerir más que la extracción de proteínas y digestión con proteasas. Como principal desventaja, estas muestras deben procesarse y analizarse en el espectrómetro de masas por separado, por lo que requieren de mayor precisión y fiabilidad de los métodos de análisis, aunque hoy en día son extremadamente fiables. (Altelaar et al., 2012; Armenagud et al., 2012). En términos de coste, son más económicas que el marcaje si los experimentos constan de un número de muestras contenido (no más de 10 muestras) pero en cuanto se supera este número, por simple reducción del tiempo de análisis y los costes asociados, los marcajes son claramente más rentables.



**Figura 6.** Flujo de trabajo de un experimento de proteómica, empleando la espectrometría de masas. Las proteínas se extraen en solución empleando tampones compatibles con todo el proceso. A continuación, las proteínas se digieren para obtener péptidos. Dependiendo del objetivo final, estas mezclas se pueden enriquecer en péptidos modificados (fosforilación, metilación, etc.), empleando resinas o anticuerpos específicos. O incluso es posible fraccionar muestras complejas, a fin de reducir su complejidad e incrementar el número de identificaciones/cuantificaciones. Las muestras prefraccionadas o enriquecidas se introducen en el sistema cromatográfico UPLC, para un paso de separación adicional, con el fin de reducir aún más su complejidad y ser analizados secuencialmente por el espectro de masas (MS). El MS registra la relación masa/carga de cada péptido y es sometido a fragmentación a fin de elucidar su secuencia y, por tanto, proceder con su identificación. El conjunto de masas del péptido y sus fragmentos se emparejan, mediante análisis bioinformático, con secuencias de péptidos conocidas extraídas de las bases de datos publicadas. Los péptidos identificados son cuantificados y agrupados acorde a la proteína a la que pertenecen para, finalmente, con los datos de identificación y cuantificación proceder al análisis comparativo de nuestras condiciones experimentales (Atelaar et al., 2012).

### 5.3 AVANCES EN BIORREMEDIACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR PLÁSTICOS

En la revisión bibliográfica realizada, hemos encontrado varios estudios de proteómica en el campo de la biorremediación de plásticos. La mayor parte de ellos son específicos, centrándose en una única especie o un único tipo de plástico. De algunos de estos estudios podemos extraer ciertas generalidades, puesto que la mayoría de las clases de enzimas con capacidad degradadora anotadas en ellos corresponden a las oxidorreductasas, hidrolasas y liasas. Sin embargo, la mayoría de los trabajos discute enzimas específicas, dependiendo del organismo o del plástico objeto de degradación, haciendo siempre referencia a una actividad muy concreta, lo que hace difícil pensar en la existencia de rutas metabólicas degradadoras del plástico, sea en uno o en combinación de varios organismos. Por ejemplo, Medić et al., en un estudio llevado a cabo en 2019, encuentran que la especie *Pseudomonas aeruginosa* degrada rápidamente el aditivo 2,6-di-ter-butilfenol, con una capacidad de degradación del 85% en 7 días por medio de la liberación de mono y dioxigenasas. Mientras que, en un estudio posterior de Tessei et al., sobre la capacidad de *Knufia chersonesos* de degradar poliésteres, las protagonistas son las poliesterasas, lipasas y cutinasas principalmente (Tessei et al., 2020). En conclusión, la clara especificidad de las enzimas producidas por los microorganismos y el sustrato polimérico hace suponer que dichas proteínas se encontraran altamente conservadas, lo que deja las puertas abiertas para encontrar nuevos organismos degradadores de plásticos, que posean una o combinaciones de varias de las enzimas degradadoras ya descritas. Un claro ejemplo lo encontramos en una reciente publicación (Zadjelovic et al., 2020) realizada sobre el género *Alcanivorax*, un microorganismo intensamente estudiado por su capacidad para degradar el petróleo en el ambiente marino. Los autores encontraron que *Alcanivorax* fue igualmente capaz de degradar poliésteres e hicieron una descripción exhaustiva de las proteínas secretadas, empleando proteómica, y responsables de dicha actividad.

En base a todo lo expuesto, proponemos algunas líneas de investigación futuras que consideramos aportarían información relevante para impulsar el campo de la biodegradación de los plásticos.

## **1. Método de cribado de organismos con capacidad degradadora conocida.**

Los diversos estudios realizados hasta el momento en biodegradación de plásticos nos permiten generar una base de datos de proteínas degradadoras y sus secuencias, o lo que podríamos denominar el meta-degradoma. Asumiendo que estas proteínas, debido a su elevada especificidad por el sustrato, se encuentran altamente conservadas, podemos realizar una búsqueda dirigida de proteínas degradadoras conservadas en muestras ambientales, conteniendo múltiples organismos desconocidos. A fin de incrementar las probabilidades de encontrar organismos degradadores de plásticos, estas muestras pueden ser extraídas de ambientes naturales contaminados, en presencia de residuos plásticos o derivados del petróleo. Aun así, consideramos que es importante explorar también ambientes no contaminados, en busca de microorganismos minoritarios o latentes que, sobreviviendo de moléculas naturales parecidas a los plásticos, poseen capacidades degradadoras. En este punto, cabría la posibilidad de incubar las muestras en presencia de mezclas de plásticos biodegradables, a fin de enriquecer los microorganismos minoritarios. Considerando que los microorganismos secretan las enzimas para llevar a cabo la degradación de los plásticos, proponemos concentrar el contenido proteico extracelular a partir de lavados y concentrados de tierras o agua de mar, de ambientes limpios y contaminados. A continuación, mediante proteómica dirigida, identificar solo las proteínas conocidas degradadoras, como indicadores de la capacidad degradadora de los extractos. Aquellos extractos que resulten positivos se emplearán para realizar cribados más exhaustivos e incluso identificar el o los microorganismos responsables de la actividad. Este método sería una aproximación novedosa en el campo de la biorremediación, que permite analizar un gran número de muestras en poco tiempo, confiando en la conservación evolutiva de las proteínas degradadoras y la presencia ubicua de todos los microorganismos.

## **2. Identificación de las enzimas o rutas metabólicas involucradas en la degradación de mezclas complejas de microorganismos.**

A partir de las muestras con actividad biodegradadora del cribado anterior, proponemos definir el proteoma responsable de dicha actividad. El primer paso consiste en obtener las secuencias de sus proteomas, existentes en las bases de datos, para crear un

meta-proteoma, es decir, la combinación de todos los proteomas. Para ello es imprescindible proceder a su identificación mediante secuenciación genómica, por ejemplo, por secuenciación del ARN ribosómico 16S. En los pasos iniciales el meta-proteoma se puede construir en lotes reducidos de organismos, simplificando las búsquedas bioinformáticas, e ir progresivamente refinando las futuras búsquedas, incluyendo en nuestro meta-proteoma solo los proteomas que resulten dominantes. Metodológicamente, los extractos de microorganismos se cultivarán en ambientes que simulen su estado natural (agua de mar o tierra), en dos condiciones: añadiendo un contaminante plástico simple y soluble o sin él. Aquel organismo que use el plástico como fuente de carbono progresará y adaptará su proteoma para aprovechar los recursos existentes. Los análisis se podrán realizar a nivel del proteoma extracelular (secretoma) o el intracelular (proteoma). Este método nos ayudará a confirmar la identidad de los microorganismos degradadores, a evaluar comunidades complejas con potenciales colaboraciones tróficas e identificar la activación de rutas metabólicas si existieran.

- 3. Proteínas esenciales para la formación de biofilms.** El primer paso en cualquier proceso de biodegradación es la colonización del material y la formación de biofilms. Es un evento esencial puesto que los microorganismos necesitan estar adheridos al plástico para poder llevar a cabo su función degradadora. Sin embargo, no existen estudios, al menos acorde a nuestro conocimiento, que hayan estudiado en detalle los mecanismos moleculares necesarios para el establecimiento de biofilms. En este experimento proponemos elucidar los mecanismos moleculares, que emplean los microorganismos degradadores, en los estadios tempranos (establecimiento) y tardíos (tráfico de enzimas y nutrientes entre el sustrato y la célula). Para ello, cultivaremos un microorganismo degradador conocido en suspensión en presencia de una lámina de plástico, que sea capaz de degradar. En un primer paso, estableceremos el tiempo necesario para que el organismo se adhiera a la superficie determinando los tiempos tempranos y tardíos, acorde al ratio de organismo libre/adherido y la formación de matriz extracelular. A continuación, extraeremos todas las proteínas adheridas a la superficie (extra e intracelulares) a fin de proceder a su identificación y cuantificación. Estos proteomas serán comparados contra los



organismos libres o sobre sustratos no plásticos, bajo exactamente las mismas condiciones experimentales. Las proteínas que se expresen de forma diferencial serán aquellas que de alguna forma participen en el establecimiento del biofilm, la degradación o el tráfico de nutrientes y enzimas. Además de la información que aportaría este experimento en el campo de la biodegradación, cabe destacar que estos resultados resultarían de sumo interés en otros ámbitos como el sanitario, donde la prevención de la formación de biofilms bacterianos en superficies plásticas (como pueden ser los catéteres) es de gran interés, por el riesgo que ello supone para la salud de los pacientes (por ejemplo, con cáncer), provocando serias complicaciones adicionales.

## **6. CONCLUSIONES**

En los últimos años, la producción industrial de plásticos ha ido en aumento y, en consecuencia, la tasa de liberación de estos contaminantes al medio es cada vez mayor, provocando graves problemas de contaminación ambiental. En el medio natural existen microorganismos capaces de degradar parcialmente algunos de estos plásticos a través de la liberación de enzimas específicas. Estos procesos de biodegradación son complejos y, por tanto, difíciles de estudiar en profundidad. Una herramienta muy útil para el estudio de sistemas complejos es la proteómica, basada en la espectrometría de masas. Por medio de análisis proteómicos, se han identificado algunas de las proteínas clave, implicadas en los procesos de biodegradación de plásticos, abriendo nuevas posibilidades para descubrir más microorganismos degradadores. La proteómica aplicada a la biorremediación nos permitirá responder a preguntas de interés en el campo de los plásticos. Con esta revisión pretendemos aportar ideas aplicadas a futuras investigaciones en biorremediación, que profundicen en el estudio de los microorganismos, sus rutas metabólicas y proteínas con capacidad degradadora de plásticos, empleando para ello la proteómica.

## **7. CONCLUSIONS**

Industrial production of plastics has been increasing in recent years and linked to this, the release rate of these pollutants to the environment has been growing, which leads to serious environmental contamination. There are microorganisms in the nature

capable of degrading some of these plastics by the release of specific enzymes. These biodegradation processes are complex and therefore difficult to study in detail. Mass spectrometry-based proteomics provides us with useful tools to investigate complex biological protein systems. Proteomics research has identified key proteins involved in plastic biodegradation, opening new perspectives to discover novel microorganisms. Proteomics applied to the plastic biodegradation enable us to respond key question in the field. This review aims to contribute with ideas for future plastic bioremediation research focused on the microorganism, their metabolic routes and enzymes using proteomics technology.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Ahmed, T., Shahid, M., Azeem, F., Rasul, I., Shah, A. A., Noman, M., Hameed, A., Manzoor, N., Manzoor, I., & Muhammad, S. (2018). Biodegradation of plastics: current scenario and prospects for environmental safety. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(8), 7287–7298. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1234-9>

Altelaar, A. F. M., Munoz, J., & Heck, A. J. R. (2012). Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nature Reviews Genetics*, 14(1), 35–48. <https://doi.org/10.1038/nrg3356>

Armengaud, J., Christie-Oleza, J. A., Clair, G., Malard, V., & Duport, C. (2012). Exoproteomics: exploring the world around biological systems. *Expert Review of Proteomics*, 9(5), 561–575. <https://doi.org/10.1586/epr.12.52>

Bhardwaj, H., Gupta, R., & Tiwari, A. (2012). Communities of Microbial Enzymes Associated with Biodegradation of Plastics. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(2), 575–579. <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0456-z>

Brydsons, J. A. (1999). *PlasticsMaterials* (7th ed.). Elsevier.

Cao, B., Nagarajan, K., & Loh, K. C. (2009). Biodegradation of aromatic compounds: status and opportunities for biomolecular approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(2), 207–228. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2192-4>

Chauhan, A., & Jain, R. K. (2010). Biodegradation: gaining insight through proteomics. *Biodegradation*, 21(6), 861–879. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9361-0>

Desai, C., Pathak, H., & Madamwar, D. (2010). Advances in molecular and “-omics” technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites. *Bioresource Technology*, 101(6), 1558–1569. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.080>

Dussud, C., Hudec, C., George, M., Fabre, P., Higgs, P., Bruzaud, S., Delort, A. M., Eyheraguibel, B., Meistertzheim, A. L., Jacquin, J., Cheng, J., Callac, N., Odobel, C.,

- Rabouille, S., & Ghiglione, J. F. (2018). Colonization of Non-biodegradable and Biodegradable Plastics by Marine Microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01571>
- Erni-Cassola, G., Wright, R. J., Gibson, M. I., & Christie-Oleza, J. A. (2019). Early Colonization of Weathered Polyethylene by Distinct Bacteria in Marine Coastal Seawater. *Microbial Ecology*, 79(3), 517–526. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01424-5>
- Fesseha, H., & Abebe, F. (2019). Degradation of Plastic Materials Using Microorganisms: A Review. *Public Health – Open Journal*, 4(2), 57–63. <https://doi.org/10.17140/phoj-4-136>
- Ghosh, S. K., Pal, S., & Ray, S. (2013). Study of microbes having potentiality for biodegradation of plastics. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(7), 4339–4355. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1706-x>
- Gu, J. D. (2003). Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52(2), 69–91. [https://doi.org/10.1016/s0964-8305\(02\)00177-4](https://doi.org/10.1016/s0964-8305(02)00177-4)
- Hollman, B. (2020). *Schematic representation of a biofilm formation*. [Ilustración]. <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/pathogens-and-disease/biofilms-and-their-role-in>
- Iwata, T. (2015). ChemInform Abstract: Biodegradable and Bio-Based Polymers: Prospects of Eco-Friendly Plastics. *ChemInform*, 46(18), no. <https://doi.org/10.1002/chin.201518345>
- Jacquín, J., Cheng, J., Odobel, C., Pandin, C., Conan, P., Pujo-Pay, M., Barbe, V., Meistertzheim, A. L., & Ghiglione, J. F. (2019). Microbial Ecotoxicology of Marine Plastic Debris: A Review on Colonization and Biodegradation by the “Plastisphere”. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00865>
- Jayasekara, R., Harding, I., Bowater, I., & Lonergan, G. (2005). Biodegradability of a Selected Range of Polymers and Polymer Blends and Standard Methods for Assessment of Biodegradation. *Journal of Polymers and the Environment*, 13(3), 231–251. <https://doi.org/10.1007/s10924-005-4758-2>
- Krueger, M. C., Harms, H., & Schlosser, D. (2015). Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plastics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(21), 8857–8874. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6879-4>
- Lambert, S., & Wagner, M. (2017). Environmental performance of bio-based and biodegradable plastics: the road ahead. *Chemical Society Reviews*, 46(22), 6855–6871. <https://doi.org/10.1039/c7cs00149e>

- Lear, G., Kingsbury, J. M., Franchini, S., Gambarini, V., Maday, S. D. M., Wallbank, J. A., Weaver, L., & Pantos, O. (2021). Plastics and the microbiome: impacts and solutions. *Environmental Microbiome*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s40793-020-00371-w>
- Lucas, N., Bienaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F., & Nava-Saucedo, J. E. (2008). Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review. *Chemosphere*, 73(4), 429–442. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.064>
- Marten, E., Müller, R. J., & Deckwer, W. D. (2003). Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters I. Low molecular mass model esters and aliphatic polyesters. *Polymer Degradation and Stability*, 80(3), 485–501. [https://doi.org/10.1016/s0141-3910\(03\)00032-6](https://doi.org/10.1016/s0141-3910(03)00032-6)
- Medić, A., Stojanović, K., Izrael-Živković, L., Beškoski, V., Lončarević, B., Kazazić, S., & Karadžić, I. (2019). A comprehensive study of conditions of the biodegradation of a plastic additive 2,6-di-tert-butylphenol and proteomic changes in the degrader *Pseudomonas aeruginosa*. *RSC Advances*, 9(41), 23696–23710. <https://doi.org/10.1039/c9ra04298a>
- Mohanani, N., Montazer, Z., Sharma, P. K., & Levin, D. B. (2020). Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580709>
- Mueller, R. J. (2006). Biological degradation of synthetic polyesters—Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. *Process Biochemistry*, 41(10), 2124–2128. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.018>
- Oberbeckmann, S., Kreikemeyer, B., & Labrenz, M. (2018). Environmental Factors Support the Formation of Specific Bacterial Assemblages on Microplastics. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02709>
- Oberbeckmann, S., & Labrenz, M. (2020). Marine Microbial Assemblages on Microplastics: Diversity, Adaptation, and Role in Degradation. *Annual Review of Marine Science*, 12(1), 209–232. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010419-010633>
- Plastics—The Facts 2020: An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste*. (2020). [Fuente]. <https://www.plasticseurope.org/en>
- Prokić, M. D., Radovanović, T. B., Gavrić, J. P., & Faggio, C. (2019). Ecotoxicological effects of microplastics: Examination of biomarkers, current state, and future perspectives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 111, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.001>
- Rogers, K. L., Carreres-Calabuig, J. A., Gorokhova, E., & Posth, N. R. (2020). Micro-by-micro interactions: How microorganisms influence the fate of marine microplastics. *Limnology and Oceanography Letters*, 5(1), 18–36. <https://doi.org/10.1002/lol2.10136>

San Miguel-Hernández, N. S., Martín-Gil, F. J., & Armentia-Medina, A. (2009). Metodología y aplicaciones en proteómica clínica. *Diálisis y Trasplante*, 30(4), 139–143. [https://doi.org/10.1016/s1886-2845\(09\)72698-0](https://doi.org/10.1016/s1886-2845(09)72698-0)

Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26(3), 246–265. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>

Tesei, D., Quartinello, F., Guebitz, G. M., Ribitsch, D., Nöbauer, K., Razzazi-Fazeli, E., & Sterflinger, K. (2020). Shotgun proteomics reveals putative polyesterases in the secretome of the rock-inhabiting fungus *Knufia chersonesos*. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66256-7>

Tokiwa, Y., Calabia, B., Ugwu, C., & Aiba, S. (2009). Biodegradability of Plastics. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 3722–3742. <https://doi.org/10.3390/ijms10093722>

Wallace, P. W., Haernvall, K., Ribitsch, D., Zitzenbacher, S., Schittmayer, M., Steinkellner, G., Gruber, K., Guebitz, G. M., & Birner-Gruenberger, R. (2016). PpEst is a novel PBAT degrading polyesterase identified by proteomic screening of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(6), 2291–2303. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7992-8>

Wei, R., & Zimmermann, W. (2017). Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we? *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1308–1322. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12710>

Wilmes, P., & Bond, P. L. (2009). Microbial community proteomics: elucidating the catalysts and metabolic mechanisms that drive the Earth's biogeochemical cycles. *Current Opinion in Microbiology*, 12(3), 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.03.004>

Worm, B., Lotze, H. K., Jubinville, I., Wilcox, C., & Jambeck, J. (2017). Plastic as a Persistent Marine Pollutant. *Annual Review of Environment and Resources*, 42(1), 1–26. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-102016-060700>

Wright, R. J., Erni-Cassola, G., Zadjelovic, V., Latva, M., & Christie-Oleza, J. A. (2020). Marine Plastic Debris: A New Surface for Microbial Colonization. *Environmental Science & Technology*, 54(19), 11657–11672. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02305>

Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). *Science*, 351(6278), 1196–1199. <https://doi.org/10.1126/science.aad6359>

Zadjelovic, V., Chhun, A., Quareshy, M., Silvano, E., Hernandez-Fernaund, J. R., Aguilo-Ferretjans, M. M., Bosch, R., Dorador, C., Gibson, M. I., & Christie-Oleza, J. A. (2020). Beyond oil degradation: enzymatic potential of *Alcanivorax* to degrade natural and synthetic polyesters. *Environmental Microbiology*, 22(4), 1356–1369. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14947>

Zhu, B., Wang, D., & Wei, N. (2021). Enzyme Discovery and Engineering for Sustainable Plastic Recycling. *Trends in Biotechnology*. Published. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.02.008>

Zumstein, M. T., Schintlmeister, A., Nelson, T. F., Baumgartner, R., Wobken, D., Wagner, M., Kohler, H. P. E., McNeill, K., & Sander, M. (2018). Biodegradation of synthetic polymers in soils: Tracking carbon into CO<sub>2</sub> and microbial biomass. *Science Advances*, 4(7), eaas9024. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aas9024>