

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias de la Vida

“Evaluación de las enzimas involucradas en la biodegradación de
plásticos de un solo uso por un consorcio microbiano”

VIDA-407

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

Bióloga

Presentado por:

Daniela Alison López Castillo

Guayaquil - Ecuador

Año: 2025

Dedicatoria

El presente proyecto lo dedico a mis padres Carlos y Mónica, a mis abuelos y a mis hermanos Carlos Iván y Keyko por amarme y apoyarme incondicionalmente durante toda mi vida. Son mi mayor inspiración y mi orgullo más grande. A Melany y a Kristel por brindarme los momentos más felices y acompañarme en los más tristes como amigas durante estos años. Y a la profesora Nardy, por ser una consejera y guía en mi formación profesional. Sin todos ellos jamás habría podido cumplir esta meta. Tendrán eternamente todo mi cariño y mi gratitud.

Declaración Expresa

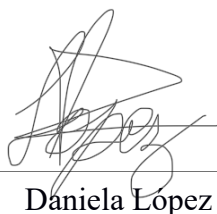
Yo **Daniela Alison López Castillo** acuerdo/acordamos y reconozco/reconocemos que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al/los autor/es que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 19 de mayo del 2025.



Daniela López

Evaluadores

Diego Arturo Gallardo Polit

Profesor de Materia

Nardy del Valle Diez Garcia

Tutor de proyecto

Resumen

El impacto ambiental generado por los plásticos de un solo uso constituye un problema crítico debido a su persistencia y acumulación en los ecosistemas. Este proyecto tiene como objetivo analizar rutas proteómicas implicadas en la biodegradación de estos polímeros mediante un enfoque temporal, bajo la hipótesis de que la expresión diferencial de proteínas microbianas se correlaciona con la transformación del material. La investigación se justifica en la necesidad de comprender los mecanismos enzimáticos que resultan esenciales para el diseño de estrategias sostenibles. Para el estudio se utilizaron datos previos de pérdida de masa y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), complementados con el análisis de proteínas obtenidas mediante geles de poliacrilamida. Los resultados mostraron una degradación significativamente mayor en los plásticos inoculados con el consorcio, acompañada de modificaciones en los enlaces C–O, C=O y CH₂, así como la detección de enzimas clave (amilasas, peroxidasas, esterasas y lipasas) relacionadas con procesos de biodegradación. En conclusión, en conjunto estos análisis permiten establecer una correlación robusta entre la expresión enzimática y la transformación química del polímero, validando la existencia de biomarcadores funcionales.

Palabras clave: proteómica, biomarcadores, FTIR, transformación química

Abstract

The environmental impact caused by single-use plastics represents a critical issue due to their persistence and accumulation in ecosystems. This project aims to analyze proteomic pathways involved in the biodegradation of these polymers through a temporal approach, under the hypothesis that the differential expression of microbial proteins correlates with the structural transformation of the material. The research is justified by the need to elucidate the enzymatic mechanisms that are essential for the design of sustainable strategies. The study employed previously obtained data on mass loss and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), complemented with protein analysis from polyacrylamide gels. The results showed significantly higher degradation in plastics inoculated with the microbial consortium, along with modifications in C–O, C=O, and CH₂ bonds, as well as the detection of key enzymes (amylases, peroxidases, esterases, and lipases) associated with biodegradation processes. In conclusion, these analyses establish a robust correlation between enzymatic expression and the chemical transformation of the polymer, validating the existence of functional biomarkers of biodegradation.

Keywords: *proteomics, biomarkers, FTIR, chemical transformation*

Índice general

Resumen.....	I
Abstract.....	II
Índice general.....	III
Abreviaturas.....	V
Simbología.....	VI
Índice de Ilustraciones	VII
Índice de Tablas	VII
Capítulo 1.....	8
1.1. Introducción	9
1.2. Descripción del Problema	10
1.3. Justificación del Problema	11
1.4. Objetivos.....	12
1.4.1. <i>Objetivo General</i>	12
1.4.2. <i>Objetivos Específicos</i>	13
1.5. Marco Teórico	13
1.5.1. <i>Plásticos de un solo uso: características, manejo e impacto ambiental</i> .	13
1.5.2. <i>Biodegradación de SUPs por consorcios de microorganismos</i>	15
1.5.3. <i>Enfoque proteómico para el estudio de la actividad enzimática microbiana durante la degradación mediada por microorganismos</i>	16
Capítulo 2.....	18

2.	Metodología	19
2.1.	Origen de los datos y descripción del experimento previo	19
2.2.	Preparación y corrida de geles SDS-PAGE	20
2.3.	Integración de datos obtenidos con datos experimentales previos	22
2.4.	Análisis bioinformático y análisis estadístico.....	23
Capítulo 3.....		26
3.	Resultados y Análisis	27
3.1.	Pérdida de masa de las muestras de plástico.....	27
3.2.	Espectrometrías transformadas de Fourier (FTIR)	28
3.3.	Análisis proteómico y bioinformático	31
3.4.	Análisis estadístico	36
Capítulo 4.....		39
4.1.	Conclusiones	40
4.2.	Recomendaciones	42
Referencias.....		43

Abreviaturas

AUC Area Under the Curve

ESPOL Escuela Superior Politécnica del Litoral

FTIR Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

ID Identifier

NCBI National Center for Biotechnology Information

ODS Objetivos de Desarrollo Sostenible

PCA Principal Component Analysis

PE Polyethylene

PET Polyethylene terephthalate

PLA Polylactic acid

PM Pérdida de Masa

PP Polypropylene

PS Polystyrene

PVC Polyvinyl chloride

ROC Receiver Operating Characteristic

SDS-PAGE Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SUP Single-use plastic

Simbología

C-H Enlace carbono hidrógeno

CH₂ Grupo metileno

CH₃ Grupo metilo

C-N Enlace carbono nitrógeno

C-O Enlace carbono oxígeno

C=O Grupo carbonilo

N-H Enlace nitrógeno hidrógeno

pH Potencial de hidrógeno

kDa Kilodalton

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1	31
Ilustración 2	¡Error! Marcador no definido.
Ilustración 3	29
Ilustración 4	30
Ilustración 5	34
Ilustración 6	35
Ilustración 7	36
Ilustración 8	37
Ilustración 9	38

Índice de Tablas

Tabla 1	19
Tabla 2	32
Tabla 3	32
Tabla 4	32
Tabla 5	32

Capítulo 1

1.1. Introducción

El aumento en la emisión de plásticos en las últimas décadas es una tendencia cada vez más presente en nuestra sociedad debido a la creciente demanda de estos productos por su gran versatilidad en diferentes mercados y sus bajos costos de fabricación (Geyer, 2017). El plástico es un material sintético de alta durabilidad y maleabilidad, de bajo peso, con propiedades térmicas y mecánicas altamente estudiadas. Estas características han facilitado su inserción en diferentes tipos de manufacturas, reemplazando otros materiales como vidrio, algodón, o madera, y así mismo incrementando las tasas de generación de desechos. No obstante, estas cualidades fisicoquímicas también le proporcionan una elevada resistencia a la degradación, lo que favorece su acumulación en el ambiente y provoca serias disrupciones en los ecosistemas (Dey, 2021).

A pesar de esto, las alternativas de reciclaje son muy bajas ya sea debido al desconocimiento social, la pérdida progresiva de las propiedades mecánicas del polímero luego de cada uso, o el desfase entre la producción de material nuevo en comparación con el reutilizado (Haque, 2023). Por ello, la búsqueda y el desarrollo de estrategias más sostenibles y efectivas para el manejo de residuos plásticos han sido ampliamente abordadas en varios estudios.

En este contexto, la biodegradación surge como una alternativa positiva debido a que presenta mecanismos libres de polución indirecta (a diferencia de la termodegradación) y genera compuestos o productos finales más asimilables por sistemas biológicos, en contraste con otros procesos de degradación abiótica como la fotodegradación. Esta estrategia consiste en el uso de microorganismos capaces de degradar los polímeros, transformándolos en unidades más pequeñas a través de sus actividades enzimáticas, asimilando y metabolizando estos compuestos complejos para suplir sus necesidades energéticas. Diversas investigaciones han documentado la capacidad de una amplia variedad de microorganismos para degradar y

despolimerizar estos materiales sintéticos; sin embargo, los mecanismos metabólicos implicados en este proceso no han sido suficientemente explorados (Chamas, 2020). Así, el presente proyecto propone un enfoque proteómico que permita identificar la expresión diferencial de proteínas a lo largo del tiempo y analizar las rutas metabólicas implicadas en esta acción enzimática, con el objetivo de comprender los mecanismos de transformación de estos materiales por parte del consorcio microbiano.

1.2. Descripción del Problema

Hasta el año 2020, la producción de plástico ha presentado un aumento de aproximadamente 370 millones de toneladas al año, donde al menos el 50% está categorizado como material de un solo uso (Siti, 2023). Los métodos de manejo de los desechos más comunes generados luego de esta utilización corresponden a reciclaje, la incineración o el depósito en vertederos, siendo el último el más registrado. Solo en el 2015, por ejemplo, se estimó que apenas el 9% del plástico producido fue reciclado, mientras que el 12% se incinero y el 79% terminó en basureros o se dispersó en el ambiente, contaminando ecosistemas terrestres, marinos y oceánicos (Gautam, 2024).

Además de la acumulación del polímero en sí, muchos de estos productos contienen aditivos y químicos suplementarios destinados a mejorar la calidad del material, los cuales también pueden ser altamente tóxicos y generar graves afectaciones en los organismos (Patra, 2024). Esta problemática se intensifica con el tiempo, ya que las condiciones fisicoquímicas ambientales -como la radiación solar, la lluvia y la temperatura- alteran la estructura del plástico, fragmentándolo en partículas más pequeñas del material conocidas como *microplásticos* (Yang, 2024). Estas partículas ingresan y se acumulan en los sistemas biológicos de numerosos organismos, biomagnificándose a lo largo de la red trófica. Diversas disrupciones endocrinas y reproductivas, enfermedades crónicas como cáncer o diabetes e

inclusive la muerte han sido asociadas a la ingestión directa o indirecta de microplástico, aunque muchos de los efectos a largo plazo aún no se comprenden en la mayoría de las especies (Ray, 2024); (Cox, 2019) .

La biodegradación se ha planteado como una solución viable para reducir el impacto ambiental de esta problemática de manera sostenible. Una amplia variedad de organismos está siendo investigados por su capacidad de degradar, asimilar y metabolizar estos compuestos, especialmente en entornos con altos niveles de polución. Tal es el caso de microorganismos extremófilos, como cepas de *Fusarium*, *Aspergillus* o *Penicillium* (Amobonye, 2021); (Khan, 2022). Sin embargo, la mayoría de estas investigaciones se enfocan en resultados observacionales o en la detección de productos intermedios, sin profundizar en los mecanismos biológicos implicados en la descomposición del polímero. Por lo tanto, se vuelve necesario ahondar en los enfoques que permitan una comprensión más integral del proceso de biodegradación del plástico, con el fin de desarrollar soluciones más efectivas para enfrentar esta problemática global.

1.3. Justificación del Problema

La persistencia de los plásticos de un solo uso en el ambiente, y la ineficiencia en los métodos tradicionales de manejo de estos desechos enmarcan la necesidad de la búsqueda de alternativas más eficaces para mitigar el impacto negativo de estos materiales en los ecosistemas. A pesar del creciente número de investigaciones que documentan la actividad degradadora de microorganismos, el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen a estas acciones enzimáticas representa una valiosa oportunidad para el desarrollo de estrategias biotecnológicas más precisas y dirigidas, que permitan aprovechar y optimizar el potencial de estos organismos para proponer aplicaciones ambientales de remediación sostenibles.

En este sentido, la presente investigación aporta información valiosa al proponer un enfoque proteómico que permita una visión detallada del proceso de degradación, mediante el estudio temporal de las proteínas expresadas por un consorcio bacteriano expuesto a plástico de un solo uso, con el objetivo de comprender el papel funcional de las enzimas involucradas.

Por otro lado, la integración de los registros experimentales relacionados con las variaciones químicas y estructurales del material permite un análisis más profundo, que contribuye a la identificación de proteínas clave dentro del proceso de transformación del polímero. Así, el proyecto se alinea con los Objetivos de Desarrollo Sostenible, particularmente con el ODS 13: Acción por el clima, al proponer estrategias sostenibles para mitigar el impacto ambiental de estos residuos contaminantes; mientras que, de la manera similar, también contribuye al ODS 15: Vida de ecosistemas terrestres, ya que busca reducir la acumulación de plástico y microplástico en el suelo (Organización de las Naciones Unidas, 2015). En conjunto, esta investigación presenta una pertinencia científica importante, subrayada a su vez dentro de la agenda global de sostenibilidad, orientada a la restauración y preservación de los ecosistemas.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

- Analizar rutas proteómicas implicadas en la biodegradación de plásticos de un solo uso a través del análisis temporal de la expresión de proteínas para la comprensión del proceso de transformación de los polímeros.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Correlacionar los datos de expresión proteómica y registros analíticos de productos intermedios para la caracterización de proteínas clave en el proceso de degradación.
- Analizar comparativamente patrones de expresión proteica para la inferencia de rutas metabólicas asociadas a la transformación de los polímeros en compuestos más simples.

1.5. Marco Teórico

1.5.1. Plásticos de un solo uso: características, manejo e impacto ambiental

Los plásticos están compuestos principalmente por polímeros derivados del petróleo, como polietileno (PE), polipropileno (PP), cloruro de polivinilo (PVC), poliestireno (PS) o tereftalato de polietileno (PET). Sin embargo, este proceso de polimerización no está limitado solo a compuestos sintéticos, ya que también pueden producirse a partir de bases biológicas - tales como el ácido poliláctico (PLA), o derivados de polisacáridos- obtenidas de fuentes renovables o sustancias orgánicas (Kutz, 2002). De este modo, estos materiales pueden clasificarse tanto de acuerdo con su biodegradabilidad (biodegradables y no biodegradables) como por la fuente de su material base (fuentes renovables y fuentes fósiles) (Hassan, 2022).

Los plásticos no biodegradables de fuentes fósiles poseen cadenas de macromoléculas con enlaces covalentes más estables y estructuras hidrofóbicas que les confieren altos niveles de resistencia térmica, química y biológica (Alshehrei, 2017). Estas características ofrecen grandes ventajas para los usos industriales modernos y la fabricación de estos polímeros, especialmente al combinarse con los bajos precios de producción, lo que impide su reemplazo efectivo por otros polímeros sintetizados a partir de bases orgánicas o biodegradables. Los

tipos más comunes, es decir PP y PE, son extremadamente abundantes en contextos domésticos, y su fabricación está destinada a ciclos de vida muy cortos. Esto les brinda la denominación de plásticos de un solo uso (SUP, por sus siglas en inglés), aunque poseen a su vez una buena capacidad para ser reciclados a través de métodos de post-procesamiento (Vimal, 2020).

A pesar de ello, la mayoría de los desechos derivados de SUPs terminan depositándose en vertederos o siendo incinerados, causando su acumulación en el ambiente y la pérdida de su valor como recursos reciclables (Chen, 2021).

En el Ecuador, la ciudadanía y las empresas están sujetas a un marco normativo en cuanto a la gestión de desechos plásticos, especialmente hacia plásticos de un solo uso. Aun así, su impacto ha sido limitado debido a múltiples factores legales, administrativos y sociales que dificultan la implementación, supervisión y cumplimiento efectivo de estas regulaciones (Portilla, 2022). Por ejemplo, la Ley Orgánica para la Racionalización, Reutilización y Reducción de Plásticos de Un Solo Uso (Asamblea Nacional del Ecuador, 2020) establece que las empresas deben incorporar al menos 10% de material reciclado en un plazo de 18 meses, llegando hasta el 60% en 2 a 3 años, y obliga a los ciudadanos separar los residuos plásticos de otros desechos. No obstante, en el 2022 solo 7.7% de los desechos plásticos fue reciclado en el país, y el principal origen de plástico tipo PET continúa siendo virgen (Negash, 2021).

Pero inclusive en el caso de los productos reciclados, que aún constituyen una minoría, persisten las preocupaciones respecto a inocuidad del proceso. Diversas investigaciones señalan que, debido a la degradación de las propiedades mecánicas de estos polímeros con el tiempo, es necesario el uso de aditivos o *plastificantes* para conservar sus características funcionales (Thakur, 2021). La transferencia de estas sustancias al suelo, agua

e inclusive a los alimentos -en el caso de paquetes de comida o bebida- ha sido ampliamente documentada (Yin, 2024); (Lahimer, 2017). El impacto de estos compuestos, junto con el de los microplásticos, sobre los seres vivos, representa una de las principales preocupaciones ambientales y sanitarias actuales.

1.5.2. Biodegradación de SUPs por consorcios de microorganismos

La degradación de plásticos se evidencia por alteraciones en las propiedades del material, tales como pérdidas de masa, reducción de la rigidez estructural o erosión superficial. La biodegradación, en particular, es un proceso complejo mediante el cual los polímeros son descompuestos en estructuras más simples a través de la acción de microorganismos (Siti, 2023).

Según su estructura química, los plásticos sintéticos pueden diferenciarse entre aquellos con enlaces de tipo carbono-carbono (C-C) y aquellos con enlaces carbono-oxígeno (C-O). Los primeros se caracterizan por ser estructuras más estables, con alta cristalinidad, hidrofobicidad superficial, en conjunto con escasos grupos funcionales reactivos, que dificultan la capacidad microbiana de transformar el material. En cambio, los plásticos de la segunda categoría poseen una estructura hidrolizable, con enlaces éster que los vuelven más susceptibles a la biodegradación (Taniguchi, 2019).

Numerosas investigaciones han reportado la capacidad de distintos microorganismos para degradar polímeros con enlaces C-O, como el tereftalato de polietileno (PET) (Srikanth, 2022). Estudios apuntan a que el primer paso del proceso de biodegradación consiste en la colonización de la superficie del material, lo cual facilita el debilitamiento estructural del polímero (Ahmaditabatabaei, 2021). Entre los géneros microbianos más comúnmente involucrados, ya sea de forma individual o en consorcio, se destacan *Fusarium*, *Aspergillus* y *Pseudomonas* (Brunner, 2018); (Das, 2014); (de Oliveira, 2025).

Posteriormente, ocurre la despolimerización en cadenas más cortas mediada por la hidrólisis de enzimas que producen intermediarios que pueden ser usados por los organismos como fuentes de carbono. Finalmente, enzimas oxidorreductasas pueden actuar sobre estos compuestos para degradarlos en moléculas más simples de agua, dióxido de carbono o metano, completando así el proceso de mineralización (Temporiti, 2022). Particularmente, especies como *Phialemoniopsis curvata*, *Purpureocillium spp.*, y *Purpureocillium lilacinum* han sido aisladas en sitios contaminados con residuos plásticos o de hidrocarburos, con reportada actividad enzimática hidrolasa, oxidasa y descarboxilasa durante el proceso de degradación (Bhavsar, 2024); (Benguenab, 2021); (Tseng, 2023); (Varaljay, 2019).

No obstante, gran parte de estos estudios se ha centrado en observar la degradación macroscópica (como la pérdida de peso del material o el cambio en su morfología), dejando aún sin esclarecer los mecanismos moleculares involucrados. Esta limitación justifica la necesidad de enfoques como el análisis proteómico, que permitan avanzar en la comprensión integral del fenómeno de biodegradación desde una perspectiva bioquímica y funcional.

1.5.3. Enfoque proteómico para el estudio de la actividad enzimática microbiana durante la degradación mediada por microorganismos

El uso de técnicas proteómicas desempeña un papel en el avance de la comprensión sobre los mecanismos involucrados en la biodegradación del plástico a partir de microorganismos. Este enfoque permite caracterizar las enzimas que se producen en presencia de estos polímeros, identificar perfiles de expresión diferencial y detectar proteínas clave durante el proceso de degradativo mediante ensayos como SDS-PAGE (Poulsen, 2023).

El SDS-PAGE es una técnica común para separar proteínas de acuerdo con su peso molecular, que puede ser utilizada para la visualización de enzimas específicas activas en la degradación del plástico. Además, permite determinar el peso molecular de estas enzimas

para la caracterización de estas y su comparación con proteínas similares producidas en procesos de degradación similares por otros microorganismos (Chatterjee, 2010).

En conjunto con otras herramientas, como la espectroscopía IR (FT-IR) y los análisis de variación de peso, altamente utilizadas en el análisis de variaciones estructurales asociadas con la degradación de plástico es posible llevar a cabo un análisis integral del fenómeno de transformación del material (Ibrahim, 2024). Así, esta complementariedad metodológica resulta especialmente valiosa para identificar proteínas clave como posibles biomarcadores del proceso o blancos potenciales para el diseño de estrategias que optimicen la acción degradadora del consorcio microbiano en condiciones ambientales reales a través del tiempo.

Capítulo 2

2. Metodología

2.1. Origen de los datos y descripción del experimento previo

La presente investigación se fundamenta en el análisis de datos generados a partir de un experimento realizado con el objetivo de evaluar la capacidad de un consorcio fúngico para degradar plástico de un solo uso en condiciones controladas. El experimento consistió en la incubación de fragmentos de plástico de un solo uso (1×1 cm) distribuidos en tres fiolas inoculadas con un consorcio microbiano (Tabla 1) y una fiola adicional sin inocular que sirvió como control. Se añadió a todas las fiolas 800ml de medio mineral líquido para proveer a los microorganismos de condiciones mínimas de crecimiento, de modo que su única fuente de nutriente pudiera ser el material sintético. Las fiolas se mantuvieron durante un periodo total de 24 meses, a temperatura ambiente y en agitación. Se realizaron también recambios quincenales y toma de alícuotas recolectadas mensualmente. A partir de este diseño experimental, se obtuvieron datos relacionados con la pérdida de masa del polímero, cambios estructurales detectados por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), y una colección de muestras de sobrenadante correspondientes a diferentes momentos del proceso.

El presente trabajo se enfocó exclusivamente en el análisis de una selección de estos datos, correspondientes a las semanas 270, 360, 450, 540 y 630, correspondientes a intervalos quimestrales del tiempo experimental, y escogidas por representar puntos clave a través de todo el proceso de degradación.

Tabla 1.

Identificación de microorganismos del consorcio

Organismo	Código de Acceso (NCBI)
<i>Phalemoniopsis curvata</i>	LC371259.1

<i>Fusarium sp. KC-2010ba</i>	JQ364978.1
<i>Purpureocillum lilacinum</i>	MK173630.1
<i>Fusarium oxysporum strain</i>	JX103564.1
<i>Fusarium oxysporum isolate</i>	OM906080.1
<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Lactobacillus sp.</i>	
<i>Bifidubacterium longum</i>	

2.2. Preparación y corrida de geles SDS-PAGE

Para el análisis proteico de las muestras, se seleccionaron cinco puntos temporales del experimento: semanas 270, 360, 450, 540 y 630, correspondientes a alícuotas de tres de las fiolas experimentales previamente almacenadas (F1, F3 y control). Estas muestras, fueron sometidas a un proceso de extracción de proteínas a partir de los sobrenadantes obtenidos. El procedimiento incluyó la precipitación de proteínas totales mediante tratamiento con frío y etanol al 100%, seguido de centrifugación y resuspensión del pellet proteico en buffer de carga. Esta preparación aseguró la desnaturalización parcial y la carga uniforme de las proteínas mediante la inclusión de SDS y β -mercaptoetanol.

Las muestras preparadas fueron divididas para la carga en dos geles SDS-PAGE diferentes: el primero incluyó las proteínas extraídas de las semanas 270, 360 y 450, mientras que el segundo gel se utilizó para las semanas 540 y 630, junto con una muestra control adicional correspondiente al medio mineral inoculado con el consorcio microbiano, pero sin la presencia de plástico. Esta muestra control se empleó como referencia para contrastar la producción basal de proteínas por parte del consorcio en ausencia del polímero, permitiendo identificar posibles bandas diferenciales asociadas a la presencia del sustrato plástico.

Los geles se prepararon utilizando una concentración de acrilamida al 12 % para el gel de separación y el gel de apilamiento. Se cargaron entre 10 μ L por pocillo, incluyendo un

marcador de peso molecular para la estimación relativa del tamaño de las proteínas, de manera 7:3 (7 μ L de muestra y 3 de loading buffer). La corrida de electroforesis se realizó a 120 V durante aproximadamente 4h.

Una vez finalizada la corrida, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie brillante durante un tiempo de exposición controlado, y posteriormente desteñidos con solución de ácido acético para facilitar la visualización de las bandas.

Los geles fueron digitalizados mediante escáner de alta resolución, y las imágenes resultantes fueron procesadas y analizadas en el software ImageLab para evaluar la presencia, intensidad y distribución de las bandas proteicas a lo largo del tiempo y entre condiciones. Este programa permitió realizar un análisis cuantitativo y cualitativo de las bandas proteicas presentes en cada una de las muestras correspondientes que consistió en la detección automática de bandas a lo largo de cada carril, estableciendo parámetros de sensibilidad y umbral para garantizar la identificación precisa de señales relevantes. Para cada banda detectada, se registraron datos como el peso molecular estimado, la intensidad relativa (área bajo la curva de densidad) y la posición en el gel. Estas variables permitieron comparar la presencia, ausencia o variación de bandas entre las diferentes condiciones temporales y frente al control, con el objetivo de identificar proteínas diferencialmente expresadas que pudieran estar asociadas con el proceso de biodegradación del plástico.

Los perfiles proteicos fueron organizados en una matriz de datos que sirvió de base para los análisis estadísticos multivariados posteriores. Se consideraron como bandas de interés aquellas que mostraban diferencias notables en intensidad entre los distintos tiempos o entre las condiciones con y sin presencia del polímero. Estas fueron codificadas y clasificadas por su peso molecular estimado, para ser posteriormente analizadas en conjunto con la información proveniente de los ensayos FTIR y de pérdida de masa del plástico.

Este análisis inicial de bandas constituyó una etapa clave para la identificación preliminar de patrones de expresión proteica, facilitando la interpretación de los datos en el contexto de las rutas enzimáticas potencialmente involucradas en la degradación del polímero.

2.3. Integración de datos obtenidos con datos experimentales previos

Además del análisis proteico realizado mediante SDS-PAGE, en esta investigación se integraron dos tipos de datos obtenidos previamente respecto a la variación en el peso del plástico a lo largo del tiempo y los espectros de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Estos conjuntos de datos fueron empleados como herramientas complementarias para contextualizar los perfiles de expresión proteica observados y proporcionar una visión más integral del proceso de biodegradación.

Los datos de pérdida de masa fueron obtenidos a partir del secado y pesaje del plástico antes y después de cada etapa de incubación. Esta información permitió calcular el porcentaje de pérdida de masa del polímero a lo largo del tiempo, sirviendo como un indicador directo del avance del proceso de descomposición, a través de la siguiente fórmula:

$$P\acute{e}rdida\ de\ masa\ (\%) = \frac{Masa\ inicial - Masa\ final}{Masa\ inicial} \times 100\% \quad (2.3.1)$$

Para determinar la curva de degradación se calculó también la media entre los datos de las tres réplicas y el control, y la desviación estándar. De esta manera, las semanas seleccionadas para el análisis proteómico fueron correlacionadas con los valores de pérdida de peso, con el objetivo de evaluar si los cambios en la expresión proteica coincidían con etapas de mayor o menor actividad degradativa. Además, con el objetivo de distinguir la

degradación de referencia (control sin inóculo) de la **degradación atribuible** al consorcio se calculó la degradación neta en cada punto temporal:

$$\frac{PM \text{ material inoculado} - PM \text{ material sin inóculo}}{PM \text{ material sin inóculo}} \times 100\% \quad (2.3.2)$$

Por su parte, los datos de espectroscopía FTIR permitieron observar modificaciones en la estructura química del plástico, específicamente la aparición o desaparición de grupos funcionales relevantes (como carbonilos, ésteres o grupos hidroxilo), que podrían reflejar alteraciones en la composición del polímero atribuibles a la actividad enzimática. Las regiones espectrales con variaciones significativas fueron identificadas con base en estudios previos, y se compararon con los perfiles de bandas proteicas obtenidas en los geles. Picos con absorbancias bajas fueron excluidos del análisis ya que resultan en variaciones no significativas.

La integración de estas tres dimensiones de análisis —física (peso), estructural (FTIR) y bioquímica (SDS-PAGE)— permitió un análisis más completo del fenómeno de biodegradación. Esta estrategia contribuyó a reforzar la interpretación de los resultados proteómicos, al proporcionar evidencia entre la presencia de determinadas proteínas y los cambios detectados en el polímero, a nivel químico tanto como físico.

2.4. Análisis bioinformático y análisis estadístico

Para complementar el análisis de las bandas proteicas observadas en los geles SDS-PAGE, se realizó un tratamiento estadístico y exploratorio de los datos mediante herramientas bioinformáticas y de análisis multivariado. El objetivo fue identificar patrones de expresión a lo largo del tiempo, agrupar muestras según similitud de perfiles y detectar proteínas

diferenciales que pudieran estar relacionadas con la actividad enzimática del consorcio fúngico frente a la presencia de plástico.

En primer lugar, la información obtenida a partir de ImageLab fue organizada en una hoja de cálculo de Excel, donde se construyó una matriz para comparar la presencia/ausencia de las bandas entre las distintas semanas de muestreo y la muestra control. Esta matriz permitió identificar bandas compartidas, exclusivas o transitorias, agrupándolas según su comportamiento en el tiempo. Se prestó especial atención a las bandas que se repetían en varias semanas, así como a aquellas que estaban presentes únicamente en el medio con plástico o, por el contrario, solo en el control (medio mineral inoculado sin plástico).

Para enriquecer la interpretación funcional de las bandas diferenciales, se realizó una búsqueda de posibles identificaciones basadas en el peso molecular estimado, utilizando literatura científica especializada y bases de datos como NCBI Protein. Esta comparación referencial tuvo como objetivo vincular cada banda con posibles enzimas ya reportadas en procesos de biodegradación de plásticos, especialmente en hongos de los géneros *Fusarium*, *Phialemoniopsis* y *Purpureocillium*, y bacterias *Bacillus* y *Bifidubacterium* los cuales componen el consorcio utilizado en el estudio (**Tabla 1.**).

A partir de esto, se establecieron criterios específicos para la selección de proteínas candidatas clave en la propuesta de una posible ruta proteómica asociada al proceso de biodegradación. Estas proteínas fueron agrupadas por peso molecular estimado y contrastadas con información funcional disponible en bases de datos y literatura científica. Con base en esta clasificación preliminar, se identificaron biomarcadores a través del tratamiento de los datos (normalización) y curvas ROC con la herramienta de MetaboAnalyst 5.0. Finalmente, se seleccionaron las proteínas con AUC significativos (≥ 0.8) y log2FC negativos (sobreexpresión respecto al medio mineral).

Adicionalmente, se utilizó el software InfoStat para realizar análisis estadísticos de ANOVA (Kruskal Wallis Test y Friedman's test), T- test de una muestra y para muestras independientes y el entorno bioinformático MetaboAnalyst 5.0 para aplicar análisis de componentes principales (PCA) de todas las muestras. Estos métodos multivariados permitieron visualizar tendencias y agrupamientos de muestras según sus perfiles proteicos, evaluando la progresión del proceso de degradación en el tiempo y la posible influencia de la condición experimental (plástico vs. control). Las intensidades de las bandas fueron utilizadas como variables cuantitativas para la construcción de los modelos estadísticos.

La combinación de estos enfoques permitió no solo detectar proteínas de interés diferencial, sino también relacionarlas con etapas específicas del proceso de biodegradación y con los datos estructurales y físicos previamente obtenidos, aportando así una visión integral de los mecanismos enzimáticos implicados.

Capítulo 3

3. Resultados y Análisis

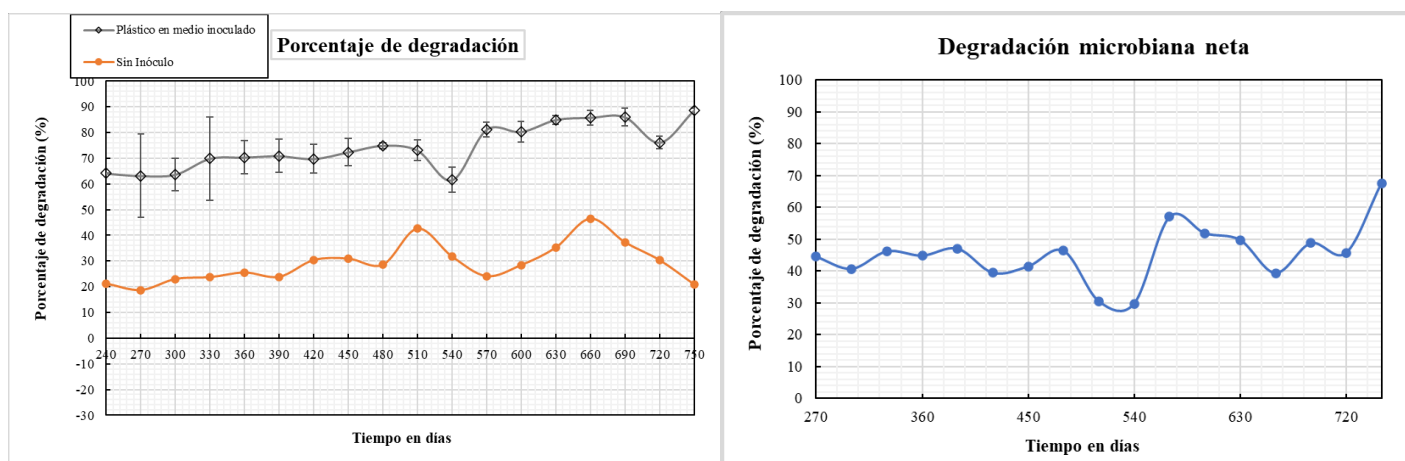
3.1. Pérdida de masa de las muestras de plástico

El análisis de la pérdida de masa señala que las muestras inoculadas con el consorcio microbiano experimentaron una reducción de masa claramente superior a la observada en los controles sin inóculo a lo largo del periodo experimental. La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra de forma consistente que el tratamiento biológico induce una mayor remoción del polímero a lo largo de todo el periodo experimental. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se aprecia que las medias del porcentaje de degradación del grupo inoculado permanecen sistemáticamente por encima de las del control en cada punto temporal, y que ambas series presentan variabilidad entre réplicas, reflejada en las barras de error; esta variabilidad es mayor en algunos intervalos intermedios, lo que sugiere fluctuaciones en la dinámica del proceso. Además de la diferencia sostenida entre curvas, se observan episodios de aceleración y estabilización de la degradación en el tratamiento inoculado, que no se reproducen con la misma intensidad en el control, indicando que la actividad biológica introduce patrones temporales distintivos respecto a la degradación de fondo. Por otro lado, ambas series experimentales pueden estar sometidas a procesos de degradación abiótica que contribuyen al descenso de masa observado y que, por tanto, conforman el nivel de referencia del experimento. Entre los mecanismos abióticos relevantes se incluyen la hidrólisis química de enlaces susceptibles (favorecida por pH y temperatura), la oxidación por especies reactivas generadas en el medio o por exposición a oxígeno disuelto (autooxidación), la fotooxidación inducida por radiación UV dada por la exposición lumínica durante el manejo y almacenamiento, así como por el desgaste físico o erosión mecánica durante las manipulaciones (Jarosz et al., 2024). Al calcular la degradación neta (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) se aprecia que la contribución atribuible a la

actividad biológica es positiva en todos los tiempos muestreados, con un promedio general del 43%, aunque presenta fluctuaciones temporales, incluyendo picos de degradación de hasta más del 60% (día 750), y porcentajes de degradación más bajos al 30% (días 510 al 540), que podrían reflejar fases de adaptación del consorcio, cambios en la disponibilidad de sustrato o variaciones en la expresión enzimática.

Ilustración 1

Porcentajes de pérdida de masa y degradación microbiana. Las barras representan la desviación



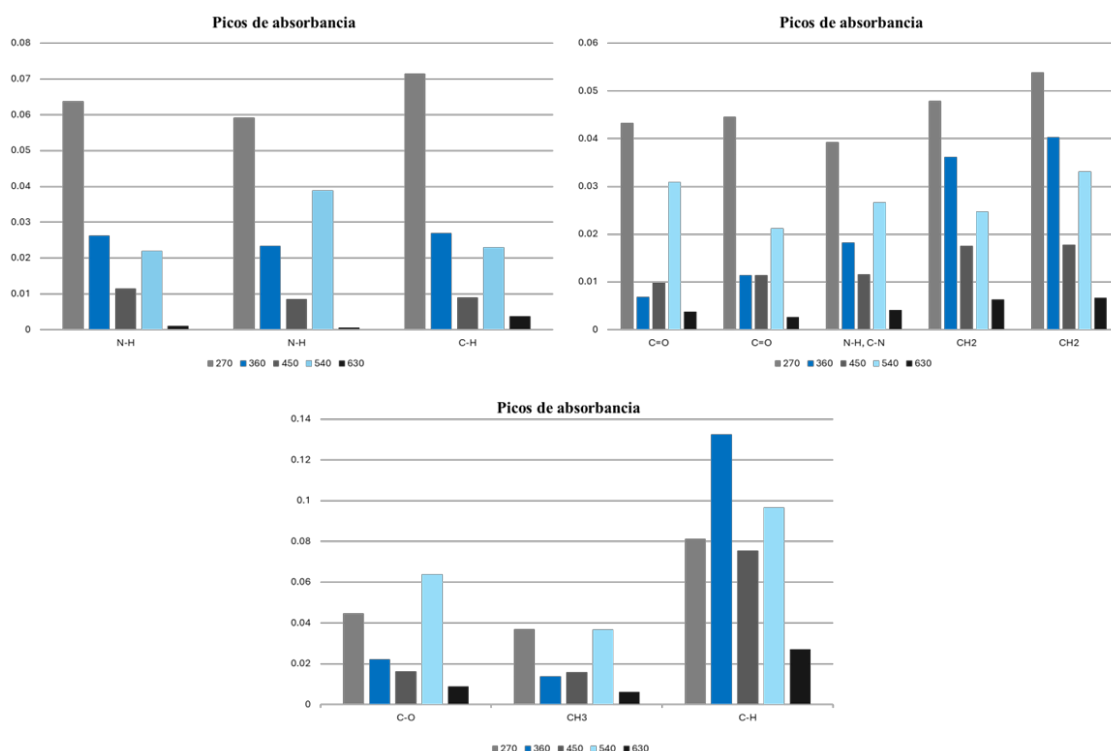
3.2. Espectrometrías transformadas de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR muestran una clara evolución temporal de las bandas asociadas a los grupos funcionales más relevantes del material (**Ilustración 2**). En términos cuantitativos, las bandas asignadas a enlaces alifáticos y aromáticos (C–H) presentan una dinámica marcada: la señal C–H reportada en el rango de 700 cm⁻¹ aumenta desde 0.081 a 0.133 en el día 360 y posteriormente cae hasta 0.027 en 630, lo que sugiere una alteración rápida seguida de una atenuación de la fracción alifática superficial. Las señales CH₂ exhiben una tendencia decreciente a lo largo del seguimiento, mientras que las intensidades de CH₃ también disminuyen hacia los días finales, reflejando una pérdida relativa de grupos metilo y metileno en la superficie del material. Este proceso de disminución sostenida es coherente con un

proceso de pérdida/erosión de la fracción superficial alifática del polímero (Odigbo et al., 2023).

Ilustración 2

Picos de absorbancia de acuerdo con los grupos químicos categorizados por semanas. a. Superior izquierda. Muestra rangos de 4000 a 2800 números de onda [cm⁻¹]. b. Superior derecha. Rangos de 1800 a 1400 números de onda [cm⁻¹]. c. Inferior. Rangos de 1300 a >700 números de onda [cm⁻¹]

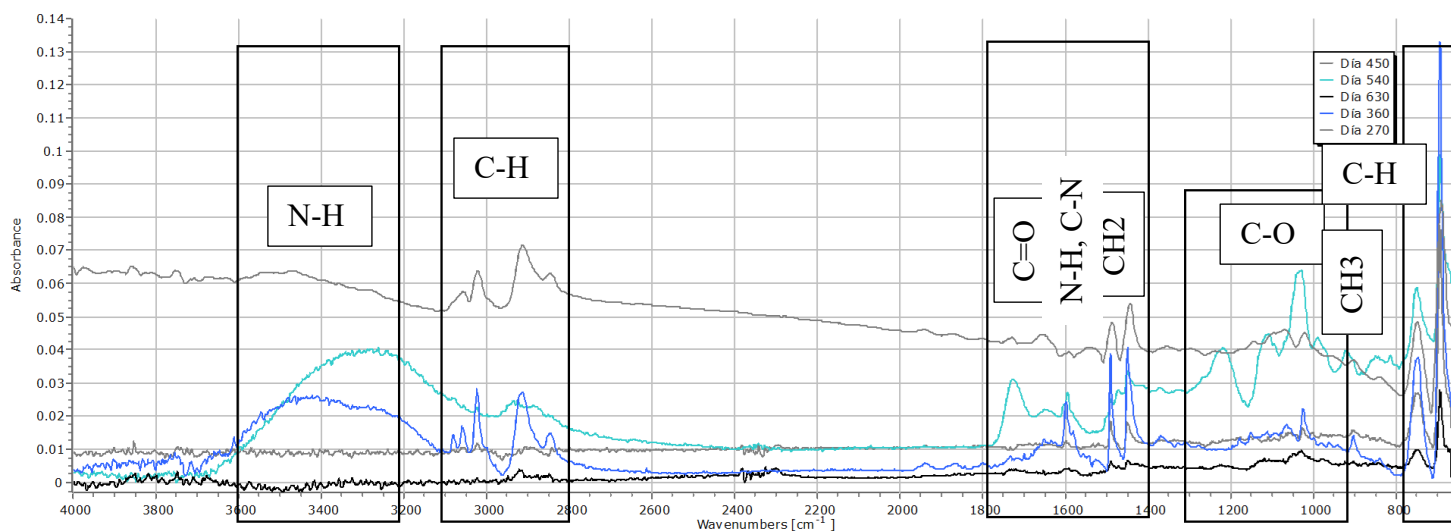


Las bandas carbonilo (C=O) muestran un comportamiento oxidativo ya que en ambos picos de abundancia se observa una reducción en los días intermedios (360–450) seguida por un aumento notable en el día 540, y una nueva atenuación en 630 (atribuible a procesos de lixiviación o asimilación orgánica). Por otro lado, la banda C–O presenta un pico destacado en 540 (0.0639), superior tanto al valor inicial (0.0448) como a los intermedios, y cae de forma sensible en 630 (0.0090), sugiriendo un episodio de hidrolisis/introducción de grupos oxigenados posiblemente asociado a despolimerización parcial y formación de fragmentos ricos en oxígeno (Fernández-Sanmartín et al., 2024). Los valores asociados a N–H y N–H/C–

N disminuyen de forma continuada hasta cifras muy bajas en 630, indicando pérdida o transformación de componentes nitrogenados superficiales.

Ilustración 3

Ondas registradas categorizadas de acuerdo con las semanas. Los grupos funcionales se encuentran señalados e identificados para cada área de interés



Todas las oscilaciones observadas indican que la degradación no es lineal, sino que se produce en fases, lo que es compatible con procesos de adaptación microbiana en capas sucesivas del material o con la aparición temporal de productos intermedios que luego son metabolizados o removidos del sustrato. En conjunto, la evidencia espectroscópica se integra de forma coherente con el patrón observado en la pérdida de masa, aportando una lectura molecular de los eventos macroscópicos registrados. En los tiempos en que la degradación neta mostró picos de actividad (notablemente alrededor de ~540 días y hacia el final del seguimiento), los espectros FTIR presentan un incremento transitorio en las bandas asociadas a grupos carbonilo (C=O) y a enlaces C-O , consistente con la generación de productos oxidados e intermedios hidrolíticos derivados de la rotura de la estructura polimérica (**Ilustración 3**). Este acoplamiento temporal sugiere que los episodios de mayor pérdida de masa implican etapas de despolimerización química (formación de fragmentos oxigenados

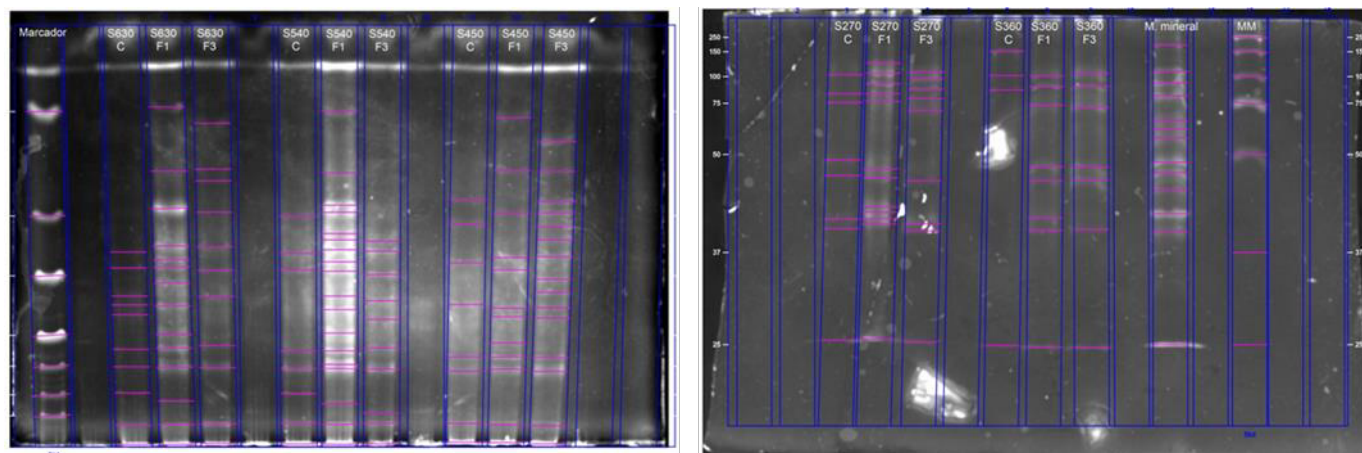
solubles) que luego parecen ser asimilados o lixiviados, explicando la posterior atenuación de esas señales en días posteriores (Dwiyana et al., 2023). Las disminuciones sostenidas en las intensidades de bandas alifáticas (C–H, CH₂, CH₃) acompañan la pérdida de masa acumulada, lo que confirma la colonización orgánica en superficie. Sin embargo, también se presentan días en los que la pérdida de masa muestra cambios con escasa respuesta FTIR aparente que pueden reflejar contribuciones abióticas (erosión física) o procesos de desprendimiento que afectan la masa sin producir inmediatamente señales químicas distintivas.

3.3. Análisis proteómico y bioinformático

El análisis proteómico realizado sobre los geles de poliacrilamida (**Ilustración 4**) permitió identificar proteínas clave asociadas al proceso de biodegradación microbiana del plástico. Se detectaron 4 bandas de interés que fueron identificadas como **amilasas**, **peroxidasas**, **esterasas** y **lipasas**, cada una asociada a diferentes organismos dentro del consorcio, como *Bifidobacterium longum*, *Fusarium sp.*, *Purpureocillium lilacinum* y *Fusarium oxysporum*. Estas enzimas cumplen roles complementarios dentro del proceso degradativo, desde la hidrólisis de enlaces glucosídicos hasta la oxidación y esterificación de compuestos intermedios.

Ilustración 4

Geles de poliacrilamida procesados a través de ImageLab



Los patrones de abundancia mostraron variaciones significativas respecto a la intensidad de las bandas entre los diferentes tiempos de muestreo (270, 360, 450, 540 y 630 días), lo que refleja una dinámica temporal en la expresión proteica estrechamente ligada a las fases de colonización, asimilación y degradación activa del material. Posteriormente, el análisis bioinformático nos ayudó a validar estas muestras como enzimas clave del proceso de transformación del polímero.

Tabla 2

Datos de intensidad de banda e identificación enzimática de acuerdo con el análisis proteómico para el peso molecular correspondiente al marcador 75 kDa

	270 C	270 F1	270 F3	360 C	360 F1	360 F3	Prot	Organismo	ID NCBI
75	76,285	248,711	218,708	0	441,358	778,691	Amilasa	B. longum	WP_129879952.1

Tabla 3

Datos de intensidad de banda e identificación enzimática de acuerdo con el análisis proteómico para el peso molecular correspondiente los marcadores 43 y 40 kDa

	270 C	270 F1	270 F3	Prot	Organismo	ID NCBI
43	363,321	855,706	0	Amilasa	B. longum	WP_223895371.1
40	0	641,670	1,092,299	Peroxidasa	Fusarium sp.	KAI8724901.1

Tabla 4

Datos de intensidad de banda e identificación enzimática de acuerdo con el análisis proteómico para el peso molecular correspondiente al marcador 37 kDa

	540 C	540 F1	540 F3	Prot	Organismo	ID NCBI
37	0	957,833	374,709	Esterasa	P. lilacinum	OAQ71798.1

Tabla 5

Datos de intensidad de banda e identificación enzimática de acuerdo con el análisis proteómico para el peso molecular correspondiente al marcador 35 kDa

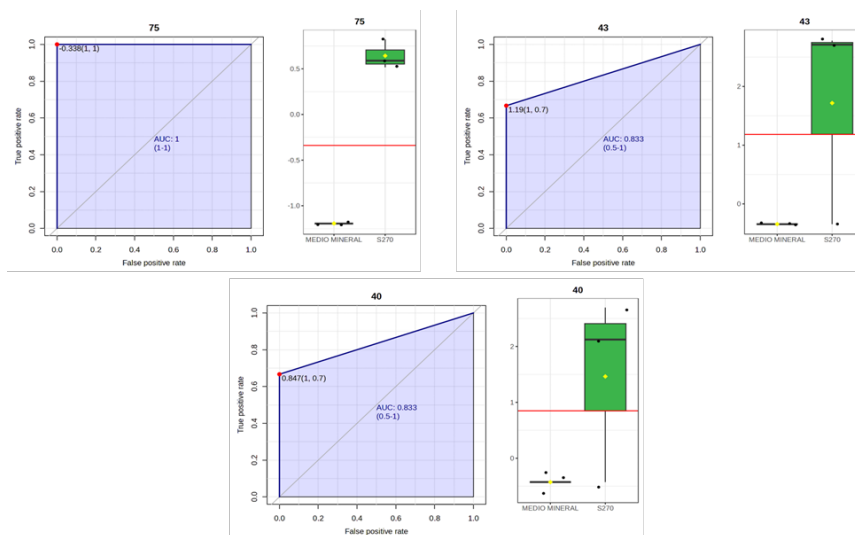
	630 C	630 F1	630 F3	Prot	Organismo	ID NCBI
--	------------------	-------------------	-------------------	-------------	------------------	----------------

35	149,650	0	232,724	Lipasa	F. oxysporum	ABR12479.1
----	---------	---	---------	--------	--------------	------------

En la primera fase, correspondiente al día 270, los análisis proteómicos revelaron la expresión diferencial en el área de los marcadores moleculares 75, 43 y 40 (**Ilustración 5**), que corresponden a amilasas (*Bifidobacterium longum*) y peroxidasa (*Fusarium* sp.). El marcador 75 (**Tabla 2**) mostró la señal más robusta en comparación con el control (medio mineral), con un AUC de 1.0 y una clara separación en el análisis estadístico, aunque el control también muestra expresión de la proteína en baja intensidad. Este hallazgo es consistente con la pérdida de masa registrada en esta etapa, donde la degradación neta microbiana alcanzó valores intermedios, y con los resultados de FTIR que evidenciaron modificaciones tempranas en los enlaces N–H y C=O, atribuibles a procesos de hidrólisis iniciales. En paralelo, en el marcador 40 (**Tabla 3**) correspondiente a la enzima peroxidasa se presentó una respuesta significativa (AUC 0.833,), sugiriendo que la enzima podría estar generando radicales libres o modificando químicamente la superficie del polímero, introduciendo grupos polares que aumentan la hidrofiliidad (Han et al., 2024). Esta función es clave en la estrategia del consorcio, ya que permite acondicionar el plástico para etapas posteriores de degradación más intensiva. En conjunto, los datos integran de forma coherente la evidencia analizada indicando una biodegradación inicial dominada por la acción hidrolítica de amilasas y un acondicionamiento oxidativo de la superficie mediado por peroxidasas, que establece las condiciones necesarias para la progresión del proceso biodegradativo durante esta primera etapa.

Ilustración 5

Desempeño de cada muestra (día 270) respecto al medio mineral evaluado mediante Curva ROC y diagrama de cajas. a. Superior izquierda muestra proteína de 75 kDa. b. Superior derecha. Muestra proteína de 43kDa. c. Inferior. Proteína de 40kDa

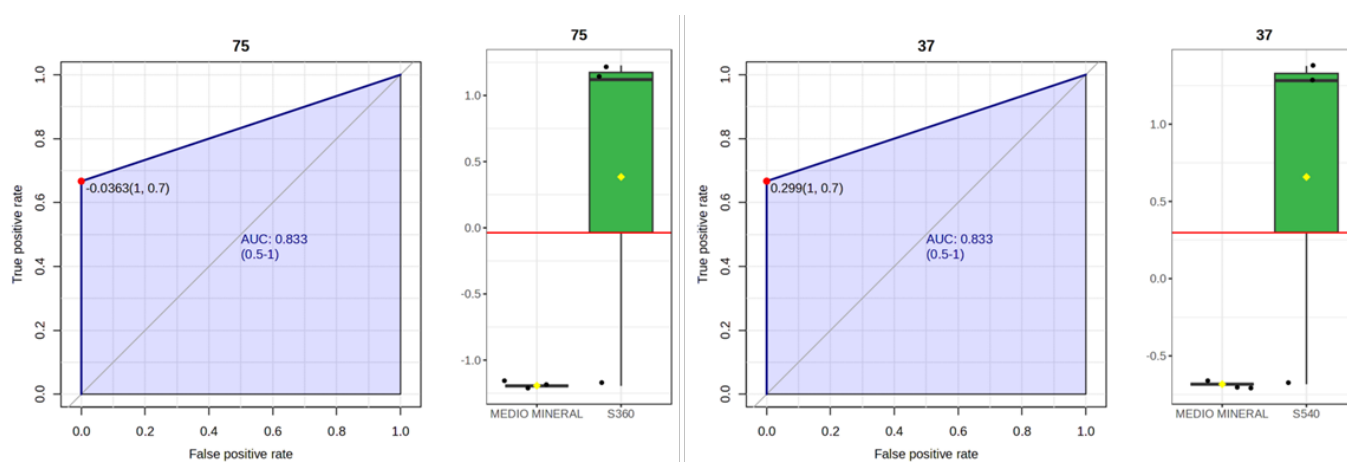


Durante la fase de asimilación del material, en los días 360 y 540, se observó un cambio en la naturaleza de las proteínas predominantes (**Ilustración 6**), reflejando una transición hacia procesos más especializados de aprovechamiento del sustrato. En el día 360 destacó nuevamente el biomarcador de amilasa, en 75kDa (**Tabla 2**), con una alta capacidad discriminante frente al medio mineral (AUC = 0,833), que confirma su rol sostenido en la hidrólisis de enlaces glucosídicos, posiblemente sobre aditivos o componentes carbonados secundarios asociados al plástico. Paralelamente, en el día 540 se mostraron picos en la expresión de esterasa (AUC = 0,833, **Tabla 4**), cuya actividad se relaciona con la ruptura de enlaces éster y la modificación de productos intermedios de la oxidación inicial del polímero (Akram et al., 2024; Jin et al., 2023a). La presencia diferencial de estas enzimas sugiere que el consorcio microbiano no solo coloniza la superficie, sino que es capaz de integrar los fragmentos liberados como fuentes de carbono y energía, coherente con los cambios en las señales FTIR, particularmente la reducción de la intensidad en las bandas de C=O y C–O. Respecto a la pérdida de masa, a diferencia de la fase inicial de colonización, la fase de

asimilación mostró un comportamiento más moderado en términos de degradación absoluta, lo que sugiere un periodo de estabilización metabólica del consorcio (Ho et al., 2018). Estos resultados podrían sugerir que, durante esta etapa, los microorganismos no generan una aceleración inmediata en la pérdida de material, sino que optimizan el aprovechamiento de los fragmentos liberados previamente, estabilizando el sistema y asegurando la disponibilidad de recursos metabólico. Así, este aparente estancamiento en la pérdida de masa coincide con la detección de las enzimas identificadas, cuya función se centra más en la transformación de subproductos de la degradación que en la ruptura inicial del polímero. De este modo, la evidencia proteómica vincula esta fase con una asimilación activa de los derivados de degradación, marcando el inicio de un metabolismo coordinado de oxidación e hidrólisis que sostiene la progresión del proceso biodegradativo.

Ilustración 6

Desempeño de cada muestra (días 360 y 540) respecto al medio mineral evaluado mediante Curva ROC y diagrama de cajas. a. Izquierda muestra proteína de 75 kDa. b. Derecha. Muestra proteína de 37kDa

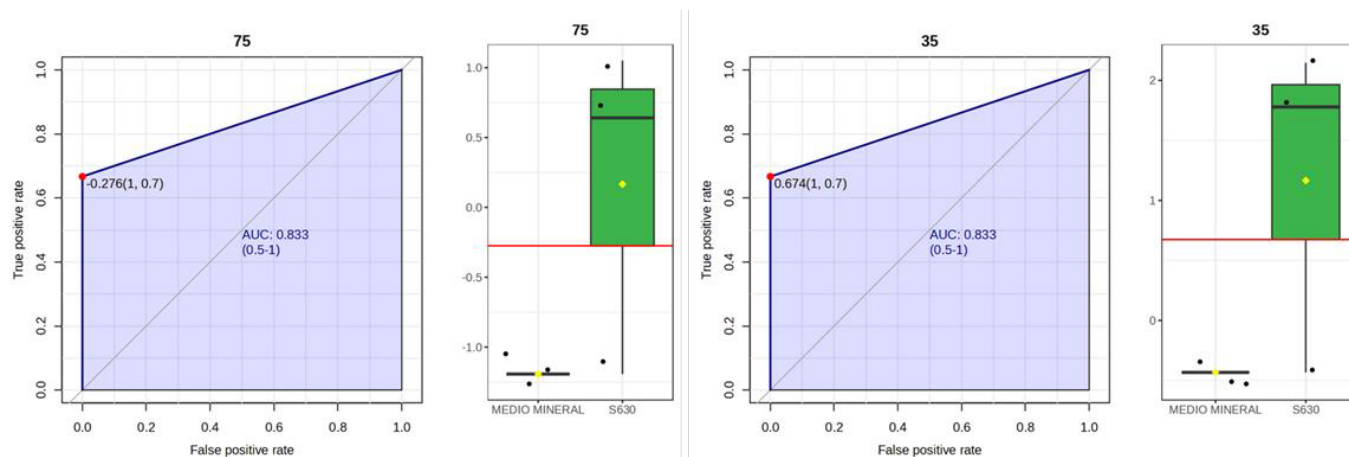


En la fase final de mineralización (día 630), los biomarcadores detectados, correspondientes a la amilasa y la lipasa en 75 kDa y 35 kDa (**Tabla 1.**, **Tabla 5**), mostraron una expresión diferencial frente al control mineral, con un AUC de 0.833 en ambos casos (**Ilustración 7**). La lipasa, proveniente de *Fusarium oxysporum*, fue un hallazgo

particularmente relevante ya que este tipo de enzimas participa en la ruptura de enlaces éster y contribuye a la transformación de intermediarios hacia compuestos más simples, favoreciendo la conversión del polímero en productos finales de bajo peso molecular (Akram et al., 2024). Por su parte, la amilasa, asociada inicialmente con la hidrólisis de enlaces glicosídicos, desempeña un papel complementario en la mineralización, ya que los azúcares liberados durante su acción pueden ser metabolizados por el consorcio microbiano, generando ácidos orgánicos y condiciones que potencian la oxidación y la conversión de los residuos hacia CO₂ y H₂O (Jin et al., 2023b). Esta acción combinada coincide con los resultados de FTIR, que evidenciaron disminución en la intensidad de los picos de C–O y C–H, y con la pérdida de masa registrada, sugiriendo que el consorcio no solo fragmenta el material, sino que impulsa su transformación química hacia productos minerales finales.

Ilustración 7

Desempeño de cada muestra (día 630) respecto al medio mineral evaluado mediante Curva ROC y diagrama de cajas. a. Izquierda muestra proteína de 75 kDa. b. Derecha. Muestra proteína de 35kDa



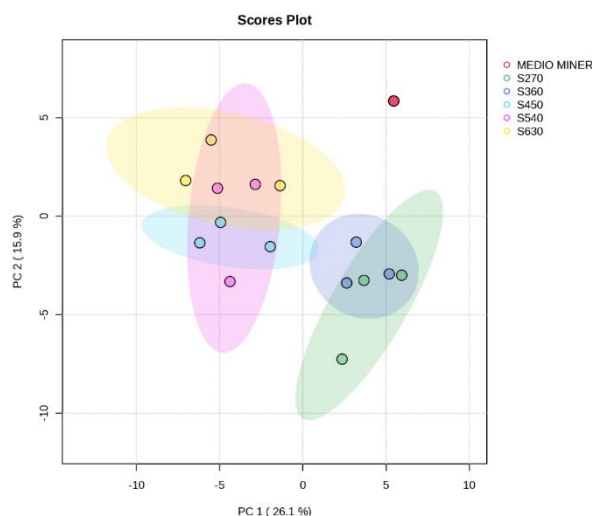
3.4. Análisis estadístico

El análisis multivariado mediante PCA (**Ilustración 8**) global explicó un 42% de la varianza acumulada en los dos primeros componentes principales (PC1 = 26.1% y PC2 = 15.9%), mostrando una separación clara entre el control (medio mineral) y los grupos

experimentales. La separación de S270 y S360 hacia cuadrantes negativos de PC1 y PC2 refleja fases tempranas, donde se observaron biomarcadores como peroxidasa y amilasa. Por otro lado, las muestras S540 y S630 se agrupan en regiones más dispersas, lo que indica mayor heterogeneidad proteómica.

Ilustración 8

Score plot de PCA global



El análisis mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y Friedman (**Ilustración 9**) no revelaron diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p > 0.05$, $p = 0.0873$); sin embargo, los valores de medias y medianas sugieren **tendencias diferenciadas** en la expresión, especialmente para amilasa y esterasa y tendencias hacia mayores niveles de expresión proteica en las muestras S270 y S360 frente al medio mineral, lo respalda la hipótesis de que ciertas enzimas tienen un papel más marcado en fases específicas de la biodegradación.

Ilustración 9

Pruebas estadísticas de Friedman y T-test

Friedman's test

Column2	Column3	Column5	Column4	Column6	T ^a	p
3.65	2.77	3.27	2.50	2.81	2.16	0.0873

Minimum significant difference between sum of ranks = 11.517

Treatment	Sum of Ranks	Mean of Ranks	n		
Column4	32.50	2.50	13	A	
Column3	36.00	2.77	13	A	B
Column6	36.50	2.81	13	A	B
Column5	42.50	3.27	13	A	B
Column2	47.50	3.65	13		B

Means with a common letter are not significantly different ($p > 0.050$)

One-Sample t-Test

Mean value under the null hypothesis: 0

Variable	n	Mean	SD	LL(95)	UL(95)	T	p(Two tails)
Column2	13	234.70	258.20	78.67	390.73	3.28	0.0066
Column3	13	93.77	249.99	-57.29	244.84	1.35	0.2012
Column5	13	176.58	283.55	5.23	347.93	2.25	0.0444
Column4	13	75.11	193.74	-41.97	192.18	1.40	0.1875
Column6	13	130.55	363.28	-88.98	350.08	1.30	0.2194

Por otra parte, las pruebas de t-test (**Ilustración 9**) de una muestra y PCA también permitieron validar la abundancia diferencial respecto a la amilasa ($p = 0.0066$) y esterasa ($p = 0.0444$), ambas significativamente distintas del valor nulo y con la mayor contribución a la varianza observada lo que confirma su relevancia como biomarcadores potenciales. Los t-test de muestras independientes entre el medio mineral y los distintos tiempos de muestreo no mostraron diferencias estadísticamente significativas tras la corrección por varianzas, probablemente debido tamaño reducido de las réplicas ($n=3$ por tratamiento), que limita la potencia estadística, aunque se observaron medias consistentemente más altas en los grupos inoculados, en particular en S270 y S540.

Capítulo 4

4. Conclusiones y Recomendaciones

4.1. Conclusiones

- En conjunto los resultados demostraron asociaciones consistentes entre la dinámica enzimática y la transformación del polímero. La detección temporal de peroxidasa, esterasas, lipasas y amilasa coincidió con disminuciones en regiones FTIR sensibles a oxidación e hidrólisis (C=O y C–O), así como con ajustes en bandas alifáticas (CH₂/CH₃) compatibles con ruptura de cadenas y aumento de grupos terminales. En paralelo, la mayor pérdida de masa observada en las muestras inoculadas, y la degradación neta obtenida tras descontar el componente abiótico del control, confirmaron que los cambios estructurales registrados por FTIR se traducen en remoción efectiva de material. Estos hallazgos se reforzaron con análisis univariados y multivariantes: los biomarcadores candidatos mostraron desempeño discriminante consistente en los análisis ROC, y las comparaciones de abundancia (t-test y ANOVA no paramétricos) respaldaron diferencias de expresión acordes con la cronología del proceso. En conjunto, la ocurrencia conjunta temporal entre señales FTIR, pérdida de masa y aparición/ausencia de bandas proteicas específicas aporta una correlación positiva robusta que permite caracterizar a estas cuatro enzimas como **proteínas clave** del fenómeno de transformación del polímero bajo las condiciones evaluadas.
- El patrón comparativo de expresión proteica permite proponer una **ruta secuencial** de transformación del polímero mediada por el consorcio. La primera fase, de colonización y pre-activación oxidativa de la superficie por peroxidasa, que incrementa la hidrofiliidad, genera radicales y sitios reactivos y facilita el anclaje celular (coherente con el debilitamiento y reconfiguración de señales FTIR en C–H/N–H y C=O); la fase dos, de depolimerización hidrolítica dirigida por esterasas y

lipasas, orientada a la ruptura de enlaces éster y a la generación de oligómeros/monómeros más asimilables (respaldada por las trayectorias FTIR en regiones C–O/C=O y por el aumento concomitante de la pérdida de masa); y finalmente, la fase de asimilación y mineralización progresiva, donde hidrolasas auxiliares como amilasa contribuyen al procesamiento y canalización de intermediarios hacia rutas centrales del metabolismo energético. Esta secuencia se ve apoyada por la separación temporal observada en los análisis multivariantes y por la concordancia entre marcadores proteicos y métricas fisicoquímicas, lo que reduce la ambigüedad típica de evaluaciones basadas en un solo tipo de dato. La ruta propuesta, sugiere un mecanismo operativo para guiar el diseño de bioprocesos y bioproductos orientados a acelerar la transformación del polímero sin generar subproductos tóxicos y priorizar enzimas diana en estrategias de mejora del consorcio microbiano.

- Estos hallazgos no solo confirman la participación activa del consorcio microbiano en la transformación del polímero, sino que también aportan una ruta proteómica tentativa que explica cómo los polímeros son progresivamente modificados y canalizados hacia procesos metabólicos internos. En conjunto, el proyecto sienta bases sólidas para la comprensión de la biodegradación microbiana y abre la posibilidad de diseñar estrategias aplicadas que optimicen la acción enzimática para acelerar la transformación de plásticos bajo condiciones ambientales controladas, contribuyendo así a soluciones biotecnológicas de alta calidad, eficaces y novedosas frente a la crisis global de contaminación por plástico de un solo uso.

4.2. Recomendaciones

- Se recomienda incrementar el número de réplicas biológicas y técnicas incluidas en cada fase temporal del estudio con el fin de reducir la variabilidad experimental y aumentar la significancia estadística. Asimismo, se sugiere incorporar más puntos intermedios y finales de las alícuotas utilizadas para los análisis proteómicos para captar con mayor precisión las transiciones en la expresión proteómica asociadas al proceso de degradación.
- Con el objetivo de fortalecer la identificación de estos biomarcadores, se recomienda complementar el análisis proteómico con técnicas de validación adicionales como espectrometría de masas (LC–MS/MS) y ensayos de actividad enzimática específicos para corroborar la función biológica de las proteínas y su efectividad. Estas aproximaciones permitirán establecer con mayor certeza el papel de los biomarcadores en la degradación de polímeros y favorecerán la reproducibilidad y aplicabilidad de los resultados en escenarios ambientales y biotecnológicos.

Referencias

- Ahmaditabatabaei, S. K. (2021). Fungal Enzymes as Catalytic Tools for Polyethylene Terephthalate (PET) Degradation. *Journal of Fungi*. doi:doi.org/10.3390/jof7110931
- Alshehrei, F. (2017). Biodegradation of Synthetic and Natural Plastic by Microorganisms. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*. doi:10.12691/jaem-5-1-2
- Amobonye, A. B. (2021). Plastic biodegradation: Frontline microbes and their enzymes. *Science of The Total Environment*. doi:doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143536
- Asamblea Nacional del Ecuador. (2020). Ley Orgánica para la Racionalización, Reutilización y Reducción de Plásticos de un Solo Uso. *Registro oficial Supremo No358*.
- Benguenab, A. C. (2021). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by filamentous fungi (*Aspergillus ustus* and *Purpureocillium lilacinum*) isolated from used engine oil contaminated soil. *ScienceDirect*. doi:doi.org/10.1016/j.chnaes.2020.10.008
- Bhavsar, P. B. (2024). Effective multi-stage biodegradation of commercial bulk polyurethane by *Clonostachys* and *Purpureocillium* spp. *ScienceDirect*. doi:doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168329
- Brunner, I. F. (2018). Ability of fungi isolated from plastic debris floating in the shoreline of a lake to degrade plastics. *PlosOne*. doi:doi.org/10.1371/journal.pone.0202047
- Chamas, A. M.-O. (2020). Degradation Rates of Plastics in the Environment. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. doi:doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.9B06635
- Chatterjee, S. R. (2010). Enzyme-mediated biodegradation of heat treated commercial polyethylene by *Staphylococcal* species. En *Polymer Degradation and Stability*.
- Chen, Y. A. (2021). Single-use plastics: Production, usage, disposal, and adverse impacts. (S. o. Environment, Ed.) *ScienceDirect*. doi:doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141772

- Cox, K. C. (2019). Human Consumption of Microplastics. *Environmental Science & Technology*. doi:doi.org/10.1021/ACS.EST.9B01517
- Das, M. K. (2014). Microbial Deterioration of Low Density Polyethylene by *Aspergillus* and *Fusarium* sp. *ResearchGate*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/260982412_Microbial_Deterioration_of_Low_Density_Polyethylene_by_Aspergillus_and_Fusarium_sp?enrichId=rgreq-d07fd64b7b7fb0de4f481e0bc77b9dfd-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzI2MDk4MjQxMjtBUzoxMDQwODA5NDkxMjEwMjZAMTQw
- de Oliveira, M. C. (2025). Evaluating cutinase from *Fusarium oxysporum* as a biocatalyst for the degradation of nine synthetic polymer. *Sci Rep*. doi:doi.org/10.1038/s41598-024-84718-0
- Dey, A. D. (2021). Challenges and possible solutions to mitigate the problems of single-use plastics used for packaging food items: a review. *J Food Sci Technol*. doi:doi.org/10.1007/s13197-020-04885-6
- Gautam, B. Q. (2024). Global Scenario of Plastic Production, Consumption, and Waste Generation and Their Impacts on Environment and Human Health. *Advanced Strategies for Biodegradation of Plastic Polymers*. Springer, Cham. doi:doi.org/10.1007/978-3-031-55661-6_1
- Geyer, R. J. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*. doi:doi.org/10.1126/SCIADV.1700782
- Haque, A. (2023). Theme: A Brief Study and One Step Ahead of Plastic Sustainability. *Global Journal of Science Frontier Research*. doi:doi.org/10.34257/gjsfrhvol23is4pg31

- Hassan, T. S. (2022). Characterization of Plastics and Polymers: A Comprehensive Study. *IOP Publishing Ltd*. doi:10.1088/1757-899X/1225/1/012033
- Ibrahim, S. I. (2024). Tapping into fungal potential: Biodegradation of plastic and rubber by potent Fungi. *Science of The Total Environment*. doi:doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173188
- Akram, M. A., Savitha, R., Kinsella, G. K., Nolan, K., Ryan, B. J., & Henehan, G. T. (2024). Microbial and Enzymatic Biodegradation of Plastic Waste for a Circular Economy. *Applied Sciences*, 14(24), 11942. <https://doi.org/10.3390/app142411942>
- Dwiyana, A., Sutanto, S., Fathurrahman, M., & Herlina, E. (2023). Determination of Biodegradation Rate of Bioplastic with Controlled Environment. *Helium: Journal of Science and Applied Chemistry*, 3(2), 65-77. <https://doi.org/10.33751/helium.v3i2.9521>
- Fernández-Sanmartín, P., Robledo-Mahón, T., Requena-Menéndez, A., Martínez-Cortizas, A., & Aranda, E. (2024). ATR-FTIR characterisation of daily-use plastics mycodegradation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 286, 117232. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.117232>
- Han, Y., Wang, R., Wang, D., & Luan, Y. (2024). Enzymatic degradation of synthetic plastics by hydrolases/oxidoreductases. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 189, 105746. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2024.105746>
- Ho, B. T., Roberts, T. K., & Lucas, S. (2018). An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: The microbial approach. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(2), 308-320. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1355293>
- Jarosz, K., Borek-Dorosz, A., Drozdek, M., Rokicińska, A., Kielbasa, A., Janus, R., Setlak, K., Kuśtrowski, P., Zapotoczny, S., & Michalik, M. (2024). Abiotic weathering of plastic: Experimental contributions towards understanding the formation of

- microplastics and other plastic related particulate pollutants. *Science of The Total Environment*, 917, 170533. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.170533>
- Jin, J., Arciszewski, J., Auclair, K., & Jia, Z. (2023a). Enzymatic polyethylene biorecycling: Confronting challenges and shaping the future. *Journal of Hazardous Materials*, 460, 132449. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132449>
- Jin, J., Arciszewski, J., Auclair, K., & Jia, Z. (2023b). Enzymatic polyethylene biorecycling: Confronting challenges and shaping the future. *Journal of Hazardous Materials*, 460, 132449. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132449>
- Odigbo, C., Adenipekun, C., Oladosu, I., & Ogunjobi, A. (2023). Polyethylene terephthalate (PET) biodegradation by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 195(5), 585. <https://doi.org/10.1007/s10661-023-11153-5>
- Khan, S. A. (2022). Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by mesophilic fungus ‘*Penicillium citrinum*’ isolated from soils of plastic waste dump yard, Bhopal, India. *Environmental Technology*. doi:doi.org/10.1080/09593330.2022.2027025
- Kutz, M. (2002). Characterization and Identification of plastics. En *Handbook of Materials Selection*. John Wiley & Sons.
- Lahimer, M. C. (2017). Characterization of plastic packaging additives: Food contact, stability and toxicity. *Arabian journal of ch*. doi:doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.07.022
- Negash, Y. T. (2021). Engagement factors for household waste sorting in Ecuador: Improving perceived convenience and environmental attitudes enhances waste sorting capacity. *Resources, Conservation and Recycling*. doi:doi.org/10.1016/j.resconrec.2021.105893
- Organización de las Naciones Unidas. (2015). *Objetivos de Desarrollo Sostenible*. Obtenido de <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>

- Patra, P. K. (2024). Impact of Societal Development and Infrastructure on Biodiversity Decline. En *Plastic Pollution and Its Impact on Biodiversity*. doi:doi.org/10.4018/979-8-3693-6950-0.ch012
- Portilla, J. (2022). Análisis del Marco Normativo de Economía Circular en Ecuador Orientado al Sector de los Plásticos. *FIGEMPA: Investigación y Desarrollo*. doi:doi.org/10.29166/revfig.v13i1.3364
- Poulsen, J. (2023). Proteogenomic tools for studying microbial degradation of polymers and additives.
- Ray, S. K. (2024). Ecotoxicity of microplastic wastes and their sustainable management: A review. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*. doi:doi.org/10.1016/j.enccco.2024.05.003
- Siti, I. T. (2023). The degradation of single-use plastics and commercially viable bioplastics in the environment: A review. *Environmental Research*. doi:doi.org/10.1016/j.envres.2023.115988.
- Srikanth, M. S. (2022). Biodegradation of plastic polymers by fungi: a brief review. *Bioresour. Bioprocess*. doi:doi.org/10.1186/s40643-022-00532-4
- Taniguchi, I. Y. (2019). Biodegradation of PET: Current Status and Application Aspects. *American Chemical Society*. doi:10.1021/acscatal.8b05171
- Temporiti, M. N. (2022). Fungal Enzymes Involved in Plastics Biodegradation. *Microorganisms*. doi:doi.org/10.3390/microorganisms10061180
- Thakur, K. t. (2021). A Comprehensive Review On Plasticizing Agent. *Journal of Emerging Technologies and Innovative Research*. Obtenido de <https://www.jetir.org/view?paper=JETIR2106010>

- Tseng, W. L. (2023). Poly(butylene adipate-co-terephthalate) biodegradation by *Purpureocillium lilacinum* strain BA1S. *Appl Microbiol Biotechnol*.
doi:doi.org/10.1007/s00253-023-12704-z
- Varaljay, V. L. (2019). Draft Genome Sequence of Filamentous Fungus *Phialemoniopsis curvata*, Isolated from Diesel Fuel. *Microbiol Resour Announc*.
doi:doi.org/10.1128/mra.00400-19
- Vimal, K. M. (2020). Analysis of barriers that impede the elimination of single-use plastic in developing economy context. *Journal of Cleaner Production*.
doi:doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122629
- Yang, Y. J. (2024). Plastic wastes (PWs) and microplastics (MPs) formation: Management, migration, and environmental impact. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. doi:doi.org/10.1016/j.jece.2024.112926
- Yin, Y. &. (2024). Transitioning of petroleum-based plastic food packaging to sustainable bio-based alternatives. *Sustainable Food Technology*.
doi:doi.org/10.1039/D4FB00028E