

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Identificación y caracterización bioinformática de enzimas degradadoras de tereftalato de polietileno con validación experimental de su expresión

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Juan Manuel Zurita Artaloitia

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Liliana Pardo López Instituto de Biotecnología – UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Fidel Alejandro Sánchez Flores Instituto de Biotecnología – UNAM

Miguel Ángel Carlos Cevallos Gaos Centro de Ciencias Genómicas – UNAM

Cuernavaca, Morelos

Abril, 2025



Universidad Nacional Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL

(Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

"Identificación y caracterización bioinformática de enzimas degradadoras de tereftalato de polietileno con validación experimental de su expresión"

que presenté para obtener el grado de maestro es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Juan Manuel Zurita Artaloitia Número de cuenta: 523023933

Agradecimientos

Principalmente a mi directora, la Dra. Liliana Pardo López: por su paciencia, dedicación y todo el apoyo brindado durante el desarrollo de este trabajo.

Al comité tutoral: al Dr. Alejandro Sánchez, al Dr. Miguel Ángel Cevallos y a la tutora invitada, la Dra. Rosa María Gutiérrez, por la retroalimentación y el compromiso con mi proyecto.

Al jurado revisor de mi tesis: el Dr. Luis Alcaraz, el Dr. Ayixon Sánchez, la Dra. Marcela Ayala, el Dr. Sergio Romero y la Dra. María Luisa Castrejón, por todas las observaciones y sugerencias que permitieron presentar este documento refinado.

A todo el grupo de Biotecnología Marina del IBt, por resolver siempre mis dudas en el laboratorio.

A la Dra. María Tabche y al Dr. Luis Felipe Muriel, por su valiosa ayuda durante los experimentos del proyecto.

A Antonio Bolaños, por su disposición y amabilidad para atender cualquier duda respecto al posgrado.

Dedicatoria

A mis padres, Salvador y Begoña: por su apoyo y cariño a lo largo de toda mi vida. Sin ellos no hubiera logrado llegar hasta aquí.

A mis amigos de toda la vida: Santiago, Julio, Pepo, Joey, Ilse y Jero, con quienes he compartido momentos inolvidables a través de los años.

A mi primo Juancho: por ser como imagino que debe ser un hermano mayor.

A mis amigos del Instituto: Yahel, Sofía, Laura, Ari, Libertad, Marla, Camila, Rodrigo, Erik, Nallely, Memo y Mariana, porque hicieron más divertida la experiencia del posgrado.

A Argui, Iru, Maika, Zuri y Neska: por su cariño incondicional y compañía.

"A journey will have pain and failure. It is not only the steps forward that we must accept. It is the stumbles. The trials. The knowledge that we will fail. That we will hurt those around us. But if we stop, if we accept the person we are when we fall, the journey ends. That failure becomes our destination. To love the journey is to accept no such end. I have found, through painful experience, that **the most important step a person can take is always the next one**."

- Dalinar Kholin

1.	INTRODUCCIÓN	1
	1.1. La problemática del plástico	1
	1.2. El plástico en los ecosistemas	2
	1.3. Tereftalato de polietileno y su biodegradación	3
	1.3.1. Carboxilesterasas (EC 3.1.1.1, EC 3.1.1.2)	4
	1.3.2. Lipasas (EC 3.1.1.3)	4
	1.3.3. Cutinasas (EC 3.1.1.74)	5
	1.3.4. PETasas (EC 3.1.1.101)	5
	1.4. Limitaciones del reciclaje del PET	8
2.	ANTECEDENTES	10
	2.1. Microorganismos y enzimas capaces de degradar PET	10
	2.2. Aminoácidos clave en la estructura de las PETasas	10
	2.3. Búsqueda de enzimas capaces de degradar PET	12
3.	JUSTIFICACIÓN	14
4.	OBJETIVO GENERAL	15
	4.1. Objetivos particulares	15
5.	METODOLOGÍA	16
	5.1. Ensamblado y anotación de genomas de aislados marinos	16
	5.2. Recopilación de secuencias de bases de datos	16
	5.3. Búsqueda de homólogos remotos por medio de PSI-BLAST, MEME y MAST	17
	5.4. Clasificación de posibles PETasas	19
	5.5. Construcción de árbol filogenético de PETasas	20
	5.6. Análisis de contexto genómico	20
	5.7. Identificación de péptido señal	21
	5.8. Comparación de estructuras 3D	21
	5.9. Búsqueda del metabolismo del PET	22
	5.10. Pruebas de halo de aclaramiento	22
	5.11. Selección de oligonucleótidos en regiones conservadas	23
	5.12. PCR de punto final	23
	5.13. Cinética de crecimiento	24
	5.14. Extracción de RNA de las cepas bacterianas	24
	5.15. RT-PCR	25

Índice

	5.16. PCR cuantitativa (qPCR)	25
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
	6.1. Análisis de los genomas del LBM	28
	6.2. Abundancias taxonómicas encontradas en las bases de datos descargadas	29
	6.3. Diversidad de secuencias en el alineamiento creado a partir de PSI-BLAST	31
	6.4. Motivos construidos por MEME y búsqueda en MAST	31
	6.5. Búsqueda de PETasas en bases de datos marinas y de suelos	33
	6.6. Clasificación de las posibles PETasas	34
	6.7. Distribución taxonómica de las posibles PETasas	36
	6.8. Posibles PETasas encontradas en el repositorio del LBM	41
	6.9. Contexto genómico de las posibles PETasas encontradas en el LBM	44
	6.10. Búsqueda de péptido señal en las secuencias encontradas	48
	6.11. Modelado tridimensional de las proteínas	49
	6.12. Búsqueda del metabolismo de PET	53
	6.13. Pruebas de halo de aclaramiento	55
	6.14. Oligonucleótidos diseñados para PCR	56
	6.15. Genes normalizadores para la RT-qPCR	59
	6.16. PCR de punto final	60
	6.17. Cinética de crecimiento de Stutzerimonas (Cepa CBC2) y Pseudomonas (Cepas GOM6)	61
	6.18. Expresión de las posibles PETasas en presencia de BHET	62
7.	CONCLUSIONES	63
8.	PERSPECTIVAS	64
9.	HIPÓTESIS DE TRABAJO	64
1(). REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
11	1. MATERIAL SUPLEMENTARIO	75

Índice de figuras

```
Figura 2. Monómero del PET y sus sustratos intermediarios generados por la degradación del polímero de
Figura 3. Simplificación de la degradación completa del PET y su integración al metabolismo central por
Figura 4. La estructura conservada de las enzimas alfa-beta hidrolasas. Están compuestas de seis láminas
betas unidas por ocho alfa hélices. Poseen una triada catalítica compuesta por serina (S), aspartato (D) e
Figura 5. Estructura tridimensional de la ISPETasa mostrada en blanco. En naranja se observan los
residuos que crean el agujero oxianión. En turquesa se observan los aminoácidos hidrofóbicos con los
cuales se une al PET. A. Superficie de la enzima en la que se puede observar el canal por el que pasa la
molécula de PET. B. Acercamiento al sitio activo, donde se puede observar los aminoácidos que facilitan
la estabilidad de la reacción y de la molécula del PET. Tomada de Burgin et al., 2024......11
Figura 6. Los seis homólogos de PETasas sintetizadas a partir de secuencias que fueron encontradas en
sitios extremófilos y su capacidad para producir monómeros del PET en diferentes concentraciones de sal.
Modificada de Chen et al. 2024.
Figura 7. Método de búsqueda de homólogos remotos por mediante PSI-BLAST (Yousaf et al., 2022).. 17
Figura 9. Gráfico Sankey en donde se observan los aislados del LBM de acuerdo con su taxonomía. ....28
Figura 11. Gráficos de mosaico que muestran la correlación entre las secuencias de las posibles PETasas
encontradas y tres distinas variables: A. Clases contra tipo de PETasas. B. Clases contra base de datos. C.
Figura 12. Árbol filogenético encontrado por búsqueda de máxima verosimilitud. En el exterior se
observa el tipo de PETasas que contiene cada taxón terminal. En el círculo interior se señala de dónde se
origina la secuencia. Los colores en cada rama representan la clase taxonómica a la cual pertenecen.
Figura 13. Alineamiento de las cinco posibles PETasas encontradas en el LBM con la IsPETasa. Se
marcan ambos puentes disulfuro, sus pinzas aromáticas, triada catalítica, agujero oxiainión y las
Figura 14. Contexto genómico de las posibles PETasas encontradas en el LBM. Las flechas indican su
dirección de transcripción. En color rojo se encuentran las posibles PETasas. En azul los reguladores tipo
hélice-vuelta-hélice. En verde el sistema regulador de dos componentes. En morado la histidina histidina
Figura 15. Contexto genómico de cepas con actividad PETasa confirmada. Las flechas indican su
dirección de transcripción. En color rojo se encuentran las PETasas. En azul los reguladores tipo hélice-
Figura 16. Alineamiento de la estructura tridimensional cristalizada de la IsPETasa 6EOE (rojo) contra las
estructuras predichas con Alphafold de tres posibles PETasas identificadas en este trabajo. Pseudomonas
sp. GOM6 (azul), Stutzerimonas stutzeri CBC2 (amarilla) y Halopseudomonas aestusnigiri GOM5
(verde). A. Estructura completa. B. Triada catalítica con la distancia en Amstrongs. C. Pinzas aromáticas.
D. Ser238 de la IsPETasa, aminoácido clave en la clasificación de las PETasas. E. Puentes disulfuro 1 y
```

Figura 17. Superficie de estructura cristalizada de la ISPETasa 6EQE. La superficie color rojo indica donde se encuentran los aminoácidos de la triada catalítica y los aminoácidos equivalentes de la IsPETasa (rojos) alineados. Los aminoácidos observados pertenecen a: Pseudomonas sp. GOM6 (azul), Stutzerimonas stutzeri CBC2 (amarilla) y Halopseudomonas aestusnigiri GOM5 (verde). A. Agujero de oxianión. B. Pinzas aromáticas. C. Vista de la hendidura superficial en la cual la molécula de PET se desliza hacia el sitio activo y como los aminoácidos aromáticos de las cepas del LBM pueden dificultar el Figura 18. Placas con LB inoculadas con tres cepas que contienen posibles PETasas y una E. coli. La placa 1 (A, B, C y D) contiene PCL al 0.5% y la placa 2 (E, F, G y H) contiene BHET al 0.5%. Se Figura 19. Árbol filogenético y secuencias nucleotídicas de diez PETasas pertenecientes a cinco géneros de la familia Pseudomonadaceae y a P. sakaiensis. Las secuencias corresponden a los sitios de unión de los oligonucleótidos diseñados. En la parte inferior está la secuencia consenso de ambas regiones. Los colores en los taxones del árbol representan la Tm de los oligonucleótidos forward (F) y reverse (R). 58 Figura 20. Electroforesis de los amplicones generados con los genes PETasa en las dos cepas seleccionadas, tres controles negativos bióticos y un control negativo sin DNA......60 Figura 21. Crecimiento de las cepas GOM6 (línea roja) y CBC2 (línea azul) a lo largo de 96 horas con el Figura 22. Expresión de la enzima PETasa en las cepas GOM6 (A) y CBC2 (B) a 48 y 72 horas. La línea roja punteada indica la expresión en el medio LB. El * indica que de acuerdo con la prueba de t de

Índice de tablas

Tabla 1. Porcentaje de los plásticos producidos (> 5%) a nivel mundial y su abreviatura (Plastics Europe, 2024).
Tabla 2. Esquema de los pasos realizados en el equipo Lightcycler para llevar a cabo la qPCR, detallandosus ciclos, temperaturas y tiempos
Tabla 3. Los diez géneros más representados, de acuerdo con su abundancia absoluta, en la búsqueda de IsPETasas por medio de PSI-Blast
Tabla 4. Los diez motivos obtenidos del modelo MEME y su descripción funcional (negritas) y/o estructural. El término "parcial" significa que el motivo no cubrió la totalidad de la estructura secundaria descrita. 32 Tabla 5. PETasas encontradas en las bases de datos curadas con microbioma marino, de suelos y humano, además del repositorio de cepas del Laboratorio de Biotecnología Marina. La tabla indica la cantidad de genomas recuperados y las posibles PETasas encontradas en cada uno, además del cálculo de porcentaje de PETasas encontradas por número de genómas. MG: Metagenomas. 33 Tabla 6. Los 11 sitios de interés encontrados en la PETasas que no entraron en una de las clasificaciones existentes. 36
Tabla 8. Matriz de identidad pareada entre las posibles PETasas encontradas en el repositorio del LBM y la IsPETasa. Los colores indican el porcentaje de identidad relativo (rojo < verde). Los valores se calcularon después de eliminar secuencia de la péptido señal
Tabla 12. Proteínas involucradas en el metabolismo completo del MHET y el TPA reportadas por Yoshida et al., 2016 en <i>P. sakaiensis</i> , sus arquitecturas de dominios y los vales de E-value y sequence score de hmmer con que se anotaron. 54 Tabla 13. Resultado de la búsqueda de proteínas con potencial metabólico de MHET y TPA en las cepas 54 del LBM. 1 indica presencia y 0 ausencia. 55 Tabla 14. Matriz de confusión que muestra en qué secuencias geonómicas se unieron los oligonucleótidos
forward y reverse

Abstract

There is a current environmental crisis due to the accumulation of plastics in the environment since they are recalcitrant and there are no efficient management and recycling mechanisms. In addition, their natural degradation is extremely slow, and they tend to fragment into microplastics. These cause significant impacts on marine and terrestrial ecosystems, but also on human health. One of the most produced and commercialized plastics is polyethylene terephthalate (PET). It is mainly used for packaging products due to its malleability and resistance.

Because of this, new biotechnological methods have been developed to degrade it using microorganisms and enzymes. These enzymes are mainly esterases, lipases and cutinases capable of hydrolyzing the ester bonds of PET, converting it into monomers (bis-2-hydroxyethyl terephthalate (BHET), terephthalic acid (TPA) and ethylene glycol (EG)) that can be used to synthesize virgin PET. In 2016, an enzyme was discovered that exhibits a higher affinity for PET than for substrates, such as aliphatic para-nitrophenols, which prefer the other enzymes, and was therefore assigned the name PETase. Although the mechanism of action of this enzyme and its structure have been elucidated, important aspects such as its distribution and expression still need to be studied.

To address this lack of knowledge, a strategy combining bioinformatic analysis of putative PETases with experimental validation of their differential expression in the presence of was implemented. The enzymes identified as potential PETases were classified according to their structure, identifying the presence of key catalytic motifs, such as the catalytic triad (serine, aspartate and histidine), aromatic clamps and disulfide bridges, essential features for their function. Phylogenetic trees were constructed to assess the evolutionary relationship between the sequences found, and genomic context analysis was performed to infer possible regulatory mechanisms.

Once the most promising sequences were selected, specific oligonucleotides were designed for the detection of their expression by quantitative PCR (RT-qPCR), to evaluate their expression in bacterial cultures in the presence of BHET.

The results obtained allowed us to demonstrate the feasibility of the analysis of PETase distribution and expression. This study represents an advance in the understanding of the diversity and functionality of PETases in different ecosystems and lays the foundation for future studies on the expression of these enzymes.

Resumen

Existe una presente crisis ambiental debido a la acumulación de plásticos en el medio ambiente, ya que son recalcitrantes y no existen mecanismos de manejo y reciclaje eficientes. Sumado a que su degradación natural es extremadamente lenta y tiende a fragmentarse en microplásticos. Estos causan afectaciones importantes en ecosistemas marinos y terrestres, pero también en la salud humana. Uno de los plásticos más producidos y comercializados es el tereftalato de polietileno (PET). Este principalmente se usa para envasar productos por su maleabilidad y resistencia.

Debido a esto, se han desarrollado nuevos métodos biotecnológicos para degradarlo usando microorganismos y enzimas. Estas enzimas principalmente son esterasas, lipasas y cutinasas capaces de hidrolizar los enlaces éster del PET, convirtiéndolo en monómeros (bis-2-hidroxietiltereftalato (BHET), ácido tereftalico (TPA) y etilenglicol (EG)) que pueden ser utilizados para sintetizar PET virgen. En 2016 se descubrió una enzima que presenta una mayor afinidad por el PET que por sustratos, como para-nitrofenoles alifáticos, que prefieren las otras enzimas, por lo que se le asignó el nombre de PETasa. Aunque ya se ha elucidado el mecanismo de acción de esta enzima y su estructura, aún hace falta estudiar aspectos importantes como su distribución y expresión.

Para abordar esta falta de conocimiento, se implementó una estrategia que combina análisis bioinformáticos de posibles PETasas con una validación experimental de su expresión diferencial ante la presencia de BHET. Las enzimas identificadas como posibles PETasas fueron clasificadas en función de su estructura, identificando la presencia de motivos catalíticos clave, como la triada catalítica (serina, aspartato e histidina), las pinzas aromáticas y los puentes disulfuro, características esenciales para su función. Se construyeron árboles filogenéticos para evaluar la relación evolutiva entre las secuencias encontradas, y se realizó un análisis de contexto genómico para inferir posibles mecanismos de regulación. Una vez seleccionadas las secuencias más prometedoras, se diseñaron oligonucleótidos específicos para la detección de su expresión mediante PCR cuantitativa (RT-qPCR), con el fin de evaluar su expresión en cultivos bacterianos en presencia del BHET. Los resultados obtenidos permitieron demostrar la viabilidad del análisis de distribución de PETasas y de su expresión. Este estudio representa un avance en la comprensión de la diversidad y funcionalidad de PETasas en distintos ecosistemas y sienta las bases para futuros estudios referentes a la expresión de estas enzimas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La problemática del plástico

Los plásticos son polímeros orgánicos sintéticos de alta masa molecular, derivados de hidrocarburos obtenidos del petróleo crudo y del gas natural (Rhodes, 2018). Desde su invención y comercialización en el siglo XX, estos se han convertido en materiales esenciales en múltiples sectores industriales, debido a propiedades como su resistencia, durabilidad y versatilidad (Andrady y Neal, 2009; Thompson et al., 2009). Sin embargo, debido a estas mismas propiedades, no se degradan fácilmente en la naturaleza, provocando su acumulación (Pathak y Navneet, 2017). Como resultado de la creciente dependencia de la humanidad hacia estos compuestos, su producción ha aumentado en los últimos años. Actualmente se producen alrededor de 413.8 Mt de plásticos anualmente (Plastic Europe, 2024). A pesar de esto, los mecanismos de gestión no han sido capaces de satisfacer la demanda y el 72% de estos productos se terminan acumulando en vertederos (40%) o siendo liberados en ecosistemas (32%), donde impactan negativamente en la red trófica y en la supervivencia de la fauna (Ali et al. 2021). Por otro lado, los plásticos que terminan siendo incinerados (14%) liberan contaminantes a la atmósfera como metano, mono- y dióxido de carbono, furano, etc., lo que causa contaminación y acidificación de suelos y cuerpos de agua (Ali et al. 2021; Evode et al., 2021). Por último, los que llegan a ser reciclados son únicamente el 14%, de los cuales únicamente el 8% termina siendo un nuevo producto, 2% se convierte en una resina virgen y el 4% restante se pierde durante el proceso de reciclaje (Ali et al. 2021). Las principales dificultades para su reciclaje son la colecta y separación de estos residuos, las dificultades del proceso, como la separación de contaminantes y los requisitos fisicoquímicos para su despolimerización (Vogt et al. 2021).

Considerando lo anterior, es indispensable enfocarse en mejorar y diseñar nuevas estrategias para su gestión, especialmente porque se prevé que para el año 2050 se habrá producido un total histórico de 26 mil millones de toneladas métricas (Guglielmi, 2017).

1.2. El plástico en los ecosistemas

Además de los métodos de gestión de residuos mencionados anteriormente, el plástico también suele ser depositado en el ambiente, donde se acumula indefinidamente (Guglielmi, 2017). Cada año, alrededor de catorce millones de toneladas llegan a los océanos, representando el 80% de los residuos marinos (Marine plastic pollution - resource | IUCN, s/f). Al flotar en los cuerpos de agua oceánicos, la concentración de estos materiales aumenta en las superficies y áreas costeras, ocasionando impactos adversos en la fauna (Ghaffar et al., 2022), como bloqueo de su tracto intestinal o impedimento de movimiento (Duis y Coors, 2016). Por otro lado, existen pocos estudios relacionados a los efectos que los plásticos puedan causar en los suelos (Duis y Coors, 2016). El interés por estudiar los efectos en los ecosistemas acuáticos, aunque la presencia de los microplásticos sea hasta 23 veces menor que en los terrestres, se debe a que estos se encuentran suspendidos en el medio, lo que hace más probable que ingresen a la red trófica, causando biomagnificación (de Souza Machado et al. 2018). A pesar de los pocos estudios al respecto, se sabe que la presencia de microplásticos puede afectar el suelo al causar cambios en su fisicoquímica, textura y estructura, perturbando los ciclos biogeoquímicos (de Souza Machado et al. 2018). Además, se debe considerar que estos residuos también tienen impactos negativos sobre la salud humana, ya sean los aditivos del plástico que actúan como disruptores endócrinos (Seewoo et al. 2024), como los microplásticos que pueden acumularse en tejidos como el hígado, riñones o el cerebro, donde producen inflamación (Dick Vethaak y Heather, 2016; Nihart et al. 2025).

Como es de esperarse, la flora y la fauna no son los únicos organismos que interactúan con este material, ya que se ha observado la recurrencia de ciertas bacterias adheridas a los plásticos. A estas comunidades se las ha acuñado el término "plastísferas" (Zettler *et al.*, 2013). Durante los estudios de esta, se ha demostrado que la presencia del plástico influye en la composición de las comunidades microbianas, reportándose un enriquecimiento de bacterias pertenecientes a los filos: *Bdellovibrionota, Bacteroidota, Actinomycetota, y Patescibacteria* (Xia *et al.*, 2022). Su adaptación a esta fuente de energía es consistente con la idea del "principio de la infalibilidad microbiana", un concepto que sugiere que, con el tiempo suficiente, los microorganismos pueden desarrollar la capacidad de metabolizar casi cualquier fuente de energía (O'malley y Walsh, 2021). Asimismo, se han encontrado tendencias que indican cómo los microorganismos y su potencial

para degradar plásticos se correlaciona con sitios de muestreo en donde ha aumentado la contaminación por este tipo de polímeros (Zrimec *et al.*, 2021).

De estos polímeros plásticos, dentro de los más producidos (Tabla 1), en quinto lugar, se encuentra el tereftalato de polietileno (PET) (Plastics Europe, 2024). Este constituye el 30% del plástico encontrado en ecosistemas marinos.

Plástico	Abreviación	Porcentaje %
Polipropileno	PP	19
Polietileno de baja densidad	PE-LD	14
Cloruro de polivinilo	PVC	12.8
Polietileno de alta densidad	PE-HD	12.2
Tereftalato de polietileno	PET	6.2
Poliuretano	PU	5.3
Poliestireno	PS	5.2
Total:		74.7

Tabla 1. Porcentaje de los plásticos producidos (> 5%) a nivel mundial y su abreviatura (Plastics Europe, 2024).

1.3. Tereftalato de polietileno y su biodegradación

El tereftalato de polietileno (PET) (Figura 1) es un polímero que se obtiene mediante la condensación de ácido tereftálico (TPA) y el etilenoglicol (EG). Su versatilidad lo ha convertido en uno de los plásticos más producidos y comercializados, principalmente en la industria de contenedores desechables (Urbanek *et al.*, 2021).



Figura 1. Estructura del tereftalato de polietileno. Imagen usada bajo la licencia: CC BY-SA 4.0.

Desde una perspectiva biotecnológica, se han identificado y caracterizado enzimas capaces de degradar el PET hasta sus monómeros constitutivos. Estas enzimas pertenecen a cuatro familias estructuralmente similares (Buchholz *et al.*, 2022). Todas ellas pertenecen al grupo de las hidrolasas del grupo de las carboxilesterasas, según el código de la Comisión Internacional de Estándares de Enzimas (EC 3.1.1). Estructuralmente, estas enzimas capaces de degradar PET se encuentran familia de las lipasas (SCOP ID: 4000727) en la base de datos de clasificación estructural SCOP (Andreeva *et al.* 2014).

1.3.1. Carboxilesterasas (EC 3.1.1.1, EC 3.1.1.2)

Las carboxilesterasas son enzimas pertenecientes a la familia de las alfa y beta hidrolasas, responsables de la hidrólisis de carboxiésteres en ácido carboxílico y alcohol. Estas enzimas tienen como sustratos preferidos compuestos con ésteres de ácido carboxílico, amidas y tioésteres (Mojtabavi y Amin, 2024). Un ejemplo es la arilesterasa de la bacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* que es capaz de degradar diferentes poliésteres ftálicos (Haernvall *et al.*, 2017).

1.3.2. Lipasas (EC 3.1.1.3)

Las lipasas son enzimas que hidrolizan los enlaces éster de los triglicéridos para producir ácidos grasos libres y glicerol, por lo que están presentes en forma natural en el metabolismo de los seres vivos, principalmente en la digestión de grasas (Pirahanchi y Sharma, 2023). Son estructuralmente análogas a las cutinasas, pero contienen una especie de tapa en el sitio activo. Esta interfiere con la hidrólisis de la molécula de PET, debido a que es un poliéster polimérico (Maurya *et al.*, 2020). Ronkvist *et al.* (2009) encontraron que la lipasa *Pseudomonas mendocina* logró un 5% de degradación total de PET en condiciones óptimas. En contraste, Wang *et al.* (2008) reportaron que la lipasa de *Aspergillus oryzae* mejoró la hidrofobicidad de la superficie del PET, reduciendo el ángulo de contacto con el agua, pero con poca pérdida de peso de aproximadamente 0.5-1%. La prueba de disminución de hidrofobicidad empleada en estos estudios evidencia cómo la estructura hidrofóbica de los polímeros plásticos pierde esta propiedad conforme se reduce la cantidad de enlaces presentes, lo que indica una descomposición de la matriz polimérica.

1.3.3. Cutinasas (EC 3.1.1.74)

Las cutinasas son enzimas pertenecientes a la familia de las alfa/beta hidrolasas que fueron descubiertas inicialmente en hongos, y que son capaces de hidrolizar la cutina vegetal (Chen *et al.*, 2013). Pueden catalizar la hidrólisis de polímeros, triacilgliceroles insolubles y ésteres de bajo peso molecular. También catalizan reacciones de esterificación y transesterificación. La versatilidad de estas enzimas permitió su estudio para aplicaciones industriales (Chen *et al.*, 2013). Las cutinasa de *Humicola insolens* mostró una buena capacidad para hidrolizar PET (97%) y disminuyendo significativamente la hidrofobicidad de su superficie (Ronkvist *et al.*, 2009). En el trabajo anterior no se reportaron los datos de actividad específica de la enzima, lo cual impide la comparación de su eficiencia con otras hidrolasas de PET. Respecto a la actividad específica de estas enzimas, es importante conocer la cantidad de enzima que se utiliza en estos experimentos y la velocidad en la que se lleva a cabo la reacción, especialmente en trabajos que propongan enzimas con potencial para realizar reciclaje de plásticos a nivel industrial.

1.3.4. PETasas (EC 3.1.1.101)

Las PETasas, también conocidas como hidrolasas de polietileno tereftalato, son un grupo de enzimas recientemente descritas (Buchholz *et al.*, 2022). En el año 2016 se descubrió una enzima, parecida a una cutinasa, en el organismo *Piscinibacter sakaiensis* (anteriormente conocido como *Ideonella sakaiensis*), una bacteria capaz de crecer utilizando únicamente PET como fuente de carbono y energía (Figura 2) (Yoshida *et al.*, 2016). La PETasa de *Piscinibacter sakaiensis* es también conocida como IsPETasa y es la enzima de referencia con la cual se identifican y comparan sus homólogas. Lo que diferencia a esta enzima de otras hidrolasas degradadoras de PET es por tener una actividad mayor en PET (hasta 120 veces más) y una menor actividad en para-nitrofenoles alifáticos (Yoshida *et al.*, 2016). Los para-nitrofenoles alifáticos son los sustratos preferidos de cutinasas y lipasas, lo que demuestra la especificidad de las PETasas por encima del resto de proteínas (Han *et al.* 2017). Esta especificidad se debe a modificaciones estructurales en la superficie y en el interior de la proteína (Joo *et al.* 2018) que se detallarán más adelante. La

bacteria que posee esta enzima fue aislada de una planta de reciclaje de PET, lo que sugiere que su metabolismo fue seleccionado por encontrarse en un ambiente enriquecido con PET.

El mecanismo de degradación propuesto por Yoshida *et al.* en 2016 consiste en la degradación del PET a cuatro monómeros distintos: tereftalato de bis(2-hidroxietilo) (BHET), MHET, etileno glicol (EG) y ácido tereftálico (TPA). Las estructuras químicas de estos compuestos involucrados en esta reacción se encuentran en la Figura 2. El motivo por el que el PET puede formar estos distintos compuestos es que los subproductos se generan dependiendo del enlace donde la enzima realice el corte hidrolítico (Joo *et al.*, 2018). Este proceso, al actuar sobre un polímero de alta masa molecular, ocurre al exterior de la célula, por lo que las enzimas deben secretarse. Los transportadores (TPATP) llevan a cabo la internalización de los monómeros, y las dioxigenasas (TPADO y Pca34) e hidrolasas (DCDDH) conducen el sustrato hasta la vía de degradación del benzoato. Como se ilustra en la Figura 3, estos sustratos terminan entrando en el ciclo del ácido cítrico como piruvato y glioxilato (Lewis *et al.*, 2020).



Figura 2. Monómero del PET y sus sustratos intermediarios generados por la degradación del polímero de PET causada por hidrolasas. Modificada de Han *et al.*, 2017.



Figura 3. Simplificación de la degradación completa del PET y su integración al metabolismo central por la bacteria *P. sakaiensis*.

Estos cuatro grupos de enzimas pertenecen a las *alfa-beta* hidrolasas, específicamente por las serina hidrolasas, las cuales se caracterizan por tener en su estructura ocho láminas beta, conectadas por hélices alfas (Pérez-García *et al.*, 2021). Realizan la hidrólisis del PET por medio de la triada catalítica clásica de las serina hidrolasas, la cual es constituida por una serina nucleofílica, una histidina que actúa como base y un aspartato que actúa como ácido (Figura 4) (Pérez-García *et al.*, 2021). Poseen también un agujero oxianión, formado por las cadenas principales de dos residuos (de los que se profundizará más adelante), el cual ayuda a estabilizar la reacción.



Figura 4. La estructura conservada de las enzimas alfa-beta hidrolasas. Están compuestas de seis láminas betas unidas por ocho alfa hélices. Poseen una triada catalítica compuesta por serina (S), aspartato (D) e histidina (H). Figura modificada de Pérez-García *et al.*, 2021.

1.4.Limitaciones del reciclaje del PET

Aunque el PET es un plástico que se considera completamente reciclable y puede participar en una economía circular (Gracida-Alvarez *et al.*, 2023), su reciclaje mecánico altera sus propiedades estructurales, limitando su uso. Sin mencionar que se deben hacer procesos de separación de contaminantes por densidad (Lang *et al.*, 2023).

Mientras que el reciclaje químico requiere de grandes cantidades de energía (entre 90 y 300 °C), presión (entre 50 y 100 bar) y químicos adicionales (como solventes y catalizadores) resultando en altos costos que no suelen ser económicamente sustentables para las empresas de reciclaje y una alta producción de CO_2 (Lang *et al.*, 2023).

Desde el punto de vista enzimático, aún existen desafíos respecto a su degradación; como la baja termoestabilidad de las enzimas capaces de degradarlo y la liberación de subproductos capaces de inhibir a estas mismas proteínas (Anuar *et al.*, 2022). La bacteria *P. sakaiensis* con su PETasa es capaz de metabolizar cerca de 50 mg de PET en 70 días (Yoshida *et al.*, 2016), lo cual no es rentable desde el punto de vista industrial. Sin embargo, un estudio realizado por Arnal *et al.*, 2023

mostró que, al optimizar las condiciones de temperatura y pH de cuatro PETasas modificadas, se pueden romper hasta 41.25 g (un 98% del peso total) de PET en monómeros a las 24 horas. Esto resulta comparable con el reciclaje químico, como la metanólisis, que es capaz de recuperar al 100% los monómeros de 0.5 g de PET en 30 minutos a 300 °C y una presión de 81 bar (Sako *et al.*, 1997). Aunque la metanólisis es mucho más rápida que la biodegradación escalar este procedimiento a nivel industrial resulta económicamente inviable (Lang *et al.*, 2023).

Existe poca información sobre a la diversidad, distribución y expresión de estas enzimas (Xu *et al.*, 2023), y este trabajo busca ampliar el repertorio de conocimiento al respecto. Como se expuso anteriormente, aunque la *P. sakaiensis* creció en un ambiente enriquecido en PET, aún no está tan especializada en su degradación; aun así, es una excelente base para conocer más acerca de cómo afectan los aminoácidos a su estructura y poder mejorarla mediante ingeniería de proteínas. (Austin *et al.*, 2018). Desafortunadamente, no todas las PETasas identificadas *in silico* son capaces de degradar PET (Chen *et al.*, 2024), por lo que hay que realizar filtros y ensayos experimentales que nos permitan saber cuáles realmente se están expresando. Los principales análisis de degradación de PET involucran técnicas como la pérdida de peso (Pfaff *et al.*, 2022), el halo de aclaramiento (Zhang *et al.*, 2022) y generación de subproductos (Bell *et al.*, 2022; Lu *et al.*, 2022; Tournier *et al.*, 2020). Hasta donde se conoce, no hay reportes que cuantifiquen la expresión de PETasas por medio de RT-qPCR. Este trabajo tiene como objetivo explorar la diversidad, distribución y expresión de enzimas capaces de degradar PET, mediante el uso de bases de datos y el diseño de oligonucleótidos con alta especificidad y sensibilidad.

2. ANTECEDENTES

2.1. Microorganismos y enzimas capaces de degradar PET

Una revisión bibliográfica realizada por Gambarini *et al.* 2021 identificó que los géneros bacterianos *Pseudomonas, Streptomyces, Bacillus, Paenibacillus, Amycolatopsis* y *Thermobifida* destacan, en ese orden, como los más frecuentemente reportados en estudios relacionados con la biodegradación del PET.

En el panorama de las enzimas, la base de datos The Plastics-Active Enzymes Database (PAZy) (Buchholz *et al.*, 2022) recopila enzimas con capacidad para degradar plásticos. Dado que esta base de datos se recopiló y se actualiza a partir de evidencia experimental, las secuencias de las enzimas registradas para la degradación de PET se emplearán como controles positivos en los análisis computacionales realizados en este estudio.

2.2. Aminoácidos clave en la estructura de las PETasas

Como se expuso anteriormente, se conoce que la IsPETasa de *Piscinibacter sakaiensis*, al ser una serina hidrolasa, posee una triada catalítica de serina (S160), aspartato (D206) e histidina (H237) (Figura 5B). Un estudio de actividad enzimática (Austin *et al.*, 2018) permitió determinar el mecanismo de acción de la enzima, dando a conocer la importancia de los siguientes aminoácidos: poseen dos aminoácidos aromáticos (Y87 y W185) (Figura 5B) conocidos como "pinzas aromáticas", las cuales les permiten acercarse a superficies hidrofóbicas como puede ser el PET al alinear sus anillos aromáticos con los del benceno del PET (referir a la Figura 5). El estudio también reveló la presencia de un agujero oxianión formado por los grupos amino de las cadenas principales aminoácidos (M161 y Y87) (Figura 5B), estos estabilizan la transferencia de energía durante la hidrólisis (Han *et al.*, 2017). En el extremo carboxilo de la secuencia, poseen dos cisteínas (C273-C289) que forman un puente disulfuro que puede ayudar al plegamiento de la proteína y/o a su termoestabilidad. Los sitios mencionados anteriormente, aunque necesarios para la degradación eficiente del PET, no son exclusivos de las PETasas y además de estas, también los

poseen algunas cutinasas (Han *et al.*, 2017). A continuación, se describirán los sitios que son exclusivos de las PETasas más especializadas.

El aminoácido W159 (Figura 5B) es responsable de ayudar a estabilizar la molécula de PET al igual que las pinzas aromáticas (Burgin *et al.* 2024). Asimismo, el surco por el cual se posiciona la molécula de PET (Figura 5A) es menos profundo y más ancho, lo que facilita el desplazamiento del polímero (Liu *et al.* 2018). La última característica que poseen es un segundo puente disulfuro que acerca la triada catalítica entre ella, estabilizando al sitio activo (Joo *et al.* 2018).



Figura 5. Estructura tridimensional de la IsPETasa mostrada en blanco. En naranja se observan los residuos que crean el agujero oxianión. En turquesa se observan los aminoácidos hidrofóbicos con los cuales se une al PET. A. Superficie de la enzima en la que se puede observar el canal por el que pasa la molécula de PET. B. Acercamiento al sitio activo, donde se puede observar los aminoácidos que facilitan la estabilidad de la reacción y de la molécula del PET. Tomada de Burgin *et al.*, 2024.

En el trabajo de Joo *et al.*, 2018 realizaron un estudio estructural de diferentes PETasas que reveló la diversidad existente entre ellas. Además de considerar la presencia del segundo puente disulfuro, hicieron una subclasificación especial para las que poseen una serina en el sitio 238, debido a que esta permite que la enzima sea más eficiente al degradar PET. Con base en lo anterior, clasificaron a las PETasas en tres tipos diferentes:

- Tipo I: únicamente el puente disulfuro 1.
- Tipo IIa: tienen ambos puentes disulfuro. También poseen un bucle extendido generado de los sitios 242 a 247.
- Tipo IIb: tienen las mismas características que las del tipo IIa, pero la presencia de una serina en el sitio 238 permite un mejor acceso a la molécula de PET.

Esta clasificación es crucial para entender la eficiencia de las enzimas en la degradación de PET, ya que la presencia de puentes disulfuro y la serina en el sitio 238 influyen en su actividad catalítica (Joo *et al.*, 2018). Existe poca información respecto a la distribución taxonómica de los diferentes tipos de PETasas.

2.3. Búsqueda de enzimas capaces de degradar PET

Para identificar enzimas capaces de degradar PET en genomas y metagenomas, el grupo de investigación de Streit, de la Universidad de Hamburgo, ha construido modelos ocultos de Markov. (estos son modelos probabilísticos que registran la composición de un grupo de secuencias para encontrar homólogos remotos (Eddy, 2004)). Con este objetivo, el grupo utilizó las secuencias de nueve PETasas caracterizadas y las complementó con trece secuencias identificadas *in silico* que encontraron con su primer modelo. Identificaron 504 posibles PETasas en la base de datos UniProtKB y de este set, se sintetizaron dos de ellas, confirmando experimentalmente el aumento de un subproducto del PET por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) (Danso *et al.*, 2019).

El método que usaron para identificar la actividad de las PETasas sintetizadas fue empleando cajas de agar adicionadas con dos sustratos: la policaprolactona (PCL) y el BHET, ya que el primero es un plástico biodegradable que se utiliza en el tamizaje primario para buscar la capacidad de hidrolizar enlaces de poliésteres y el segundo es un subproducto del PET que también puede ser degradado en TPA por las PETasas para producir TPA y EG (Zhang *et al.*, 2022). En este experimento, se observó que la enzima formó zonas de aclaramiento alrededor de estos compuestos, mostrando su actividad comparado con controles negativos donde no mostró actividad.

Gracias a esta técnica se han descubierto nuevas PETasas activas. También se revisa que las secuencias contengan sitios conservados necesarios para la degradación de PET: triada catalítica, pinzas aromáticas y puentes disulfuro (Danso *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2023).

Un método alternativo para descubrir PETsas fue el utilizado en el trabajo de Chen *et al.*, 2024, en el cual se realizó una búsqueda menos restrictiva a través de 2.4 millones de proteínas marinas. Para ello, buscaron las IsPETasa en todos los genomas y con un E-value de 10⁻⁵ encontraron 3,954

enzimas, de las cuales solo 1,598 contaban con la triada catalítica de las *alfa-beta* hidrolasas y 893 con un péptido señal. De estas, seleccionaron seis enzimas procedentes de ambientes extremófilos (tres de ventilas hidrotermales y tres de las fosas Marianas) y las sintetizaron. Probaron las enzimas con un gradiente de concentración de NaCl (0, 0.6, 1.2, 1.9, 2.8, 3.7, 4.5, y 5.3 M) y encontraron que tres de ellas eran incluso más eficientes que la IsPETasa a altas concentraciones de sal (4.5 M y 5.3 M) y a 37 °C (Figura 6).



Figura 6. Los seis homólogos de PETasas sintetizadas a partir de secuencias que fueron encontradas en sitios extremófilos y su capacidad para producir monómeros del PET en diferentes concentraciones de sal. Modificada de Chen *et al.*, 2024.

Además de estas enzimas que se han buscado cuidadosamente, también se ha detectado la expresión de enzimas hidrolasas, esterasas y serina hidrolasas durante estudios transcriptómicos relacionados a la degradación del PET (Kim *et al.*, 2020; Kumari *et al.*, 2021).

Debido a lo anterior, se espera que, en caso de encontrar posibles PETasas *in silico* con el uso de modelos bioinformáticos, se puede confirmar experimentalmente la expresión con un tamizaje utilizando la técnica de halos de aclaramiento y seguido de una comprobación de expresión más exacta de transcrito por medio de la técnica de RT-qPCR. El usar oligonucleótidos diseñados para genes en específico permite una detección precisa y validar su función durante la degradación.

3. JUSTIFICACIÓN

La producción desmedida de plásticos en el medio ambiente representa una problemática social, ecológica y económica. Ya que estos materiales son altamente recalcitrantes y su degradación natural es extremadamente lenta, estos se acumulan en los ecosistemas, causando impactos negativos para la flora, fauna y la salud pública. El tereftalato de polietileno (PET) es uno de los plásticos más producidos y utilizados a nivel mundial, y si bien se han desarrollado estrategias biotecnológicas para la degradación del PET mediante microorganismos y enzimas específicas, aún existe un conocimiento limitado sobre la diversidad y distribución de las PETasas, las enzimas más prometedoras para integrar este polímero a una economía circular.

Además, se desconoce en gran medida si la expresión de estas enzimas está regulada o inducida por la presencia de sustratos intermediarios del PET, como el bis-2-hidroxietiltereftalato (BHET). Comprender estos aspectos es crucial para entender su evolución y su mecanismo de expresión.

Por ello, este estudio emplea un enfoque integral que combina análisis bioinformáticos para identificar y clasificar posibles PETasas en diversas bases de datos, incluyendo una cuyos aislados se encuentran disponibles para validar experimentalmente su expresión en presencia de BHET. La generación de este conocimiento no solo contribuye a la identificación de nuevas posibles PETasas con potencial biotecnológico, sino que también sienta las bases para futuras investigaciones sobre los mecanismos de regulación de su expresión, un aspecto clave para su aplicación en estrategias de biodegradación del PET.

4. OBJETIVO GENERAL

Implementar un análisis computacional eficiente para identificar hidrolasas específicas para PET, complementándolo con técnicas experimentales para confirmar su actividad transcripcional.

4.1. Objetivos particulares

1. Implementar un modelo de búsqueda para identificar homólogos de la IsPETasa.

2. Identificar posibles PETasas a través de diferentes bases de datos para analizar su distribución y diversidad.

3. Diseñar y evaluar oligonucleótidos degenerados que logren amplificar las posibles PETasas de al menos un género.

4. Validar la expresión de las posibles PETasas identificadas en los aislados con de BHET por medio de RT-qPCR.

5. METODOLOGÍA

5.1. Ensamblado y anotación de genomas de aislados marinos

En el Laboratorio de Biotecnología Marina (LBM), del Instituto de Biotecnología de la UNAM, se han aislado y secuenciado los genomas de 48 cepas bacterianas (19 de ellos depositados en Genbank (Tabla suplementaria 1)) y se cuenta con dos metagenomas. De estos, 33 ya habían sido ensamblados. Los 15 restantes fueron ensamblados utilizando el programa DISCOVAR (Weisenfeld *et al.*, 2014), en el caso de las lecturas realizadas por Illumina MiSeq utilizando Unicycler (Wick *et al.*, 2017), en el caso de las lecturas híbridas realizadas con el secuenciador Oxford Nanopore MiniON e Illumina, se verificó su porcentaje de completitud con el software CheckM (Parks *et al.*, 2015). Para tener un repositorio de secuencias de aminoácidos homogeneizado, se anotaron todos los genomas con el programa Bakta (Schwengers *et al.*, 2021), haciendo uso de la versión completa de su base de datos.

5.2. Recopilación de secuencias de bases de datos

Para la búsqueda de posibles PETasas, se descargaron las secuencias de aminoácidos de tres bases de datos. Se buscó que estas fueran de ecosistemas contrastantes, con el fin de comparar la presencia y diversidad de las secuencias:

- NIH Human Microbiome Project (Proctor *et al.*, 2019): Es una base de datos diseñada para caracterizar la microbiota de humanos saludables en cinco diferentes sitios: piel, cavidad nasal, cavidad oral, sistema gastrointestinal y sistema urogenital. Las secuencias se obtuvieron por secuenciación por shotgun.
- Refsoil (Choi *et al.*, 2016): Cuenta con una colección curada de genomas y metagenomas de bacterias obtenidas de suelos.
- MAR (Klemetsen *et al.*, 2018): Esta contiene un amplio catálogo de genomas y metagenomas obtenidos de ambientes marinos, desde profundidades hasta agua superficial. También cuenta con una gran cantidad de metadatos en la mayoría de sus entradas.

Las secuencias de aminoácidos de cada base de datos se descargaron obteniendo la lista de claves GCA (claves de cada genoma ensamblado) y descargando las secuencias de aminoácidos correspondiente para cada ensamble. Se concatenaron las secuencias de cada base de datos y se modificaron los headers con el fin de que siguieran el mismo patrón de header: Base de datos, clave GCA, género, especie y clave de proteína.

5.3. Búsqueda de homólogos remotos por medio de PSI-BLAST, MEME y MAST

Para buscar homólogos remotos en las bases de datos, se empleó el programa MEME v.5.5.4 (Bailey y Elkan, 1994). Este programa permite generar matrices de peso posicional, generando un perfil de motivos. Para construir la matriz se partió de la secuencia de IsPETasa (GAP38373), la cual fue sometida a una búsqueda por medio de PSI-BLAST (Figura 7) (Altschul *et al.*, 1997) para obtener un alineamiento múltiple de homólogos remotos. El E-value de la búsqueda fue de 1x10⁻³, el parámetro por defecto de la herramienta.

Para el PSI-BLAST se empleó la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI y se realizaron búsquedas hasta que la búsqueda convergió. Posteriormente, se eliminaron las proteínas que provenían de construcciones sintéticas.



Figura 7. Método de búsqueda de homólogos remotos por mediante PSI-BLAST (Yousaf *et al.*, 2022).

Una vez que se obtuvieron las secuencias de la proteína, se usaron para alimentar al programa MEME v.5.5.4 (Bailey y Elkan, 1994), con el fin de encontrar motivos conservados que no contengan gaps. Los parámetros consideran encontrar 10 motivos en cada alineamiento múltiple, con una distribución tipo *Zero or One Occurrence per Sequence* (Para indicarle que no puede haber motivos repetidos en cada secuencia) y con motivos de entre 6 y 40 aminoácidos de tamaño. Con el archivo de salida obtenido en el paso anterior, se usó el programa MAST (Bailey y Gribskov, 1998) para escanear cada base de datos de aminoácidos y obtener los homólogos remotos de cada una. Un resumen simplificado de la metodología se puede observar en la Figura 8.



Figura 8. Procedimiento estándar de MEME-MAST. Modificada de Bailey et al., 2009.

Se filtraron los resultados obtenidos, únicamente extrayendo las secuencias que tuvieran un Evalue $< 10^{-20}$ y que tuvieran una longitud mayor a 200 aminoácidos. El corte a este E-value fue elegido debido a que se utilizó la matriz para buscar posibles PETasas con las secuencias registradas en PAZy (Buchholz *et al.*, 2022) y las secuencias del trabajo de Chen *et al.*, 2024 como control positivo y ninguna secuencia de estas PETasas funcionales poseía un E-value $> 10^{-20}$. El corte de longitud se aplicó debido a que ciertas secuencias fragmentadas estaban siendo extraídas, ya que no hubieran podido ser eficientemente comparadas con las completas, las cuales poseen una longitud cercana a 290 aminoácidos de la IsPETasa. Una vez identificados los homólogos remotos, se procedió a clasificar las posibles PETasas encontradas en función de ciertos residuos presentes (o asuentes) en su secuencia.

5.4. Clasificación de posibles PETasas

Una vez que se obtuvieron las secuencias homólogas de cada base de datos, estas se extrajeron de cada base de datos y se alinearon usando el programa MUSCLE5 (Edgar, 2022) junto a la secuencia de la IsPETasa. Una vez alineadas, se buscaron los 11 sitios importantes en la secuencia de la IsPETasa y con el programa BioEdit (Hall, 1999) se recortaron las secuencias para que solo se representen los 11 sitios importantes a lo largo de todos los hits. Una vez que se obtuvieron, se escribió un script (https://github.com/Zurita-Artaloitia/Tesis-m/blob/main/Petase-type) capaz de clasificar el tipo de PETasa de cada secuencia. El script crea un flujo que leía cada secuencia de aminoácidos y en caso de contener un solo puente disulfuro, fueron registradas como PETasas de tipo I, en caso de poseer doble puente disulfuro las registraba como del tipo IIa, en caso de tener ambos puentes y la S238, las registraba como del tipo IIb y todas las restantes quedan como "sin clasificar". Se omitió la IsPETasa de estos análisis para representar únicamente lo encontrado en las bases de datos seleccionadas. También se omitieron las secuencias del LBM con el fin de comprar únicamente entre las bases de datos públicas.

Para entender la diversidad taxonómica de las posibles PETasas encontradas, se usó un script (https://github.com/Zurita-Artaloitia/Tesis-m/blob/main/getclass) que lee una lista de GCAs y le asigna una clasificación taxonómica a nivel de clase a cada una. Para esto, el script busca la clave de GCA con la herramienta efetch de NCBI y con la herramienta de esummary se obtuvo su taxonomía.

Posteriormente se procedió a examinar la asociación entre las variables de interés mediante la prueba de chi-cuadrado a través de la función chi2_contingency del módulo SciPy, evaluando así la independencia entre las variables de clase, origen y tipo de PETasa. Los resultados se graficaron en diagramas de mosaico con el paquete mosaicplot de Python.

5.5. Construcción de árbol filogenético de PETasas

Las secuencias de aminoácidos, previamente alineadas, obtenidas de cada base de datos, incluyendo las contenidas en el repositorio del LBM se recortaron con el programa TrimAl (Capella-Gutiérrez *et al.*, 2009), el cual elimina las regiones que considera pobremente alineadas. Se usaron las opciones predeterminadas del programa. Las secuencias recortadas (incluyendo la de la IsPETasa) fueron usadas para estimar un árbol filogenético, a través de IQtree2 (Minh *et al.*, 2020). Se realizaron 1,000 bootstraps y la búsqueda del modelo fue en modo automático.

Para la visualización del árbol, se cargó el archivo de salida de IQtree2 al servidor web ITOL v6 (Letunic y Bork, 2024). En este se agregaron los metadatos como: clasificación taxonómica a nivel de clase, la base de datos de la cual se obtuvo la secuencia y la clasificación de cada posibles PETasa.

Con esto se concluye el análisis realizado con todas las posibles PETasas que fueron encontradas en las bases de datos descargadas. A partir de este punto únicamente se trabaja con las secuencias extraídas del repositorio del LBM. Realizando filtros bioinformáticos con el fin de conocer qué tanto se parecen a las PETasas caracterizadas.

5.6. Análisis de contexto genómico

La comprensión del contexto genómico de las enzimas nos proporciona la capacidad de inferir su ortología, aspecto crucial para prever tanto su funcionalidad como su expresión (Dewey, 2011). Para esto, se escribió un script (https://github.com/Zurita-Artaloitia/Tesis-m/blob/main/gbk-extract-query) que extrae las secuencias codificantes (CDS) de los formatos Genbank para los genes que dieron hit en los genomas del LBM, así como de los cinco CDS que se encuentran antes y los cinco CDS que se encuentran después. Se seleccionaron cinco genes arriba y debajo de manera arbitraria, con el fin de buscar genes relacionados al metabolismo de degradación del PET o reguladores de transcripción.

Como las anotaciones suelen encontrarse desactualizadas, se decidió usar Interproscan (Jones *et al.*, 2014) para buscar a qué familia pertenecían los genes de la vecindad genómica, por lo que se buscaron las secuencias en la base de datos de Pfam (Mistry *et al.*, 2021) y la de SUPERFAMILY

2.0 (Pandurangan *et al.*, 2019). Se extrajeron las familias más comunes encontradas y se calculó su frecuencia. Una vez que se tuvieron, se graficaron con la librería de R: GenoplotR (Guy *et al.*, 2010). Se realizaron modificaciones posteriores a las figuras empleando Inkscape, para resaltar los genes similares con diferentes colores.

5.7. Identificación de péptido señal

Como segundo filtro, se realizó un análisis de las secuencias del LBM y de la IsPETasa de *Piscinibacter sakaiesnsis* con el programa SignalP 6 (Teufel *et al.*, 2022). Esto con el fin de saber si tiene la capacidad de ser exportada de la célula.

Una vez que se conoció el PS de cada secuencia encontrada en el LBM, estas se eliminaron y las secuencias se compararon entre ellas realizando una matriz de identidad pareada entre estas y la IsPETasa utilizando blastp (Camacho *et al.*, 2009), con el fin de saber que tan parecidas según su distancia.

5.8. Comparación de estructuras 3D

Otro método para confirmar la similitud estructural de las posibles PETasas encontradas con la de *P. sakaiensis* es predecir su estructura tridimensional y compararla. Para esto, se utilizó el programa ColabFold (Mirdita *et al.*, 2022) a través del servidor web. Se seleccionó el mejor de los cinco modelos producidos por el programa y se utilizó PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.0 Schrödinger, LLC., s/f) para superponer las estructuras con el algoritmo "align".

5.9. Búsqueda del metabolismo del PET

Se buscó el metabolismo de degradación del PET en las secuencias de aminoácidos de las cepas del LBM que hayan tenido posibles PETasas, para saber si son capaces de llevar a cabo la asimilación completa con la misma ruta que *P. sakaiensis*. Para esto, se descargaron las secuencias de aminoácidos, reportadas por Yoshida *et al.*, 2016, que codifican para el metabolismo completo del PET y se buscaron sus dominios conservados por medio de Interproscan (Jones *et al.*, 2014), usando la base de datos de Pfam. Una vez que se identificaron los dominios, se buscaron en los genomas del LBM donde se encontraron posibles PETasas con hmmsearch (Eddy *et al.* 2009) y los hits positivos fueron seleccionados de acuerdo con los puntajes de similitud que se obtuvieron de la búsqueda en las secuencias de *P. sakaiensis*, los cuales fueron un E-value < 10^{-18} y un full sequence score mayor a 40.

5.10. Pruebas de halo de aclaramiento

Para realizar las pruebas de halo de aclaramiento, se prepararon cajas de agar con medio LB, en donde se agregó policaprolactona (PCL) al 0.5% y cajas de agar con tereftalato de bis(2-hidroxietilo) (BHET) al 0.5% (Pérez-García *et al.*, 2021). Se dejaron crecer preinóculos durante 24 horas y de estos se gotearon 5 μ L en las cajas. Como control negativo se utilizó *E. coli* BL21 en las mismas cajas. Para las cajas con PCL, se utilizó goma arábiga a 0.5%, ya que ayuda a distribuir la PCL en las cajas. El BHET se preparó a una concentración de 1M en dimetilsulfóxido (DMSO), siendo disuelto en un thermoblock a 70 °C por dos horas. Las cajas se dejaron incubar por cinco días a 30 °C. No se realizó una medición de los halos de aclaramiento debido a que no se estandarizó la densidad óptima de las bacterias, esto porque únicamente se quería saber si producían halos o no.

5.11. Selección de oligonucleótidos en regiones conservadas

Una vez que se identificaron las posibles PETasas del LBM, se realizó un búsqueda de motivos MEME (Bailey *et al.*, 2009) con sus secuencias nucleotídicas, con el fin de encontrar las regiones mejor conservadas. Se diseñaron los oligonucleótidos tomando en cuenta parámetros importantes para su eficiencia, como: longitud, porcentaje de GC, temperatura de alineamiento, nucleótidos terminales y la formación de estructuras secundarias (Singh y Kumar, 2001).

Se analizaron las características de los oligonucleótidos y se alinearon contra genomas de organismos degradadores, organismos del microbioma humano y las cepas del LBM, con el fin de conocer la sensibilidad y especificidad de estos. Estos análisis fueron realizados usando el programa SnapGene software (www.snapgene.com). Para encontrar el gen normalizador que se emplearon durante el RT-qPCR, se revisó bibliografía para obtener un grupo de genes candidatos y se buscó el que tuviera una mejor conservación nucleotídica entre las cepas, con el fin de usar un solo juego de oligonucleótidos para todas las cepas. Para los oligonucleótidos utilizados para el gen normalizador de la qPCR se realizó una búsqueda bibliográfica para seleccionar los mejores candidatos. Estos se identificaron en nuestras cepas y se diseñaron los oligonucleótidos con los mismos parámetros de calidad descritos anteriormente.

5.12. PCR de punto final

Para confirmar la presencia de los genes en las cepas bacterianas en las que se encontraron las posibles PETasas, se realizó una extracción de DNA con el kit Quick-DNA Miniprep de Zymo Research. También se extrajo el DNA de cepas en las que no se detectaron posibles PETasas como controles negativos. Los oligonucleótidos utilizados fueron los diseñados en este trabajo y se encuentran en los resultados. Se realizó la PCR con la enzima NZYTaq II con las características descritas en las tablas suplementarias 6 y 7.

Los amplicones obtenidos se corrieron en un gel de agarosa preparado al 2% por una hora y a 100 volts. Se mezclaron 5 μ L del amplicón con 2 μ L de buffer de carga. El gel se preparó con 50 mL de TAE y se le agregaron 3 μ L de intercalante Epiquik.
5.13. Cinética de crecimiento

Para llevar a cabo el experimento de qPCR, fue necesario determinar el tiempo adecuado de cultivo para la extracción de los ácidos nucleicos. Con este fin, se prepararon cultivos en líquido de LB con una concentración al 50% (es decir, la mitad de la concentración normal de NaCl, triptona y extracto de levadura con la cual se prepara el medio LB), con la intención de que, al ser un medio semi restrictivo, en cuanto se terminaran esos nutrientes buscaran otra fuente de carbono. Además de un medio con únicamente LB al 0.5X. Para la condición con plástico, se preparó un medio con BHET al 0.5%. Se colocaron 50 mL de cada medio en matraces (con tres réplicas para cada uno) y se inocularon con las cepas, en las cuales se encontró secuencias de posibles PETasas, a una densidad óptica (D.O.) a 0.1 a 600 nm. Los matraces se incubaron a 30 °C con agitación.

A las 24, 48, 72 y 96 horas se tomaron muestras para medir la D.O., mientras que paralelamente se cosecharon células de 5 mL de cultivo, de las cuales se realizaron las extracciones de ácidos nucleicos. Se analizó la curva de crecimiento y se seleccionó el tiempo en el cual aún no se llegaba a la fase de muerte.

5.14. Extracción de RNA de las cepas bacterianas

Para la extracción de ácidos nucleicos, las células colectadas en el punto anterior fueron lavadas tres veces con sulfato de magnesio (MgSO₄), una solución sin nutrientes que se utiliza normalmente para eliminar el medio de cultivo de las células, además de que contiene una concentración de sales adecuada para mantener la presión osmótica de las bacterias. La centrifugación fue a 4 °C por tres minutos y a una velocidad de 8k rpm. Se vació el sobrenadante y se conservó la pastilla generada. En este momento se pueden guardar los tubos a -80 °C para su posterior uso.

Las pastillas se resuspendieron en 100 μ l de agua DEPC y se homogeneizaron por medio de agitación. Posteriormente se agregaron 200 μ l de trizol. Se homogeniza por inversión y se incuba a temperatura ambiente por cinco minutos.

Se agregaron 40 µL de cloroformo, de nuevo se homogenizaron por inversión y se incubaron por cinco minutos en hielo. Se homogenizó por agitación y se centrifugaron a 4 °C por ocho minutos

a 8k rpm. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a tubos Eppendorf nuevos. Las muestras se precipitaron con isopropanol y se colocaron a -80 °C durante 24 horas.

Los tubos se centrifugaron a 4 °C durante 30 minutos y a 8,000 rpm. Se decantaron los tubos cuidadosamente y se colocó 1 mL de etanol absoluto. Los tubos se centrifugaron nuevamente por 5 minutos a -5 °C y a 8,000 rpm. Se realizaron dos lavados con etanol absoluto. Se decantaron los tubos y se dejaron secar. Las muestras se resuspendieron en 24 µL de agua DEPC. Finalmente se midió la concentración de ácidos nucleicos por medio de Nanodrop a la longitud de onda estándar para ácidos nucleicos (260 nm).

5.15. RT-PCR

Se ajustó la concentración de ácidos nucleicos a 1ng por microlitro y se dio un tratamiento con la enzima DNase I (RNase-Free) de Thermo Scientific, dejando la reacción por una hora a 37°C e inactivando por diez minutos a 75 °C. Se realizó un PCR con los parámetros de las tablas suplementarias 6 y 7. Se hizo migrar el resultado en un gel de agarosa al 1.3% para comprobar la degradación del DNA y se cuantificó el RNA en un Nanodrop. Se ajustó la cantidad de RNA a 500 ng por microlitro y se realizó un RT-PCR con el kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis de Thermo Scientific, siguiendo las indicaciones del producto, con un mix de los oligonucleótidos (descritos en los resultados) reversos. Se realizó un PCR de punto final con el cDNA para confirmar la presencia de los genes. Las condiciones fueron las mismas que en la de PCR de punto final anterior.

5.16. PCR cuantitativa (qPCR)

Con el cDNA extraído, se procedió a preparar el máster mix (Tabla suplementaria 6) para las reacciones de PCR cuantitativa, un mix independiente para el gen de la PETasa y otro para el gen normalizador (rpoD). El gen normalizador debe ser un gen que se exprese constitutivamente y su expresión sea constante en ambas condiciones, debido a esto se realizó una revisión bibliográfica para buscar genes normalizadores adecuados para los taxones en los cuales se encontraron

secuencias de posibles PETasas. También se agregaron 10 μ L del reactivo SYBRgreen de Thermofisher.

Los experimentos se colocaron en una placa de 96 pozos (con tres réplicas por cada condición) y se utilizó el equipo LightCycler 96 de ROCHE. Se colocaron 20 μ L de reacción en cada pozo, con un control negativo para cada gen. Considerando que se tienen tres réplicas biológicas y tres técnicas, en cada placa únicamente se colocó una cepa y un tiempo de colecta, con ambos genes. Los pasos del qPCR, sus ciclos, temperatura y tiempo se describen en la Tabla 2.

 Pasos	Ciclos	Temperatura °C	Tiempo (segundos)
Preincubación	1	95	600
Amplificación	40	95	30
		60	60
Melting	1	95	5
		65	60
		97	1
Enfriamiento	1	37	30

Tabla 2. Esquema de los pasos realizados en el equipo Lightcycler para llevar a cabo la qPCR, detallando sus ciclos, temperaturas y tiempos.

Se exportaron los resultados con el software del equipo y se promedió el resultado de las réplicas técnicas de cada experimento. A continuación, se calculó el Δ CT y el $\Delta\Delta$ CT de cada réplica biológica ya la desviación estándar entre ellas, graficando los resultados en un box plot con Rstudio.

Se usó la condición de LB como base (con valor de 1) ya la expresión de los otros medios se representó con un valor relativo al LB. Finalmente, se calculó si la expresión era estadísticamente significativa aplicando la prueba *t* de Student.

El cálculo se realizó de la siguiente manera:

1. Se promediaron las réplicas técnicas de los resultados obtenidos con ambos genes:

$$CT_{\text{promedio PETasa}} = \frac{\sum CT_{\text{técnicas PETasa}}}{3}$$

$$CT_{\text{promedio rpoD}} = \frac{\sum CT_{\text{técnicas rpoD}}}{3}$$

2. Se calculó el Δ CT de cada réplica biológica.

$$\Delta CT = CT_{\text{promedio PETasa}} - CT_{\text{promedio rpoD}}$$

3. Se calculó el $\Delta\Delta$ CT de cada réplica biológica.

$$\Delta \Delta CT = \Delta CT_{\rm BHET} - \Delta CT_{\rm LB \ a \ 0.5X}$$

4. Se calculó la expresión relativa de cada réplica biológica.

Expressión Relativa =
$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

5. Se calculó la desviación estándar para las tres réplicas biológicas.

$$SD_{\Delta\Delta CT} = \sqrt{\frac{\left(\Delta\Delta CT_1 - \overline{\Delta\Delta CT}\right)^2 + \left(\Delta\Delta CT_2 - \overline{\Delta\Delta CT}\right)^2 + \left(\Delta\Delta CT_3 - \overline{\Delta\Delta CT}\right)^2}{3 - 1}}$$

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Análisis de los genomas del LBM

Primero se revisó la completitud y la contaminación de los genomas secuenciados en la colección de cepas del LBM con CheckM (Parks *et al.*, 2015). Para la primera, el programa busca los linajes de cada uno y posteriormente se asegura de que posean un set de genes base. Para la contaminación busca genes de copia única, asegurándose de que no posea más de una de estas. Los resultados mostraron una completitud promedio de 99.7%, lo que asegura que la búsqueda de genes permitirá identificar la mayoría de ellos, con un riesgo mínimo de genes ausentes en los genomas. También se determinó que la contaminación promedio fue de 0.81%, lo que indica que casi todos los genes presentes pertenecen a los genomas secuenciados. La mayor representación se encuentra en la clase *Gammaproteobacteria* y el género más reportado fue *Pseudomonas* (Figura 9).



Figura 9. Gráfico Sankey en donde se observan los aislados del LBM de acuerdo con su taxonomía.

6.2. Abundancias taxonómicas encontradas en las bases de datos descargadas

Una vez que se preparó el repositorio de la colección de cepas del LBM, se buscó tener genomas derivados de metagenomas con los cuales se pudiera realizar la búsqueda de posibles PETasas. Para esto se descargaron las secuencias de aminoácidos de bases de datos curadas para suelos, océanos y microbioma humano. Se obtuvieron 873 secuencias de la base de datos de suelos, 1,269 de la base de datos de océanos y 1,526 de la base de datos del microbioma. Para conocer la diversidad, se asoció cada identificador GCA con su clase taxonómica. Esto nos permitió saber la distribución de clases en cada base de datos, y determinar si había alguna parcialidad hacia las posibles PETasas identificadas (Figura 10).

En el suelo, los *Alfaproteobacteria* figuran entre los linajes más ubicuos y abundantes, tanto en estudios con cultivos como en análisis metagenómicos, en donde cumplen funciones relacionadas a la fijación de nitrógeno y al metabolismo del metano (Zhang y Xu, 2008). En los ecosistemas marinos son la clase más abundante, representando cerca del 40% de la diversidad (Wang *et al.*, 2012). Bacterias pertenecientes a esta clase suelen ser encontradas en la superficie de polietileno proveniente de debris marino (Du *et al.*, 2022).

Las *Betaproteobacteria* son comunes en suelos y suelen tener funciones ecológicas relacionadas a la nitrificación (Zhang y Xu, 2008). En ambientes marinos no son tan comunes y principalmente se encuentran en cuerpos de agua dulce (Wang *et al.*, 2012). En el contexto de plásticos, *Piscinibacter sakaiensis* y especies del género *Comamonas* (ambas pertenecientes a las *Betaproteobacterias*) destacan por su capacidad de metabolizar PET y TPA (Sasoh, *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2016).

Las *Gammaproteobacteria* están altamente representadas en todos los ecosistemas analizados. En suelos se encuentran en abundancias altas y son conocidas por poder metabolizar una gran diversidad de compuestos a base de carbono (Zhang y Xu, 2008). En los océanos son de los grupos más diversos y abundantes (Wang *et al.*, 2012). Géneros pertenecientes a esta clase, como *Alcanivorax* y *Pseudomonas*, han sido estudiados debido a su potencial para degradar PET (Liu *et al.*, 2024).

Las *Bacilli* son bacterias formadoras de esporas que se encuentran reportadas dentro del 25-75% de los microbiomas de suelo (Zhang y Xu, 2008). Al ser bacterias principalmente saprofitas, su

presencia en los océanos es relativamente baja (Wang *et al.*, 2012). El género *Bacillus* ha sido aislado de plastísferas y enriquecido con plásticos como única fuente de carbono (Du *et al.*, 2022) Las *Actinomycetota* son abundantes en suelos, en donde suelen ser recuperados principalmente en aislados y en menos abundancia en estudios metagenómicos (Zhang y Xu, 2008). Al igual que las *Bacilli*, tienen una baja ocurrencia en mares, ya que estas bacterias prefieren condiciones eutróficas (Wang *et al.*, 2012). Guo *et al.*, 2023 encontraron una cepa de *Rhodococcus* que posee una esterasa anclada a su membrana exterior que es capaz de degradar PET.

En los microbiomas, se observan las mismas clases que son reportadas en la literatura como las más abundantes, ya que estas contienen los géneros más comunes en los microbiomas humanos *Streptococcus (Bacilli), Actinomyces (Actinomicetes)* y *Prevotella (Bacteroidota)* (Zheng *et al.,* 2014) (Figura 10). Debido a la revisión bibliográfica realizada, existe un gran potencial en la degradación de plástico dentro de estas clases. Más específicamente, *Actinomycetota, Beta-* y *Gammaproteobacteria* son las clases con reportes asociados a la degradación de PET.



Figura 10. Abundancia relativa de las clases bacterianas en las bases de datos consultadas.

6.3. Diversidad de secuencias en el alineamiento creado a partir de PSI-BLAST

El alineamiento con el que se alimentó la matriz está compuesto por 100 géneros (Tabla suplementaria 2), lo cual potencialmente le permitirá al modelo MEME encontrar posibles PETasas en diferentes taxones. Existe una alta abundancia de algunos géneros (Tabla 3), lo cual puede causar un sesgo, ya que al buscar secuencias homólogas con una matriz generada mayormente por ciertos taxones es posible que se obtenga un mayor score en las secuencias filogenéticamente cercanas a estos.

Tabla 3. Los diez géneros más representados, de acuerdo con su abundancia absoluta, en la búsqueda de IsPETasas por medio de PSI-Blast.

Género	Abundancia
Streptomyces	68
Halopseudomonas	26
Micromonospora	24
Actinoplanes	23
Pseudomonas	21

6.4. Motivos construidos por MEME y búsqueda en MAST

Se encontraron los 10 motivos solicitados a MEME. Pese a que el porcentaje de identidad entre las proteínas es relativamente bajo (30%), todos los motivos tuvieron el mismo arreglo a través del alineamiento múltiple.

Considerando que las enzimas registradas en PAZY están simplemente clasificadas como carboxilesterasas, sus motivos son bastante similares a los construidos usando la PETasa de *Piscinibacter sakaiensis*, lo que muestra una baja diversidad dentro de este conjunto de proteínas. Al correr MAST en estas, 43 de ellas mostraron motivos similares a las posibles PETasas y 23 mostraron una estructura distinta. Se decidió no trabajar con estas secuencias debido a que, a pesar de degradar PET, pertenecen a otras familias y poseen una estructura distinta (Han *et al.* 2017; Buchholz *et al.*, 2022) a la de las enzimas que se buscaron en este trabajo.

Basándonos en el trabajo de Joo *et al.*, 2018 y Pérez-García *et al.*, 2021 se asignaron descripciones funcionales y/o estructurales a los diez motivos generados, como se puede observar en la Tabla 4.

Tabla 4. Los diez motivos obtenidos del modelo MEME y su descripción funcional (negritas) y/o estructural. El término "parcial" significa que el motivo no cubrió la totalidad de la estructura secundaria descrita.

#	Motivo	Descripción
1		Puente disulfuro 1
	MTTLAKYSVSVLKKFULNUTK EQTLUZ	Alfa hélice 6 (parcial)
	<u>ॱ╚⋵⋵⋩ଡ଼⋛⋎⋵⋧⋾⋎╢⋒⋎⋶⋧⋳⋷⋧⋎⋳⋕</u> ⋕⋦⋓⋎⋎ <u></u>	Alfa hélice 7
2		Pinza hidrofóbica
	NS UTA ON A TABLE A CONTRACT	Agujero oxianión
		Beta plegada 3 (parcial)
		Alfa hélice 2 (parcial)
3		Serina catalítica
		Agujero oxianión
	មកកកកកិច្ធិ ខេត្ត ដែល ដែល ដែល ដែល ដែល ដែល ដែល នៅ ដែល	Beta plegada 5
		Alfa hélice 4
4	Hotor Dol clo At Allovia e	Alfa hélice 2
	I LIN KATAN BUNARALAN KATAR	Beta plegada 4
		Alfa hélice 3 (parcial)
5		Aspartato de triada catalítica
		Puente disulfuro 2
		Beta plegada 7
_		Alfa hélice 5
6		Alfa hélice 1
7		Pinza hidrofóbica
		Beta plegada 6
8		Histidina de triada catalítica
	MALLINGAS ERAN	Puente disulfuro 2
		Beta plegada 8
9		Beta plegada 2
		Beta plegada 3 (parcial)
10		Puente disulfuro 1
		Beta plegada 9

6.5. Búsqueda de PETasas en bases de datos marinas y de suelos

Se encontró una distribución relativamente baja en los conjuntos de genomas seleccionados. Se encontraron 51 posibles PETasas en los genomas marinos y 35 en los terrestres. No se encontraron posibles PETasas en los genomas del microbioma humano (Tabla suplementaria 3), lo que confirma su utilidad como control negativo para la búsqueda de estas enzimas (Tabla 5). Sin embargo, en los genomas del LBM, se encontraron cinco posibles PETasas en 48 genomas. Considerando que dos de ellas se encontraron en la misma cepa, se encontraron posibles PETasas en el 8.3% de los genomas. También se encontraron dos posibles PETasas en uno de los metagenomas del LBM.

Tanto en este trabajo como en el de Danso *et al.*, 2018 se encontró una mayor cantidad de PETasas en metagenomas obtenidos de sitios contaminados por hidrocarburos. No existe una relación directa entre las moléculas de los hidrocarburos, que presentan enlaces carbono-carbono y el PET que tiene enlaces de tipo éster, por lo que puede deberse a una coincidencia o a un factor aún no contemplado.

Tabla 5. PETasas encontradas en las bases de datos curadas con microbioma marino, de suelos y humano, además del repositorio de cepas del Laboratorio de Biotecnología Marina. La tabla indica la cantidad de genomas recuperados y las posibles PETasas encontradas en cada uno, además del cálculo de porcentaje de PETasas encontradas por número de genómas. MG: Metagenomas.

Base de datos	Genomas recuperados	Posibles PETasas	%
MarRef	1,269	51	4.0
RefSoil	873	35	4.0
NIH-HMP	1526	0	0
LBM	48	5 (+ 2 de MG)	10.4

Se encontraron ciertos géneros exclusivos para cada ecosistema (Figura 9), mostrando que las posibles PETasas de *Pseudomonas*, como las de este trabajo, únicamente se encontraron en ecosistemas marinos. De igual forma que al realizar el PSI-BLAST, el género *Streptomyces* fue el más representado. Esto también ocurrió en el trabajo de Danso *et al.*, 2018, en el que su matriz se construyó con secuencias pertenecientes a *Actinomycetes* y fue de los que más detectó. Este sesgo metodológico es derivado de la diversidad disponible en las bases de datos respecto a las PETasas.

6.6. Clasificación de las posibles PETasas

Una vez que se obtuvieron las secuencias con sus respectivos metadatos (origen y género) se revisó que tuvieran la triada catalítica y las pinzas aromáticas equivalentes a la IsPETasa (Tabla 6). En este caso, todas las secuencias presentaron estas características, con variaciones de aminoácidos aromáticos en los sitios 87 y 185. Como todas las secuencias pasaron el filtro, estas se clasificaron de acuerdo con los tipos de PETasas definidas por Joo *et al.*, 2018.

Sitio	Aminoácido	Función
87	Y	Pinza aromática
160	S	Serina catalítica
161	Μ	Agujero oxianión
185	W	Pinza aromática
203	С	Puente disulfuro 2
206	D	Aspartato catalítico
237	Н	Histidina catalítica
238	S	Cambio en el subsitio 2
239	С	Puente disulfuro 2
273	С	Puente disulfuro 1
289	С	Puente disulfuro 1

Tabla 6. Los 11 sitios de interés encontrados en la PETasa de P. sakaiensis y su función.

Las secuencias de posibles PETasas se clasificaron en los tipos I y IIa, además de un tercer grupo que no fue clasificado debido a que no presentaba patrones considerados en el sistema. No se encontraron secuencias correspondientes al tipo IIb, lo que se puede deber a que estas se han encontrado únicamente en organismos pertenecientes a las clases *Betaproteobacteria* y *Polyangium* (Joo *et al.* 2018), grupos pobremente representados en las bases de datos en donde se realizó la búsqueda (Figuras 9 y 10).

Una de las posibles PETasas de los metagenomas del LBM quedó como no clasificada debido a que la secuencia está truncada antes de los sitios 10 y 11, por lo cual no se puede asegurar a qué clasificación pertenece. Se revisaron los sitios de interés en el resto de las secuencias no clasificadas, las cuales sí se encontraron completas.

Las características que no permitieron su clasificación fueron debido a secuencias que, por ejemplo, poseen una serina en el sitio 238 (característica exclusiva de las PETasas tipo IIb) sin tener ambos o ningún puente disulfuro (Tabla 7). Otro dato que cabe resaltar es que las únicas posibles PETasas que no tienen puentes disulfuro, son todas marinas (Tabla 7). Esto podría deberse a que, en condiciones de alta salinidad, como las marinas, las PETasas mantengan su cohesión sin necesidad de puente disulfuro y en lugar de estos cuenten con puentes salinos que cumplan esa función. Esta idea se encuentra sustentada en un trabajo que demostró el aumento de la termoestabilidad de una PETasa al mutar residuos para generar puentes salinos (Qu *et al.*, 2023) y en otro trabajo en el cual se encontró una PETasa marina que cuenta con una red de puentes salinos (Qi *et al.*, 2023).

Considerando la existencia de PETasas ya caracterizadas que no poseen puentes disulfuro (Qi *et al.* 2023; Chen *et al.* 2024) es necesario realizar una revisión a la clasificación de las PETasas. Además, en caso de que las secuencias, obtenidas en este trabajo, no clasificables resulten tener actividad PETasa, también deberían de ser consideradas para esta reclasificación.

ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Origen
LBM_MG_SRR11308318	Y	S	L	Y	S	D	Н	М	L	-	-	LBM
GCA_003443675.1_AXT51849.1	F	S	М	W	G	D	Н	S	V	Ν	С	Marref
GCA_014171595.1_QNA98832.1	F	S	М	W	G	D	Н	Ν	F	K	G	Marref
GCA_014171775.1_QNA87929.1	F	S	М	W	G	D	Н	Ν	F	K	G	Marref
GCA_003351365.1_AXH88621.1	F	S	М	W	А	D	Н	S	А	С	С	Marref
GCA_009707425.1_QGN48084.1	F	S	М	А	G	D	Н	С	G	W	R	Marref
GCA_001444425.1_ALO45417.1	F	S	М	W	G	D	Н	F	Ι	Y	Ν	Marref
GCA_000153485.2_AFU69884.1	F	S	М	W	G	D	Н	S	V	Т	С	Marref
GCA_002196515.1_ASA58222.1	F	S	М	Н	G	D	Н	F	А	Q	D	Marref
GCA_000284295.1_BAL88670.1	F	S	М	W	А	D	Н	S	А	С	С	RefSoil
GCA_000494755.1_AGZ42239.1	Y	S	М	Y	А	D	Н	S	А	С	С	RefSoil
GCA_000282715.1_AFO77175.1	Y	S	М	F	G	D	Н	S	F	С	С	RefSoil
GCA_000177655.2_ADU08876.1	F	S	М	W	А	D	Н	S	А	С	С	RefSoil

Tabla 7. Los 11 sitios importantes de las PETasas que no entraron en una de las clasificaciones existentes.

6.7. Distribución taxonómica de las posibles PETasas

Una vez clasificadas las secuencias, se correlacionaron de acuerdo a su tipo de PETasas, base de datos y clase taxonómica. El análisis de correlación se realizó con la prueba de chi-cuadrada, con el fin de evaluar la independencia entre las variables y las frecuencias.

El análisis estadístico realizado mediante la prueba de chi-cuadrada permitió evaluar la independencia entre las variables y revelar los patrones de distribución en las secuencias. En la comparación entre los tipos de PETasas y las bases de datos, se obtuvo un valor de chi-cuadrada de 4.9 con un *p*-value de 0.086. Este resultado indica que, estadísticamente, no se encontró una diferencia significativa en la distribución de los tipos enzimáticos entre los distintos ecosistemas. Sería interesante buscar en bases de datos más grandes la presencia de PETasas "Tipo IIb", con el fin de encontrar si estas explican mejor la distribución en los ecosistemas. Al comparar la base de datos con las clases taxonómicas se encontró una diferencia significativa, por un chi-cuadrado de 17.7 y un *p*-value de 0.007. Esto señala que existe una asociación considerable entre el ecosistema y la composición taxonómica. Por ejemplo, las muestras de suelo principalmente se componen por

Actinomycetes, mientras que las muestras marinas presentan una mayor diversidad en cuanto a grupos taxonómicos. La relación más significativa se observó en la comparación entre los tipos de PETasas y la clase taxonómica, donde el valor del chi-cuadrado fue de 86.8 y el *p*-value prácticamente fue de cero (*p*-value = 0.000). Estos resultados sugieren una fuerte asociación entre el tipo de PETasa y el grupo taxonómico, ya que se observa claramente que las PETasas tipo I se encuentran en *Actinomycetes* y las tipo IIa en las *Gammaproteobacteria*.

En conjunto, estos análisis indican que, aunque la distribución de los tipos de PETasas no varía significativamente según la base de datos de origen, sí se observan diferencias significativas en la composición taxonómica en función del origen, así como una robusta relación entre el tipo enzimático y la clase a la que pertenece. Estos hallazgos aportan evidencia de que los factores ambientales y taxonómicos están estrechamente vinculados a la diversidad funcional de las PETasas.

Más específicamente se realizó una búsqueda de qué géneros eran los que estaban presentes en los diferentes ecosistemas (Figura sumplementaria 1) y si estos tenían distintos tipos de PETasas (Figura suplementaria 2). Se encontró que los géneros: *Streptomyces, Micromonospora, Amycolatopsis* y *Nocardiopsis* fueron encontrados en la base de datos tanto de ecosistemas marinos como de suelos. Los géneros: *Streptomyces, Micromonospora, Actinoplanes, Amycolatopsis* y *Vibrio* tienen más de un solo tipo de PETasa. Esto se debe a que dentro de los genomas de ciertas cepas se encuentra más de una sola copia de PETasa, como el caso de *Vibrio gazogenes* ATCC 43942, la cual posee dos secuencias (una en cada cromosoma) que pertenecen a distintos tipos (ASA57064 y ASA58222). Además, estas proteínas, como se muestra más adelante, se encuentra filogenéticamente lejanas (Figura 12), lo cual puede indicar la ocurrencia de eventos de transcisión horizontal de genes o que la divergencia de estos genes se deba a una duplicación.

La ausencia completa de PETasas en el microbioma humano refuerza la especificidad ambiental y funcional de estas enzimas, tanto de las PETasas, como de la familia de las cutinasas. Adicionalmente, la presencia de PETasas no clasificadas plantea la posibilidad de nuevas clasificaciones o funcionalidades no reconocidas en la literatura actual, algo que futuros estudios podrían abordar experimentalmente.



Figura 11. Gráficos de mosaico que muestran la correlación entre las secuencias de las posibles PETasas encontradas y tres distinas variables: A. Clases contra tipo de PETasas. B. Clases contra base de datos. C. Tipo de PETasas contra base de datos. El tamaño de ambos ejes representa las abuncandias.

Para revisar cómo se relacionan las secuencias de estas posibles PETasas a nivel evolutivo, se realizó un árbol filogenético de máxima verosimilitud. Para esto, se realizó la búsqueda del mejor modelo de substitución, el cual resultó ser WAG+F+R6. El modelo WAG consta de una matriz de substitución empírica de aminoácidos desarrollado por Whelan y Goldman 2001, a partir de 182 familias de proteínas globulares. La función "+F" indica que las frecuencias de los aminoácidos no se toman de la matriz WAG original, sino que se calculan a partir de los datos específicos de la alineación utilizada. Por último, la función "+R6" asume que los sitios de la secuencia evolucionan a seis diferentes velocidades.

En el árbol se puede identificar que los *Actinomycetes* contienen a la mayoría de las secuencias de PETasas, y que en esta clase no importó si las secuencias provenían del suelo o de ambientes marinos. Se puede observar en la Figura 11 como las secuencias de posibles PETasas tipo I se encuentran distribuidas casi exclusivamente en la clase *Actinomycetes*, con excepciones encontradas por las ocurrencias individuales de taxones pertenecientes a las clases; *Nitriliruptoria*, *Deinococci* y *Acidimicrobiia*.

Las secuencias clasificadas como de tipo II forman otro clado, en el que se encuentran las posibles PETasas pertenecientes a las clases *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Flavobacteriia* y *Actinomycetes*. Se puede observar que las secuencias clasificadas como tipo IIa se encuentran principalmente en *Gammaproteobacteria* y las del tipo IIb en las *Betaproteobacteria*. Se puede hipotetizar que las secuencias del tipo I, que pertenecen a la clase *Actinomycetes*, al tener secuencias parecidas a las cutinasas, son más ancestrales y las que son más eficientes y específicas son parecidas a las que se distribuyen en las *beta-* y *gammaproteobacteria*.

Las secuencias "no clasificadas" podrían distribuirse adecuadamente en caso de que se revise la clasificación y sea menos restrictiva. Para poder considerar esto, estas proteínas deberían de sintetizarse y expresarse, para comprobar su función como PETasa. Si no se comprueba su función, está reclasificación está limitada a permanecer como hipótesis.



Figura 12. Árbol filogenético encontrado por búsqueda de máxima verosimilitud. En el exterior se observa el tipo de PETasas que contiene cada taxón terminal. En el círculo interior se señala de dónde se origina la secuencia. Los colores en cada rama representan la clase taxonómica a la cual pertenecen. Seguido del identificador de ensamblado se encuentra el ID de la proteína.

6.8. Posibles PETasas encontradas en el repositorio del LBM

La búsqueda contra los genomas del LBM logró identificar cinco diferentes posibles PETasas con un E-value menor a 10⁻⁹⁰ (dos de ellas en el genoma de *Pseudomonas* sp. 119) y la misma conformación de motivos que las secuencias de referencia. Todos los hits fueron en cepas de la familia *Pseudomonadaceae*, habiendo una *Halopseudomonas* (cepa GOM5), una *Stutzerimonas* (cepa CBC2) y dos *Pseudomonas* (cepas GOM6 y 119).

Los motivos mostraron un E-value menor contra los genomas de organismos degradadores de PET $(<1E^{-100})$ que contra los genomas provenientes del microbioma humano $(>1E^{-05})$. Esto demuestra que la base de datos de microbioma humano utilizada fue un control negativo eficiente para la búsqueda de homólogos de la IsPETasa. Lo cual es esperado debido a que esta enzima posiblemente evolucionó recientemente a partir de cutinasas (Joho *et al.*, 2022). Aunque no se hayan encontrado estas enzimas en la base de datos empleada, ya se ha reportado la presencia de homólogos de la IsPETasa en un metagenoma obtenido a partir de saliva humana (White & Wallace, 2023).

Las posibles PETasas encontradas en el repositorio de cepas del LBM tienen un porcentaje de identidad mayor al 50% entre ellas y entre la IsPETasa (Tabla 8). También son parecidas en su estructura primaria a la IsPETasa (Figura 13). En estas, el aminoácido equivalente al de la serina 238 de la IsPETasa es aromático (fenilalanina o tirosina). Esto las clasificaría en PETasas de tipo IIa, las cuales están reportadas como menos eficientes para degradar PET por la presencia de estos aminoácidos que, por su anillo aromático, dificultan la entrada del polímero de PET en la hendidura donde se lleva a cabo la hidrólisis (Joo *et al.* 2018). Al tener un aminoácido aromático, el ancho de la hendidura cambia de 8.46 a 2.98 Å, haciéndola más parecida a la encontrada en las cutinasas (Austin *et al.*, 2018).

Tabla 8. Matriz de identidad pareada entre las posibles PETasas encontradas en el repositorio del LBM y la IsPETasa. Los colores indican el porcentaje de identidad relativo (rojo < verde). Los valores se calcularon después de eliminar secuencia de la péptido señal.

Сера	IsPET	119A	119B	GOM5	GOM6	CBC2
IsPET		0.53	0.52	0.51	0.53	0.52
Pseudomonas sp. 119A	0.53		0.94	0.56	1	0.81
Pseudomonas sp. 119B	0.52	0.94		0.55	0.94	0.81
Halopseudomonas aestusnigiri GOM5	0.51	0.56	0.55		0.56	0.53
Pseudomonas sp. GOM6	0.53	1	0.94	0.56		0.81
Stutzerimonas stutzeri CBC2	0.52	0.81	0.81	0.53	0.81	

Austin *et al.*, 2018 realizaron la doble mutante S238F/W159H, con el fin de hacer la hendidura más angosta, como una cutinasa. Lo que resultó interesante fue que esta doble mutante tuvo una mayor generación de productos de degradación que la IsPETasa WT. Esto indica que aún hace falta investigar la estructura de estas enzimas para descubrir su potencial completo por medio de ingeniería genética.

Cabe recalcar que las posibles PETasas encontradas en el laboratorio poseen en la posición 215 una histidina, en lugar de la comúnmente observada serina, lo que también aumenta la eficiencia de la enzima contra el PET (Liu *et al.* 2018).



Figura 13. Alineamiento de las cinco posibles PETasas encontradas en el LBM con la IsPETasa. Se marcan ambos puentes disulfuro, sus pinzas aromáticas, triada catalítica, agujero oxiainión y las mutaciones positivas y negativas que pueden afectar su actividad.

6.9. Contexto genómico de las posibles PETasas encontradas en el LBM

De las PETasas caracterizadas en PAZy, se descargaron los genomas completos de las cepas que lo tenían disponible. Se obtuvieron 28 genomas de bacterias que poseen PETasas caracterizadas. Se extrajeron y visualizaron los contextos genómicos de cada PETasa, considerando cinco genes upstream y downstream.

En la mitad de estos genomas, se identificaron dominios pertenecientes a reguladores transcripcionales tipo hélice-vuelta-hélice (HtH) (PF12833 y PF13556) adyacentes a las PETasas. Este hallazgo sugiere una posible regulación transcripcional de estas enzimas por proteínas con dominios HtH, pero hasta la fecha no existe evidencia directa que asocie a estos reguladores con la regulación de PETasas.

En este sentido, varios reguladores de la familia AraC/HtH han sido estudiados en la regulación de operones responsables de la degradación de compuestos complejos, incluidos carbohidratos y xenobióticos, como los hidrocarburos aromáticos y contaminantes ambientales (Kotoky *et al.*, 2022). Estos reguladores, en su mayoría activadores, respondiendo a la presencia de sustratos específicos que generan cambios conformacionales en su estructura, modulando así la expresión de los genes diana (Gallegos *et al.*, 1997). Además, estos genes suelen regular la expresión de genes que se encuentran en direcciones opuestas (Wilcox *et al.*, 1974), como en los casos observados en las figuras 14 y 15.

Dado que el PET (tereftalato de polietileno) es un polímero sintético derivado de compuestos aromáticos, no sería sorprendente que algunos reguladores HtH, como los de la familia AraC/XylS, participen en la regulación de PETasas, especialmente en microorganismos adaptados a ambientes contaminados con xenobióticos como lo son los plásticos.

Este hallazgo sugiere la posible relación entre reguladores HtH y la expresión de PETasas. Se requieren estudios experimentales adicionales para determinar si estos reguladores participan en la activación o represión de las PETasas y, en caso afirmativo, identificar los posibles sustratos inductores que podrían modular su actividad.

La cepa del LBM *Halopseudomonas aestusnigiri* GOM5 también tiene un contexto genómico idéntico al de la PETasa caracterizada de *Halopseudomonas aestusnigiri* VGXO14 (Bollinger *et al.*, 2020). Por otra parte, a diferencia de la mayoría de las cepas analizadas, estas presentan una

histidina cinasa (PF02518 y PF00512) seguida de un factor regulador de dos componentes adyacente a la PETasa (Figura 15).

Las histidinas cinasas forman parte de los sistemas de señalización de dos componentes, los cuales permiten a las bacterias detectar y responder a estímulos ambientales mediante la activación de reguladores de respuesta que modulan la expresión génica (Buschiazzo *et al.*, 2019). En este caso, la proximidad de este sistema al gen de la PETasa sugiere un posible mecanismo de regulación ambiental de la expresión de la PETasa, en respuesta a señales específicas.

Por otro lado, solo el 46.4% de las PETasas pudieron ser anotadas utilizando las matrices de las bases de datos de Pfam (Tabla 9). Para complementar la búsqueda, se emplearon las matrices de SUPERFAMILY, lo que permitió detectar dominios en un total del 82.1% de las PETasas. Sin embargo, el 17.9% de las PETasas permanecieron sin anotación.

La búsqueda en la base de datos InterPro reveló que las secuencias utilizadas para construir la matriz de Pfam del dominio de la familia de las dienolactona hidrolasas (PF01738) son altamente divergentes con respecto a las PETasas, lo que las hace inadecuadas para detectar el dominio funcional de estas enzimas. Por esta razón, métodos como BLASTp o MEME-MAST resultan más específicos para la identificación de PETasas. Alternativamente, sería recomendable desarrollar matrices nuevas diseñadas específicamente para estas enzimas.

Pfam	Frecuencia	Nombre
PF01738	46.4	Dienelactone hydrolase family
SSF53474	35.7	alpha/beta-Hydrolases
PF12833	32.1	Helix-turn-helix domain
PF03547	21.4	Membrane transport protein
PF02518	21.4	Histidine kinase
PF00005	21.4	ABC transporter
PF03280	17.8	Proteobacterial lipase chaperone protein
PF13556	14.2	PucR C-terminal helix-turn-helix domain
PF08240	14.2	Alcohol dehydrogenase
PF07992	14.2	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase
PF00512	14.2	His Kinase A
PF00107	14.2	Zinc-binding dehydrogenase
PF00072	14.2	Response regulator receiver domain

Tabla 9. Clave de acceso de Pfam, frecuencia y nombre de los Pfams más encontrados cinco genes Upsteam y cinco genes Downstream en cepas con PETasas caracterizadas y genoma secuenciado.



Figura 14. Contexto genómico de las posibles PETasas encontradas en el LBM. Las flechas indican su dirección de transcripción. En color rojo se encuentran las posibles PETasas. En azul los reguladores tipo hélice-vuelta-hélice. En verde el sistema regulador de dos componentes. En morado la histidina histidina quinasa. Gráfico realizado con el paquete GenoplotR (Guy *et al.*, 2010).



Figura 15. Contexto genómico de cepas con actividad PETasa confirmada. Las flechas indican su dirección de transcripción. En color rojo se encuentran las PETasas. En azul los reguladores tipo hélice-vuelta-hélice. Gráfico realizado con el paquete GenoplotR (Guy *et al.*, 2010).

6.10. Búsqueda de péptido señal en las secuencias encontradas

La búsqueda de péptidos señales (PS) mostró que todas las posibles PETasas contienen el mismo tipo de péptido que la IsPETasa (Tabla 10), cuya secuencia se usó como control. El péptido señal tipo Sec/SPI se encuentra en proteínas secretadas desde la membrana citoplasmática y es el PS general en las bacterias, por lo que está presente en la mayoría de las proteínas (Dalbey *et al.*, 2012).

La presencia de secuencias PS en todas las posibles PETasas encontradas es otro indicio de la funcionalidad de estas enzimas, las cuales deben de estar especializadas para ser exportadas al medio en el que se encuentre el PET y donde ejerzan su actividad hidrolítica. Esto es debido a que, por la masa molecular de este polímero, tiene que ser previamente hidrolizado en sus monómeros para entrar a la célula.

Tabla 10. Resumen de los resultados del análisis de SignalP de las posibles PETasas identificadas en el LBM y la IsPETasa. La columna "PS (Sec/SPI)" indica la probabilidad de que el péptido señal (PS) dirija la proteína a la ruta de secreción Sec con un tipo de corte SPI. La columna "Posición de corte del PS y probabilidad" muestra la posición estimada del sitio de corte (CS pos) junto con la probabilidad asociada a esta predicción, lo que refleja la confianza en la ubicación del sitio de corte señalada por SignalP.

Сера	PS (Sec/SPI)	Posición de corte del PS y probabilidad
IsPETase	0.99	CS pos: 27-28. Pr: 0.968
119_EGEIHL_14115_ Petase	0.99	CS pos: 23-24. Pr: 0.962
119_EGEIHL_14120_ Petase	0.99	CS pos: 25-26. Pr: 0.977
CDC2_GHPFKI_01665_ Petase	0.99	CS pos: 23-24. Pr: 0.971
GOM5_CFAHGH_15410_ Petase	0.99	CS pos: 25-26. Pr: 0.974
GOM6_PDLKBB_01975_ Petase	0.99	CS pos: 23-24. Pr: 0.962

6.11. Modelado tridimensional de las proteínas

El modelado realizado con tecnologías como ColabFold (Mirdita *et al.*, 2022) es una opción para aproximarse a la estructura tridimensional de las proteínas cuando métodos más precisos, como la cristalización, no están contemplados en el proyecto. En este caso, se descargó el modelo de la proteína cristalizada 6EQE (Figura 16, estructura color rojo) como referencia, ya que esta es la que contiene la secuencia canónica de la IsPETasa sin modificaciones (con excepción de la cola de histidinas). Se predijeron las estructuras y se observó la típica conformación de las *alfa-beta* hidrolasas descrita en la Figura 4.

Se compararon con la secuencia de la posible PETasa de *Pseudomonas* sp. GOM6 (Figura 16, azul), *S. stutzeri* CBC2 (Figura 16, amarilla) y *Halopseudomonas aestusnigiri* GOM5 (Figura 16, verde). Debido a la alta identidad entre las PETasas de la cepa *Pseudomonas* sp. 119 y las de *Pseudomonas* sp. GOM6 (Tabla 8), las estructuras tridimensionales resultaron redundantes, por lo que se decidió no utilizarla en este análisis. El alineamiento entre las estructuras predichas (Figura 16A). de las posibles PETasas mostró su alta homología estructural, al mostrar distancias entre los átomos (medida por la puntuación RMDS) menores a 0.6 Å, además de que más del 70% de los átomos fueron alineados (Tabla 11). La posible PETasasa de la cepa *S. stutzeri* CBC2 mostró la mejor homología estructural, por ambos parámetros (Tabla 11). La triada catalítica se mantiene estructuralmente conservada entre las cuatro estructuras, con una distancia de 2.9 Å entre la serina catalítica y la histidina y una distancia de 2.7 Å entre la histidina y el aspartato (Figura 16B).

Los aminoácidos que forman el agujero oxianión de la IsPETasa (Y87 y M161) presentan los residuos equivalentes en las cepas del LBM, adyacentes al sitio catalítico (Figura 17A). Únicamente GOM5 cuenta con una fenilalanina en lugar de la tirosina.

La pinza aromática tyr87 se observa en las tres estructuras, con excepción de la GOM5, la cual tiene una fenilalanina. Esta fenilalanina en el residuo 87 es común entre las secuencias homólogas de PETasa, ya que entre las secuencias obtenidas del psi-blast, la frecuencia de tirosina fue de 52.8%, de fenilalanina fue de 46.8% y de triptófano únicamente 0.4%.

Opuestamente, la pinza equivalente al trp185 de la IsPETasa solo se encuentra en la GOM5, mientras que en la GOM6 y CBC2 tienen tirosinas (Figura 16C), lo cual no es común en las secuencias homólogas del psi-blast (triptófano: 93.2%, tirosina: 5.6% y 1.2% otros). Estos

residuos, al ser aminoácidos aromáticos y estar en la misma posición, cerca del sitio catalítico (17B), también podrían cumplir la función. Una PETasa caracterizada que también posee una tirosina en el sitio 185 pertenece a la *Gammaproteobacteria* psicrófila *Moraxella* sp. TA144 (Blázquez-Sánchez *et al.* 2022).

Los aminoácidos equivalentes a la S238 de la IsPETasa son aminoácidos aromáticos (Figura 16D), los cuales, como reportaron Joo *et al.*, 2018, se encuentran en el sitio de entrada del polímero (Figura 17C) de PET, dificultando su desplazamiento. Finalmente, los cuatro residuos de cisteína que forman los puentes disulfuro se encuentran en los sitios equivalentes de las cuatro estructuras. El puente disulfuro que está estabilizando al sitio activo se encuentra exactamente en la misma posición, a una distancia de 2.0 Å, mientras que el puente disulfuro cercano al carboxilo terminal de las cepas del LBM se encuentran diferentes al puente equivalente del a IsPETasa e incluso tienen una distancia 0.2 Å mayor en comparación (Figura 16E).

Tabla 11. Resultados de la función "align" de PyMOL entre la estructura tridimensional predicha de las posibles PETasas del LBM y la estructura cristalizada de la IsPETasa. La puntuación RMDS indica la distancia promedio entre los átomos. En la última columna se muestra el número de átomos alineados entre cada comparación.

Сера	RMDS contra 6EQE	Átomos alineados
Pseudomonas sp. GOM6	0.531	203/265
Halopseudomonas aestusnigiri GOM5	0.519	198/265
Stutzerimonas stutzeri CBC2	0.506	206/265



Figura 16. Alineamiento de la estructura tridimensional cristalizada de la IsPETasa 6EQE (rojo) contra las estructuras predichas con Alphafold de tres posibles PETasas identificadas en este trabajo. *Pseudomonas* sp. GOM6 (azul), *Stutzerimonas stutzeri* CBC2 (amarilla) y *Halopseudomonas aestusnigiri* GOM5 (verde). A. Estructura completa. B. Triada catalítica con la distancia en Amstrongs. C. Pinzas aromáticas. D. Ser238 de la IsPETasa, aminoácido clave en la clasificación de las PETasas. E. Puentes disulfuro 1 y 2. La numeración de los aminoácidos está basada en la IsPETasa.



Figura 17. Superficie de estructura cristalizada de la IsPETasa 6EQE. La superficie color rojo indica donde se encuentran los aminoácidos de la triada catalítica y los aminoácidos equivalentes de la IsPETasa (rojos) alineados. Los aminoácidos observados pertenecen a: *Pseudomonas* sp. GOM6 (azul), *Stutzerimonas stutzeri* CBC2 (amarilla) y *Halopseudomonas aestusnigiri* GOM5 (verde). A. Agujero de oxianión. B. Pinzas aromáticas. C. Vista de la hendidura superficial en la cual la molécula de PET se desliza hacia el sitio activo y como los aminoácidos aromáticos de las cepas del LBM pueden dificultar el acceso. La numeración de los aminoácidos está basada en la IsPETasa.

6.12. Búsqueda del metabolismo de PET

La búsqueda del metabolismo completo del PET se llevó a cabo usando los dominios funcionales de la base de datos de Pfam. Para esto, se realizó la búsqueda de estos dominios en las proteínas identificadas por Yoshida *et al.*, 2016 como las responsables de la mineralización del PET (Tabla 12). Los genes responsables del metabolismo del TPA ya habían sido detectados en la cepa *Comamonas* sp. E6 (Sasoh *et al.*, 2006), perteneciente, al igual que *P. sakaiensis*, a las *betaproteobacteria*.

La MHETasa tiene un dominio similar en score al de proteínas tanasas (PF07519), las cuales son hidrolasas de estéres carboxílicos. Los transportadores de membrana contienen dominios de transportadores tripartitos de tricarboxilatos (PF01970 y PF07331), siendo la subunidad A la que más se parece a la matriz con la cual se realizó la búsqueda. La dioxigenasa de TPA es una proteína compleja, ya que está formada por tres subunidades. La subunidad A tiene una arquitectura formada por dos dominios, ambos responsables de romper anillos aromáticos (PF00355 y PF00848). Se revisó que en esta y en todas las arquitecturas los dominios no se superpusieran. La subunidad B contiene un solo dominio, SnoaL (PF13577), el cual es encontrado en proteínas involucradas en la ciclización de anillos aromáticos. Por último, la subunidad C posee tres dominios, uno de unión de grupos hierro-azúfre (PF00111), un segundo dominio de unión al co-factor NAD (PF00175) y el tercero de unión a FAD (PF00970).

La proteína DCDDH tiene un domino asociado a la síntesis de compuestos basados en el anillo de piridina (PF04166). Finalmente, las subunidades A y B de la proteína protocatecuato desoxigenasa comparten el dominio desoxigenasa (PF00775), pero la subunidad B también tiene un dominio asociado a la subunidad beta de las protocatecuato desoxigenasas (PF12391).

No se profundizó más en los mecanismos de acción de estas enzimas debido a que únicamente se quería conocer si las cepas del LBM tenían el potencial para usar TPA como fuente de carbono, por lo que a continuación se realizó la búsqueda de estos dominios en las secuencias de aminoácidos de estas.

Tabla 12. Proteínas involucradas en el metabolismo completo del MHET y el TPA reportadas
por Yoshida et al., 2016 en P. sakaiensis, sus arquitecturas de dominios y los vales de E-value y
sequence score de hmmer con que se anotaron.

Proteína	Dominios Pfam	E-Value	Score
Mhataaa	PF07519	8.90E-126	409.8
Minetase	Tannase and feruloyl esterase		
	PF01970	3.20E-160	522.6
111-A	Tripartite tricarboxylate transporter TctA family		
ттт р	PF07331	6.90E-26	80.5
111-D	Tripartite tricarboxylate transporter TctB family		
	PF00355	1.50E-22	68.9
	Rieske [2Fe-2S] domain		
IPADO-A	PF00848	2.30E-16	49.6
	Ring hydroxylating alpha subunit (catalytic domain)		
	PF13577	3.10E-17	52.2
ТРАDO-В	SnoaL-like domain		
	PF00111	1.40E-16	49.8
	2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain		
	PF00175	1.30E-20	63.6
IPADO-C	Oxidoreductase NAD-binding domain		
	PF00970	1.40E-15	47
	Oxidoreductase FAD-binding domain		
DCDDU	PF04166	3.00E-69	222.9
DCDDH	Pyridoxal phosphate biosynthetic protein PdxA		
	PF00775	6.10E-21	64.1
PCDO-A	Dioxygenase		
	PF00775	2.20E-54	173.1
	Dioxygenase		
PCDO-B	PF12391	5.60E-18	53.9
	Protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit N terminal		

Como se observa en la tabla 13, se encontraron algunos de los genes del metabolismo de TPA, principalmente en las cepas 119, GOM6 y CBC2, las cuales poseen los transportadores responsables. Por otro lado, únicamente poseen dos de las subunidades de la TPA-dioxigenasa y ninguna de la protocatecuato desoxigenasa, por lo que no se consideró que las cepas puedan metabolizar el TPA, al menos por la ruta canónica.

ID	MHET	TTT-A	TTT-B	TPADO-A	TPADO-B	TPADO-C	DCDDH	PCDO
119	0	1	1	1	0	1	0	0
GOM5	0	0	0	1	0	0	1	0
GOM6	0	1	1	0	0	1	1	0
CBC2	1	1	1	1	0	1	1	0

Tabla 13. Resultado de la búsqueda de proteínas con potencial metabólico de MHET y TPA en las cepas del LBM. 1 indica presencia y 0 ausencia.

La falta del metabolismo completo del PET podría parecer una limitante, no obstante, para fines como el reciclaje de este polímero, con el objetivo de generar una economía circular, resulta más conveniente obtener los monómeros en el medio y que estos no sean mineralizados. Debido a esto, únicamente las enzimas que generan las hidrólisis primarias de este plástico son las que pueden implementarse en esta problemática.

6.13. Pruebas de halo de aclaramiento

Inicialmente se probaron las cuatro cepas del LBM en cajas de LB+PCL para realizar un tamizaje inicial. Tres ellas mostraron un halo de aclaramiento, a excepción de la cepa 119. *E. coli* fue colocada como control negativo (Figura 18B y Figura 18F). Al repetir las pruebas con cajas de LB+BHET se reprodujo el patrón de halos de aclaramiento en las cepas (Figura 18). La cepa 119 mostró un crecimiento irregular y no mostró un halo de aclaramiento en BHET, lo cual es inusual, debido a su parecido a nivel de secuencia con la cepa *Pseudomonas* sp. GOM6). Es posible que la cepa no se encuentre axénica y que por eso muestre estas características distintivas, por lo que se descartó en el resto de los experimentos. Al no cuantificar la densidad óptica de los cultivos antes de realizar las cajas, no es posible medir los halos de aclaramiento con el fin de conocer cuál cepa tiene una mejor degradación. Como se está realizando el ensayo con las cepas, no es posible saber a este nivel si las posibles PETasas son las responsables del halo, por lo que no se consideró que esta medición fuera importante. No haber expresado heterólogamente las enzimas en una cepa como *E. coli* DH5 α fue una limitante en el trabajo para confirmar la función de estas. En un proyecto que continúe con la caracterización de estas y se realice la expresión de la enzima sería posible realizar estas mediciones de D.O. y de los halos de aclaramiento.



Figura 18. Placas con LB inoculadas con tres cepas que contienen posibles PETasas y una *E. coli*. La placa 1 (A, B, C y D) contiene PCL al 0.5% y la placa 2 (E, F, G y H) contiene BHET al 0.5%. Se incubaron por cinco días a 30 °C.

6.14. Oligonucleótidos diseñados para PCR

Para el diseño de los oligonucleótidos se descartó la secuencia de la posibles PETasa encontrada en la *Halopseudomonas aestusnigiri* GOM5, ya que divergía demasiado de las secuencias del resto de las posibles PETasas del LBM. Con estas se logró diseñar un oligonucleótido que no solo se une a estas, ya que, tras realizar las pruebas de especificidad y sensibilidad, únicamente se alinean con los controles positivos de la familia *Pseudomonadaceaede*. Todos los amplicones tienen un tamaño de 143 pb. Los oligonucleótidos se unen en los motivos (generados en MEME, Tabla 4) 6 (forward) y 1 (reverse). El motivo 6 no posee aminoácidos relacionados a la catálisis enzimática, mientras que el motivo 1 únicamente contiene una de las cisteínas que forman el primer puente disulfuro. Aunque no estén relacionados a la catálisis, es posible que estos motivos desempeñen alguna función estructural de importancia, ya que son las zonas más conservadas a nivel de nucleótidos en las seis cepas analizadas.

La secuencia utilizada para el oligonucleótido PetPseudomonadaceaeFW fue 5'-GCACSGTGYAYTACCCSACC -3' y para PetPseudomonadaceaeRV fue 5'- GGTATTCAT GGTSATGACCACRAARCC -3'. Ambos poseen una Tm de 60 °C, lo que nos permite realizar el qPCR en dos pasos, con la misma temperatura de alineamiento y extensión, ya que la polimerasa se activa a la misma temperatura. Ambos oligonucleótidos cuentan con dos nucleótidos de citosina en su extremo 3', lo cual promueve una mejor unión durante la reacción. Para diseñar estos oligonucleótidos, los cuales fueron capaces de unirse a diferentes posibles PETasas de la familia *Pseudomonadaceae*, se tuvieron que agregar tres tipos de degeneraciones dobles en la secuencia, siendo estas la S (C o G), Y (A o T) y R (A o G).

Para comprobar la especificidad y sensibilidad de los oligonucleótidos diseñados, se buscó su alineamiento (empleando SnapGene software (www.snapgene.com)) a través 96 genomas de referencia seleccionados para este propósito: 17 de microorganismos degradadores de PET como referencia, 39 de los aislados del LBM y 40 del microbioma humano como control negativo (Tabla suplementaria 4). Se anotaron las temperaturas medias en caso de que se uniera el primer forward o reverse, mostrado en la matriz de confusión de la Tabla 14. Ninguno de los hits mostró falsos positivos tanto para el oligonucleótido forward como para el reverse dentro de un mismo genoma (Tabla suplementaria 5). Esto indica que no existe un riesgo de obtener amplicones inespecíficos durante la reacción.

Base de datos	Verdadero negativo	Falso negativo	Verdadero positivo	Falso positivo	Total
Forward					
Referencia	13	0	4	0	17
LBM	32	0	3	9	44
Microbioma	37	0	0	3	
Reverse					40
Referencia	12	0	0	5	17
LBM	37	0	3	4	44
Microbioma	38	0	0	2	40

Tabla 14. Matriz de confusión que muestra en qué secuencias geonómicas se unieron los oligonucleótidos forward y reverse.

Se encontró que los oligonucleótidos diseñados para las cepas de este trabajo también pueden unirse *in silico* a la PETasa de *P. sakaiensis* y a cinco géneros de la familia *Pseudomonadaceae* (*Ectopseudomonas*, *Halopseudomonas*, *Stuzerimonas*, *Aquipseudomonas* y *Pseudomonas*) con PETasas caracterizadas (Figura 19). La única excepción fue la secuencia de la *H. aestusnigiri* GOM5, en la cual solo se une el oligonucleótido *reverse*, ya que su región nucleotídica en donde debería alinearse con el *forward* es más divergente que en el resto (Figura 19).



Figura 19. Árbol filogenético y secuencias nucleotídicas de diez PETasas pertenecientes a cinco géneros de la familia *Pseudomonadaceae* y a *P. sakaiensis*. Las secuencias corresponden a los sitios de unión de los oligonucleótidos diseñados. En la parte inferior está la secuencia consenso de ambas regiones. Los colores en los taxones del árbol representan la Tm de los oligonucleótidos forward (F) y reverse (R).

6.15. Genes normalizadores para la RT-qPCR

Se revisó la bibliografía para encontrar los genes normalizadores comúnmente usados en los ensayos de RT-qPCR con el género *Pseudomonas*, ya que es el género para el cual se diseñaron los oligonucleótidos.

Al extraer todas las secuencias de estos genes de los genomas del LBM, se alinearon en busca de regiones conservadas para realizar la RT-qPCR. Las secuencias nucleotídicas mejor conservadas fueron las del gen ribosomal *rpoD*, las cuales ya han sido usadas anteriormente para ensayos de crecimiento normal, ensayos de infección y ensayos de presión ocasionada por antibióticos (Tabla 15), por lo que se seleccionaron para el trabajo. Los oligonucleótidos resultantes fueron: RpoDPseudomonadaceaeFW: 5'-YCGCGGCTACAAGTTCTCG-3'.

RpoDPseudomonadaceaeRV: 5'- GCTTGTTGATSGTCTCGATCATGTG -3'.

Cepa	Condición	Genes	Referencia
Pseudomonas brassicacearum GS20	Crecimiento	rho, rpoD y gyrA	(Bai <i>et al.</i> , 2020)
	normal		
Pesudomonas aeruginosa	Déficit de	rpoS	(Alqarni <i>et al.</i> ,
	carbono		2016)
Pseudomonas syringae pv. tomato	Infección	16S, oprF, recA	(Smith <i>et al.</i> ,
DC3000		y rpoD	2018)
Varias cepas	Cuantificación	proC y rpoD	(Savli <i>et al.</i> , 2003)
de Pesudomonas aeruginosa	de genes de		
	resistencia		
Pesudomonas aeruginosa PAO1	Exposición a	algD y nadB	(Meng et al.,
	antibióticos		2023)

Tabla 15. Genes normalizadores utilizados en estudios de RT-qPCR de diferentes cepas de *Pseudomonas*.
6.16. PCR de punto final

Se confirmó la presencia de los genes que codifican para posibles PETasas a nivel de DNA mediante una PCR de punto final. Se observan bandas en el gel del tamaño esperado (143 pb) para los amplicones de las posibles PETasas (Figura 20). Tampoco se encontró el amplicón en los controles negativos seleccionados. Es interesante observar que la cepa GOM5 no produjo el amplicón de la PETasa, como se predijo en los análisis, posiblemente debido a la degeneración de la secuencia (Figura 19). A pesar de que la cepa GOM5 y GOM2, pertenecen a la familia *Pseudomonadaceae* y fueron aisladas del Golfo de México, estas no causan falsos positivos con este juego de oligonucleótidos.



Figura 20. Electroforesis de los amplicones generados con los genes PETasa en las dos cepas seleccionadas, tres controles negativos bióticos y un control negativo sin DNA.

6.17. Cinética de crecimiento de *Stutzerimonas* (Cepa CBC2) y *Pseudomonas* (Cepas GOM6)

Los resultados de la cinética de crecimiento (Tabla suplementaria 8) mostraron que las bacterias crecieron mejor en el medio que únicamente presentaba LB al 0.5X que en el suplementado con BHET. Este comportamiento ha sido observado antes por Zadjelovic *et al.*, 2020, en donde se planea que el TPA (producto de la hidrólisis del BHET), tiene un efecto citotóxico al ser acumulado. Como las cepas probadas no poseen la maquinaria celular capaz de metabolizar el TPA, es probable que este se acumule en el medio. Se decidió tomar muestras de los matraces a las 24, 48 y 72 horas, ya que se observa la fase de muerte de las cepas de CBC2 con BHET a las 96 horas (Figura 21). Al sintetizar el cDNA de las PETasas a las 24 horas, no se observó que hubiera ocurrido una amplificación, por lo que los qPCR únicamente se realizaron con las muestras tomadas a las 48 y 72 horas.



Figura 21. Crecimiento de las cepas GOM6 (línea roja) y CBC2 (línea azul) a lo largo de 96 horas con el medio LB al 50% (círculos) y con LB al 50% con BHET (cuadrados).

6.18. Expresión de las posibles PETasas en presencia de BHET

Una vez que se tomaron las muestras en los tiempos seleccionados, se realizó la extracción de los ácidos nucleicos, seguida de un tratamiento enzimático para eliminar el DNA de las muestras. Al realizar una PCR con los oligonucleótidos y las muestras tratadas con la DNAsa no se observaron bandas, lo que indica que no existe una contaminación que pueda causar sesgos en la qPCR.

El cDNA fue amplificado a punto final después de ser sintetizado. De acuerdo con los resultados obtenidos, se observa una clara tendencia de expresión de las posibles PETasas a las 72 horas, que supera significativamente a la expresión observada en LB. Considerando que, a las 96 horas, el crecimiento de las bacterias con BHET comienza a descender, es posible que a las 72 horas haya sido el tiempo ideal para medir su expresión. Se realizó una prueba *t* de Student entre los distintos tiempos para cada una de las cepas para conocer si existe una diferencia significativa en su expresión. La prueba fue realizada con el software R (R Core Team, 2021). Se encontró una diferencia significativa en la expresión de la cepa CBC2 según la prueba estadística (Figura 22 y Tabla suplementaria 10). La ausencia de una diferencia significativa en la expresión de la cepa GOM6 puede deberse a la variabilidad biológica durante el experimento (Tabla suplementaria 9) o a que la expresión en esta cepa no presente una diferencia significativa como la CBC2.



Figura 22. Expresión de la enzima PETasa en las cepas GOM6 (A) y CBC2 (B) a 48 y 72 horas. La línea roja punteada indica la expresión en el medio LB. El * indica que de acuerdo con la prueba de *t* de Student mostró un *p*-value <0.05.

7. CONCLUSIONES

La presente investigación integró herramientas bioinformáticas y experimentación molecular para identificar posibles PETasas y confirmar su expresión inducida por BHET, sustrato intermediario del PET. El análisis *in silico* mediante matrices de motivos construidas a partir de la IsPETasa y con búsquedas iterativas de homólogos remotos permitió una búsqueda taxonómicamente amplia, logrando detectar secuencias candidatas a través de distintos géneros y en ambas bases de datos. Esta estrategia mostró buena especificidad, ya que no se obtuvieron coincidencias significativas en los controles negativos, evidenciando la baja probabilidad de falsos positivos *in silico*.

Además, trabajar con bases de datos curadas, la clasificación estructural y filogenética de las secuencias identificadas permitió realizar análisis entre estas variables. Esto produjo agrupamientos entre posibles PETasas de acuerdo con sus clases taxonómicas, las cuales se agruparon de acuerdo con el tipo de PETasas y a su ecosistema de origen, lo que indica una posible especialización taxonómica. El mapeo del contexto genómico generó hipótesis sobre la regulación de estas enzimas, debido a la frecuente colocalización de genes de factores de transcripción junto a aproximadamente la mitad de las PETasas de referencia y de las identificadas. El estudio actual no fue capaz de comprobar esta regulación debido a limitaciones de tiempo, por lo que se propone como un proyecto experimental a futuro. A pesar de la divergencia significativa a nivel de nucleótidos entre las PETasas halladas, reflejada en la necesidad de emplear oligonucleótidos degenerados para abarcar su detección, fue posible diseñar iniciadores RT-qPCR capaces de unirse *in silico* a varios géneros de la familia *Pseudomonadaceae* y a la IsPETasa. Además de que experimentalmente amplificaron eficientemente las posibles PETasas que se probaron.

Por último, mediante RT-qPCR se comprobó que, en cultivos bacterianos expuestos a BHET, la expresión de los genes PETasa seleccionados aumenta en comparación con cultivos control en ausencia de este compuesto. Este resultado fue consistente con la hipótesis de un sistema de regulación específico que se activa en la presencia de productos de degradación de PET. También se reconocen las limitaciones de este estudio. Solo una fracción de las enzimas candidatas identificadas pudo ser evaluada experimentalmente, debido a restricciones de tiempo y recursos, de modo que no todas las PETasas predichas fueron validadas en el laboratorio. Esto implica que podrían existir falsos positivos *in silico* y que en realidad estas enzimas no sean capaces de hidrolizar PET, por lo que la comprobación experimental de su actividad es necesaria.

8. PERSPECTIVAS

- Comprobar, por medio de expresión heteróloga, la capacidad de estas enzimas de hidrolizar BHET.
- 2. Diseñar un par de oligonucleótidos para la cepa de *Halopseudomonas aestusnigiri*, con el fin de medir su transcripción.
- Realizar un qPCR utilizando un medio distinto al LB al 0.5X, como un medio mínimo con una fuente de carbono simple (como citrato), lo cual contendría una menor cantidad de interferencia y permitiría observar claramente la expresión diferencial durante la qPCR.

9. HIPÓTESIS DE TRABAJO

- 1. Existe un mecanismo de regulación en la expresión de PETasas asociado a los sistemas AraC e histidina cinasa que se encuentran adyacentes a estas enzimas.
- Las posibles PETasas identificadas en este estudio, que no pudieron clasificarse en los tipos I y II, podrían sintetizarse y expresarse para evaluar su capacidad de degradación del PET. Esto permitiría determinar si es necesario revisar la clasificación actual.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, S., Elsamahy, T., Koutra, E., Kornaros, M., El-Sheekh, M., Abdelkarim, E., Zhu, D. & Sun, J. (2021). Degradation of conventional plastic wastes in the environment: A review on current status of knowledge and future perspectives of disposal. Science of the Total Environment, 771, 144719. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144719.
- Alqarni, B., Colley, B., Klebensberger, J., McDougald, D., & Rice, S. A. (2016). Expression stability of 13 housekeeping genes during carbon starvation of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of microbiological methods, 127, 182–187. https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2016.06.008
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic acids research, 25(17), 3389–3402. https://doi.org/10.1093/NAR/25.17.3389
- Andrady, A. L., & Neal, M. A. (2009). Applications and societal benefits of plastics. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 364(1526), 1977. https://doi.org/10.1098/RSTB.2008.0304
- Andreeva, A., Howorth, D., Chothia, C., Kulesha, E., & Murzin, A. G. (2014). SCOP2 prototype: a new approach to protein structure mining. Nucleic acids research, 42(D1), D310-D314. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1242
- Anuar, N. F. S., Huyop, F., Ur-Rehman, G., Abdullah, F., Normi, Y. M., Sabullah, M. K., & Abdul Wahab, R. (2022). An Overview into Polyethylene Terephthalate (PET) Hydrolases and Efforts in Tailoring Enzymes for Improved Plastic Degradation. En International Journal of Molecular Sciences, 23(20), 12644. https://doi.org/10.3390/ijms232012644
- Arnal, G., Anglade, J., Gavalda, S., Tournier, V., Chabot, N., Bornscheuer, U. T., Weber, G., & Marty, A. (2023). Assessment of Four Engineered PET Degrading Enzymes Considering Large-Scale Industrial Applications. ACS Catalysis, 13(20), 13156–13166.
- Austin, H. P., Allen, M. D., Donohoe, B. S., Rorrer, N. A., Kearns, F. L., Silveira, R. L., Pollard, B. C., Dominick, G., Duman, R., Omari, K. El, Mykhaylyk, V., Wagner, A., Michener, W. E., Amore, A., Skaf, M. S., Crowley, M. F., Thorne, A. W., Johnson, C. W., Lee Woodcock, H., McGeehan, J. & Beckham, G. T. (2018). Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 115(19), E4350–E4357. https://doi.org/10.1073/PNAS.1718804115
- Bai, B., Ren, J., Bai, F., & Hao, L. (2020). Selection and validation of reference genes for gene expression studies in *Pseudomonas brassicacearum* GS20 using real-time quantitative reverse transcription PCR. PLoS ONE, 15(1), e0227927. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0227927

- Bailey, T. L., & Elkan, C. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol., 2, 28-36.
- Bailey, T. L., & Gribskov, M. (1998). Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches. Bioinformatics (Oxford, England), 14(1), 48-54.
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W., & Noble, W. S. (2009). MEME Suite: Tools for motif discovery and searching. Nucleic Acids Research, 37(SUPPL. 2), W202-W208. https://doi.org/10.1093/nar/gkp335
- Bell, E. L., Smithson, R., Kilbride, S., Foster, J., Hardy, F. J., Ramachandran, S., Tedstone, A. A., Haigh, S. J., Garforth, A. A., Day, P. J. R., Levy, C., Shaver, M. P., & Green, A. P. (2022). Directed evolution of an efficient and thermostable PET depolymerase. Nature Catalysis,5(8), 673–681. https://doi.org/10.1038/s41929-022-00821-3
- Blázquez-Sánchez, P., Engelberger, F., Cifuentes-Anticevic, J., Sonnendecker, C., Griñén, A., Reyes, J., Díez, B., Guixé, V., Richter, P. & Ramírez-Sarmiento, C. A. (2022). Antarctic polyester hydrolases degrade aliphatic and aromatic polyesters at moderate temperatures. Applied and Environmental Microbiology, 88(1), e01842-21.
- Bollinger, A., Thies, S., Knieps-Grünhagen, E., Gertzen, C., Kobus, S., Höppner, A., Ferrer, M., Gohlke, H., Smits, S. & Jaeger, K. E. (2020). A novel polyester hydrolase from the marine bacterium *Pseudomonas aestusnigri*-structural and functional insights. Frontiers in microbiology, 11, 114.
- Buchholz, P. C. F., Feuerriegel, G., Zhang, H., Perez-Garcia, P., Nover, L. L., Chow, J., Streit, W. R., & Pleiss, J. (2022). Plastics degradation by hydrolytic enzymes: The plastics-active enzymes database—PAZy. Proteins: Structure, Function and Bioinformatics, 90(7), 1443–1456. https://doi.org/10.1002/PROT.26325
- Burgin, T., Pollard, B. C., Knott, B. C., Mayes, H. B., Crowley, M. F., McGeehan, J. E., ... & Woodcock, H. L. (2024). The reaction mechanism of the Ideonella sakaiensis PETase enzyme. Communications Chemistry, 7(1), 65.
- Buschiazzo, A., & Trajtenberg, F. (2019). Two-component sensing and regulation: how do histidine kinases talk with response regulators at the molecular level?. Annual review of microbiology, 73(1), 507-528.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. BMC Bioinformatics, 10(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421.
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., & Gabaldón, T. (2009). trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. Bioinformatics, 25(15), 1972-1973. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTP348.

- Chen, J., Jia, Y., Sun, Y., Liu, K., Zhou, C., Liu, C., Li, D., Liu, G., Zhang, C., Yang, T., Huang, L., Zhuang, Y., Wang, D., Xu, D., Zhong, Q., Guo, Y., Li, A., Seim, I., Jiang, L., Wang, L., Ming, S., Liu, Y., Wang, D., Zhang, G. & Fan, G. (2024). Global marine microbial diversity and its potential in bioprospecting. Nature 633(8029), 371–379. https://doi.org/10.1038/s41586-024-07891-2
- Chen, S., Su, L., Chen, J., & Wu, J. (2013). Cutinase: Characteristics, preparation, and application. Biotechnology Advances, 31(8), 1754–1767. https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2013.09.005
- Choi, J., Yang, F., Stepanauskas, R., Cardenas, E., Garoutte, A., Williams, R., Flater, J., Tiedje, J. M., Hofmockel, K. S., Gelder, B., & Howe, A. (2016). RefSoil: A reference database of soil microbial genomes. bioRxiv, 053397. https://doi.org/10.1101/053397
- Dalbey, R. E., Wang, P., & van Dijl, J. M. (2012). Membrane Proteases in the Bacterial Protein Secretion and Quality Control Pathway. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 76(2), 311–330. https://doi.org/10.1128/MMBR.05019-11.
- Danso, D., Chow, J., & Streit, W. R. (2019). Plastics: environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation. Applied and environmental microbiology, 85(19), e01095-19. https://doi.org/10.1128/AEM.01095-19
- Danso, D., Schmeisser, C., Chow, J., Zimmermann, W., Wei, R., Leggewie, C., Li, X., Hazen, T., & Streit, W.
 R. (2018). New insights into the function and global distribution of polyethylene terephthalate (PET)-degrading bacteria and enzymes in marine and terrestrial metagenomes. Applied and Environmental Microbiology, 84(8), e02773-17. https://doi.org/10.1128/AEM.02773-17/SUPPL FILE/ZAM008188431S1.PDF
- de Souza Machado, A. A., Kloas, W., Zarfl, C., Hempel, S., & Rillig, M. C. (2018). Microplastics as an emerging threat to terrestrial ecosystems. Global change biology, 24(4), 1405-1416.
- Dewey, C. N. (2011). Positional orthology: Putting genomic evolutionary relationships into context. Briefings in Bioinformatics, 12(5), 401-412. https://doi.org/10.1093/bib/bbr040
- Dick Vethaak, A., & Heather, A. L. (2016). Plastic Debris Is a Human Health Issue. Environmental Science & Technology. 50 (13), 6825-6826. 10.1021/acs.est.6b02569
- Du, Y., Liu, X., Dong, X., & Yin, Z. (2022). A review on marine plastisphere: biodiversity, formation, and role in degradation. Computational and Structural Biotechnology Journal, 20, 975-988.
- Duis, K., & Coors, A. (2016). Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. Environmental Sciences Europe, 28(1), 2.
- Eddy, S. R. (2004). What is a hidden Markov model?. Nature biotechnology, 22(10), 1315-1316. 10.1038/nbt1004-1315.

- Eddy, S. R. (2009). A new generation of homology search tools based on probabilistic inference. In Genome Informatics 2009: Genome Informatics Series Vol. 23 (pp. 205-211).
- Edgar, R. C. (2022). Muscle5: High-accuracy alignment ensembles enable unbiased assessments of sequence homology and phylogeny. Nature Communications, 13(1), 1–9. <u>https://doi.org/10.1038/s41467-022-34630-w</u>
- Evode, N., Qamar, S. A., Bilal, M., Barceló, D., & Iqbal, H. M. N. (2021). Plastic waste and its management strategies for environmental sustainability. Case Studies in Chemical and Environmental Engineering, 4. 100142. https://doi.org/10.1016/J.CSCEE.2021.100142
- Gallegos, M. T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., & Ramos, J. L. (1997). Arac/XylS family of transcriptional regulators. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 61(4), 393-410.
- Gambarini, V., Pantos, O., Kingsbury, J. M., Weaver, L., Handley, K. M., & Lear, G. (2021). Phylogenetic distribution of plastic-degrading microorganisms. Msystems, 6(1), 10-1128. https://doi.org/10.1128/mSystems.01112-20
- Ghaffar, I., Rashid, M., Akmal, M., & Hussain, A. (2022). Plastics in the environment as potential threat to life: an overview. Environmental Science and Pollution Research, 29(38), 56928-56947. https://doi.org/10.1007/s11356-022-21542-x
- Gracida-Alvarez, U. R., Xu, H., Benavides, P. T., Wang, M., & Hawkins, T. R. (2023). Circular Economy Sustainability Analysis Framework for Plastics: Application for Poly(ethylene Terephthalate) (PET). ACS Sustainable Chemistry and Engineering, 11(2), 514–524. https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.2C04626
- Guglielmi, G. (2017). In the next 30 years, we'll make four times more plastic waste than we ever have. Science. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAN7121
- Guo, W., Duan, J., Shi, Z., Yu, X., & Shao, Z. (2023). Biodegradation of PET by the membrane-anchored PET esterase from the marine bacterium *Rhodococcus pyridinivorans* P23. Communications Biology, 6(1), 1090.
- Guy, L., Kultima, J. R., Andersson, S. G. E., & Quackenbush, J. (2010). genoPlotR: comparative gene and genome visualization in R. Bioinformatics, 26(18), 2334–2335. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTQ413
- Haernvall, K., Zitzenbacher, S., Yamamoto, M., Schick, M. B., Ribitsch, D., & Guebitz, G. M. (2017). A new arylesterase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* can hydrolyze ionic phthalic polyesters. Journal of Biotechnology, 257, 70-77. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.01.012
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acids symposium series. 41(41), 95-98.

- Han, X., Liu, W., Huang, J. W., Ma, J., Zheng, Y., Ko, T. P., Xu, L., Cheng, Y. S., Chen, C. C., & Guo, R. T. (2017). Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. Nature Communications, 8(1), 2106. https://doi.org/10.1038/S41467-017-02255-Z
- Joho, Y., Vongsouthi, V., Spence, M. A., Ton, J., Gomez, C., Tan, L., Kaczmarski, J., Caputo, A., Royan, S., Jackson, C. & Ardevol, A. (2022). Ancestral sequence reconstruction identifies structural changes underlying the evolution of *Ideonella sakaiensis* PETase and variants with improved stability and activity. Biochemistry, 62(2), 437-450. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.2c00323
- Jones, P., Binns, D., Chang, H. Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A. F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, S. Y., Lopez, R., & Hunter, S. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. Bioinformatics, 30(9), 1236-1240. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU031
- Joo, S., Cho, I. J., Seo, H., Son, H. F., Sagong, H. Y., Shin, T. J., Choi, S. Y., Lee, S. Y., & Kim, K. J. (2018). Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation. Nature Communications, 9(1), 382. https://doi.org/10.1038/S41467-018-02881-1
- Kim, H. R., Lee, H. M., Yu, H. C., Jeon, E., Lee, S., Li, J., & Kim, D. H. (2020). Biodegradation of Polystyrene by *Pseudomonas* sp. Isolated from the Gut of Superworms (Larvae of Zophobas atratus). Environmental science & technology, 54(11), 6987–6996. https://doi.org/10.1021/ACS.EST.0C01495
- Klemetsen, T., Raknes, I. A., Fu, J., Agafonov, A., Balasundaram, S. V., Tartari, G., Robertsen, E., & Willassen, N. P. (2018). The MAR databases: development and implementation of databases specific for marine metagenomics. Nucleic Acids Research, 46(D1), D692-D699. https://doi.org/10.1093/NAR/GKX1036
- Kotoky, R., Ogawa, N., & Pandey, P. (2022). The structure-function relationship of bacterial transcriptional regulators as a target for enhanced biodegradation of aromatic hydrocarbons. Microbiological Research, 262, 127087.
- Kumari, A., Bano, N., Bag, S. K., Chaudhary, D. R., & Jha, B. (2021). Transcriptome-Guided Insights Into Plastic Degradation by the Marine Bacterium. Frontiers in Microbiology, 12, 751571 https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.751571/FULL
- Lang, W. T., Mehta, S. A., Thomas, M. M., Openshaw, D., Westgate, E., & Bagnato, G. (2023). Chemical recycling of polyethylene terephthalate, an industrial and sustainable opportunity for Northwest of England. Journal of Environmental Chemical Engineering, 11(5), 110585. https://doi.org/10.1016/J.JECE.2023.110585
- Letunic, I., & Bork, P. (2024). Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. Nucleic Acids Research, 52(W1), W78–W82. https://doi.org/10.1093/NAR/GKAE268

- Lewis, L., Perisin, M., & Tobias, A. (2020). Metabolic modeling of Pseudomonas putida to understand and improve the breakdown of plastic waste. Department of Defense (DOD) Undersecretary for Research and Engineering(USRE) Historically Black Colleges and Universities/Minority-Serving Institutions (HBCU/MI) Summer Research Program, 1–33.
- Liu, B., He, L., Wang, L., Li, T., Li, C., Liu, H., Luo, Y. & Bao, R. (2018). Protein crystallography and sitedirect mutagenesis analysis of the poly (ethylene terephthalate) hydrolase PETase from *Ideonella sakaiensis*. ChemBioChem, 19(14), 1471-1475. https://doi.org/10.1002/cbic.201800097
- Liu, R., Xu, H., Zhao, S., Dong, C., Li, J., Wei, G., Li, G., Gong, L., Yan, P. & Shao, Z. (2024). Polyethylene terephthalate (PET)-degrading bacteria in the pelagic deep-sea sediments of the Pacific Ocean. Environmental Pollution, 352, 124131.
- Lu, H., Diaz, D. J., Czarnecki, N. J., Zhu, C., Kim, W., Shroff, R., Acosta, D. J., Alexander, B. R., Cole, H. O., Zhang, Y., Lynd, N. A., Ellington, A. D., & Alper, H. S. (2022). Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization. Nature 2022 604:7907, 604(7907), 662–667. https://doi.org/10.1038/s41586-022-04599-z
- Marine plastic pollution resource | IUCN. (s/f). Recuperado el 21 de abril de 2023, de https://www.iucn.org/resources/issues-brief/marine-plastic-pollution
- Maurya, A., Bhattacharya, A., & Khare, S. K. (2020). Enzymatic Remediation of Polyethylene Terephthalate (PET)–Based Polymers for Effective Management of Plastic Wastes: An Overview. En Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 8, 602325. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.602325
- Meng, L., Cao, X., Li, C., Li, J., Xie, H., Shi, J., Han, M., Shen, H., & Liu, C. (2023). Housekeeping gene stability in *Pesudomonas aeruginosa* PAO1 under the pressure of commonly used antibiotics in molecular microbiology assays. Frontiers in Microbiology, 14, 1140515. https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1140515/BIBTEX
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., Lanfear, R., & Teeling, E. (2020). IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. Molecular Biology and Evolution, 37(5), 1530–1534. https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAA015
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2022). ColabFold: making protein folding accessible to all. Nature Methods, 19(6), 679-682. https://doi.org/10.1038/S41592-022-01488-1
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L. L., Tosatto, S. C. E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L. J., Finn, R. D., & Bateman, A. (2021). Pfam: The protein families database in 2021. Nucleic Acids Research, 49(D1), D412–D419. https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA913

- Mojtabavi, S., & Amin, M. (2024). Carboxylesterases. Encyclopedia of Toxicology, 571–578. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.01175-1
- Nihart, A. J., Garcia, M. A., El Hayek, E., Liu, R., Olewine, M., Kingston, J. D., Castillo, E. F., Gullapalli, R. R., Howard, T., Bleske, B., Scott, J., Gonzalez-Estrella, J., Gross, J. M., Spilde, M., Adolphi, N. L., Gallego, D. F., Jarrell, H. S., Dvorscak, G., Zuluaga-Ruiz, M. E., West, A. B., & Campen, M. J. (2025). Bioaccumulation of microplastics in decedent human brains. Nature Medicine, 1–6. https://doi.org/10.1038/s41591-024-03453-1
- O'malley, M. A., & Walsh, D. A. (2021). Rethinking microbial infallibility in the metagenomics era. FEMS Microbiology Ecology, 97, 1-12. https://doi.org/10.1093/femsec/fiab092
- Pandurangan, A. P., Stahlhacke, J., Oates, M. E., Smithers, B., & Gough, J. (2019). The SUPERFAMILY 2.0 database: a significant proteome update and a new webserver. Nucleic Acids Research, 47(D1), D490– D494. https://doi.org/10.1093/NAR/GKY1130
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. Genome Research, 25(7), 1043-1055. https://doi.org/10.1101/gr.186072.114
- Pathak, V. M., & Navneet. (2017). Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach. Bioresources and Bioprocessing 2017, 4(1), 1–31. https://doi.org/10.1186/S40643-017-0145-9
- Pérez-García, P., Danso, D., Zhang, H., Chow, J., & Streit, W. R. (2021). Exploring the global metagenome for plastic-degrading enzymes. Methods in Enzymology, 648, 137–157. https://doi.org/10.1016/BS.MIE.2020.12.022
- Pfaff, L., Gao, J., Li, Z., Jäckering, A., Weber, G., Mican, J., Chen, Y., Dong, W., Han, X., Feiler, C., Ao, Y., Badenhorst, C., Bednar, D., Palm, G., Lammers, M., Damborsky, J., Strodel, B., Lui, W., Borncheuer, U. & Wei, R. (2022). Multiple substrate binding mode-guided engineering of a thermophilic PET hydrolase. ACS catalysis, 12(15), 9790-9800. https://doi.org/10.1021/acscatal.2c02275
- Pirahanchi, Y., & Sharma, S. (2023). Biochemistry, Lipase. StatPearls.
- PlasticEurope. (2024). The fast facts 2024. https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-fast-facts-2024/
- Proctor, L. M., Creasy, H. H., Fettweis, J. M., Lloyd-Price, J., Mahurkar, A., Zhou, W., Buck, G. A., Snyder, M.
 P., Strauss, J. F., Weinstock, G. M., White, O., & Huttenhower, C. (2019). The Integrative Human Microbiome Project. Nature , 569(7758), 641–648. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1238-8
- PyMOL The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.0 Schrödinger, LLC. (s/f). https://www.pymol.org/
- Qi, X., Ji, M., Yin, C. F., Zhou, N. Y., & Liu, Y. (2023). Glacier as a source of novel polyethylene terephthalate hydrolases. Environmental Microbiology, 25(12), 2822-2833.

- Qu, Z., Chen, K., Zhang, L., & Sun, Y. (2023). Computation-Based Design of Salt Bridges in PETase for Enhanced Thermostability and Performance for PET Degradation. ChemBioChem, 24(21), e202300373.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/.
- Rhodes, C. J. (2018). Plastic Pollution and Potential Solutions. Science progress, 101(3), 207–260. https://doi.org/10.3184/003685018X15294876706211
- Ronkvist, Å. M., Xie, W., Lu, W., & Gross, R. A. (2009). Cutinase-Catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate). Macromolecules, 42(14), 5128-5138. https://doi.org/10.1021/ma9005318
- Sako, T., Sugeta, T., Otake, K., Nakazawa, N., Sato, M., Namiki, K., & Tsugumi, M. (1997). Depolymerization of polyethylene terephthalate to monomers with supercritical methanol. Journal of chemical engineering of Japan, 30(2), 342-346.
- Sasoh, M., Masai, E., Ishibashi, S., Hara, H., Kamimura, N., Miyauchi, K., & Fukuda, M. (2006). Characterization of the terephthalate degradation genes of *Comamonas* sp. strain E6. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1825-1832.
- Savli, H., Karadenizli, A., Kolayli, F., Gundes, S., Ozbek, U., & Vahaboglu, H. (2003). Expression stability of six housekeeping genes: A proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. Journal of Medical Microbiology, 52(5), 403–408. https://doi.org/10.1099/JMM.0.05132-0
- Schwengers, O., Jelonek, L., Dieckmann, M. A., Beyvers, S., Blom, J., & Goesmann, A. (2021). Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. Microbial genomics, 7(11), 000685. https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000685
- Seewoo, B. J., Goodes, L. M., Thomas, K. V., Rauert, C., Elagali, A., Ponsonby, A.-L., Symeonides, C., & Dunlop, S. A. (2024). How do plastics, including microplastics and plastic-associated chemicals, affect human health? Nature Medicine, 30(11), 3036–3037. https://doi.org/10.1038/s41591-024-03287-x
- Singh, V. K., & Kumar, A. (2001). PCR primer design. Mol. Biol. Today, 2(2), 27-32.
- Smith, A., Lovelace, A. H., & Kvitko, B. H. (2018). Validation of RT-qPCR approaches to monitor Pseudomonas syringae gene expression during infection and exposure to pattern-triggered immunity. Molecular Plant-Microbe Interactions, 31(4), 410-419.
- Teufel, F., Almagro Armenteros, J. J., Johansen, A. R., Gíslason, M. H., Pihl, S. I., Tsirigos, K. D., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2022). SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. Nature Biotechnology, 40(7), 1023-1025. https://doi.org/10.1038/S41587-021-01156-3

- Thompson, R. C., Moore, C. J., Saal, F. S. V., & Swan, S. H. (2009). Plastics, the environment and human health: Current consensus and future trends. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 364(1526), 2153–2166. https://doi.org/10.1098/RSTB.2009.0053
- Tournier, V., Topham, C. M., Gilles, A., David, B., Folgoas, C., Moya-Leclair, E., Kamionka, E., Desrousseaux, M. L., Texier, H., Gavalda, S., Cot, M., Guémard, E., Dalibey, M., Nomme, J., Cioci, G., Barbe, S., Chateau, M., André, I., Duquesne, S., & Marty, A. (2020). An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. Nature, 580(7802), 216–219. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2149-4
- Urbanek, A. K., Kosiorowska, K. E., & Mirończuk, A. M. (2021). Current Knowledge on Polyethylene Terephthalate Degradation by Genetically Modified Microorganisms. En Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 9, 771133. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.771133
- Vogt, B. D., Stokes, K. K., & Kumar, S. K. (2021). Why is recycling of postconsumer plastics so challenging?. ACS Applied Polymer Materials, 3(9), 4325-4346. https://doi.org/10.1021/acsapm.1c00648.
- Wang, X., Lu, D., Jönsson, L. J., & Hong, F. (2008). Preparation of a PET-hydrolyzing lipase from Aspergillus oryzae by the addition of bis (2-hydroxyethyl) terephthalate to the culture medium and enzymatic modification of PET fabrics. Engineering in life sciences, 8(3), 268-276.
- Wang, Y., Sheng, H. F., He, Y., Wu, J. Y., Jiang, Y. X., Tam, N. F. Y., & Zhou, H. W. (2012). Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags. Applied and environmental microbiology, 78(23), 8264-8271.
- Weisenfeld, N. I., Yin, S., Sharpe, T., Lau, B., Hegarty, R., Holmes, L., Sogoloff, B., Tabbaa, D., Williams, L., Russ, C., Nusbaum, C., Lander, E. S., Maccallum, I., & Jaffe, D. B. (2014). Comprehensive variation discovery in single human genomes. Nature Genetics, 46(12), 1350-1355. https://doi.org/10.1038/ng.3121
- Whelan, S., & Goldman, N. (2001). A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. Molecular biology and evolution, 18(5), 691-699.
- White, M., & Wallace, S. (2023). A new PETase from the human saliva metagenome and its functional modification via genetic code expansion in bacteria. Angewandte Chemie International Edition, 62(12), e202216963. 10.1002/anie.202216963.
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. PLoS Computational Biology, 13(6), e1005595. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1005595
- Wilcox, G., Boulter, J., & Lee, N. (1974). Direction of transcription of the regulatory gene araC *in Escherichia coli* B/r. Proceedings of the National Academy of Sciences, 71(9), 3635-3639.

- Xia, Y., Zhang, X., Zhang, M., Chen, L., Tang, X., Sun, Y., & Li, X. (2022). Plastic materials and water sources actively select and shape wastewater plastispheres over time. Frontiers of Environmental Science and Engineering, 16(11), 145. https://doi.org/10.1007/s11783-022-1580-1
- Xu, A., Zhou, J., Blank, L. M., & Jiang, M. (2023). Future focuses of enzymatic plastic degradation. Trends in Microbiology, 31(7), 668-671. DOI: 10.1016/j.tim.2023.04.002
- 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 (New York, N.Y.), 351(6278), 1196–1199. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAD6359
- Yousaf, A., Shehzadi, T., Farooq, A., & Ilyas, K. (2022). Protein active site prediction for early drug discovery and designing. International Review of Applied Sciences and Engineering, 13(1), 98–105. https://doi.org/10.1556/1848.2021.00315
- Zadjelovic, V., Chhun, A., Quareshy, M., Silvano, E., Hernandez-Fernaud, J. R., Aguilo-Ferretjans, M. M., Bosch, R., Dorador, C., Gibson, M, & Christie-Oleza, J. (2020). Beyond oil degradation: enzymatic potential of *Alcanivorax* to degrade natural and synthetic polyesters. Environmental Microbiology, 22(4), 1356-1369.
- Zettler, E. R., Mincer, T. J., & Amaral-Zettler, L. A. (2013). Life in the "plastisphere": microbial communities on plastic marine debris. Environmental science & technology, 47(13), 7137-7146.
- Zhang, H., Dierkes, R. F., Perez-Garcia, P., Costanzi, E., Dittrich, J., Cea, P. A., Gurschke, M., Applegate, V., Partus, K., Schmeisser, C., Pfleger, C., Gohlke, H., Smits, S. H. J., Chow, J., & Streit, W. R. (2023). The metagenome-derived esterase PET40 is highly promiscuous and hydrolyses polyethylene terephthalate (PET). FEBS Journal, 29(1), 70-91. https://doi.org/10.1111/febs.16924
- Zhang, H., Perez-Garcia, P., Dierkes, R. F., Applegate, V., Schumacher, J., Chibani, C. M., Sternagel, S., Preuss, L., Weigert, S., Schmeisser, C., Danso, D., Pleiss, J., Almeida, A., Höcker, B., Hallam, S. J., Schmitz, R. A., Smits, S. H. J., Chow, J., & Streit, W. R. (2022). The *Bacteroidetes Aequorivita* sp. and *Kaistella jeonii* Produce Promiscuous Esterases With PET-Hydrolyzing Activity. Frontiers in Microbiology, 12, 803896. https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.803896/BIBTEX
- Zhang, L., & Xu, Z. (2008). Assessing bacterial diversity in soil. Journal of Soils and Sediments, 8(6), 379–388. doi:10.1007/s11368-008-0043-z
- Zheng, J., Gänzle, M. G., Lin, X. B., Ruan, L., & Sun, M. (2014). Diversity and dynamics of bacteriocins from human microbiome. Environmental Microbiology, 17(6), 2133–2143. doi:10.1111/1462-2920.12662
- Zrimec, J., Kokina, M., Jonasson, S., Zorrilla, F., & Zelezniak, A. (2021). Plastic-Degrading Potential across the Global Microbiome Correlates with Recent Pollution Trends. mBio, 12(5). 10-1128. https://doi.org/10.1128/MBIO.02155-21

11. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Clave	Nombre	Clave NCBI
CBC1	Stutzerimonas stutzeri	GCF_039583995.1
CBC2	Stutzerimonas stutzeri	GCF_039584005.1
CBC3	Pseudomonas sp.	GCF_037967085.1
GOM1	Pseudomonas aeruginosa	GCF_006802095.1
GOM10	Staphylococcus sp.	GCF_047577315.1
GOM2	Stutzerimonas frequens	GCF_009737025.1
GOM3	Paenarthrobacter sp.	GCF_018215265.2
GOM4	Stutzerimonas kunmingensis	GCF_019702405.1
GOM5	Halopseudomonas aestusnigri	GCF_021184005.1
GOM6	Pseudomonas sp.	GCF_029537485.1
GOM7	Pseudomonas sp.	GCF_026723825.1
GOM8	Alloalcanivorax xenomutans	GCF_032810065.1
GOM9	Pseudomonas aeruginosa	GCF_032811685.1
MDS1	Marinobacter salarius	GCF_030718145.1
MDS2	Marinobacter sp.	GCF_030718085.1
MDS3	Vreelandella aquamarina	GCF_030718065.1
MDS4	Bacillus halotolerans	GCF_030718045.1
MDS5	Pseudalkalibacillus hwajinpoensis	GCF_030718105.1
MDS6	Bacillus sp.	GCF_030718025.1

Tabla suplementaria 1. Genomas en el LBM que se encuentran disponibles en NCBI.

Tabla suplementaria 2. Abundancia de los géneros en los cuales se encontraron homólogos remotos dela IsPETasa en el PSI-BLAST.

Género	Abundancia
Streptomyces	68
Halopseudomonas	26
Micromonospora	24
Actinoplanes	23
Pseudomonas	21
Rhizobacter	17
Piscinibacter	17
Saccharothrix	15
Amycolatopsis	15
unclassified	12
Marinobacter	10

Actinomadura	10
Acidimicrobiales	10
Paractinoplanes	9
Nonomuraea	9
Lentzea	9
Streptosporangium	8
Aquabacterium	8
uncultured	7
Thermobifida	7
Cellulomonas	7
Amorphoplanes	7
Pseudomonadota	6
Actinokineospora	6
Sphaerisporangium	5
Kibdelosporangium	5
Actinophytocola	5
Roseateles	4
Noviherbaspirillum	4
Ketobacter	4
Gammaproteobacteria	4
Burkholderiales	4
Actinocorallia	4
Vibrio	3
Umezawaea	3
Steroidobacteraceae	3
Steroidobacter	3
Planomonospora	3
Oceaniserpentilla	3
Isoptericola	3
Thermocatellispora	2
Stutzerimonas	- 2
Streptomonospora	2
Snirillospora	2
Saccharonolysnora	2
Saccharoporyspora	2
Ruhrivivar	2
Pseudomonadales	2
Pseudomonadaeeae	2
Protoobactaria	2
Planototraspora	2
1 iunoieiruspora	2
Oleispira Maaalan atamint	2
Mycobacteriales	2

Kitasatospora	2
Kineococcus	2
Comamonadaceae	2
Candidatus	2
Caldimonas	2
Burkholderia	2
Alkalilimnicola	2
Actinosynnema	2
Verrucosispora	1
Thermomonospora	1
Thermodesulfobacteriota	1
Thermoactinospora	1
Streptosporangiaceae	1
Streptodolium	1
Spongiibacteraceae	1
Solwaraspora	1
Shewanella	1
Salinactinospora	1
Quadrisphaera	1
Qaidamihabitans	1
Promicromonospora	1
Plantactinospora	1
Phytohabitans	1
Pelomonas	1
Nocardiopsis	1
Mitsuaria	1
Microtetraspora	1
Micromonosporaceae	1
Marinimicrobium	1
Hydrogenophaga	1
Herbidospora	1
Hamadaea	1
Haloechinothrix	1
Hahellaceae	1
Ectothiorhodospiraceae	1
Deinococcus	1
Cellvibrionaceae	1
Catelliglobosispora	1
Burkholderiaceae	1
Asanoa	1
Arenicella	1
Allohahella	1
	1

Aestuariicella	1
Actinomycetota	1
Actinocrispum	1
Actinoalloteichus	1
Acidovorax	1

Tabla Suplementaria 3. Mejores hits (superior a E-100) del escaneo con MAST a través de los genomas de confirmadas bacterias degradadoras de PET, bacterias del LBM y los cuarenta genomas del microbioma humano como control negativo (se colocaron únicamente los dos hits con un E-value negativo de estas últimas, ya que no alcanzaron el E-value de 100).

Orígen	Сера	E-value
Degradadora de PET	Piscinibacter_sakaiensis_201	7.0E-203
Degradadora de PET	Rhizobacter_gummiphilus_NS21	1.2E-186
Degradadora de PET	Thermomonospora_curvata_DSM_43183	9.6E-177
Degradadora de PET	Thermobifida_halotolerans_DSM44931_CP063196	1.7E-168
Degradadora de PET	Caldimonas_brevitalea_DSM7029	6.0E-168
Degradadora de PET	Rhizobacter_gummiphilus_NS21	1.1E-162
Degradadora de PET	Thermomonospora_curvata_DSM_43183	1.1E-162
LBM	Pseudomonas_sp_119	6.3E-162
LBM	Pseudomonas_sp_GOM6	6.3E-162
Degradadora de PET	Thermobifida_halotolerans_DSM44931_CP063196	1.1E-160
LBM	Pseudomonas_sp_119	4.6E-159
Degradadora de PET	Thermobifida_fusca_YX	6.2E-159
Degradadora de PET	Thermobifida_fusca_YX	6.5E-156
LBM	Pseudomonas_sp_PBS4	2.6E-151
Degradadora de PET	Halopseudomonas_aestusnigri_VGXO14	7.8E-149
LBM	Halopseudomonas_aestusnigri_GOM5	1.8E-146
Degradadora de PET	Halopseudomonas_pelagia_CL-AP6	1.9E-143
Degradadora de PET	Oleispira_antarctica_strain_RB-8	5.4E-143
Degradadora de PET	Thermomonospora_curvata_DSM_43183	2.4E-130
Degradadora de PET	Rhizobacter_gummiphilus_NS21	1.6E-116
Degradadora de PET	Rhizobacter_gummiphilus_NS21	1.6E-103
Degradadora de PET	Bacterium_HR29	2.8E-102
Degradadora de PET	Rhizobacter_gummiphilus_NS21	1.2E-101
Microbioma humano	Pseudomonas_citronellolis	1.4E-05
Microbioma humano	Pseudomonas_aeruginosa	2.4E-05

Tabla suplementaria 4. Taxonomía de las especies en el set de genomas del microbioma humano usadas como control negativo en Snapgene para verificar la especificidad de los oligonucleótidos.

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
Actinobacteriota	Actinobacteria	Actinomycetales	Brevibacteriaceae	Brevibacterium	Brevibacterium senegalense
Actinobacteriota	Actinobacteria	Actinomycetales	Cellulomonadaceae	Cellulomonas	Cellulomonas massiliensis
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides	Bacteroides xylanisolvens
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Prevotella	Prevotella multisaccharivorax
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Coprobacteraceae	Coprobacter	Coprobacter fastidiosus
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Marinifilaceae	Odoribacter	Odoribacter laneus
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Alistipes	Alistipes putredinis
Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Weeksellaceae	Chryseobacterium	Chryseobacterium gambrini
Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Weeksellaceae	Chryseobacterium	Chryseobacterium bovis
Campylobacterota	Campylobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	Campylobacter	Campylobacter concisus
Desulfobacterota	Desulfovibrionia	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	Desulfovibrio	Desulfovibrio piger
Bacillota	Bacilli	Bacillales	Amphibacillaceae	Oceanobacillus	Oceanobacillus massiliensis
Bacillota	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus sp900199695
Bacillota	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus testis
Bacillota	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus sp000821085
Bacillota	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus massiliosenegalensis
Bacillota	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus jeddahensis
Bacillota	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus rubiinfantis
Bacillota	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus simplex
Bacillota	Bacilli	Bacillales	Caldibacillaceae	Bacillus	Bacillus andreraoultii
Bacillota	Bacilli	Bacillales	Domibacillaceae	Bacillus	Bacillus smithii
Bacillota	Bacilli	Erysipelotrichales	Erysipelatoclostridiaceae	Erysipelatoclostridium	Erysipelatoclostridium ramosum
Bacillota	Bacilli	Erysipelotrichales	Erysipelatoclostridiaceae	Stoquefichus	Stoquefichus massiliensis
Bacillota	Bacilli	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Absiella	Absiella innocuum
Bacillota	Bacilli	Lactobacillales	Listeriaceae	Listeria	Listeria innocua
Bacillota	Clostridia	Tissierellales	Helcococcaceae	Parvimonas	Parvimonas micra
Bacillota	Negativicutes	Selenomonadales	Selenomonadaceae	Megamonas	Megamonas funiformis
Bacillota	Negativicutes	Veillonellales	Dialisteraceae	Dialister	Dialister succinatiphilus
Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Sutterella	Sutterella parvirubra
Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	Hafnia	Hafnia alvei
Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	Metakosakonia	Metakosakonia massiliensis
Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Halomonadaceae	Salinicola	Salinicola tamaricis
Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas aeruginosa
Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas citronellolis
Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas luteola
Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas extremaustralis
Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas fragi
Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas fulva
Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas putida

Tabla suplementaria 5. Unión de los oligonucleótidos diseñados para la identificación de PETasas de acuerdo con los parámetros estándar de Snapgene. Se indica si la búsqueda fue hecha con el oligonucleótido Forward o reverse, la base de datos en la que se encontraba, su Tm de unión y si fue un falso o verdadero positivo.

Grupo	Сера	Tm	Resultado
Forward			
Microbioma humano	4740	54	Falso positivo
Microbioma humano	1580	53	Falso positivo
Microbioma humano	1581	56	Falso positivo
LBM	119	59	Falso positivo
LBM	246	55	Falso positivo
LBM	294	61	Falso positivo
LBM	305	56	Falso positivo
LBM	GOM1	54	Falso positivo
LBM	GOM2	56	Falso positivo
LBM	GOM3	51	Falso positivo
LBM	GOM6	59	Verdadero positivo
LBM	GOM7	55	Falso positivo
LBM	GOM9	54	Falso positivo
LBM	PBS1	55	Falso positivo
LBM	CBC1	55	Falso positivo
LBM	CBC2	62	Verdadero positivo
Degradador de PET	Calidomonas	55	Verdadero positivo
Degradador de PET	Piscinibacter sakaiensis	56 y 61	Verdadero positivo
Degradador de PET	Pseudomonas_syringae	56	Verdadero positivo
Degradador de PET	Rhizobacter_gummiphilus	55 y 60	Verdadero positivo

Grupo	Сера	Tm	Resultado
Reverse			
Microbioma humano	142	45	Falso positivo
Microbioma humano	144	49	Falso positivo
Microbioma humano	152	45	Falso positivo
Microbioma humano	156	44	Falso positivo
Microbioma humano	1417	44	Falso positivo
Microbioma humano	1581	47	Falso positivo
Microbioma humano	4816	48	Falso positivo
Microbioma humano	4818	52	Falso positivo
Microbioma humano	5061	51	Falso positivo
LBM	CBC3	52	Falso positivo
LBM	CBC2	61	Verdadero positivo
LBM	CBC1	44	Falso positivo
LBM	MDS6	53	Falso positivo
LBM	GOM6	59	Verdadero positivo
LBM	GOM5	52	Falso positivo
LBM	318	51	Falso positivo
LBM	205	48	Falso positivo
LBM	119	59	Verdadero positivo
Degradador de PET	T. curvata	55	Verdadero positivo
Degradador de PET	T. haloternas	57 y 60	Verdadero positivo
Degradador de PET	P. mendocina	51	Falso positivo
Degradador de PET	I. sakaiensis	60	Verdadero positivo
Degradador de PET	H. aestusnigiri	51 y 58	Verdadero positivo

Reactivos	Cantidad 1X en µL
Buffer	2.5
MgCl ₂ [0.5 mM]	1.25
dNTPs [10 mM]	0.625
Oligonucleótido FW [10 µM]	1
Oligonucleótido RV [10 µM]	1
DNA	1
Enzima [0.05 unidades/µL]	0.125
Agua MiliQ	16.5

Tabla suplementaria 6. Las concentraciones de cada reactivo usado en las PCRs del trabajo.

Tabla suplementaria 7. Los tiempos y temperaturas usados en los protocolos de las PCRs del trabajo.

Temperatura en °C	Tiempo
95	3:00
94	0:30
60	0:30
72	0:15
Repetir 30 veces d	lesde el segundo paso
72	10:00
12	Indefinido

Tabla suplementaria 8. Resultados de las cinéticas de crecimiento medidas por medio de densidad

 óptica a 600 nm.

Tiempo				
(h)	Cepa	Medio	Replica	DO 600
0	CBC2	LB	1	0.112
0	CBC2	LB	2	0.117
0	CBC2	LB	3	0.118
0	CBC2	BHET	1	0.131
0	CBC2	BHET	2	0.121
0	CBC2	BHET	3	0.122
0	GOM6	LB	1	0.124
0	GOM6	LB	2	0.119
0	GOM6	LB	3	0.118
0	GOM6	BHET	1	0.116
0	GOM6	BHET	2	0.12
0	GOM6	BHET	3	0.11
24	CBC2	LB	1	2.223
24	CBC2	LB	2	2.289
24	CBC2	LB	3	2.397
24	CBC2	BHET	1	1.452
24	CBC2	BHET	2	1.38
24	CBC2	BHET	3	1.248
24	GOM6	LB	1	1.833
24	GOM6	LB	2	1.692
24	GOM6	LB	3	1.758
24	GOM6	BHET	1	0.453
24	GOM6	BHET	2	0.582
24	GOM6	BHET	3	0.612
48	CBC2	LB	1	1.53
48	CBC2	LB	2	1.475
48	CBC2	LB	3	1.775
48	CBC2	BHET	1	0.525
48	CBC2	BHET	2	0.705
48	CBC2	BHET	3	0.525
48	GOM6	LB	1	2.33
48	GOM6	LB	2	1.28
48	GOM6	LB	3	1.285
48	GOM6	BHET	1	0.44
48	GOM6	BHET	2	0.95
48	GOM6	BHET	3	0.896
72	CBC2	LB	1	1.305

72	CBC2	LB	2	1.27
72	CBC2	LB	3	2.08
72	CBC2	BHET	1	0.902
72	CBC2	BHET	2	0.882
72	CBC2	BHET	3	0.878
72	GOM6	LB	1	3.43
72	GOM6	LB	2	2.845
72	GOM6	LB	3	2.28
72	GOM6	BHET	1	1.438
72	GOM6	BHET	2	1.83
72	GOM6	BHET	3	1.93
96	CBC2	LB	1	1.06
96	CBC2	LB	2	1.055
96	CBC2	LB	3	1.055
96	CBC2	BHET	1	0.052
96	CBC2	BHET	2	0.014
96	CBC2	BHET	3	0.07
96	GOM6	LB	1	2.785
96	GOM6	LB	2	2.615
96	GOM6	LB	3	2.845
96	GOM6	BHET	1	0.131
96	GOM6	BHET	2	0.317
96	GOM6	BHET	3	0.374

Tabla suplementaria 9. Resultados de los cálculos de expresión y desviación estándar obtenidos del qPCR.

Tiempo y cepa	Expresión en BHET (En comparación de LB)	Desviación estándar
48horas_GOM6	1.16	
48horas_GOM6	0.83	0.2
48horas_GOM6	0.68	
48horas_CBC2	0.43	
48horas_CBC2	0.45	1.2
48horas_CBC2	2.62	
72horas_GOM6	1.96	
72horas_GOM6	0.99	0.75
72horas_GOM6	2.46	
72horas_CBC2	3.18	
72horas_CBC2	2.68	0.61
72horas_CBC2	1.96	

Tabla suplementaria 10. Comparación estadística por medio de *t* de Student entre cada condición contra el control de LB 0.5X. Los resultados que se muestran son los *P*-values.

Cepa y tiempo	<i>p</i> -value
GOM6 48 horas	0.84
GOM6 72 horas	0.04
CBC2 48 horas	0.53
CBC2 72 horas	0.20



Figura suplementaria 1. Comparación entre los géneros encontrados en la base de datos de Marref y Refsoil. Entre corchetes se indica la cantidad de veces que ese género aparece.



Figura suplementaria 2. Abundancia de los géneros bacterianos clasificados según los tres tipos de PETasas presentes en cada uno. Las barras apiladas representan la abundancia absoluta de los géneros, diferenciados por colores, en función del tipo de PETasa asociado. Los géneros que se encuentran en más de un tipo de PETasa tienen sus border remarcados con una línea negra. Debajo de cada columna se encuentra el logo que muestra los aminoácidos de los 11 sitios de interés usados durante su clasificación.