

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**Diversidad de genes relacionados con la degradación
de microplásticos en muestras de suelos antárticos
impactados por pingüinos *Pygoscelis***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Ambiental
y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:**

Alexander Alberto Marín González

Director de Tesis: Dra. Julieta Orlando

Santiago-CHILE

Mayo 2024

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

ALEXANDER ALBERTO MARÍN GONZÁLEZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Ambiental, y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día _____

Director de Tesis:

Dra. Julieta Orlando

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Sergio Álvarez

Dr. Vinicius Maracajá

Dr. Michael Seeger

FINANCIAMIENTO

Este trabajo de investigación fue financiado con el siguiente proyecto:

-Instituto Milenio BASE ICN2021_002 (Dra. Julieta Orlando)

-Proyecto FONDECYT 1241787

Presentaciones a congreso:

Marín, A., Valenzuela, C., Ramírez-Fernández, L., Orlando, J. 2023. Potencial degradación microbiana de microplásticos en suelos antárticos impactados por pingüinos. XI Congreso Antártico. Punta Arenas, Chile.

Marín, A., Valenzuela, C., Ramírez-Fernández, L., Orlando, J. 2024. Enzymatic potential for microplastic degradation in Antarctic soils impacted by penguins: higher abundance in soils close to human settlements. SCAR. Pucón, Chile.

Valenzuela, C., **Marín, A.**, Almendras, K., Cabrol, L., Orlando, J. 2024. Soils impacted by *Pygoscelis* penguins host microorganisms with the potential to degrade anthropogenic pollutants. SCAR. Pucón, Chile.

Valenzuela, C., **Marín, A.**, Almendras, K., Cabrol, L., Orlando, J. 2024. Antarctic soils impacted by *Pygoscelis* penguins could serve as a potential reservoir of microplastic degrading microorganisms. ISME19. Ciudad del Cabo, Sudáfrica.

Valenzuela, C., **Marín, A.**, Almendras, K., Cabrol, L., Orlando, J. 2024. Exploring Antarctic soils impacted by *Pygoscelis* penguins: a potential reservoir for microorganisms capable of degrading microplastics. IUMS2024. Florencia, Italia.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, Yudith, sin tu apoyo y sin tu energía, este proceso hubiese quedado en nada, gracias por tus consejos, por tu sabiduría y tu paciencia. Gracias por estos 25 años de vida, te quiero mucho mamita.

Para mis abuelos, Yudi y Adrián, que sin sus comidas ricas esta etapa no sería igual, gracias por tanto y perdón por lo poco. Mis viejitos por favor que sean eternos, los quiero mucho.

Para mis amigos, sean de la carrera o fuera de ella; Carlos, Cami, Juanpi, Joaquín, Nacho, Vale, Benja, Pelao, Mati, Kenito, Andrew y muchos más, que me han apoyado y ayudado a nunca rendirme en esta etapa. Sin las risas, los juegos, las copuchas y muchas otras cosas más esta etapa no hubiera sido la misma.

Para Camila, mi polola, mi compañera de vida, mi rayito de sol que me ilumina cada vez que mi cabeza se nublaban en esta etapa, gracias por acompañarme en estos seis años fortaleciendo esta relación día a día. Tu alegría fue mi motor a seguir para terminar esta etapa, gracias por todo te amo.

Para Arya, mi gata de tres años, a la que apodé mi co-directora de mi tesis que me acompañaba siempre en mi escritorio para observar lo que escribía y también su compañía durmiendo mientras trabajaba.

Para los integrantes del laboratorio LEMI, en especial a la profe Julieta, por sus correcciones y apoyo en las presentaciones. También para Claudio, gracias por siempre brindarme tu tiempo para cualquier duda que se me ocurriera y para apañar siempre en reuniones con horarios no habituales para responder mis dudas.

TABLA DE CONTENIDOS

FINANCIAMIENTO	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
TABLA DE CONTENIDOS	v
ABREVIATURAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Plásticos y Microplásticos	1
1.2. Biodegradación de microplásticos	2
1.3. Microorganismos presentes en los microplásticos	3
1.4. Enzimas involucradas en la biodegradación de microplásticos	5
1.4.1. PET hidrolasas	5
1.4.2. Poliuretanasa	6
1.4.3. Alcano hidroxilasas	7
1.4.4. Estireno monooxigenasas y Estireno óxido isomerasas	8
1.5. Distribución de microplásticos	9
1.5.1 Distribución e microplásticos en el continente antártico	10
1.6. Fuentes de contaminación de microplásticos en Antártica	10
1.7. Efectos de microplásticos en la Antártica	12
1.8. Pingüinos <i>Pygoscelis</i>	13
1.8.1 Microplásticos en pingüinos <i>Pygoscelis</i>	14
2. HIPOTESIS	16
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo general	16
3.2. Objetivos específicos	16
4. METODOLOGÍA	17
4.1. Toma de muestras	17
4.2. Extracción de DNA y secuenciación	19
4.3. Creación de base de datos	19

4.4. Creación de modelos ocultos de Markov (HMM)	20
4.5. Cuantificación de genes	21
4.6. Datos de asentamientos humanos	21
4.7. Análisis estadísticos	22
5. RESULTADOS	23
5.1. Secuenciación de los metagenomas	23
5.2 Creación de base de datos	26
5.3 Generación de secuencias homólogas	29
5.4 Distancia de los asentamientos humanos a los sitios de muestreo	30
5.5 Cuantificación de genes	31
5.6 Variabilidad de la abundancia de genes entre especies, sitios y cercanía a asentamientos humanos.	37
5.7 Correlación entre la abundancia de genes en suelos impactados por pingüinos y la distancia a asentamientos humanos.	38
6. DISCUSIÓN	43
6.1. Cuantificación de genes relacionados con la degradación de microplásticos en metagenomas de suelos antárticos.	43
6.2. Variabilidad de la abundancia de genes entre especies, sitios y distancia a asentamientos humanos.	47
6.3. Proyecciones con enfoque bioinformático para el análisis de suelos antárticos	52
7. CONCLUSIONES	54
8. BIBLIOGRAFÍA	55
9. ANEXOS	69

ABREVIATURAS

MP	Microplástico
μm	Micrometro
mm	Milimetro
m	Metro
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
PS	Poliestireno
PE	Polietileno
PET	Tereftalato de polietileno
PUR	Poliuretano
PA	Poliamida
PP	Polipropileno
PVC	Policloruro de polivinilo
PHB	Polihidroxibutirato
PCL	Policaprolactona
MHET	Ácido mono (2-hidroxietil) tereftálico
BHET	Bis (2-hidroxietil)-TPA
TPA	Ácido Tereftalico
EG	Etilenglicol
PCA	Análisis de componentes principales
IAATO	International Association of Antarctica Tour Operators
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
HMM	<i>Hidden Markov model</i> (Modelo oculto de Markov)
COMNAP	Council of Managers of National Antarctic Programs
g	Gramo
ng	Nanograno
μl	Microlitro
pb	Pares de bases
TCA	Ácido tricarbóxico
ATS	<i>Antartic treaty System</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismo de reacción PET Hidrolasa	6
Figura 2	Mecanismo de reacción Poliuretanasas	7
Figura 3	Mecanismo de reacción Alcano Hidroxilasas	8
Figura 4	Mecanismo de reacción de estireno monooxigenasas y estireno oxido isomerasas.	9
Figura 5	Mapa de los distintos sitios de muestreo alrededor de la Península Antártica y las islas circundantes.	17
Figura 6	Mapa de los distintos sitios de muestreo alrededor de la Península Antártica y las islas circundantes. Con sitios cercanos y alejados de asentamientos humanos	31
Figura 7	Gráfico de abundancias promedio de hits por millón de bases encontrados para cada sitio impactado por pingüinos <i>Pygoscelis</i> .	34
Figura 8	Mapa de calor representando la abundancia de los genes que codifican cada enzima relacionada con la degradación de plástico en cada sitio y especie correspondiente.	36
Figura 9	Análisis de componentes principales (PCA) de la abundancia de genes (hits/Mb) que codifican enzimas de degradación de microplásticos.	38
Figura 10	Gráficos de cajas para cada grupo de enzimas representando en eje X los sitios que están cercanos o alejados de asentamientos humanos, mientras que en el eje Y se representa la abundancia de los genes representados en hits/Mb.	39
Figura 11	Gráficos de dispersión para cada grupo de enzimas representando en el eje X la distancia a la que está cada sitio con respecto al asentamiento humano más cercano, mientras que en el eje Y se representa la abundancia de los genes representados en hits/Mb.	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Información geográfica de los sitios de muestreo.	18
Tabla 2	Resumen de los resultados de la secuenciación.	23
Tabla 3	Largo total del ensamblaje de los metagenomas.	25
Tabla 4	Base de datos de enzimas conocidas y parcialmente caracterizadas asociadas con la degradación de plásticos.	27
Tabla 5	Número de secuencias para cada enzima.	29
Tabla 6	Distancia del asentamiento humano más cercano a los sitios de muestreo.	30
Tabla 7	Coefficientes de Spearman correspondiente a cada enzima analizada utilizando todos los sitios en triplicado (n=54) y el promedio de los sitios (n=18).	40

RESUMEN

Cada año crece exponencialmente la producción de plásticos a nivel mundial, ocasionando así un aumento de contaminación por estos polímeros. La degradación de plásticos puede generar microplásticos (MP) y también los MP pueden ser biodegradados por enzimas como alcanohidroxilasas, lipasas, cutinasas, hidrolasas y lacasas. Los MP están distribuidos globalmente contaminando aguas, suelos y aire. Sitios remotos como el continente antártico no están exentos de esta contaminación, ya que gran parte de los MP provienen de actividades antropogénicas desarrolladas en el continente y su presencia afecta diferentes entornos, incluyendo suelos impactados por pingüinos del género *Pygoscelis*. El propósito de este estudio es determinar la abundancia de genes que codifican para enzimas que degradan plásticos en metagenomas asociados a muestras de suelo impactado por pingüinos *Pygoscelis* en la Península Antártica y las islas aledañas. Por ende, se propone buscar genes relacionados con la biodegradación de MP en 54 metagenomas obtenidos desde suelos impactados por pingüinos *Pygoscelis*. Se plantea como hipótesis que la abundancia de genes microbianos relacionados con la biodegradación de MP es mayor en suelos impactados por pingüinos del género *Pygoscelis* cercanos a asentamientos humanos. El objetivo general del proyecto es comparar la abundancia de genes microbianos relacionados con la biodegradación de microplásticos en suelos antárticos impactados por pingüinos *Pygoscelis* cercanos y alejados de asentamientos humanos. Además, se proponen los siguientes objetivos específicos: (1) Detectar los genes microbianos que codifican para enzimas relacionadas con la biodegradación de MP en metagenomas provenientes de suelos impactados por pingüinos *Pygoscelis*; (2) Cuantificar los genes microbianos que codifican para enzimas relacionadas con la biodegradación de MP en metagenomas provenientes

de suelos impactados por pingüinos *Pygoscelis*; (3) Comparar la abundancia de genes microbianos asociados a la degradación de MP entre los metagenomas provenientes de suelos impactados por pingüinos *Pygoscelis* que se encuentran cercanos y alejados de asentamientos humanos. Para la detección de los genes asociados a la biodegradación de MP, se obtuvo como resultado una base de datos que abarca 48 secuencias de genes que codifican enzimas relacionadas con la degradación de MP. Posterior a esto, la búsqueda de los genes en los metagenomas de suelos se realizó por medio de la herramienta BLAST+ v2.9 con la opción blastp contra la base de datos de creación propia. La cuantificación se realizó mediante el programa HMMER y las pruebas estadísticas para las comparaciones propuestas se realizaron en R, utilizando principalmente funciones implementadas en el paquete vegan y graficadas con el paquete ggplot2. Este trabajo revela que se pueden identificar genes que codifican enzimas relacionadas con la degradación de MP en suelos impactados por pingüinos *Pygoscelis*. Se encontró una mayor presencia de genes que codifican enzimas capaces de degradar tereftalato de polietileno (PET) en comparación con genes para otros tipos de plástico, indicando que el PET puede ser más abundante o susceptible a la degradación microbiana. La abundancia de estos genes no está vinculada a la especie de pingüino ni a la proximidad a asentamientos humanos, pero existe una leve correlación negativa entre la distancia a los asentamientos y la abundancia de genes relacionados con la degradación de microplásticos, sugiriendo que los sitios más alejados tienen menor abundancia de estos genes. Otras variables no consideradas en el estudio, como la migración de pingüinos o el turismo, podrían influir en estos resultados.

ABSTRACT

Every year, the production of plastics grows exponentially worldwide, thus causing an increase in pollution from these polymers. The degradation of plastics can generate microplastics (MP), and MP can be biodegraded by enzymes such as alkane-hydroxylases, lipases, cutinases, hydrolases, and laccases. MP are distributed globally, contaminating water, soil, and air. Remote sites such as the Antarctic continent are not exempt from this contamination since a large part of the MP comes from anthropogenic activities carried out on the continent, and its presence affects different environments, including soils impacted by penguins of the genus *Pygoscelis*. The purpose of this study is to determine the abundance of genes that encode plastic-degrading enzymes in metagenomes associated with soil samples impacted by *Pygoscelis* penguins on the Antarctic Peninsula and surrounding islands. Therefore, we propose to search for genes related to MP biodegradation in 54 metagenomes obtained from soils impacted by *Pygoscelis* penguins. It is hypothesized that the abundance of microbial genes related to MP biodegradation is greater in soils impacted by penguins of the genus *Pygoscelis* close to human settlements. The general objective of the project is to compare the abundance of microbial genes related to the biodegradation of MP in Antarctic soils impacted by *Pygoscelis* penguins near and far from human settlements. In addition, the following specific objectives are proposed: (1) Detect microbial genes that encode enzymes related to MP biodegradation in metagenomes from soils impacted by *Pygoscelis* penguins; (2) Quantify the microbial genes that encode enzymes related to MP biodegradation in metagenomes from soils impacted by *Pygoscelis* penguins; (3) Compare the abundance of microbial genes associated with MP degradation between metagenomes from soils impacted by *Pygoscelis* penguins that are close to and far from human settlements., a database

covering 48 gene sequences encoding enzymes related to MP degradation was obtained to detect genes associated with MP biodegradation. After this, the search for genes in the soil metagenomes was carried out using the BLAST+ v2.9 tool with the blastp option against the self-created database. The quantification was carried out using the HMMER programs and the statistical tests for the proposed comparisons were carried out in R, mainly using functions implemented in the vegan package and plotted with the ggplot2 package. This work reveals that genes encoding enzymes related to MP degradation can be identified in soils impacted by *Pygoscelis* penguins. A greater presence of genes encoding enzymes capable of degrading polyethylene terephthalate (PET) was found compared to genes for other types of plastic, indicating that PET may be more abundant or susceptible to microbial degradation. The abundance of these genes is not linked to the penguin species or proximity to human settlements, but there is a slight negative correlation between the distance to settlements and the abundance of genes related to the degradation of microplastics, suggesting that the most distant ones have a lower abundance of these genes. Other variables not considered in the study, such as penguin migration or tourism, could influence these results.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Plásticos y microplásticos

Los plásticos son polímeros orgánicos sintéticos que derivan de la polimerización de monómeros extraídos del petróleo o del gas natural, como el metano (Derraik, 2002; Zavala-Araiza *et al.*, 2015), y se consideran uno de los materiales sintéticos más utilizados, debido a que son ligeros, duraderos, inertes y resistentes a la corrosión (Chae y An, 2018). Estos atributos han llevado al uso extensivo de plásticos en aplicaciones casi inagotables, lo que desencadena que la producción mundial de estos polímeros haya crecido exponencialmente desde la década de 1950, con 400 millones de toneladas producidas en todo el mundo en 2023 (PlasticsEurope, 2023). Sería de esperar que, dada su alta demanda y la gran acumulación, que ocasiona múltiples efectos ambientales, hubiera un mayor reciclaje de plásticos; sin embargo, solo el 21% del plástico se recicla o incinera anualmente (Law, 2017), mientras que el resto se degrada y descompone en pequeños fragmentos conocidos como microplásticos (MP).

Los MP se definen como partículas plásticas con un tamaño de 1 μm a 5 mm, y se pueden clasificar en dos categorías: primarios y secundarios. Los clasificados como primarios se definen como los plásticos fabricados ya con un diámetro inferior a los 5 mm. En cambio, los MP secundarios son los formados a partir de la erosión y el fraccionamiento de los plásticos más grandes (Cole *et al.*, 2011). Se ha demostrado que los MP constituyen el 92,4% de los residuos plásticos, los cuales consisten principalmente en poliestireno (PS), polietileno (PE), polipropileno (PP), tereftalato de polietileno (PET), poliuretano (PUR), poliamida (PA) y cloruro de polivinilo (PVC) (Carr *et al.*, 2016; Santana *et al.*, 2016; Danso *et al.*, 2019).

Los MP se degradan a través de los mismos procesos que descomponen a los macrolásticos, aunque más rápido debido a su mayor proporción de superficie a volumen. Los tres tipos de degradación considerados son mecánicos, químicos y biológicos, estos últimos también conocidos como biodegradación, los cuales en la mayoría de los casos producen una degradación extensa de estas partículas cuando están relacionados de manera simultánea o consecutiva.

1.2 Biodegradación de microplásticos

Pathak y Navneet (2017) describen la biodegradación como el proceso mediante el cual los desechos plásticos se descomponen en productos más pequeños mediante la degradación microbiana. Este proceso procede de la siguiente forma: (1) formación de biopelículas, (2) colonización, (3) biofragmentación, (4) asimilación y (5) mineralización. Para que se desarrollen biopelículas (1), la superficie de una partícula de MP entra en contacto con el agua ambiental, creando condiciones adecuadas para la formación de biopelículas. Los tipos de organismos que forman la biopelícula están determinados principalmente por la química de la biopelícula (Rummel *et al.*, 2017). Posterior a esto, la colonización (2) comienza a lo largo de las grietas superficiales, hoyos y otras hendiduras que fueron creadas por procesos de desgaste mecánicos y químicos (Harrison *et al.*, 2018). Una vez que ha tenido lugar la colonización de la superficie microplástica, los organismos liberan enzimas extracelulares, que descomponen el polímero para formar oligómeros, dímeros o monómeros (3) (Shah *et al.*, 2008). El nombre que se le da a la parte de la superficie colonizada de los microplásticos es la "plastisfera", descrita como una comunidad microbiana que crece en una biopelícula sobre plástico (Zettler *et al.*, 2013). La plastisfera contiene una alta diversidad de microorganismos, como bacterias, algas, hongos y briozoos (Andrady 2011; Zettler *et al.*, 2013). La siguiente etapa, la asimilación (4), sólo

puede continuar si la partícula de plástico original se ha fragmentado a tamaños que permitan el paso de las moléculas al citoplasma microbiano. Una vez que tiene lugar la asimilación, las moléculas se pueden utilizar como fuentes de carbono y energía. El CO₂, H₂O y CH₄ se producen en el paso final de la biodegradación, conocido como mineralización (5) (Corcoran, 2020), la cual puede ocurrir aeróbicamente y producir CO₂ y H₂O, o anaeróbicamente y producir CO₂, H₂O y CH₄ (Shah *et al.*, 2008). La velocidad a la que se produce la degradación depende de varias características del material plástico, como el peso molecular, la cristalinidad, los grupos funcionales y los aditivos.

1.3 Microorganismos presentes en los microplásticos

Los MP constituyen un ambiente ecológico novedoso para los microorganismos al ofrecer apoyo para la colonización y el crecimiento microbiano, al mismo tiempo que sirven como fuente de carbono y/o nitrógeno. Existe una variedad de estudios sobre la biodegradación de MP, los cuales evalúan el potencial de degradación de ciertos plásticos por parte de distintos microorganismos (solos o en consorcios/biopelículas). Por ejemplo, entre algunas de las bacterias que presentan dicha capacidad se encuentran representantes de los géneros *Alcaligenes*, *Amycolatopsis*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Ideonella*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Schlegelella*, *Streptomyces*, *Thermobifida* y *Thermomonospora*, mientras que entre los hongos se encuentran representantes de los géneros *Acremonium*, *Aspergillus*, *Auredosobasidium*, *Claptocarium*, *Fiumicium*, *Cryptocarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhodospiridium*, *Thermoascus* y *Verticillium* (Ghosh *et al.*, 2013, Jaiswal *et al.*, 2020, Kale *et al.*, 2015, Pathak y Navneet 2017, Tiwari *et al.*, 2020, Urbanek *et al.*, 2018 & Yuan *et al.*, 2020). Aunque algunos estudios han demostrado que la comunidad microbiana en el plástico es diferente a la de otras partículas en el mismo

entorno (Kirstein *et al.*, 2016), incluyendo ambientes de agua dulce, marinos y suelos (Amaral-Zettler *et al.*, 2020; Yuan *et al.* 2020; Yang *et al.*, 2022), ciertos grupos microbianos se encuentran consistentemente en el plástico. Dada la novedad de este sustrato en el medio ambiente, es probable que los microorganismos aún se estén adaptando para colonizar y biodegradar plástico (Amaral-Zettler *et al.*, 2020).

La composición bacteriana de la plastisfera se ha estudiado mediante diferentes métodos. Algunos estudios, en los que se han colocado piezas de plástico en el ambiente para estudiar la colonización bacteriana de la plastisfera (De Tender *et al.*, 2017; Oberbeckmann *et al.*, 2016), han demostrado que la composición de las comunidades microbianas cambia gradualmente a lo largo del tiempo. Además, el tipo de muestra (por ejemplo, forma plástica y tipo de polímero), la localización (por ejemplo, puerto, costa, columna de agua o sedimento), la geografía, la estación del año y el tiempo de exposición, son factores que influyen en la formación de biopelículas (De Tender *et al.*, 2017; Oberbeckmann *et al.*, 2016). Los estudios basados en filogenia han permitido conocer la composición de las comunidades microbianas asociadas a estas biopelículas, pero carecen de información sobre su capacidad para la degradación de los polímeros. En otros casos, se recopilaron datos sobre genes que codificaban enzimas relacionadas con la degradación de diferentes tipos de plástico, identificando 16.170 potenciales ortólogos de genes relacionados con la biodegradación de plásticos mediante el análisis de genomas microbianos disponibles públicamente (Gambarini *et al.*, 2021). El plástico con el mayor número de ortólogos potenciales fue el polímero natural polihidroxibutirato (PHB), con 10.969 ortólogos, seguido de los polímeros sintéticos PET y policaprolactona (PCL), con 8.233 y 6.809 ortólogos, respectivamente. Estos genes ortólogos se descubrieron en los genomas de 6.000 especies microbianas, y la confirmación de su

relación con la biodegradación de plásticos aún está pendiente para la mayoría de ellos.

1.4 Enzimas involucradas en la biodegradación de microplásticos

Las enzimas que participan en el proceso de degradación de MP presentan una amplia diversidad, aunque la mayoría de ellas aún carece de una descripción detallada de su mecanismo o de su acción específica frente a los plásticos. A pesar de esta incertidumbre, algunas enzimas muestran un mecanismo bien definido (Othman *et al.*, 2021), donde principalmente estos mecanismos se relacionan con la degradación de algunos tipos de plásticos de origen sintético, como el tereftalato de polietileno (PET), poliuretano (PUR), poliestireno (PS) y polietileno (PE). Estos tipos de plásticos proporcionan una fuente de carbono que resulta beneficiosa para los microorganismos involucrados en el proceso de biodegradación.

1.4.1 PET hidrolasas

Una de las vías de biodegradación más conocidas es la del PET, la cual involucra hidrolasas, como cutinasas y carboxilesterasas (Danso *et al.*, 2019). Entre ellas, las PET hidrolasas de *Thermobifida fusca* (Roth *et al.*, 2014) e *Ideonella sakaiensis* (Yoshida *et al.*, 2016) son las más estudiadas, y se han utilizado como modelos para la búsqueda de nuevos genes bacterianos implicados en la degradación de PET en varios metagenomas terrestres y marítimos (Danso *et al.*, 2018). Este mecanismo involucra a dos enzimas principales (Figura 1). Primero, la PET hidrolasa convierte el PET en ácido mono (2-hidroxietil) tereftálico (MHET), ácido tereftálico (TPA) y bis (2-hidroxietil)-TPA (BHET). En segundo lugar, participa una enzima secundaria conocida como MHETasa, la cual convierte el MHET en TPA y etilenglicol (EG). También se ha evidenciado que la Lipasa B de *Candida antarctica* convierte el BHET en TPA (Carniel *et al.*, 2017). El TPA, por otro lado, puede sufrir una serie de

reacciones, incluida la síntesis de protocatecuato; mientras que el EG puede usarse como precursor en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), ya que se puede convertir en acetato, mediante la acetil-CoA, o en isocitrato.

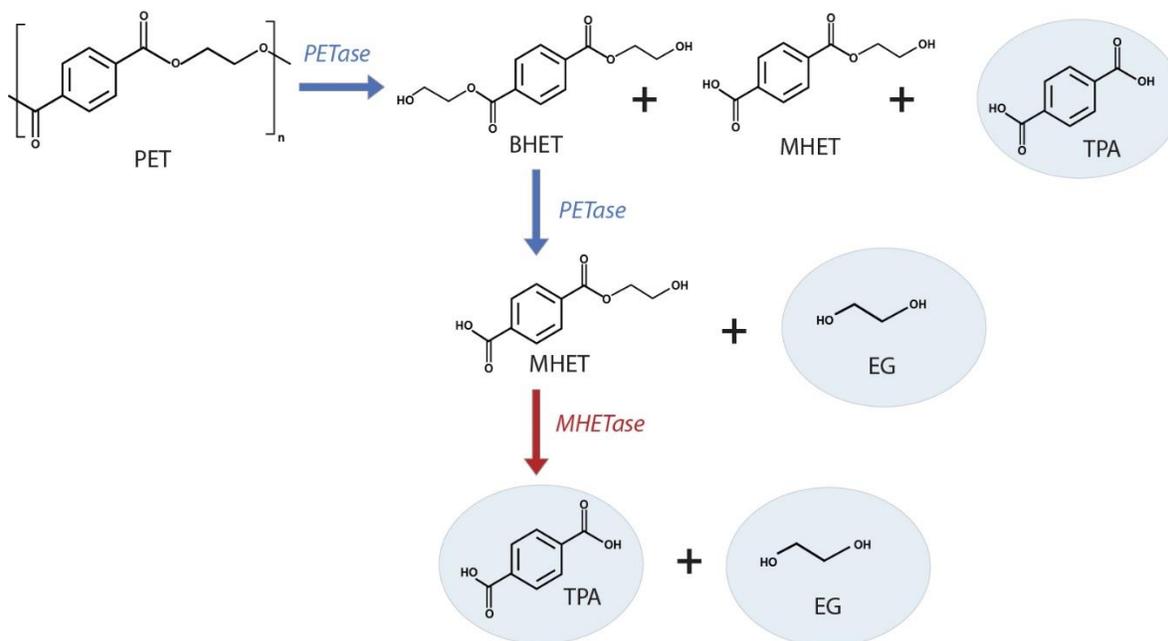


Figura 1. Mecanismo de reacción de la PET hidrolasa, que cataliza la despolimerización del PET en bis(2-hidroxi-etil)-TPA (BHET), mono(2-hidroxi-etil) tereftalato (MHET) y ácido tereftálico (TPA). Por otro lado, la MHETasa convierte el MHET en los monómeros TPA y etilenglicol (EG) como los productos principales de la reacción. Adaptado de Tenchov (2021).

1.4.2 Poliuretanasas

Las poliuretanasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces éster, como el presente en los poliuretanos (Figura 2), descomponiéndolos en productos más simples (do Canto *et al.*, 2019). Algunas de estas enzimas han sido identificadas y caracterizadas, entre ellas PueB y PueA de *Pseudomonas chlororaphis* (Howard, G. T *et al.*, 2001), así como la esterasa PudA de *Comamonas acidovorans* TB-35 (Danso *et al.*, 2019). En 2019, do Canto *et al.* (2019) utilizaron por primera vez una técnica de modelado de homología para analizar la estructura de dos poliuretanasas: PueA y PueB. La estabilidad de estas enzimas se confirmó mediante

simulaciones de dinámica molecular. Las simulaciones de las enzimas en complejos con un monómero de poliuretano demostraron estabilidad estructural, estableciendo así las bases para futuros estudios de las poliuretanasas.

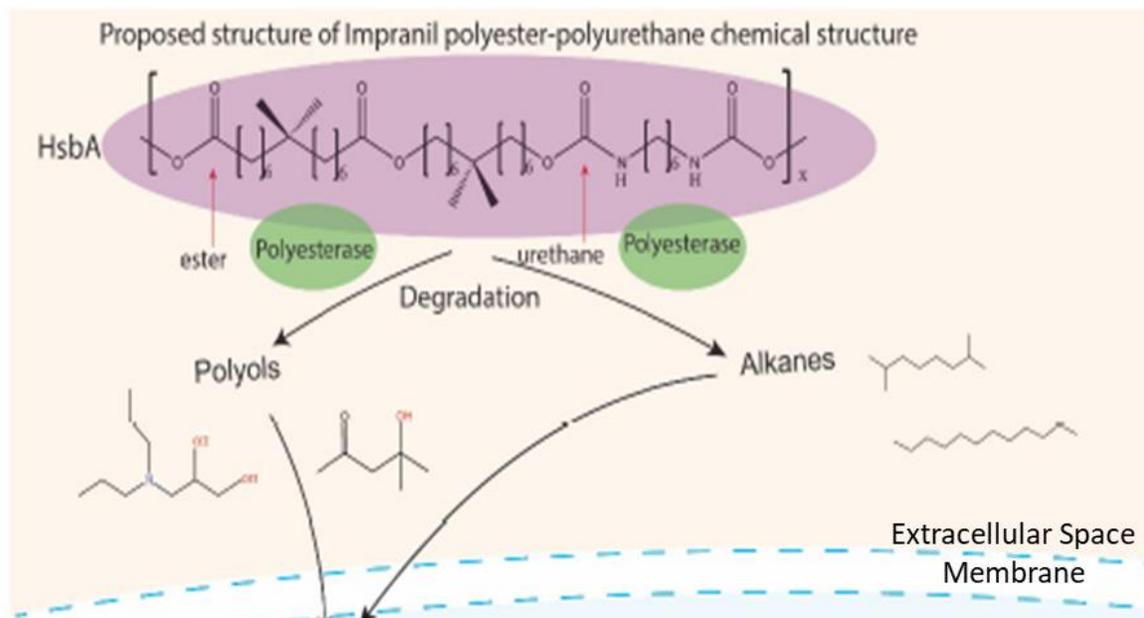


Figura 2. Mecanismo de reacción de las poliuretanasas, las cuales hidrolizan el enlace uretano como también el enlace éster de la estructura. Los productos que ingresan a los microorganismos para la asimilación varían dependiendo de la hidrólisis que se realice. Modificado de Zhang *et al.* (2022).

1.4.3 Alcano hidroxilasas

Las alcano hidroxilasas pertenecientes a la familia AlkB representan una clase esencial de enzimas capaces de descomponer los oligómeros de hidrocarburos mediante procesos de oxidación terminal o biterminal, (Rojo *et al.*, 2010). En particular, la oxidación terminal conlleva una secuencia específica de reacciones que inicia con el ataque selectivo de las alcano hidroxilasas al grupo metilo terminal de los alcanos. Este proceso da lugar a la formación de alcoholes primarios correspondientes, los cuales posteriormente son sometidos a oxidación a través de la acción coordinada de alcohol deshidrogenasas y aldehído deshidrogenasas, generando ácidos grasos como productos intermedios. La transformación

de alcoholes primarios a ácidos grasos marca un paso crucial en la ruta catabólica, ya que estos ácidos grasos se incorporan posteriormente en el proceso de β -oxidación (Figura 3).

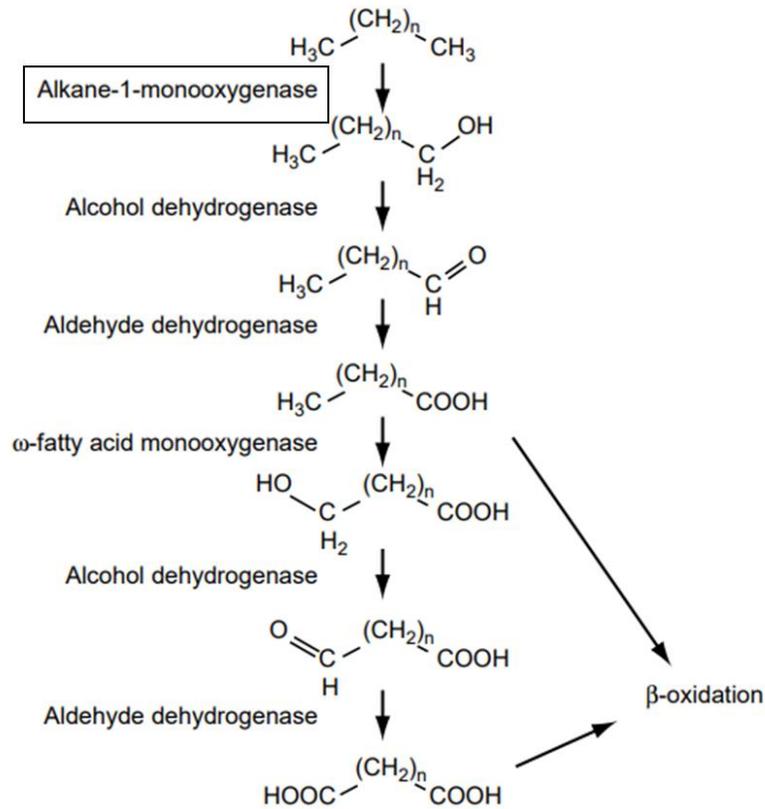


Figura 3. Vías de degradación de alcanos por oxidación terminal y biterminal. La oxidación terminal conlleva una secuencia específica de reacciones que inicia con el ataque selectivo de las alcano hidroxilasas al grupo metilo terminal de los alcanos formando ácidos grasos, que entran en la vía de β -oxidación. Alternativamente, puede tener lugar una ω hidroxilación mediante una monooxygenasa de ácido graso, dando lugar a ácidos dicarboxílicos, para posteriormente terminar en la vía de β -oxidación. Modificado de van Beilen *et al.* (2003).

1.4.4 Estireno monooxigenasas y Estireno óxido isomerasas

Para la degradación del PS, se ha reportado la participación de enzimas como las estireno monooxigenasas (SMO). Este mecanismo (Figura 4) se inicia al degradar el PS por actividad hidrolítica en monómeros de estireno. El monómero de estireno se oxida a óxido de estireno en presencia de estireno monooxigenasa. A continuación, el óxido de

estireno se isomeriza en 3-fenil acetaldehído mediante la isomerasa de óxido de estireno (SOI). Luego, el 3-fenil acetaldehído se convierte en ácido 4-fenilacético mediante la fenilacetaldehído deshidrogenasa. Por último, el ácido 4-fenilacético se convierte en 5-fenilacetil coenzima A en presencia de la enzima fenilacetil coenzima A ligasa. La 5-fenilacetil coenzima A sufre β -oxidación para producir acetil-CoA para el ciclo del TCA (Ho *et al.*, 2018)

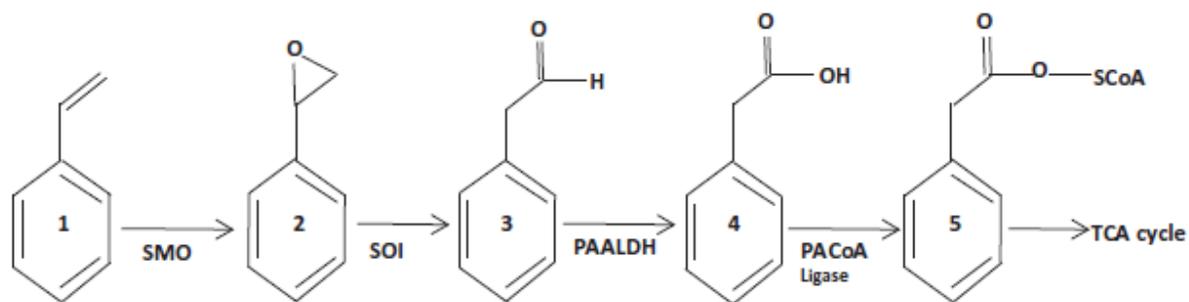


Figura 4. Vía de degradación del estireno. 1: estireno, 2: óxido de estireno, 3: ácido fenil acetaldehído, 4: ácido 4-fenilacético, 5: fenilacetil coenzima A; SMO: estireno monooxigenasa, SOI: estireno óxido isomerasa, PAALDH: fenilacetaldehído deshidrogenasa, PACoA ligasa: fenilacetil coenzima A ligasa. Modificado de Ho *et al.* (2018).

1.5 Distribución de microplásticos

En la actualidad, los MP están distribuidos globalmente contaminando aguas, suelos y ambientes atmosféricos, lo que genera un problema medioambiental a nivel mundial (Mammo *et al.*, 2020). Los MP presentes en los suelos pueden originarse de manera secundaria por la descomposición de productos plásticos más grandes, como, por ejemplo, la disolución de láminas de PE agrícolas, fertilizantes de lodos de aguas residuales contaminados, descargas domésticas, y también de manera primaria mediante la producción de MP propiamente tal (Nizzetto *et al.*, 2016; Mammo *et al.*, 2020). También se han encontrado MP en la atmósfera de diferentes entornos, incluidas áreas suburbanas, urbanas y remotas (Zhang *et al.*, 2020). La presencia de MP en el ambiente

atmosférico fue estudiada por primera vez por Dris *et al.* (2016), quien sugirió que los microplásticos atmosféricos en suspensión pueden ser transportados fácilmente por el viento a lugares distantes. Por último, los MP pueden llegar a los ambientes acuáticos a través de una contaminación deliberada o accidental a través de diversos medios, entre los que destacan: el aire, los ríos y los desechos terrestres (Avio *et al.*, 2017; Andrady, 2011).

1.5.1 Distribución de microplásticos en el continente antártico

Se ha descrito que los MP son ubicuos en todo el mundo en diferentes compartimentos marinos (Bergmann *et al.*, 2017), estando incluso presentes en ambientes remotos como el Océano Austral que rodea la Antártica (Leistenschneider *et al.*, 2021; Waller *et al.*, 2018; Waller *et al.*, 2017). En un principio se consideraba que el Océano Austral estaba relativamente aislado de esta contaminación debido a la Corriente Circumpolar Antártica y los vientos polares del oeste, los cuales obstaculizarían la dispersión pasiva norte-sur del material a la deriva y de la biota (Clarke *et al.*, 2005). Sin embargo, se demostró que la Corriente Circumpolar Antártica no es tan impermeable como se pensaba anteriormente (Fraser *et al.*, 2017; Waller *et al.*, 2017), lo que ocasiona que los MP estén presentes también en la Antártica. De hecho, se han encontrado MP en, al menos, sedimentos de aguas profundas en el Mar de Weddell (Van Cauwenberghe *et al.*, 2013), en agua y sedimentos de lugares cercanos a la costa en el Mar de Ross (Cincinelli *et al.*, 2017 & Munari *et al.*, 2017) y también en muestras de nieve en el continente Antártico (Aves *et al.*, 2022)

1.6 Fuentes de contaminación de microplásticos en Antártica

Los MP en la Antártica pueden provenir tanto de fuentes locales como del transporte a larga distancia. Las fuentes directas de microplásticos al

medio ambiente antártico pueden incluir la fragmentación de equipos de plástico de las estaciones de investigación, la ropa usada por el personal de las bases y los investigadores, la mala gestión de los desechos y la descarga de aguas residuales. Los MP también pueden ingresar al ambiente antártico a través del transporte de largo alcance por las corrientes oceánicas (Fraser *et al.*, 2018), el intercambio océano-atmósfera (Allen *et al.*, 2020) y el transporte atmosférico de corto y largo alcance (Evangelidou *et al.*, 2020).

Teniendo en cuenta estos factores, se atribuye la principal fuente de contaminación por microplásticos al impacto antropogénico generado en la Antártica. Por ejemplo, los más de 100 estaciones de investigación operativas y campamentos locales de los 30 países con presencia en la Antártida enfrentan actualmente problemas de descarga de aguas residuales. En este contexto, la contaminación plástica en las aguas antárticas aumenta paralelamente con la actividad humana (Grondahl *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2008).

Otro factor para considerar es el turismo desarrollado en este continente, ya que, según datos de la Asociación Internacional de Tours Operadores de la Antártica (IAATO), en el período 2022-2023 se presentó un récord histórico de aproximadamente 100 mil personas que viajaron hasta la zona, superando así temporadas anteriores (IAATO, 2023). Este aumento de visitantes conlleva un incremento en la presencia de plásticos, por ejemplo, el desgaste general de la ropa y el equipo exterior utilizado en el distintas zonas puede introducir plásticos en regiones más remotas, alejadas de las bases pobladas. Con respecto a los productos plásticos que se utilizan en las bases antárticas, se incluyen materiales de construcción, banderines, equipos de seguridad, caucho de neumáticos, entre otros que pueden fragmentarse con la exposición ambiental y ser una posible fuente local de MP en el medio ambiente. Además, el aumento

de los flujos de luz ultravioleta debido al agujero de ozono en la Antártica puede acelerar la fragmentación de productos plásticos más grandes en MP (Williamson *et al.*, 2019). A modo de ejemplo, se ha detectado la presencia de MP cerca de la estación de investigación Machu Picchu (Perú) en las Islas Shetland del Sur (Waller *et al.*, 2017) y en la estación de investigación Rothera (Reino Unido) en la Península Antártica (Reed *et al.*, 2018).

1.7 Efectos de los microplásticos en la Antártica

Desde un punto de vista ambiental, se considera a los MP una amenaza emergente para la biota marina (Castañeta *et al.*, 2020; Miller *et al.*, 2020), ya que estos contaminantes pueden interferir con su alimentación, rendimiento reproductivo y supervivencia (Besseling *et al.*, 2013; Gray *et al.*, 2017). Los MP imitan la apariencia de los alimentos, siendo ingeridos por la biota y posiblemente obstruyen y comprometen la fisiología de los organismos (Gall y Thompson, 2015). En Antártica ya se ha reportado la ingesta de alimento por parte de la biota marina, siendo Bergami *et al.*, (2020) los que reportan la primera evidencia de ingesta de plásticos por el colémbolo antártico *Cryptopygus antarcticus*, el cual es considerado un componente común y central de las redes tróficas terrestres antárticas. Por otro lado, en el Océano Austral, las redes tróficas pelágicas, de interés para este estudio, se caracterizan por tener como especies clave a las diatomeas y al krill antártico *Euphausia superba* (De Broyer *et al.*, 2014). Esta última especie puede ingerir MP en el laboratorio y puede fragmentarlos a nanoplásticos (Dawson *et al.*, 2018a; Dawson *et al.*, 2018b), mientras que para las diatomeas se ha observado cierta interacción con los MP (Long *et al.*, 2015). Esto hace que ambas especies jueguen un papel crucial en la transferencia de MP a otros organismos de la red alimentaria del Océano Austral, la cual está dominada por

conexiones directas entre el zooplancton y los peces, las aves y los mamíferos marinos (Murphy *et al.*, 2016; Ergas *et al.*, 2023).

1.8 Pingüinos *Pygoscelis*

Los pingüinos conforman un porcentaje importante de la fauna de aves marinas antárticas (BirdLife International, 2021). Estas aves transfieren nutrientes desde los ecosistemas marinos a los terrestres mediante sus excreciones, restos de presas, huevos y cadáveres, entre otros factores a considerar (Nie *et al.*, 2012; Bokhorst *et al.*, 2007), estructurando mediante esas transferencias la microbiota del suelo (Ramírez-Fernández *et al.*, 2019). La comunidad bacteriana de estos suelos impactados por pingüinos se caracteriza por presentar una alta abundancia de bacterias de la familia *Clostridiaceae* (filo *Firmicutes*) (Guo *et al.* 2018), y de la clase *Flavobacteriia* (filo *Bacteroidetes*) (Ramírez-Fernández *et al.*, 2021), las cuales participan en procesos como la descomposición de la materia orgánica y el ciclado de nutrientes (Tscherko *et al.* 2003, Zdanowski *et al.* 2005).

Los pingüinos del género *Pygoscelis*, compuesto por las especies *P. adeliae*, *P. antarcticus* y *P. papua*, son los más abundantes en la Península Antártica y las islas circundantes. La distribución geográfica de este género es variada y se ve afectada por el cambio climático. Por ejemplo, las poblaciones de las especies *P. adeliae* y *P. antarcticus* han disminuido en la Península Antártica (Dias *et al.*, 2019; Lynch *et al.*, 2012) y, en el caso de *P. adeliae*, han migrado hacia las zonas más frías del continente (Naveen & Humphries, 2019). En cambio, los representantes de la especie *P. papua*, han aumentado en la zona, ya que se beneficiarían por el incremento de las zonas libres de hielo (Clucas *et al.*, 2015; Vianna *et al.*, 2020). Con respecto a la dieta de estos tipos de pingüinos, la literatura indica que la ingesta de krill representa casi la totalidad de su dieta,

aunque también se alimentan de peces en menor medida (Panasiuk *et al.* 2020; Jafari *et al.*, 2021; Tabassum *et al.*, 2022).

1.8.1 Microplásticos en pingüinos *Pygoscelis*

Debido a los hábitos alimenticios de estas aves y que forman parte de la trama trófica del Océano Austral, se ha detectado la presencia de MP en su dieta. Bessa *et al.* (2019) detectó que hasta un 20% de las muestras de excrementos de *P. papua* contenían microplásticos, los que consistían principalmente en fibras y fragmentos de diferentes tamaños y composición de polímeros, entre ellas PS, PE y PET; mientras que Panasiuk *et al.* (2020) observaron algunos fragmentos de desechos plásticos en el contenido estomacal recolectado de pingüinos *P. adeliae*, *P. antarcticus* y *P. papua* en la Isla Rey Jorge (Islas Shetland del Sur). Recientemente, Kim *et al.* (2023), encontraron restos de MP en el estómago de polluelos muertos de *P. papua*, donde los microplásticos correspondían a PE, PET, entre otros. También se ha encontrado la presencia de MP, en particular PE y PS, en muestras de excremento de pingüinos del género *Pygoscelis* de la Península Antártica (Fragão *et al.*, 2021). Este último estudio especula que estas partículas podrían haber sido ingeridas y absorbidas por las aves ya sea por ingestión directa (debido a una identificación errónea del microplástico como alimento) o por ingestión indirecta a través de presas contaminadas (por ejemplo, el krill antártico) o a través del agua.

Dada la importancia de la biodiversidad de la Antártica y el Océano Austral, y las implicaciones que el efecto de los microplásticos tiene sobre la biota marina, es necesario realizar estudios para explorar el potencial de los microorganismos para degradar estos contaminantes. En este proyecto se estudian 54 metagenomas, de los cuales corresponden a 18 sitios impactados por pingüinos del género *Pygoscelis* en triplicado

biológico. En estos metagenomas se buscaron genes de enzimas relacionadas con la biodegradación de MP, específicamente los relacionados a la degradación de PET, PUR, PE y PS, ya que, dada la evidencia, estos plásticos sintéticos son los que se han encontrado en los suelos impactados por *Pygoscelis* y también se compararon las abundancias de estos genes considerando la cercanía a asentamientos humanos, para determinar si la cercanía contribuye a la abundancia de estos genes.

2. HIPÓTESIS

La abundancia de genes microbianos relacionados con la biodegradación de microplásticos en suelos impactados por pingüinos del género *Pygoscelis* aumenta con la cercanía a asentamientos humanos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar la abundancia de genes microbianos asociados a la biodegradación de microplásticos en suelos antárticos impactados por pingüinos *Pygoscelis* y comparar la abundancia de estos genes en sitios cercanos y alejados a asentamientos humanos.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Detectar los genes microbianos que codifican para enzimas relacionadas con la biodegradación de microplásticos en metagenomas provenientes de suelos impactados por pingüinos *Pygoscelis*.

3.2.2. Cuantificar los genes microbianos que codifican para enzimas relacionadas con la biodegradación de microplásticos en metagenomas provenientes de suelos impactados por pingüinos *Pygoscelis*.

3.2.3. Comparar la abundancia de genes microbianos asociados a la degradación de microplásticos entre los metagenomas provenientes de suelos impactados por pingüinos *Pygoscelis* que se encuentran cercanos y alejados de asentamientos humanos.

4. METODOLOGÍA

4.1 Toma de muestras

Las muestras de suelo de las diferentes especies de pingüinos *Pygoscelis* se recolectaron durante los años 2019 y 2020 en distintas localidades de la Península Antártica y las islas aledañas (Figura 5). En la tabla 1, se incluyen los distintos sitios muestreados, donde cada suelo fue recolectado en triplicado biológico procurando una distancia aproximada de un metro entre cada muestra. Se recolectaron un total de 54 muestras, de las cuales seis corresponden a suelo impactados por pingüinos *P. adeliae*, cuatro a *P. antarcticus* y ocho a *P. papua*.

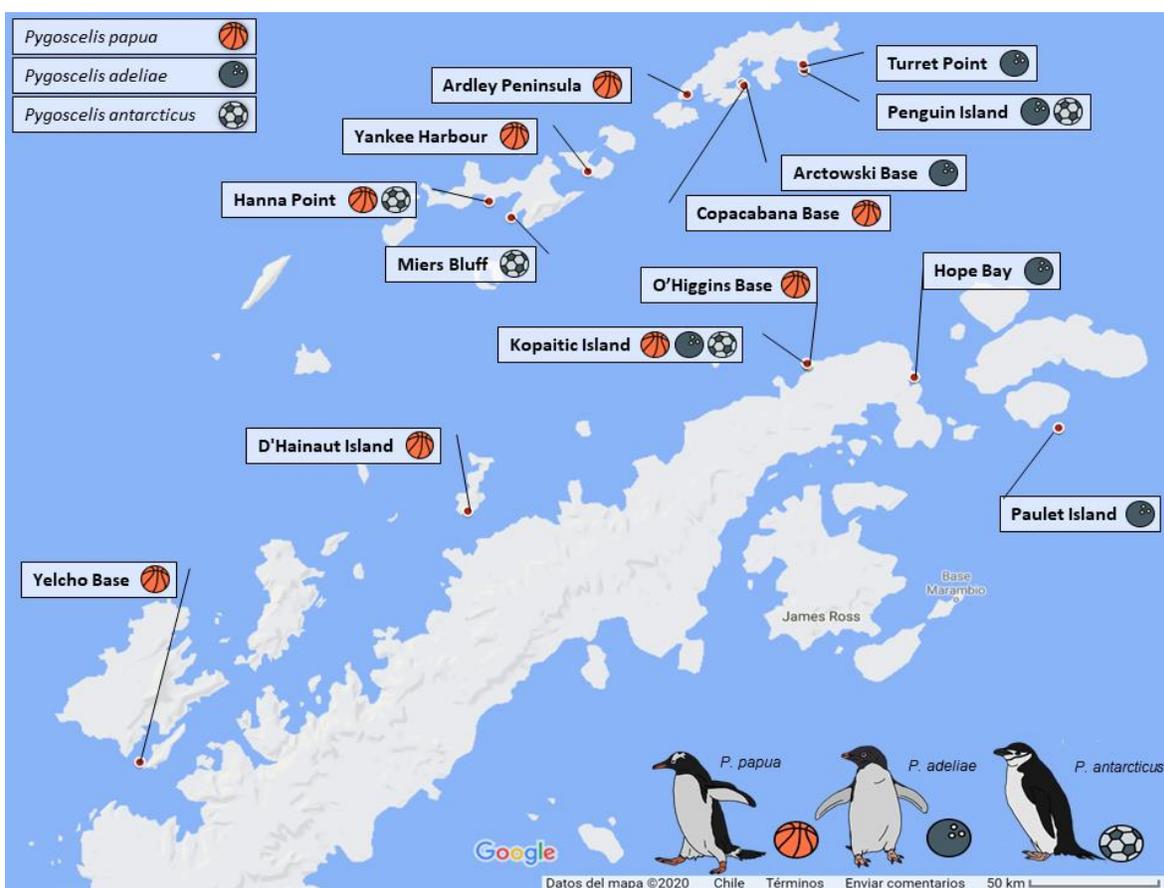


Figura 5. Mapa de los distintos sitios de muestreo alrededor de la Península Antártica y las islas circundantes. Las distintas especies de pingüino *Pygoscelis* están representadas por distintas figuras.

Tabla 1. Información de los sitios de muestreo. Se presentan los códigos de las muestras junto a la especie de pingüinos presentes, el sitio y la región de extracción, la fecha de recolección y la georreferenciación de los sitios.

Muestra	Especie	Sitio	Región	Fecha	Latitud (°)	Longitud (°)
AAB	<i>P. adeliae</i>	Arctowski Base	Admiralty B., King George Island	31-01-19	-62,1628	-58,4617
AHB	<i>P. adeliae</i>	Hope Bay	Trinity P., Antarctic Peninsula	03-02-20	-63,3692	-56,9997
AKI	<i>P. adeliae</i>	Kopaitic (hill S)	Kopaitic Island	26-01-19	-63,3149	-57,9097
APC	<i>P. adeliae</i>	Paulet (coast)	Paulet Island	14-01-19	-63,5727	-55,7733
API	<i>P. adeliae</i>	Penguin Island (coast S)	Penguin Island	12-01-20	-62,1083	-57,9362
ATP	<i>P. adeliae</i>	Turret Point	King George Island	13-01-20	-62,0857	-57,9429
CHP	<i>P. antarcticus</i>	Hanna Point	Livingston Island	10-01-20	-62,654	-60,6114
CKI	<i>P. antarcticus</i>	Kopaitic (coast NE)	Kopaitic Island	26-01-19	-63,3131	-57,9114
CMB	<i>P. antarcticus</i>	Miers Bluff	Livingston Island	10-01-20	-62,7201	-60,4249
CPI	<i>P. antarcticus</i>	Penguin Island (coast S)	Penguin Island	12-01-20	-62,1082	-57,9366
GAP	<i>P. papua</i>	Ardley Peninsula	Fildes P., King George Island	02-02-19	-62,2106	-58,9266
GCB	<i>P. papua</i>	Copacabana Base	Admiralty B., King George Island	03-02-19	-62,1745	-58,4461
GDI	<i>P. papua</i>	D'Hainaut Island	Trinity Island	05-02-20	-63,9035	-60,7899
GHP	<i>P. papua</i>	Hanna Point	Livingston Island	10-01-20	-62,6543	-60,6127
GKI	<i>P. papua</i>	Kopaitic (hill N)	Kopaitic Island	26-01-19	-63,3141	-57,9112
GOC	<i>P. papua</i>	O'Higgins Base (coast)	Covadonga R., Antarctic Peninsula	24-01-19	-63,3206	-57,8983
GYB	<i>P. papua</i>	Yelcho Base	Doumer Island	16-01-19	-64,8757	-63,5798
GYH	<i>P. papua</i>	Yankee Harbour	Greenwich Island	11-01-20	-62,5315	-59,7707

4.2 Extracción de DNA y secuenciación

Se masaron aproximadamente 0,25 g de cada muestra de suelo para la extracción de DNA utilizando el kit PowerSoil™ Plus (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. El DNA se eluyó en 50 µl, a una concentración mayor a 20 ng/µl para su posterior secuenciación. La concentración de DNA se determinó fluorimétricamente mediante Qubit (Invitrogen) y la calidad mediante electroforesis capilar (Agilent TapeStation). Las muestras de DNA fueron secuenciadas por Macrogen Inc. (Corea) utilizando la plataforma Illumina HiSeq2500 en dos carriles con formato de extremos emparejados de 2 x 150 pb. La biblioteca se preparó con el kit TruSeq Nano DNA (Illumina) según las instrucciones del fabricante.

La remoción del adaptador de lecturas cortas y bases de baja calidad se realizaron con fastp (Chen *et al.*, 2018) y el ensamblaje con SPAdes para cada una de las tres réplicas por sitio de muestreo (Bankevich *et al.*, 2020). Posteriormente, los *contigs* se trataron con la herramienta Prodigal v2.6.3 (Hyatt *et al.*, 2010).

4.3 Creación de base de datos

Para evaluar el potencial de degradación de plásticos en los suelos impactados por pingüinos, se compiló un conjunto de enzimas cuya participación en la degradación de plásticos se ha demostrado experimentalmente (Danso *et al.*, 2018; Zrimec *et al.*, 2021) y también se obtuvieron secuencias de bases de datos, tales como National Center for Biotechnology Information (NCBI), UniProt y PlasticDB. Con respecto a la degradación del PET, se buscaron genes relacionados a las PET hidrolasas (EC 3.1.1.101); para la degradación del PE, se buscaron secuencias asociadas a las alcano hidroxilasas (EC 1.14.15.3); para la degradación del PUR, se buscaron enzimas pertenecientes a las

poliuretanasas; y para la degradación del PS, se buscaron secuencias de las estireno monooxigenasas (EC 1.14.14.11) y estireno-óxido isomerasas (EC 5.3.99.7).

4.4 Creación de modelos ocultos de Markov (HMM)

Con la finalidad de obtener una base de datos más amplia, cada base de datos correspondiente a la degradación de cada plástico fue ampliada buscando secuencias homólogas con BLAST+ v2.9 (Altschul *et al.*, 1990) con la función *blastp*, donde el *query* corresponde a la base de datos de creación propia analizada contra la base de datos de UniProt TrEMBL (Uniprot Consortium, 2023), filtrando las secuencias obtenidas con un *e-value* menor a $1e^{-10}$.

Para llevar a cabo el análisis de las secuencias homólogas, se aplicaron diferentes pasos y criterios de filtrado (Zrimec *et al.*, 2021). En primer lugar, se realizó un filtrado a partir de un umbral de similitud del 60% de identidad para asegurar la inclusión de secuencias con suficiente similitud para ser relevantes en el análisis. Luego, estas secuencias se separaron en rangos de 5% de identidad, lo que significa que se agruparon en diferentes categorías según su similitud, por ejemplo 60 hasta menos de 65%, luego desde 65% hasta porcentajes menores que 70%, y así sucesivamente. Cada uno de estos rangos de identidad se sometió a un análisis adicional utilizando el programa CD-HIT (Li & Godzik, 2006; Fu *et al.*, 2012) con representatividad del 95%. Este paso busca reducir la redundancia en el conjunto de datos y seleccionar así *clusters* más representativas de cada rango. Luego, se realizó un alineamiento múltiple de los *clusters* por Clustal Omega v1.2.4 (Sievers & Higgins, 2014), para luego generar los modelos ocultos de markov (HMM), por medio del programa HMMER v3.3 (Eddy, 2020).

4.5 Cuantificación de genes

Los HMM generados fueron sometidos a un análisis adicional utilizando la función 'hmmsearch' del programa HMMER, lo que permite identificar las secuencias homólogas presentes en los ensamblajes de los metagenomas, utilizando los HMM como referencia. Se aplicó un filtro con un valor de *evaluate* menor a 10^{-3} para determinar si un hit se considera válido o no, según lo que se recomienda en el manual del programa (Eddy, 2020). Estos pasos de generación de HMM y búsqueda de secuencias homólogas se repitieron para cada metagenoma (n=54).

La normalización de los genes asociados a la degradación de plásticos se realizó con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Hits}}{\text{Largo total del ensamble para cada sitio}} \times 10^6$$

, donde los hits son los resultados que se obtienen a través del hmmsearch, los cuales se dividen por la longitud total de cada ensamble correspondiente a cada sitio. Para que el resultado de esta división sea más fácil de interpretar, se multiplicó por 1.000.000 para obtener el número de hits por millón de bases en total. La visualización de los resultados se realizó en R v3.5.1, utilizando los paquetes ggplot2 v3.4.4 (Wickham, 2009) y ComplexHeatmaps v2.14 (Gu *et al.*, 2016).

4.6 Datos de asentamientos humanos

Las coordenadas de los asentamientos humanos fueron recolectadas desde el Consejo de Administradores de Programas Antárticos Nacionales (COMNAP), luego las distancias de los asentamientos humanos más cercanos a cada sitio fueron calculadas con el método de Vincenty utilizando el paquete geosphere v1.5 (Hijmans *et al.*, 2017) en R v3.5.1.

4.7 Análisis estadísticos

Las pruebas estadísticas necesarias se realizaron en R v3.5.1, utilizando principalmente funciones implementadas en el paquete *vegan* (Oksanen *et al.*, 2019) y graficadas con el paquete *ggplot2* (Wickham, 2009). Se emplearon distintas pruebas estadísticas para el análisis del conjunto de datos que se tienen en este estudio. En primer lugar, para verificar la normalidad del conjunto de datos de abundancia de genes con las distancias de los sitios se usó la prueba de Shapiro Wilk. Posterior a este análisis y verificando que la distribución de los datos era normal, se realizó la prueba Welch para determinar la significancia de las diferencias entre las variables en estudio. Además, se calculó el coeficiente de correlación de Spearman para realizar correlaciones entre la abundancia de cada gen de interés en las muestras de suelo impactadas por los pingüinos y la distancia a asentamientos humanos. Dado que puede existir una relación significativa incluso si los coeficientes de correlación son cercanos a cero, se examinaron los diagramas de dispersión, generados con el paquete *ggplot2* (Wickham, 2009) de R v3.5.1, para determinar la forma de la relación de las variables analizadas.

5. RESULTADOS

5.1 Secuenciación de los metagenomas

Como resultado de la secuenciación de los metagenomas, en primer lugar, se obtuvieron valores estadísticos de los datos sin procesar (Tabla 2), como el total de bases, el total de lecturas, los porcentajes GC y AT, y también los términos Q20 y Q30, que se utilizan para evaluar la calidad de los datos generados durante el proceso de secuenciación. En promedio, el número total de bases es de 9.512.135.704 y el total de lecturas de 62.994.276, mientras que el promedio para Q20 y Q30 es de 97% y 92%, respectivamente.

Tabla 2. Resumen de los resultados de la secuenciación.

Sitio	Total bases (bp)	Total lecturas	GC (%)	AT (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
APC1	9.889.047.984	65.490.384	57,03	42,97	96,19	90,44
APC2	10.007.431.682	66.274.382	58,84	41,16	97,21	92,97
APC3	9.925.909.802	65.734.502	55,04	44,96	95,68	89,33
GYB1	9.825.595.368	65.070.168	50,88	49,12	95,89	89,52
GYB2	9.457.631.622	62.633.322	48,57	51,43	97,61	93,23
GYB3	9.759.857.518	64.634.818	53,04	46,96	95,80	89,53
GOC1	8.796.413.192	58.254.392	51,63	48,37	97,06	92,71
GOC2	9.426.885.908	62.429.708	49,42	50,58	96,97	92,45
GOC3	9.145.069.172	60.563.372	51,04	48,96	96,40	91,58
AKI1	8.698.166.250	57.603.750	51,20	48,80	96,74	92,17
AKI2	10.040.061.876	66.490.476	53,71	46,29	97,68	93,50
AKI3	9.943.360.268	65.850.068	55,68	44,32	96,80	92,44
CKI1	9.228.963.564	61.118.964	50,70	49,30	97,25	92,94
CKI2	9.209.278.298	60.988.598	53,47	46,53	97,11	92,13
CKI3	9.765.857.654	64.674.554	52,59	47,41	97,03	92,65
GKI1	9.370.109.002	62.053.702	51,25	48,75	96,92	92,43
GKI2	9.931.664.714	65.772.614	48,44	51,56	97,16	92,80
GKI3	9.780.157.656	64.769.256	48,19	51,81	96,75	92,09
AAB1	9.414.286.166	62.346.266	38,33	61,67	96,75	90,92
AAB2	9.211.263.646	61.001.746	56,68	43,32	97,20	92,98
AAB3	9.455.383.232	62.618.432	58,05	41,95	96,66	92,33
GAP1	9.373.699.782	62.077.482	52,70	47,30	96,04	90,69

GAP2	9.373.679.850	62.077.350	56,74	43,26	97,30	92,58
GAP3	9.932.042.214	65.775.114	57,38	42,62	97,44	93,10
GCB1	9.464.867.542	62.681.242	46,42	53,58	96,68	91,28
GCB2	8.814.181.966	58.372.066	41,82	58,18	97,61	93,01
GCB3	9.353.296.964	61.942.364	42,02	57,98	96,50	90,77
CMB1	9.841.044.178	65.172.478	49,73	50,27	96,94	92,28
CMB2	9.229.714.638	61.123.938	49,24	50,76	96,63	91,78
CMB3	9.435.297.212	62.485.412	48,10	51,90	96,83	92,10
CHP1	9.744.850.534	64.535.434	51,41	48,59	96,55	91,99
CHP2	9.893.069.416	65.517.016	46,05	53,95	96,91	91,56
CHP3	9.511.634.054	62.990.954	44,19	55,81	96,37	90,53
GHP1	10.061.871.410	66.634.910	39,18	60,82	96,19	89,98
GHP2	9.380.123.020	62.120.020	42,22	57,78	96,78	91,98
GHP3	9.668.176.962	64.027.662	43,07	56,93	97,36	92,88
GYH1	9.782.081.396	64.781.996	54,93	45,07	96,67	92,06
GYH2	9.600.512.654	63.579.554	55,32	44,68	97,12	92,94
GYH3	9.504.878.918	62.946.218	58,96	41,04	97,11	92,93
API1	9.688.364.756	64.161.356	56,65	43,35	97,15	92,96
API2	9.500.459.148	62.916.948	56,94	43,06	96,91	92,63
API3	8.864.215.212	58.703.412	47,99	52,01	96,78	92,14
CPI1	8.125.034.576	53.808.176	46,79	53,21	97,04	92,37
CPI2	9.670.065.066	64.040.166	43,55	56,45	95,98	89,69
CPI3	9.380.493.876	62.122.476	51,67	48,33	96,66	91,85
ATP1	9.473.630.978	62.739.278	42,40	57,60	96,73	91,25
ATP2	8.567.436.792	56.737.992	40,32	59,68	97,01	92,29
ATP3	9.316.538.732	61.698.932	39,83	60,17	96,76	91,17
AHB1	9.940.572.204	65.831.604	42,95	57,05	96,17	89,98
AHB2	9.465.066.560	62.682.560	43,81	56,19	96,74	91,30
AHB3	9.647.700.758	63.892.058	45,48	54,52	97,17	92,63
GDI1	9.907.497.466	65.612.566	56,83	43,17	96,98	91,94
GDI2	9.862.233.102	65.312.802	52,80	47,20	96,88	91,81
GDI3	9.998.601.504	66.215.904	55,52	44,48	96,47	91,09
Promedio	9.512.135.704	62.994.276	50	50	97	92

GC (%): Contenido GC, AT (%): Contenido AT, Q20(%): Proporción de bases que tienen un puntaje de calidad de phred superior a 20, Q30(%): Proporción de bases que tienen un puntaje de calidad de phred superior a 30.

En la Tabla 3, se muestra el largo total del ensamblaje para cada metagenoma, valor que luego es utilizado para la normalización de la cuantificación de genes.

Tabla 3. Largo total del ensamble de los metagenomas.

Muestra	Largo ensamble (pb)
AAB1	333.612.115
AAB2	474.353.808
AAB3	367.812.495
AHB1	338.592.847
AHB2	297.236.832
AHB3	463.666.805
AKI1	625.860.252
AKI2	622.296.351
AKI3	612.493.270
APC1	557.562.497
APC2	621.924.683
APC3	437.930.378
API1	491.406.332
API2	413.398.447
API3	496.918.413
ATP1	325.075.221
ATP2	439.626.228
ATP3	273.951.492
CHP1	607.048.697
CHP2	353.466.773
CHP3	439.756.622
CKI1	611.710.938
CKI2	351.641.180
CKI3	632.968.110
CMB1	602.620.563
CMB2	533.916.433
CMB3	605.111.510
CPI1	527.864.301
CPI2	481.436.820
CPI3	581.526.382
GAP1	622.620.175
GAP2	532.076.622
GAP3	438.341.373
GCB1	338.961.103
GCB2	365.740.079
GCB3	413.763.780
GDI1	602.683.017
GDI2	496.388.067
GDI3	597.204.799

GHP1	438.648.769
GHP2	552.942.425
GHP3	582.739.304
GKI1	737.275.718
GKI2	736.741.445
GKI3	681.127.298
GOC1	678.276.919
GOC2	479.100.766
GOC3	622.437.536
GYB1	424.543.150
GYB2	502.580.446
GYB3	445.013.045
GYH1	477.451.545
GYH2	599.311.083
GYH3	572.920.113

5.2 Creación de base de datos

La base de datos creada para la búsqueda de genes incluye un total de 48 secuencias que representan PET hidrolasas, alcano hidroxilasas, poliuretanasas, estireno monooxigenasas y estireno óxido isomerasas (Tabla 4). Para las PET hidrolasas, se seleccionaron 16 secuencias, siendo un gran porcentaje de ellas relacionadas al filo *Actinobacteria*; además, se encontraron secuencias relacionadas a los filos *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*, y dos secuencias que aún no se han asignado a un filo específico. Para las poliuretanasas, se seleccionaron siete secuencias codificantes de enzimas conocidas para la degradación del PUR, todas relacionadas con bacterias del filo *Proteobacteria*. Con respecto a la degradación del PE, se escogieron nueve secuencias correspondientes a alcano hidroxilasas relacionadas con los filos *Actinobacteria* y *Proteobacteria*. Y, por último, para el PS, se incluyeron nueve secuencias conocidas relacionadas con las estireno monooxigenasas, relacionadas con *Actinobacteria* y *Proteobacteria*; y siete secuencias conocidas

relacionadas con las estireno óxido isomerasas, asociadas a los filos *Actinobacteria* y *Proteobacteria*.

Tabla 4. Base de datos de enzimas conocidas y parcialmente caracterizadas asociadas con la degradación de plásticos.

Enzima	ID	Organismo	Gen	Fuente
PET Hidrolasas	D4Q9N1	<i>Thermobifida alba</i>	<i>est1</i>	Hu <i>et al.</i> , 2010
	E9LVH9	<i>Thermobifida cellulosilytica</i>	<i>cut2</i>	Herrero Acero <i>et al.</i> , 2013
	F7IX06	<i>Thermobifida alba</i>	<i>est2</i>	Hu <i>et al.</i> , 2010
	G8GER6	<i>Thermobifida fusca</i>	<i>cut_1</i>	Hegde <i>et al.</i> , 2013
	E9LVH8	<i>Thermobifida cellulosilytica</i>	<i>cut1</i>	Herrero Acero <i>et al.</i> , 2013
	Q47RJ6	<i>Thermobifida fusca</i>	<i>TfH</i>	Silva <i>et al.</i> , 2011
	Q6A0I4	<i>Thermobifida fusca</i>	<i>cut2</i>	Chen <i>et al.</i> , 2008
	Q47RJ7	<i>Thermobifida fusca</i>	N.D.	Then <i>et al.</i> , 2015
	W0TJ64	<i>Saccharomonospora viridis</i>	<i>cut190</i>	Kawai <i>et al.</i> , 2014
	WP039353427	<i>Kaistella jeonii</i>	<i>PET30</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2022
	WP111881932	<i>Aequorivita sp.</i>	<i>PET27</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2022
	A0A0K8P6T7	<i>Ideonella sakaiensis</i>	<i>ISF6_4831</i>	Yoshida <i>et al.</i> 2016
	R4YKL9	<i>Oleispira antarctica RB-8</i>	<i>lipA</i>	Danso <i>et al.</i> , 2018
	A0A0G3BI90	<i>Polyangium brachysporum</i>	N.D.	Danso <i>et al.</i> , 2018
	G9BY57	No identificado	N.D.	Sulaiman <i>et al.</i> , 2012
C3RYL0	No identificado	<i>lipIAF5-2</i>	Danso <i>et al.</i> , 2018	
Poliuretanasas	Q9X3C0	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>pueA</i>	Stern <i>et al.</i> , 2000
	Q9R9H2	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>pueB</i>	Howard <i>et al.</i> , 2001
	A1Z374	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>pueA</i>	Howard <i>et al.</i> , 2007

	Q9LAB9	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>pulA</i>	Vega <i>et al.</i> , 1999
	Q4KBS6	<i>Pseudomonas protegens Pf-5</i>	<i>pueA</i>	Hung <i>et al.</i> , 2016
	Q4KBS3	<i>Pseudomonas protegens Pf-5</i>	<i>pueB</i>	Hung <i>et al.</i> , 2016
	Q9WX47	<i>Comamonas acidovorans TB-35</i>	<i>pudA</i>	Nomura <i>et al.</i> , 1998
Alcano hidroxilasas	A0A3G2VUJ0	<i>Paenibacillus sp.</i>	<i>alkB</i>	Bardaji <i>et al.</i> , 2019
	A0A1L4AAB5	<i>Pseudomonas aeruginosa E7</i>	<i>RubB</i>	Jeon & Kim 2015
	I7AVB4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>alkB1</i>	Heera <i>et al.</i> , 2012
	Q9I0R2	<i>Pseudomonas aeruginosa PAO1</i>	<i>alkB1</i>	Marin <i>et al.</i> , 2003
	C0ZWY5	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	<i>alkB</i>	Takarada <i>et al.</i> , 2005
	P12691	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	<i>alkB</i>	Kok <i>et al.</i> , 1989
	Q0VKZ3	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	<i>alkB1</i>	Zadjelovic <i>et al.</i> , 2020
	WP_240687430.1	<i>Alcanivorax sp. 24</i>	<i>alkB</i>	Zadjelovic <i>et al.</i> , 2022
	Q6H941	<i>Pseudomonas aeruginosa PAO1</i>	<i>alkB2</i>	Marin <i>et al.</i> , 2003
	Estireno mono-oxigenasas	O06834	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>styA</i>
O50214		<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>styA</i>	Panke <i>et al.</i> , 1998
A0A076JVU4		<i>Rhodococcus opacus</i>	<i>styA</i>	Oelschlägel <i>et al.</i> , 2014
G3XEX5		<i>Rhodococcus sp. ST-5</i>	<i>styA</i>	Toda & Itoh 2012
G3XEX2		<i>Rhodococcus sp. ST-10</i>	<i>styA</i>	Toda & Itoh 2012
A0A0A7PAQ5		<i>Sphingopyxis fribergensis</i>	<i>styA</i>	Oelschlägel <i>et al.</i> , 2015
C7ACG1		<i>Rhodococcus opacus</i>	<i>styA2B</i>	Tischler <i>et al.</i> , 2009
AZN65426		<i>Acinetobacter johnsonii</i>	<i>alkB</i>	Kim <i>et al.</i> , 2021
Q0H7E8		<i>Pseudomonas putida</i>	<i>styA</i>	Park <i>et al.</i> , 2006
Estireno óxido isomerasas		O06836	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>styC</i>
	A0A076JZC7	<i>Rhodococcus opacus</i>	<i>styC2</i>	Oelschlägel <i>et al.</i> , 2014
	A0A076JZD2	<i>Rhodococcus sp. 5.3_2_1</i>	<i>styC</i>	Oelschlägel <i>et al.</i> , 2014
	A0A076K0M9	<i>Sphingopyxis fribergensis</i>	<i>styC</i>	Oelschlägel <i>et al.</i> , 2015

A0A076JZU4	<i>Rhodococcus opacus</i>	<i>styC</i>	Oelschlägel <i>et al.</i> , 2014
BAL04134.1	<i>Rhodococcus</i> <i>ST-5</i>	<i>sp. styC</i>	Toda & Itoh 2012
Q0H7E6	<i>Pseudomonas</i> <i>putida</i>	<i>styC</i>	Park <i>et al.</i> , 2006

N.D.: no determinado.

5.3 Generación de secuencias homólogas

Para la base de datos relacionada a las PET hidrolasas se obtuvieron 8.000 secuencias homólogas; para los modelos de poliuretanasas se obtuvieron 4.406 secuencias; para las alcanos hidroxilasas que degradan PE 4.503 secuencias; y para las enzimas que degradan el PS son 4.500 secuencias para las estireno monooxigenasas (SMO) y 1.128 secuencias para las estireno óxido isomerasas (SOI). Posterior a estos resultados, se aplicó el filtro a las secuencias otorgadas por blastp para obtener secuencias con identidad de secuencia aminoacídica mayor al 60%. Posterior a este filtro, las secuencias para PET hidrolasas fueron 4.070, para las poliuretanasas 1.835, para las alcanos hidroxilasas 2.118, para las SMO son 590 y para las SOI 70 secuencias. Luego, a estas secuencias se les aplicó la herramienta CD-HIT, obteniendo para las PET hidrolasas 658 clusters, para las poliuretanasas 259 clusters, para AlkB 536 clusters, para SMO 179 clusters y para SOI 45 clusters (Tabla 5).

Tabla 5. Número de secuencias para cada enzima.

Enzima	B.D.	BLAST+	B.60%	CD-HIT
PET hidrolasas	16	8.000	4.070	658
Poliuretanasas	7	4.406	1.835	259
AlkB	9	4.503	2.118	536
SMO	9	4.500	590	179
SOI	7	1.128	70	45

B.D.: Base de datos de creación propia, B.60%: BLAST+ con porcentaje de identidad mayor a 60% de identidad en secuencias aminoacídicas. AlkB: alcanos hidroxilasas, SMO: estireno monooxigenasas, SOI: estireno óxido isomerasas.

5.4 Distancia de los asentamientos humanos a los sitios de muestreo

Las coordenadas obtenidas desde la CONMAP asociadas a asentamientos humanos relacionados con los sitios de muestreo se utilizaron para el cálculo de las distancias. Se calculó la distancia de los sitios de muestreo hacia cada uno de los asentamientos humanos y luego a cada muestra se le asignó el asentamiento con la menor distancia. Los sitios de muestreo se clasificaron como cercanos a un asentamiento humano si la distancia es menor a 5.000 metros y como lejanos si la distancia es sobre los 5.000 metros. De esta manera, los 18 sitios se separan en 9 cercanos y 9 lejanos (Tabla 6, Figura 6).

Tabla 6. Distancia del asentamiento humano más cercano a los sitios de muestreo.

Muestra	Especie	Sitio	Distancia (m)	Cercanía
GOC	<i>P. papua</i>	Base O'Higgins	7,5	Cercano
GYB	<i>P. papua</i>	Base Yelcho	191	Cercano
GAP	<i>P. papua</i>	Península Ardley	427	Cercano
AAB	<i>P. adeliae</i>	Base Arctowski	693	Cercano
AKI	<i>P. adeliae</i>	Isla Kopaitic colina S	818	Cercano
GKI	<i>P. papua</i>	Isla Kopaitic colina N	934	Cercano
CKI	<i>P. antarcticus</i>	Isla Kopaitic costa NE	1.034	Cercano
GCB	<i>P. papua</i>	Base Copacabana	2.169	Cercano
AHB	<i>P. adeliae</i>	Bahía Esperanza	3.095	Cercano
CMB	<i>P. antarcticus</i>	Miers Bluff	6.593	Lejano
GYH	<i>P. papua</i>	Puerto Yankee	8.066	Lejano
CHP	<i>P. antarcticus</i>	Punta Hanna	11.493	Lejano
GHP	<i>P. papua</i>	Punta Hanna	11.556	Lejano
ATP	<i>P. adeliae</i>	Punta Turret	23.817	Lejano
CPI	<i>P. antarcticus</i>	Isla Pingüino costa S	23.980	Lejano
API	<i>P. adeliae</i>	Isla Pingüino costa S	24.000	Lejano
APC	<i>P. adeliae</i>	Isla Paulet	25.088	Lejano
GDI	<i>P. papua</i>	Isla D'Hainaut	29.257	Lejano

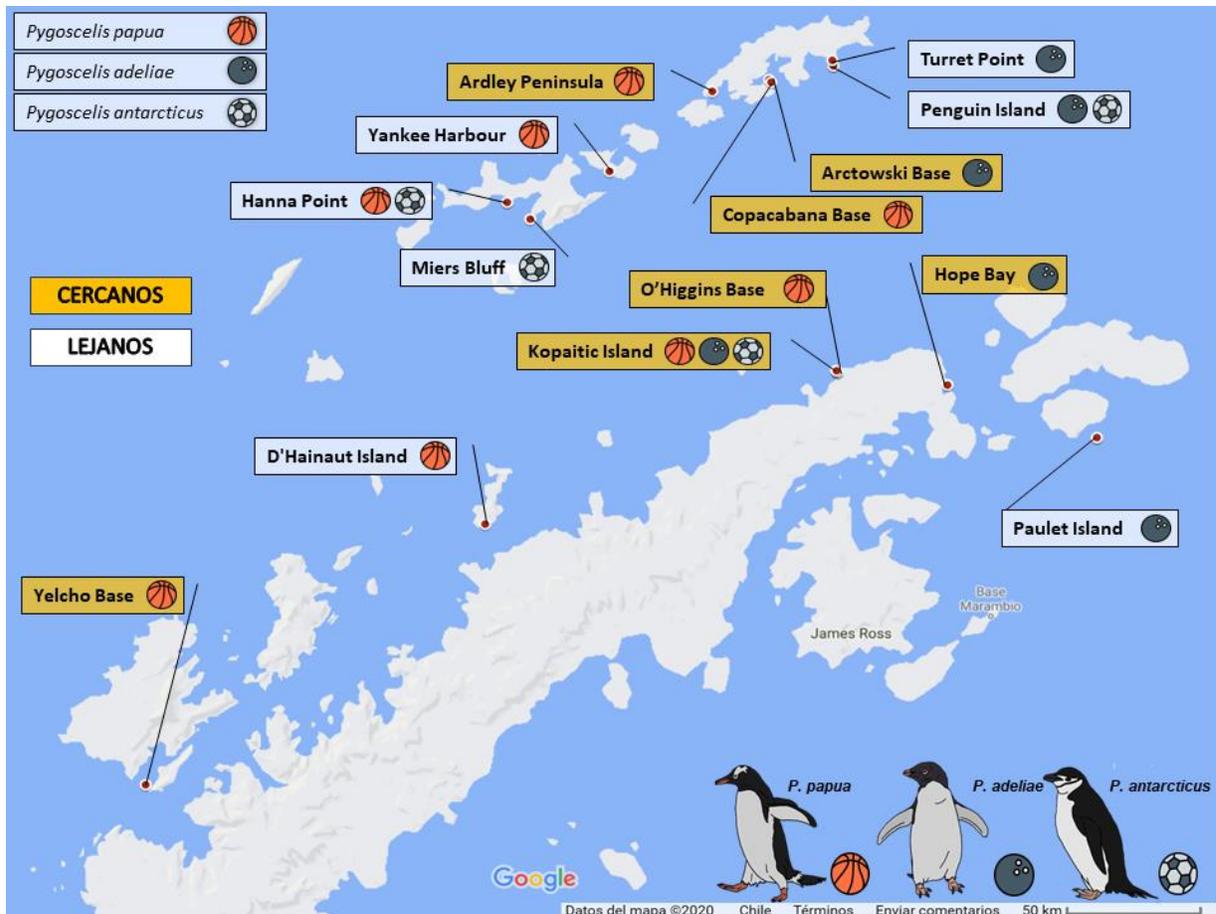


Figura 6. Mapa de los distintos sitios de muestreo alrededor de la Península Antártica y las islas circundantes. Se señalan los sitios que se encuentran cercanos a algún asentamiento humano (amarillo), como también los que se encuentran alejados de algún asentamiento humano (blanco). Las distintas especies de pingüino *Pygoscelis* están representadas por distintas figuras.

5.5 Cuantificación de genes

Se cuantificaron los genes relacionados con la degradación de plásticos en los 18 metagenomas correspondientes a suelos impactados por *P. adeliae* (triplicados obtenidos desde los seis sitios AAB, AHB, AKI, APC, API y ATP), de los 12 metagenomas de suelos impactados por *P. antarcticus* (triplicados obtenidos desde los cuatro sitios CHP, CKI, CMB y CPI) y los 24 metagenomas de los suelos impactados por *P. papua* (triplicados obtenidos desde los ocho sitios GAP, GCB, GDI, GHP, GKI,

GOC, GYB y GYH). El número de hits por muestra fue normalizado y calculado como hits por Mb (hits por millón de bases).

Los genes relacionados con las PET hidrolasas, considerando todos los sitios, variaron desde 97 hasta 976 hits, dependiendo del suelo estudiado; cuando estos resultados son normalizados se presenta una variación de 0,29 hits/Mb hasta 1,4 hits/Mb. Los sitios con una mayor frecuencia promedio de hits por millón de bases corresponden a los sitios GKI, API y CMB. De estos, solo GKI pertenece a un sitio que está cercano a un asentamiento humano, a diferencia de API y CMB, que son sitios que son alejados a algún asentamiento humano (Figura 7A).

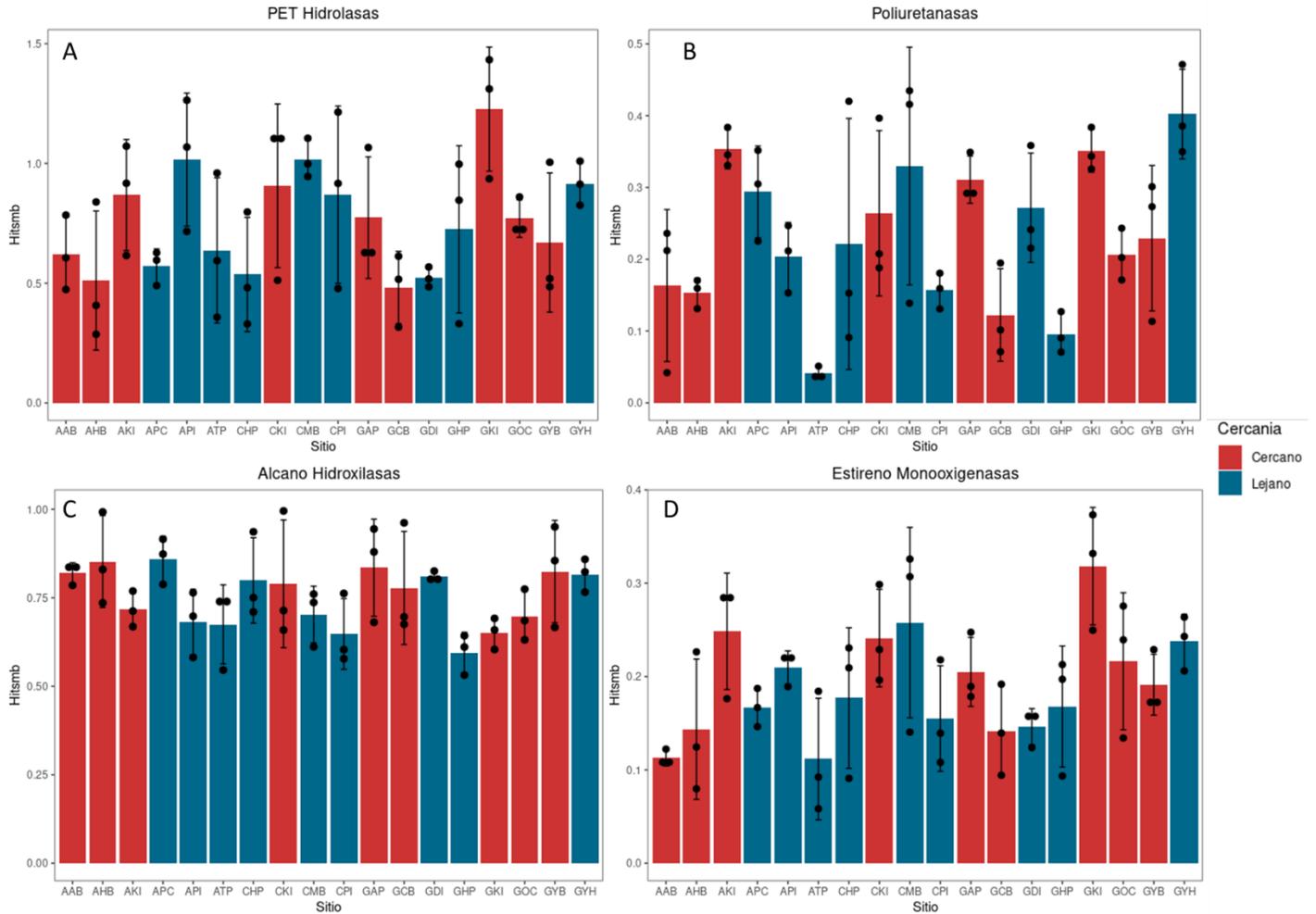
El análisis correspondiente a las poliuretanasas presenta una variación desde los 12 hasta 283 hits, mientras que con su respectiva normalización los valores van desde 0,04 hits/Mb hasta 0,5 hits/Mb. Los sitios con un mayor promedio de hits/Mb corresponden a los sitios de GYH, GKI y AKI. Donde GYH, corresponde a un sitio que se considera alejado de asentamientos humanos, mientras que GKI y AKI son considerados sitios cercanos a asentamientos humanos (Figura 7B). Al igual que para los resultados de las PET hidrolasas, se observan distintas frecuencias para cada sitio.

Los análisis para las alcanos hidroxilasas muestran que los hits van desde los 202 hasta los 510, mientras que los datos normalizados varían desde 0,5 hits/Mb hasta 1,0 hits/Mb, donde los sitios que presentan un mayor promedio de hits/Mb corresponden a los sitios APC, AHB y GAP. Solo APC corresponde a un sitio alejado de asentamientos humanos, mientras que AHB y GAP, son considerados sitios que están cercanos a asentamientos humanos (Figura 7C). A diferencia de los otros resultados, la normalización de los hits muestra valores similares entre los diferentes sitios.

Los resultados para las estireno monooxigenasas indican la presencia mínima de 16 hits, hasta un máximo de 275 hits para todos los sitios. Con la normalización de los resultados, se determinó un promedio mínimo de 0,05 hits/Mb y un máximo de 0,4 hits/Mb. Los sitios que presentan un mayor promedio de hits/Mb corresponden a los sitios GKI, CMB y AKI (Figura 7D), donde GKI y AKI corresponden a sitios cercanos a asentamientos humanos, mientras que CMB es considerado un sitio que está alejado de asentamientos humanos.

Con respecto a los análisis correspondientes a las enzimas estireno óxido isomerasas, en ningún sitio se encontraron hits para generar la respectiva normalización, por lo tanto, en los resultados siguientes solo se van a analizar los resultados para las cuatro enzimas descritas en la Figura 7 en este tipo de suelos.

En la Figura A1 en anexos, se observan estos mismos gráficos de barra, pero coloreados para las distintas especies de pingüinos (*P. adeliae*, *P. antarcticus*, *P. papua*), no observándose ninguna tendencia de que alguna muestra impactada por las especies tenga mayor promedio de hits/Mb.



Los datos de abundancia también se muestran en un mapa de calor (Figura 8), en el cual los hits por millón de bases (hits/Mb) fueron normalizados considerando la desviación específica de la cuantificación de cada enzima para cada muestra de suelo. Además, para cada muestra se indica la especie de pingüino y su correspondiente cercanía a algún asentamiento humano. Los resultados revelan una mayor abundancia de

hits/Mb para las PET hidrolasas. Esta tendencia se evidencia en varios sitios, donde también abundan las Poliuretanasas y las estireno monooxigenasas. En contraste, la presencia de las alcanos hidroxilasas varía en distintos sitios, con una tendencia opuesta a las otras enzimas. Es relevante señalar que, para las diferentes especies de *Pygoscelis*, se observa una variación en la abundancia de hits/Mb; por ejemplo, algunos suelos impactados por una especie de pingüinos no presentan genes relacionados con la degradación, mientras que otro sitio impactado por la misma especie sí exhibe genes asociados a alguna degradación. Por otro lado, el mapa de calor muestra que la clasificación por distancia al asentamiento humano más cercano también varía y no presenta una tendencia clara; por ejemplo, hay sitios cercanos que presentan una alta abundancia para tres enzimas, pero no presentan una alta abundancia para otra enzima. Además, hay sitios que se consideran alejados de asentamientos humanos que presentan una mayor abundancia de enzimas que algunos sitios que se consideran cercanos.

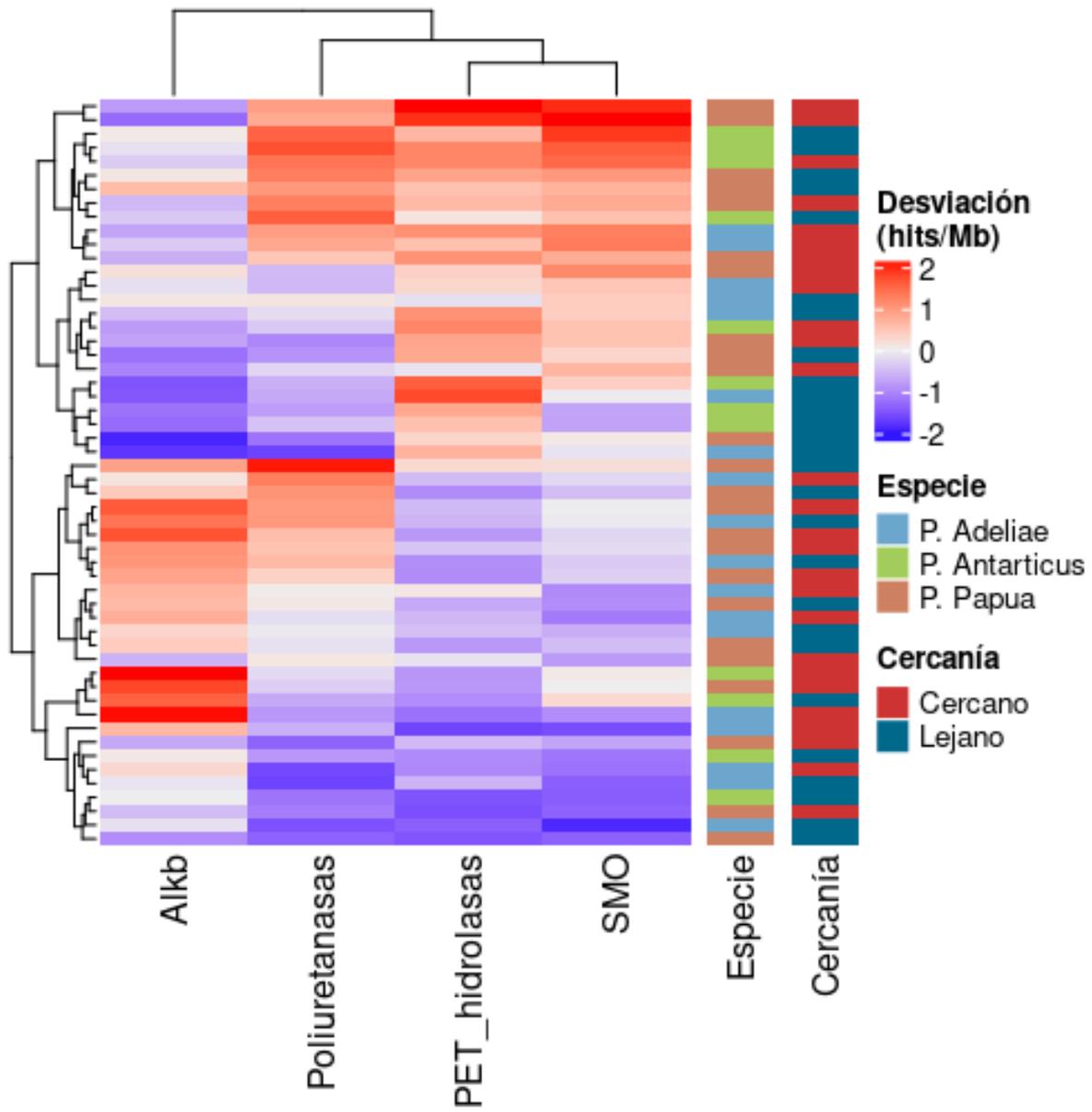


Figura 8. Mapa de calor representando la abundancia de los genes que codifican las enzimas relacionadas con la degradación de plástico en cada sitio. La lejanía o cercanía de los sitios a asentamientos humanos y la especie de *Pygoscelis* que impacta cada muestra están representados con un color de acuerdo con lo que se muestra en la leyenda de la derecha. AlkB: alcano hidroxilasas, SMO: estireno monooxigenasas.

5.6 Variabilidad de la abundancia de genes entre especies, sitios y cercanía a asentamientos humanos.

Para analizar si la abundancia de los genes representados en hits/Mb difieren entre especies o por la cercanía a asentamientos humanos, se realizó un análisis de componentes principales (PCA). Para ellos, primero se evaluó la variabilidad entre las réplicas de un mismo sitio (Figura A2, en anexos), observándose que las réplicas de un mismo sitio tienden a agruparse, indicando que la abundancia de genes en hits/Mb varía en mayor medida según el sitio de recolección más que entre las réplicas. En el PCA de la Figura 9 se observa que las especies de pingüinos, representadas cada una con una figura geométrica diferente, se encuentran dispersas en el gráfico, al igual que los sitios cercanos o lejanos a un asentamiento humano, representados con diferentes colores. Para corroborar estos resultados se realizó un análisis mediante *PERMANOVA*, donde la abundancia de genes no es distinta significativamente entre las especies de pingüinos evaluadas ni tampoco cuando consideramos la lejanía o cercanía de los sitios a un asentamiento humano, pero sí es diferente entre los sitios de recolección de la muestra.

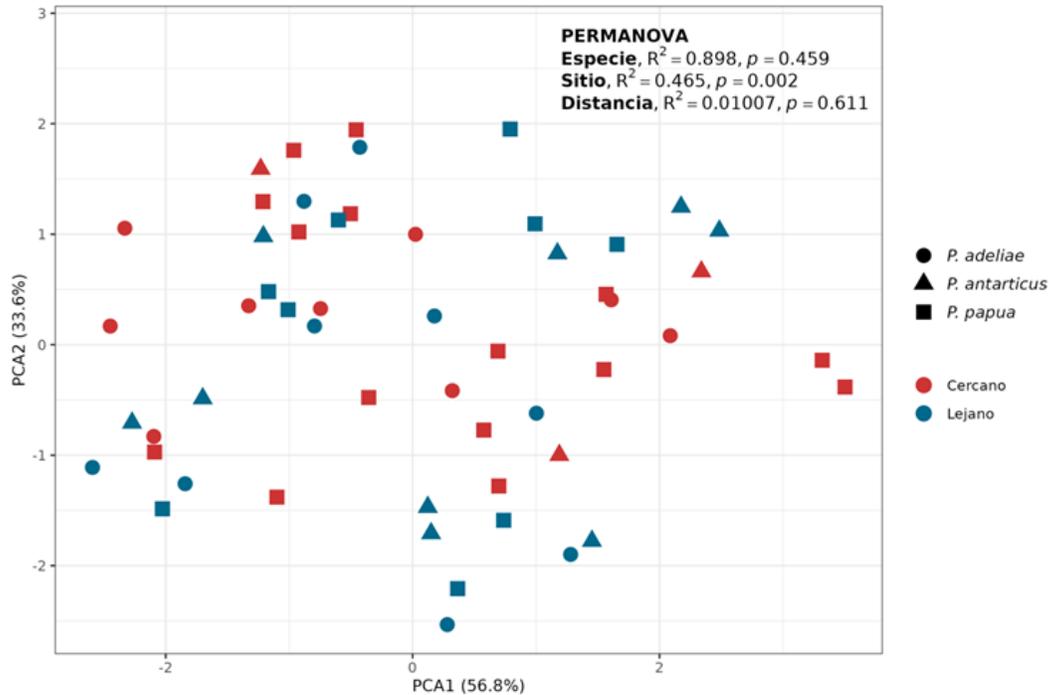


Figura 9. Análisis de componentes principales (PCA) de la abundancia de genes (hits/Mb) que codifican enzimas relacionadas con la degradación de microplásticos. Los círculos representan a la especie *P. adeliae*, los triángulos a *P. antarcticus* y los cuadrados a *P. papua*. El color rojo representa a los sitios cercanos a un asentamiento humano y el azul a los lejanos. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba PERMANOVA para ver la significancia de las variables en la agrupación de las muestras.

5.7 Correlación entre la abundancia de genes en suelos impactados por pingüinos y la distancia a asentamientos humanos.

Para comparar la abundancia de genes asociados a la degradación de MP entre los metagenomas provenientes de suelos impactados por pingüinos *Pygoscelis* que se encuentran cercanos y alejados de asentamientos humanos, primero se aplicó la prueba de Shapiro Wilk para evaluar la normalidad del conjunto de datos. Para ello, la abundancia de cada enzima fue analizada en los 18 sitios, arrojando todas ellas valores de $p > 0,05$, por lo que podemos asumir que los datos siguen una distribución normal. Posterior a estos resultados, se aplicó la Prueba de Welch, indicándose el

valor de p de esta prueba en los diagramas de cajas de la Figura 10. Como se puede observar, no hay diferencias significativas en la abundancia de los genes al comparar los sitios clasificados de acuerdo con la distancia al asentamiento humano más cercano ($p > 0,05$).

También se analizó el coeficiente de correlación de Spearman (ρ), el cual relaciona la abundancia de cada gen presente en los sitios y la distancia a los asentamientos humanos. Para el análisis de este coeficiente se utilizaron dos conjuntos de datos, el primero corresponde a un conjunto de datos que incluye las abundancias de cada sitio en triplicado y un segundo conjunto de datos que contienen los promedios de las abundancias en las réplicas de cada sitio (Tabla 7).

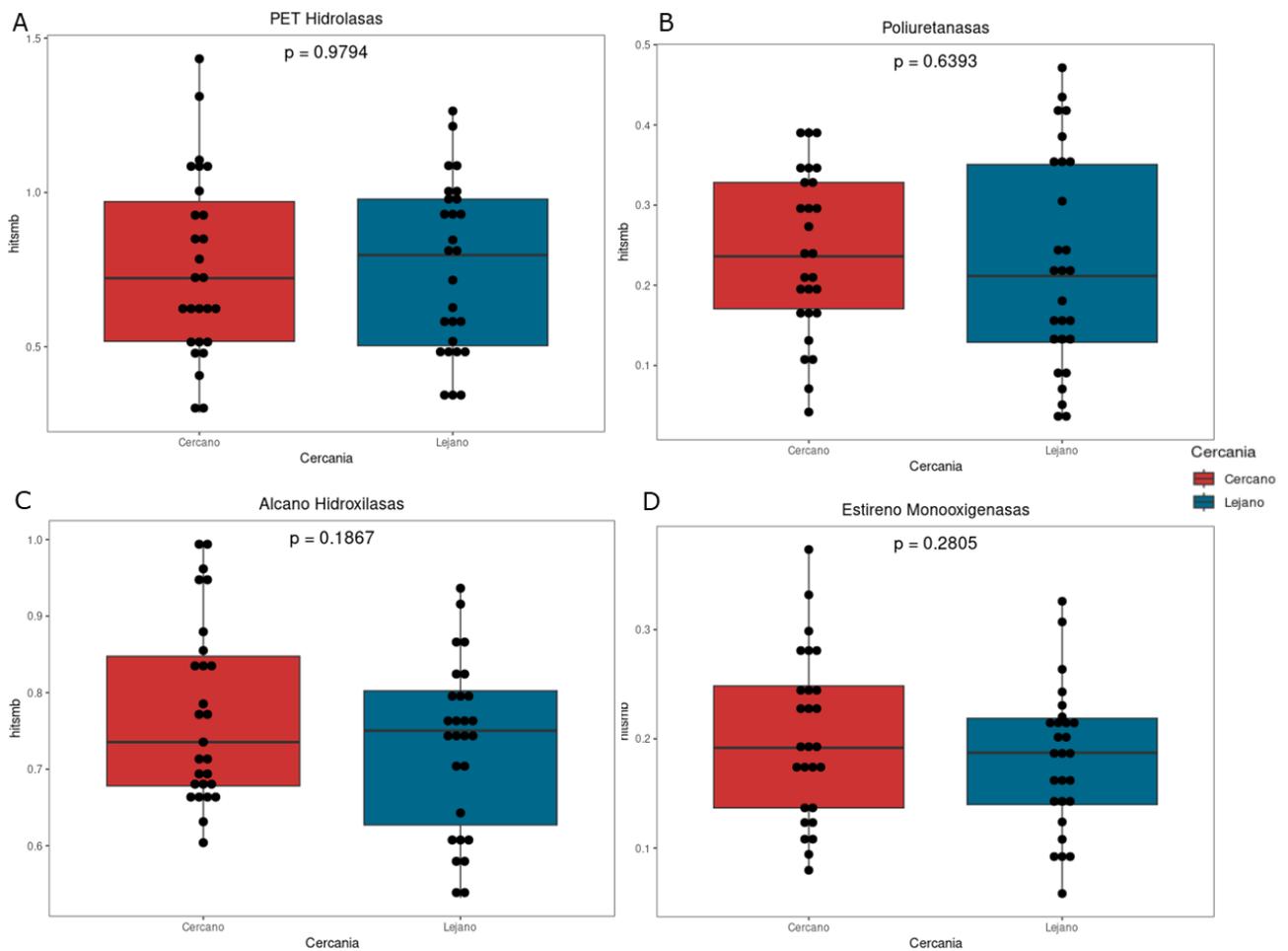


Figura 10. Gráficos de cajas que representan el promedio de abundancia (hits/Mb) para cada grupo de enzimas en los sitios cercanos (rojo) y lejanos (azul) de asentamientos humanos. Las barras de error indican la desviación estándar entre las muestras, las que se representan con un punto negro. (A) PET hidrolasas. (B) Poliuretanasas. (C) Alcano hidroxilasas. (D) Estireno monooxigenasas. El análisis estadístico para cada abundancia genética asociada a un sitio se llevó a cabo mediante la prueba de Welch. Las diferencias significativas son consideradas con un $p < 0,05$.

Tabla 7. Coeficientes de Spearman correspondientes a la relación de la abundancia de cada enzima analizada en las réplicas de todos los sitios en triplicado ($n=54$) y el promedio de las réplicas de cada sitio ($n=18$), en relación con la distancia al asentamiento humano más cercano.

Enzima	ρ (n=54)	ρ (n=18)
PET Hidrolasa	-0,1229	-0,1269
Poliuretanasas	-0,1382	-0,1909
AlkB	-0,0640	-0,1765
SMO	-0,2438	-0,3230

Los coeficientes calculados para los datos de las abundancias de los sitios en triplicado ($n=54$), para todas las enzimas, son negativos, siendo consideradas correlaciones negativas débiles. El menor valor de ρ corresponde a las estireno monooxigenasas ($\rho = -0,2438$) y las que presentaron un valor ρ con tendencia nula son las alcano hidroxilasas ($\rho = -0,0640$) (Tabla 7 y Figura A3, en anexos).

Cuando se analizan los gráficos de dispersión para los promedios de abundancia de los triplicados para cada sitio ($n=18$), mejora el coeficiente de Spearman para todas las enzimas, siendo la enzima Estireno monooxigenasa la que tiene una correlación negativa moderada ($\rho=-0,3230$), a diferencia de las otras enzimas que todavía presentan una correlación negativa débil (Figura 11).

También se evidencian los sitios para cada punto, pudiendo determinar qué sitios son los que afectan a la correlación. Por ejemplo, para las PET

hidrolasas que presentan un $\rho = -0,1269$, los sitios cercanos GCB Y AHB afectan esta correlación presentando una baja abundancia de genes, mientras que el sitio lejano API afecta a esta correlación presentando una abundancia promedio mayor que el resto de los sitios lejanos. Para las Poliuretanasas que tienen un $\rho = -0,1909$, el sitio GCB afecta a esta correlación siendo un sitio con bajo promedio de abundancia a pesar de estar cercano a un asentamiento humano, mientras que, de los sitios lejanos, el sitio APC no contribuye a la correlación negativa. Analizando el gráfico de dispersión para las alcanos hidroxilasas, cuyo ρ es de $-0,1765$, se observa que el sitio alejado APC y los sitios cercanos GOC y GKI afectan la correlación negativa. Por último, en el análisis de las estireno monooxigenasas que presenta una correlación negativa moderada, se aprecia que hay tres sitios cercanos que afectan a esta correlación, los cuales corresponden a AAB, GCB y AHB.

6. DISCUSIÓN

La producción de plásticos crece a nivel mundial, lo que ocasiona un aumento de contaminación por estos polímeros (Amaral-Zettler *et al.*, 2020). La degradación de plásticos puede generar microplásticos (MP), los cuales están distribuidos globalmente contaminando aguas, suelos y aire (Lamichhane *et al.*, 2023). Sitios remotos como el continente antártico no están exentos de la contaminación por MP (Waller *et al.*, 2017; Aves *et al.*, 2022) y su presencia ha afectado diferentes entornos, como también a la fauna antártica. Por ejemplo, se han encontrado residuos de MP en suelos impactados por pingüinos del género *Pygoscelis* (Bessa *et al.*, 2019; Panasiuk *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2023; Fragão *et al.*, 2021).

En este trabajo se determinó la abundancia de genes microbianos asociados a la biodegradación de MP en suelos antárticos impactados por pingüinos *Pygoscelis*, estudiando los metagenomas obtenidos desde las muestras de suelo a partir de la generación de una base de datos que incluye secuencias de genes que codificaban enzimas capaces de degradar los distintos plásticos que se han encontrado en el continente antártico. Asimismo, se comparó la abundancia de estos genes en sitios cercanos y alejados de asentamientos humanos.

6.1 Cuantificación de genes relacionados con la degradación de microplásticos en metagenomas de suelos antárticos.

Diversas investigaciones han utilizado la creación de base de datos de búsqueda manual para encontrar genes de interés que se asocian a la biodegradación de plásticos (Danso *et al.*, 2018; Zrimec *et al.*, 2021), incluido el continente antártico (Blázquez-Sánchez *et al.*, 2022). Para el presente trabajo se seleccionaron cinco enzimas para la cuantificación de los genes que están asociados a la biodegradación de MP. La selección de

estas enzimas se realizó en base a la presencia de los plásticos en el continente antártico y también a los plásticos que se encontraban presentes en los suelos impactados por pingüinos *Pygoscelis*, donde los plásticos que tienen una mayor abundancia fueron PET, PUR, PS y PE (Lacerda *et al.*, 2019; Fragão *et al.*, 2021).

El primer conjunto de enzimas se relaciona con las PET hidrolasas. Para este tipo de degradación se decidió agrupar el conjunto de enzimas en un solo grupo debido a la variedad de hidrolasas que pueden degradar PET. No se consideró en este grupo de enzimas la MHETasa, ya que particularmente esta enzima participa en la hidrólisis del ácido mono(2-hidroxietil) tereftálico (MHET) intermedio del PET (Yoshida *et al.*, 2016). Además, en la búsqueda de secuencias para crear la base de datos, solo existía una secuencia disponible. Para las enzimas que degradan PUR, se reúne un grupo de enzimas esterasas que degradan PUR, denominadas poliuretanasa. Contrario a esto, las alcanos hidroxilasas son todas representadas por el mismo gen (*alkB*), y ocurre lo mismo con las enzimas para la degradación del PS, las estireno monooxigenasas y las estireno óxido isomerasas que están representadas por un único gen cada una (*styA* y *styC*, respectivamente).

La ampliación de la base de datos se llevó a cabo utilizando el programa BLAST+, utilizando específicamente la función *blastp* cuyo *query* corresponde a la base de datos de creación propia analizada contra la base de datos de UniProt TrEMBL, la cual es una base de datos que contiene una alta cantidad de secuencias no revisadas manualmente (Uniprot Consortium, 2023). Si bien la elección de una base de datos que contenga secuencias no revisadas manualmente puede inducir a errores (Junker *et al.*, 2000), la cantidad de secuencias extras favorece a este trabajo, ya que de todas formas luego de utilizar BLAST+, hay ciertos criterios de filtrado. Por ejemplo, se filtra por un 60% de identidad de las

secuencias como mínimo, con incrementos de 5% para generar archivos específicos para cada porcentaje de referencia y así asegurar la precisión del método (Zrimec *et al.*, 2021). Luego se seleccionan los clusters representativas por CD-HIT al 95% (Li & Godzik, 2006; Fu *et al.*, 2012) y se realiza un alineamiento múltiple de los clusters por Clustal Omega (Sievers & Higgins, 2014), para finalmente generar los modelos ocultos de markov (HMM), por medio del programa HMMER v3.3 (Eddy, 2020).

Para realizar la cuantificación de los genes obtenidos a través de los HMM, estos fueron utilizados contra los metagenomas en estudio (n=54) a través del programa HMMER, donde los criterios de filtrado fueron en base al manual del programa (Eddy,2020). Luego, para cada sitio se obtuvieron hits o eventos significativos, los cuales permiten identificar la probabilidad de que se encuentren el gen en los metagenomas. Los hits posteriormente se normalizaron siguiendo la metodología empleada en Danso *et al.* (2018), para lo cual se utiliza el largo total de los ensamblajes y se expresa en millón de bases para una mejor visualización de los resultados.

En esta tesis encontramos que las PET hidrolasas son las enzimas que presentan una mayor abundancia de genes si las comparamos a las otras. Este fenómeno se respalda por la cantidad de secuencias utilizadas en este trabajo y porque las PET hidrolasas son una de las enzimas más estudiadas para entender el efecto de biodegradación de MP (Yoshida *et al.*, 2016; Danso *et al.*, 2018). Por lo tanto, se explica la alta cantidad de secuencias obtenidas ante la ampliación de la base de datos por BLAST. Además, en el continente antártico se han encontrado una cantidad considerable de MP de PET tanto en agua (Jones-Williams *et al.*, 2020; Lacerda *et al.*, 2019) como en suelo (Aves *et al.*, 2022).

En el análisis de las alcanos hidroxilasas, se observó una abundancia similar entre los sitios estudiados. Esto indica que en todos los sitios existe

una alta probabilidad de encontrar este tipo de enzimas. La similitud en la abundancia podría deberse a la posible contaminación de los sitios por PE u otros tipos de hidrocarburos presentes en la Antártica (Préndez et al., 2011; Martins et al., 2021). Esto se explica porque, aunque inicialmente se seleccionaron manualmente enzimas con evidencia experimental que indicaba su capacidad para degradar PE, durante la búsqueda de secuencias homólogas mediante BLAST, se identificaron secuencias relacionadas con la degradación de otros tipos de hidrocarburos, ya que las alcano hidroxilasas, en general, tienen la capacidad de degradar diferentes alcanos (Van Beilen et al., 2007).

Por último, la presencia de Estireno monooxigenasas y la ausencia de estireno óxido isomerasas en los suelos estudiados señala la diversidad de las comunidades microbianas presentes en los suelos impactados por pingüinos (Ramírez-Fernández et al., 2019). La vía de biodegradación del PS más estudiada considera una vía predominante que implica la oxidación del estireno a fenilacetil coenzima A, que luego se convierte en acetil-CoA mediante β -oxidación para el ciclo del TCA. Son dos las enzimas específicas para esta vía; en primer lugar, actúa la Estireno monooxigenasa, cuyo producto es el óxido de estireno, el cuál posteriormente se isomeriza mediante la SOI (Ho et al., 2018). El ciclo del éster en el óxido de estireno se puede abrir mediante varios métodos, incluida la luz ultravioleta y la oxidación química. Las investigaciones han demostrado que la oxidación fotoquímica del estireno, un precursor del óxido de estireno puede ocurrir bajo irradiación ultravioleta en presencia de ciertos compuestos como H_2O_2 o TiO_2 (Manríquez et al., 2020). De manera similar, la oxidación del propio óxido de estireno se puede lograr mediante métodos químicos y fotoquímicos utilizando catalizadores bajo luz ultravioleta (Lachheb et al., 2017). Estos estudios demuestran que la luz ultravioleta puede facilitar la apertura del ciclo de los ésteres en el

óxido de estireno mediante procesos de oxidación fotoquímica. Aunque en este contexto no se encontraron referencias específicas a la apertura del ciclo de éster en el óxido de estireno, la luz ultravioleta y los métodos fotoquímicos pueden contribuir a la apertura del ciclo de éster en el óxido de estireno, ofreciendo vías alternativas a la isomerización enzimática, lo que podría explicar por qué no se encontró la isomerasa de óxido de estireno en las muestras estudiadas. Sin embargo, no se puede descartar que en las muestras estudiadas existan variantes de estas enzimas aún no reportadas.

6.2 Variabilidad de la abundancia de genes entre especies, sitios y distancia a asentamientos humanos.

Para estudiar las variables que se relacionan con la abundancia de los genes de interés en suelos impactados por pingüinos *Pygoscelis*, en primer lugar, se realizó un análisis para determinar la variabilidad de las réplicas de los sitios de recolección de muestras, encontrando que la mayor variabilidad está dada por los sitios más que por las réplicas. Posteriormente, mediante un análisis de componentes principales (PCA), se determinó la influencia de dos variables: (i) la especie de pingüino y (ii) la cercanía/lejanía del sitio de recolección al asentamiento humano más cercano.

La dispersión de las muestras en el PCA no mostró relación con la especie de pingüinos que están impactando los suelos, lo que se confirmó por el análisis de PERMANOVA. Este fenómeno se puede explicar debido a que las tres especies de *Pygoscelis* se alimentan principalmente de krill antártico (Jafari *et al.*, 2021; Tabassum *et al.*, 2022), constituyendo casi la totalidad de su ingesta. De igual forma, se ha observado que también consumen peces, aunque en proporciones menores (Panasiuk *et al.*, 2020). Además, la composición microbiana del suelo impactado por estas

tres especies de pingüinos es similar entre sí (Ramírez-Fernández *et al.*, 2019). Por ende, esto sugiere una similitud en la composición de genes en términos de degradación de plásticos entre las diferentes especies de pingüinos.

Por otra parte, si bien algunos estudios han encontrado que las comunidades bacterianas de los suelos impactados por pingüinos *Pygoscelis* difieren según el nivel de impacto humano en la zona de muestreo (Wang *et al.*, 2015; Chong *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2013), en el presente estudio no se observó una relación significativa entre la cercanía/lejanía de asentamientos humanos y la abundancia de genes relacionados con la biodegradación de MP.

Esto sugiere que la cercanía/lejanía de la presencia humana no es un factor determinante en la variabilidad de genes en términos de degradación de plásticos, ya que la adaptación microbiana a la contaminación plástica es un fenómeno más complejo, influenciado por factores ambientales y ecológicos relacionados con las características de cada sitio (Strycker *et al.*, 2020; Gallagher *et al.*, 2023; Ramírez-Fernández *et al.*, 2021). También se debe considerar que hay un factor migratorio de estas aves, ya que los sitios impactados por pingüinos pueden tener la influencia de pingüinos que no permanecen constantemente en ese sitio (Naveen & Humphries, 2019; Clucas *et al.*, 2015; Vianna *et al.*, 2020).

Para profundizar sobre la influencia de la distancia a asentamientos humanos sobre la abundancia de los genes de interés, primero se determinó la normalidad del conjunto de datos de abundancia de genes mediante la prueba Shapiro-Wilk. Los resultados indican que los datos siguen una distribución normal, lo que permite el uso de la prueba de Welch. Esta prueba se utilizó para comparar la abundancia de genes entre

suelos impactados por pingüinos *Pygoscelis* en sitios que son cercanos o lejanos a asentamientos humanos. Los diagramas de caja no revelan una relación clara entre la abundancia de genes y la cercanía o lejanía de los sitios, siendo los valores p mayores a 0,05, lo que indica que no hay diferencias significativas entre las medias de los dos grupos.

Posteriormente, se analizó el coeficiente de correlación de Spearman para determinar la relación entre la abundancia de los genes de interés y la distancia a los asentamientos humanos, pudiendo determinar, además, qué sitios se desvían de lo esperado (i.e., que los sitios cercanos a asentamientos humanos presenten una alta abundancia de genes y que los sitios alejados de asentamientos humanos presenten una baja abundancia de los genes de interés). Los coeficientes sugieren una correlación negativa moderada para los genes que codifican las enzimas estireno monooxigenasas y una correlación negativa débil para los genes que codifican las demás enzimas.

Hay distintos sitios que presentan un comportamiento diferente al esperado cuando se observan los gráficos de dispersión. Por ejemplo, dos sitios cercanos a asentamientos humanos presentan valores bajos de abundancia de los genes que codifican para las PET hidrolasa, Poliuretanasas y las estireno monooxigenasas. El primero es el sitio GCB, cercano a la Base Copacabana e impactado por *P. papua*. Es relevante señalar que, a pesar de la proximidad de GCB a la Base Copacabana, esta última no se considera oficialmente un asentamiento humano según la lista de la COMNAP. La exclusión de la Base Copacabana como asentamiento humano se fundamenta en la información proporcionada por la Secretaría del Sistema del Tratado Antártico (ATS), que indica su uso exclusivo como base de investigación de aves marinas. En consecuencia, la lista de asentamientos humanos seleccionados desde la COMNAP considera la Base Arctowski como el asentamiento humano

cercano relevante para el sitio GCB, cuya distancia es de 2.150 metros aproximadamente.

A pesar de esta exclusión, GCB se clasifica como un sitio cercano a un asentamiento humano. Y que, a pesar de su proximidad a una base, GCB presenta un bajo impacto antropogénico en la zona por las condiciones mencionadas anteriormente, siendo así esta observación fundamental para comprender la baja abundancia genética de enzimas responsables de la degradación de ciertos plásticos en este sitio en particular.

El otro sitio es AHB, ubicado en Bahía Esperanza y cuyo suelo es impactado por *P. adeliae*. Este sitio también presenta una baja cuantificación para las enzimas PET hidrolasas, Poliuretanasas y estireno monooxigenasas. Este sitio se encuentra aproximadamente a 3.000 metros del asentamiento humano Base Antártica Esperanza de Argentina, la cual cuenta con una infraestructura importante que sirve de alojamiento para la dotación de verano o invierno y a la cual llega una importante cantidad de barcos (Haene & Reggio, 2003). Por lo tanto, el efecto antropogénico en esta base es bastante elevado y se podría esperar que esté altamente contaminado. No se encontró información que indicara específicamente el tratamiento de residuos en esta base, el cual podría ser altamente eficiente en evitar la contaminación de los suelos.

Adicionalmente, se han identificado dos ubicaciones cercanas a un asentamiento humano donde se ha observado una escasa presencia de genes que codifican para las alcanos hidroxilasas, específicamente GKI y GOC. A pesar de ello, es importante señalar que el promedio de hits/Mb para las alcanos hidroxilasas no es despreciable si lo comparamos a otras enzimas analizadas en este trabajo, siendo de 0,65 para GKI y 0,69 para GOC. Estas cifras sugieren que existe una probabilidad de encontrar enzimas que codifiquen para las alcanos hidroxilasas en estas áreas, pese

a que los valores son inferiores para esta enzima. Ambos sitios están cercanos a la Base O'Higgins, administrada por el Ejército de Chile; GKI corresponde a la Isla Kopaitic y GOC es el sitio que está más cercano a un asentamiento humano (7 m). Se han llevado a cabo diversos estudios relacionados con diferentes contaminantes, donde se ha identificado la presencia de hidrocarburos en la Base Antártica O'Higgins. La operación de carga y descarga de combustibles es la que permite dar la energía necesaria durante el funcionamiento de las bases (Rojas, 2009), dando cuenta de la presencia de hidrocarburos cercano a esta base. También se ha estudiado la presencia de contaminantes orgánicos persistentes (Rudolph *et al.*, 2016) y de metales pesados (Espejo *et al.*, 2014) en suelos impactados por *Pygoscelis* cercanos a esta base.

A la inversa, hay dos sitios alejados de asentamientos humanos que presentan altos niveles de los genes de interés. El primero es el sitio API, situado en la Isla Pingüino e impactado por la especie *P. adeliae*, el cual presenta altos niveles de abundancia de genes que codifican para las enzimas estireno monooxigenasas y PET hidrolasas. El segundo es el sitio APC, ubicado en la Isla Paulet e impactado por la especie *P. adeliae*, el cual presenta alta abundancia de las enzimas alcano hidroxilasas y las Poliuretanasas. Si bien ambos sitios están alejados de asentamientos humanos, presentan una alta presión antropogénica ligada al turismo que se desarrolla en ambas islas (Pfeiffer & Peter, 2004; Bender *et al.*, 2016; Yevchun *et al.*, 2021; OCEANWIDE, 2024). Según datos de la Secretaría del ATS, en ambos sitios se realizan desembarques de hasta 100 turistas cada vez, por lo que esta actividad podría explicar la alta abundancia de genes relacionados con la degradación de MP.

6.3 Proyecciones del enfoque bioinformático para el análisis de metagenomas.

Como se evidencia en este trabajo, el análisis de información metagenómica implica la aplicación de diversas herramientas para comprender los contextos microbiológicos presentes en los metagenomas. Además, se requieren distintas metodologías del ámbito bioinformático para abordar su estudio de manera adecuada (Simon & Daniel, 2011). Mediante análisis basados en la homología de secuencias y el uso de Modelos Ocultos de Markov, es posible desarrollar modelos de predicción de genes que permiten generar información para, en un futuro, hacer frente a los efectos de la contaminación en un entorno extremo como la Antártica, y así nos puede interesar determinar la existencia de vías metabólicas que asimilen los MP para biodegradar y entender a las comunidades de microorganismos antárticos, pudiendo dar cuenta de una adaptación evolutiva de estos microorganismos para biodegradar los MP.

Además, estos resultados nos ayudan para el futuro desarrollo de estrategias relacionadas con la biorremediación en este continente. Pudiendo así sentar bases para el desarrollo de modelos predictivos más eficientes y comprender los ecosistemas afectados por la contaminación.

Otra idea para desarrollar gracias a este trabajo es que se pueden cultivar los microorganismos, previo a un análisis para identificar cuáles son los probables microorganismos que degraden MP en estas muestras, para evaluar posibles efectos de biodegradación *in vitro*. También se pueden utilizar estos mismos sitios para evaluar la cantidad de microplásticos que está presente en cada sitio impactado por pingüinos, de tal forma de ver más directamente si hay una correlación de cantidad de microplásticos con la abundancia de genes para cada sitio.

Junto a todo estos hechos, se podrían explorar no solo genes que codifiquen enzimas capaces de degradar microplásticos, sino también con otros tipos de contaminantes presentes en la Antártica u otros ambientes de interés.

7. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo muestran que es posible encontrar genes que codifiquen para enzimas potencialmente relacionadas con la degradación de microplásticos en los suelos impactados por pingüinos *Pygoscelis*, encontrándose una mayor cantidad de genes que codifican enzimas capaces de degradar el PET en comparación con genes que codifican enzimas para descomponer otros tipos de plástico. Esto sugiere que el PET es más abundante en las muestras de suelo o que es más susceptible a la degradación microbiana en comparación con los otros plásticos.

La abundancia de estos genes no se relacionó con la especie de pingüino impactando el suelo ni con el hecho de que el sitio se considerara cercano o lejano a un asentamiento humano. Sin embargo, al correlacionar la abundancia de los genes asociados a la degradación de microplásticos con la distancia de los sitios a los asentamientos humanos, se presenta una leve correlación negativa entre estas variables, lo que permite concluir que mientras más alejado esté el sitio de muestreo de un asentamiento humano, menor será la abundancia de genes que codifican para enzimas relacionados a la degradación de microplásticos. Dado que las correlaciones no son fuertes, es probable que existan otras variables que pueden influir, como la migración de los pingüinos o el turismo, las cuales no se consideraron en este estudio.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Allen, S., Allen, D., Moss, K., Le Roux, G., Phoenix, V. R., & Sonke, J. E. (2020). Examination of the ocean as a source for atmospheric microplastics. *PLoS One*, 15(5), e0232746.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410.
- Amaral-Zettler, L. A., Zettler, E. R., & Mincer, T. J. (2020). Ecology of the plastisphere. *Nature Reviews in Microbiology*, 18(3), 139-151.
- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1596-1605.
- Aves, A. R., Revell, L. E., Gaw, S., Ruffell, H., Schuddeboom, A., Wotherspoon, N. E., Larue, M & McDonald, A. J. (2022). First evidence of microplastics in Antarctic snow. *The Cryosphere*, 16(6), 2127-2145.
- Avio, C. G., Gorbi, S., & Regoli, F. (2017). Plastics and microplastics in the oceans: from emerging pollutants to emerged threat. *Marine Environmental Research*, 128, 2-11.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., ... & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455-477.
- Beltrametti, F., Marconi, A. M., Bestetti, G., Colombo, C., Galli, E., Ruzzi, M., & Zennaro, E. (1997). Sequencing and functional analysis of styrene catabolism genes from *Pseudomonas fluorescens* ST. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2232-2239.
- Bender, N. A., Crosbie, K., & Lynch, H. J. (2016). Patterns of tourism in the Antarctic Peninsula region: a 20-year analysis. *Antarctic Science*, 28(3), 194-203.
- Bergami, E., Rota, E., Caruso, T., Birarda, G., Vaccari, L., & Corsi, I. (2020). Plastics everywhere: first evidence of polystyrene fragments inside the common Antarctic collembolan *Cryptopygus antarcticus*. *Biology Letters*, 16(6), 20200093.
- Bergmann, M., Tekman, M. B., & Gutow, L. (2017). Sea change for plastic pollution. *Nature*, 544(7650), 297-297.
- Bessa, F., Ratcliffe, N., Otero, V., Sobral, P., Marques, J. C., Waluda, C. M., ... & Xavier, J. C. (2019). Microplastics in gentoo penguins from the Antarctic region. *Scientific Reports*, 9(1), 1-7.

- Besseling, E., Wegner, A., Foekema, E. M., Van Den Heuvel-Greve, M. J., & Koelmans, A. A. (2013). Effects of microplastic on fitness and PCB bioaccumulation by the lugworm *Arenicola marina* (L.). *Environmental Science & Technology*, 47(1), 593-600.
- Bokhorst, S., Huiskes, A., Convey, P., & Aerts, R. (2007). Climate change effects on organic matter decomposition rates in ecosystems from the Maritime Antarctic and Falkland Islands. *Global Change Biology*, 13(12), 2642-2653.
- Blázquez-Sánchez, P., Engelberger, F., Cifuentes-Anticevic, J., Sonnendecker, C., Griñén, A., Reyes, J., ... & Ramírez-Sarmiento, C. A. (2022). Antarctic polyester hydrolases degrade aliphatic and aromatic polyesters at moderate temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(1), e01842-21.
- Carniel, A., Valoni, É., Junior, J. N., da Conceição Gomes, A., & de Castro, A. M. (2017). Lipase from *Candida antarctica* (CALB) and cutinase from *Humicola insolens* act synergistically for PET hydrolysis to terephthalic acid. *Process Biochemistry*, 59, 84-90.
- Carr, S. A., Liu, J., & Tesoro, A. G. (2016). Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. *Water Research*, 91, 174-182.
- Castañeta, G., Gutiérrez, A. F., Nacaratte, F., & Manzano, C. A. (2020). Microplastics: a contaminant that grows in all environmental areas, its characteristics and possible risks to public health from exposure. *Revista Boliviana de Química*, 37(3), 142-157.
- Chae, Y., & An, Y. J. (2018). Current research trends on plastic pollution and ecological impacts on the soil ecosystem: A review. *Environmental Pollution*, 240, 387-395.
- Chen, S., Tong, X., Woodard, R. W., Du, G., Wu, J., & Chen, J. (2008). Identification and characterization of bacterial cutinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(38), 25854-25862.
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884-i890.
- Chong, C. W., Pearce, D. A., Convey, P., Tan, G. A., Wong, R. C., & Tan, I. K. (2010). High levels of spatial heterogeneity in the biodiversity of soil prokaryotes on Signy Island, Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(4), 601-610.
- Cincinelli, A., Scopetani, C., Chelazzi, D., Lombardini, E., Martellini, T., Katsoyiannis, A., ... & Corsolini, S. (2017). Microplastic in the surface waters of the Ross Sea (Antarctica): occurrence, distribution and characterization by FTIR. *Chemosphere*, 175, 391-400.
- Clarke, A., Barnes, D. K., & Hodgson, D. A. (2005). How isolated is Antarctica?. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(1), 1-3.

- Clucas, G. V., Dunn, M. J., Dyke, G., Emslie, S. D., Levy, H., Naveen, R., Polito, M. J., Pybus, O. G., Rogers, A. D., & Hart, T. (2015). A reversal of fortunes: climate change 'winners' and 'losers' in Antarctic Peninsula penguins. *Scientific Reports*, 4(1), 5024.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 62(12), 2588-2597.
- Corcoran, P. L. (2020). Degradation of microplastics in the environment. *Handbook of Microplastics in the Environment*, 1-12.
- Danso, D., Chow, J., & Streit, W. R. (2019). Plastics: environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(19), e01095-19.
- Danso, D., Schmeisser, C., Chow, J., Zimmermann, W., Wei, R., Leggewie, C., ... & 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).
- Dawson, A. L., Kawaguchi, S., King, C. K., Townsend, K. A., King, R., Huston, W. M., & Nash, S. M. B. (2018a). Turning microplastics into nanoplastics through digestive fragmentation by Antarctic krill. *Nature communications*, 9(1), 1-8.
- Dawson, A., Huston, W., Kawaguchi, S., King, C., Cropp, R., Wild, S., ... & Bengtson Nash, S. (2018b). Uptake and depuration kinetics influence microplastic bioaccumulation and toxicity in Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Environmental science & Technology*, 52(5), 3195-3201.
- De Broyer, C., P. Koubbi, H.J. Griffiths, B. Raymond, C. Udekem d'Acoz, A.P. Van de Putte, B. Danis, B. David, S. Grant, J. Gutt, C. Held, G. Hosie, F. Huettmann, A. Post and Y. Ropert-Coudert (Eds). 2014. *Biogeographic Atlas of the Southern Ocean*. Scientific Committee on Antarctic Research, Cambridge: XII + 498 pp.
- De Tender, C., Schlundt, C., Devriese, L. I., Mincer, T. J., Zettler, E. R., & Amaral-Zettler, L. A. (2017). A review of microscopy and comparative molecular-based methods to characterize "Plastisphere" communities. *Analytical Methods*, 9(14), 2132-2143.
- Derraik, J.G.B., (2002). The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin* 44, 842-852.
- Dias, M. P., Warwick-Evans, V., Carneiro, A. P., Harris, C., Lascelles, B. G., Clewlow, H. L., ... & Trathan, P. N. (2019). Using habitat models to identify marine important bird and biodiversity areas for Chinstrap Penguins *Pygoscelis antarcticus* in the South Orkney Islands. *Polar Biology*, 42(1), 17-25.

- do Canto, V. P., Thompson, C. E., & Netz, P. A. (2019). Polyurethanases: Three-dimensional structures and molecular dynamics simulations of enzymes that degrade polyurethane. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 89, 82-95.
- Dris, R., Gasperi, J., Saad, M., Mirande, C., & Tassin, B. (2016). Synthetic fibers in atmospheric fallout: a source of microplastics in the environment?. *Marine Pollution Bulletin*, 104(1-2), 290-293.
- Eddy, S. (2020). HMMER user's guide. Department of Genetics, Washington University School of Medicine, 2(1), 13.
- Ergas, M., Figueroa, D., Paschke, K., Urbina, M. A., Navarro, J. M., & Vargas-Chacoff, L. (2023). Cellulosic and microplastic fibers in the Antarctic fish *Harpagifer antarcticus* and Sub-Antarctic *Harpagifer bispinis*. *Marine Pollution Bulletin*, 194, 115380.
- Espejo, W., Celis, J. E., González-Acuña, D., Jara, S., & Barra, R. (2014). Concentration of trace metals in excrements of two species of penguins from different locations of the Antarctic Peninsula. *Polar biology*, 37, 675-683.
- Evangelidou, N., Grythe, H., Klimont, Z., Heyes, C., Eckhardt, S., Lopez-Aparicio, S., & Stohl, A. (2020). Atmospheric transport is a major pathway of microplastics to remote regions. *Nature Communications*, 11(1), 3381.
- Fragão, J., Bessa, F., Otero, V., Barbosa, A., Sobral, P., Waluda, C. M., ... & Xavier, J. C. (2021). Microplastics and other anthropogenic particles in Antarctica: Using penguins as biological samplers. *Science of The Total Environment*, 788, 147698.
- Fraser, C. I., Morrison, A. K., Hogg, A. M., Macaya, E. C., van Sebille, E., Ryan, P. G., ... & Waters, J. M. (2018). Antarctica's ecological isolation will be broken by storm-driven dispersal and warming. *Nature Climate Change*, 8(8), 704-708.
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., & Li, W. (2012). CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(23), 3150-3152.
- Gall, S. C., & Thompson, R. C. (2015). The impact of debris on marine life. *Marine Pollution Bulletin*, 92(1-2), 170-179.
- Gallagher, K. L., Dinniman, M. S., & Lynch, H. J. (2023). Quantifying Antarctic krill connectivity across the West Antarctic Peninsula and its role in large-scale *Pygoscelis* penguin population dynamics. *Scientific Reports*, 13(1), 12072.
- Gambarini, V., Pantos, O., Kingsbury, J. M., Weaver, L., Handley, K. M., & Lear, G. (2021). Phylogenetic Distribution of Plastic-Degrading Microorganisms. *Msystems*, 6(1), e01112-20.
- Ghosh, S. K., Pal, S., & Ray, S. (2013). Study of microbes having potentiality for biodegradation of plastics. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(7), 4339-4355.

- Gray, A. D., & Weinstein, J. E. (2017). Size-and shape-dependent effects of microplastic particles on adult daggerblade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(11), 3074-3080.
- Gröndahl, F., Sidenmark, J., & Thomsen¹, A. (2009). Survey of waste water disposal practices at Antarctic research stations. *Polar Research*, 28(2), 298-306.
- Gu, Z., Eils, R., & Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*, 32(18), 2847-2849.
- Guo, Y., Wang, N., Li, G., Rosas, G., Zang, J., Ma, Y., ... & Cao, H. (2018). Direct and indirect effects of penguin feces on microbiomes in Antarctic ornithogenic soils. *Frontiers in Microbiology*, 9, 552.
- Haene, Eduardo & Reggio, Pablo. (2003). Plan visitantes Base Antártida Esperanza. 10.13140/RG.2.2.32468.09608.
- Harrison, J. P., Hoellein, T. J., Sapp, M., Tagg, A. S., Ju-Nam, Y., & Ojeda, J. J. (2018). Microplastic-associated biofilms: a comparison of freshwater and marine environments. In *Freshwater microplastics* (pp. 181-201). Springer, Cham.
- Hegde, K., & Veeranki, V. D. (2013). Production optimization and characterization of recombinant cutinases from *Thermobifida fusca* sp. NRRL B-8184. *Applied biochemistry and biotechnology*, 170(3), 654-675.
- Herrero Acero, E., Ribitsch, D., Dellacher, A., Zitzenbacher, S., Marold, A., Steinkellner, G., Gruber, K., Schwab, H., & Guebitz, G. M. (2013). Surface engineering of a cutinase from *Thermobifida cellulolytica* for improved polyester hydrolysis. *Biotechnology and bioengineering*, 110(10), 2581-2590.
- Herrero Acero, E., Ribitsch, D., Steinkellner, G., Gruber, K., Greimel, K., Eiteljoerg, I., ... & Guebitz, G. (2011). Enzymatic surface hydrolysis of PET: effect of structural diversity on kinetic properties of cutinases from *Thermobifida*. *Macromolecules*, 44(12), 4632-4640.
- Hijmans, R. J., Williams, E., Vennes, C., & Hijmans, M. R. J. (2017). Package 'geosphere'. *Spherical trigonometry*, 1(7), 1-45.
- Ho, B. T., Roberts, T. K., & Lucas, S. (2018). An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach. *Critical reviews in biotechnology*, 38(2), 308-320.
- Howard, G. T., Crother, B., & Vicknair, J. (2001). Cloning, nucleotide sequencing and characterization of a polyurethanase gene (*pueB*) from *Pseudomonas chlororaphis*. *International biodeterioration & biodegradation*, 47(3), 141-149.
- Howard, G. T., Mackie, R. I., Cann, I. K., Ohene-Adjei, S., Aboudehen, K. S., Duos, B. G., & Childers, G. W. (2007). Effect of insertional mutations in the *pueA*

and *pueB* genes encoding two polyurethanases in *Pseudomonas chlororaphis* contained within a gene cluster. *Journal of applied microbiology*, 103(6), 2074–2083.

Hu, X., Thumarat, U., Zhang, X., Tang, M., & Kawai, F. (2010). Diversity of polyester-degrading bacteria in compost and molecular analysis of a thermoactive esterase from *Thermobifida alba* AHK119. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2), 771–779.

Hung, C. S., Zingarelli, S., Nadeau, L. J., Biffinger, J. C., Drake, C. A., Crouch, A. L., ... & Crookes-Goodson, W. J. (2016). Carbon catabolite repression and Impranil polyurethane degradation in *Pseudomonas protegens* strain Pf-5. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(20), 6080-6090.

Hyatt, D., Chen, G.-L., LoCascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 119.

International Association of Antarctica Tour Operators. (Año). Visitor Statistics Downloads. Recuperado de <https://iaato.org/information-resources/data-statistics/visitor-statistics/visitor-statistics-downloads/> (Acceso 23 noviembre 2023)

Jafari, V., Maccapan, D., Careddu, G., Sporta Caputi, S., Calizza, E., Rossi, L., & Costantini, M. L. (2021). Spatial and temporal diet variability of Adélie (*Pygoscelis adeliae*) and Emperor (*Aptenodytes forsteri*) Penguin: a multi tissue stable isotope analysis. *Polar Biology*, 44(9), 1869-1881.

Jaiswal, S., Sharma, B., & Shukla, P. (2020). Integrated approaches in microbial degradation of plastics. *Environmental Technology & Innovation*, 17, 100567.

Jeon, H. J., & Kim, M. N. (2015). Functional analysis of alkane hydroxylase system derived from *Pseudomonas aeruginosa* E7 for low molecular weight polyethylene biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 103, 141-146.

Junker, V., Contrino, S., Fleischmann, W., Hermjakob, H., Lang, F., Magrane, M., ... & Apweiler, R. (2000). The role SWISS-PROT and TrEMBL play in the genome research environment. *Journal of Biotechnology*, 78(3), 221-234.

Jones-Williams, K., Galloway, T., Cole, M., Stowasser, G., Waluda, C., & Manno, C. (2020). Close encounters-microplastic availability to pelagic amphipods in sub-antarctic and antarctic surface waters. *Environment International*, 140, 105792.

Kale, S. K., Deshmukh, A. G., Dudhare, M. S., & Patil, V. B. (2015). Microbial degradation of plastic: a review. *Journal of Biochemical Technology*, 6(2), 952-961.

- Kawai, F., Oda, M., Tamashiro, T., Waku, T., Tanaka, N., Yamamoto, M., Mizushima, H., Miyakawa, T. & Tanokura, M. (2014). A novel Ca²⁺-activated, thermostabilized polyesterase capable of hydrolyzing polyethylene terephthalate from *Saccharomonospora viridis* AHK190. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 10053-10064.
- Kim, H. W., Jo, J. H., Kim, Y. B., Le, T. K., Cho, C. W., Yun, C. H., ... & Yeom, S. J. (2021). Biodegradation of polystyrene by bacteria from the soil in common environments. *Journal of Hazardous Materials*, 416, 126239.
- Kim, Y., Kim, H., Jeong, M. S., Kim, D., Kim, J., Jung, J., ... & Choi, C. Y. (2023). Microplastics in gastrointestinal tracts of gentoo penguin (*Pygoscelis papua*) chicks on King George Island, Antarctica. *Scientific Reports*, 13(1), 13016.
- Kirstein, I. V., Kirmizi, S., Wichels, A., Garin-Fernandez, A., Erler, R., Löder, M., & Gerdts, G. (2016). Dangerous hitchhikers? Evidence for potentially pathogenic *Vibrio* spp. on microplastic particles. *Marine Environmental Research*, 120, 1-8.
- Kok, M., Oldenhuis, R., van der Linden, M. P., Raatjes, P., Kingma, J., van Lelyveld, P. H., & Witholt, B. (1989). The *Pseudomonas oleovorans* alkane hydroxylase gene. Sequence and expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(10), 5435-5441.
- Lacerda, A. L. D. F., Rodrigues, L. D. S., Van Sebille, E., Rodrigues, F. L., Ribeiro, L., Secchi, E. R., ... & Proietti, M. C. (2019). Plastics in sea surface waters around the Antarctic Peninsula. *Scientific Reports*, 9(1), 1-12.
- Lachheb, H., Guillard, C., Lassoued, H., Haddaji, M., Rajah, M., & Houas, A. (2017). Photochemical oxidation of styrene in acetonitrile solution in presence of H₂O₂, TiO₂/H₂O₂ and ZnO/H₂O₂. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 346, 462-469.
- Lamichhane, G., Acharya, A., Marahatha, R., Modi, B., Paudel, R., Adhikari, A., ... & Parajuli, N. (2023). Microplastics in environment: global concern, challenges, and controlling measures. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 20(4), 4673-4694.
- Law, K. L. (2017). Plastics in the marine environment. *Annual Review of Marine Science*, 9, 205-229.
- Leistenschneider, C., Burkhardt-Holm, P., Mani, T., Pimpke, S., Taubner, H., & Gerdts, G. (2021). Microplastics in the Weddell Sea (Antarctica): A Forensic Approach for Discrimination between Environmental and Vessel-Induced Microplastics. *Environmental Science & Technology*.
- Li, F., Ginoux, P., & Ramaswamy, V. (2008). Distribution, transport, and deposition of mineral dust in the Southern Ocean and Antarctica: Contribution of major sources. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 113(D10).

- Li, W., & Godzik, A. (2006). Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 22(13), 1658–1659.
- Long, M., Moriceau, B., Gallinari, M., Lambert, C., Huvet, A., Raffray, J., & Soudant, P. (2015). Interactions between microplastics and phytoplankton aggregates: impact on their respective fates. *Marine Chemistry*, 175, 39-46.
- Lynch, H. J., Naveen, R., Trathan, P. N., & Fagan, W. F. (2012). Spatially integrated assessment reveals widespread changes in penguin populations on the Antarctic Peninsula. *Ecology*, 93(6), 1367-1377.
- Mammo, F. K., Amoah, I. D., Gani, K. M., Pillay, L., Ratha, S. K., Bux, F., & Kumari, S. (2020). Microplastics in the environment: Interactions with microbes and chemical contaminants. *Science of The Total Environment*, 140518.
- Manríquez, M. E., Valdez, M. T., Pliego, A. S., Castro, L. V., & Ortiz-Islas, E. (2020). Oxidation of styrene oxide via chemical and photochemical methods using TiO₂-CeO₂-V₂O₅ catalysts. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 395, 112505.
- Marín, M. M., Yuste, L., & Rojo, F. (2003). Differential expression of the components of the two alkane hydroxylases from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 185(10), 3232–3237.
- Martins, C. C., de Abreu-Mota, M. A., do Nascimento, M. G., Dauner, A. L. L., Lourenço, R. A., Bicego, M. C., & Montone, R. C. (2021). Sources and depositional changes of aliphatic hydrocarbons recorded in sedimentary cores from Admiralty Bay, South Shetland Archipelago, Antarctica during last decades. *Science of The Total Environment*, 795, 148881.
- Miller, M. E., Hamann, M., & Kroon, F. J. (2020). Bioaccumulation and biomagnification of microplastics in marine organisms: a review and meta-analysis of current data. *PLoS One*, 15(10), e0240792.
- Munari, C., Infantini, V., Scoponi, M., Rastelli, E., Corinaldesi, C., & Mistri, M. (2017). Microplastics in the sediments of Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). *Marine Pollution Bulletin*, 122(1-2), 161-165.
- Murphy, E. J., Cavanagh, R. D., Drinkwater, K. F., Grant, S. M., Heymans, J. J., Hofmann, E. E., ... & Johnston, N. M. (2016). Understanding the structure and functioning of polar pelagic ecosystems to predict the impacts of change. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1844), 20161646.
- Naveen, R., & Humphries, G. (2019). State of Antarctic Penguins Report 2019. Oceanites, Inc., Chevy Chase, MD USA.
- Nie, Y., Liu, X., Sun, L., & Emslie, S. D. (2012). Effect of penguin and seal excrement on mercury distribution in sediments from the Ross Sea region, East Antarctica. *Science of the Total Environment*, 433, 132-140.

Nizzetto, L., Futter, M., & Langaas, S. (2016). Are agricultural soils dumps for microplastics of urban origin?.

Nomura, N., Shigeno-Akutsu, Y., Nakajima-Kambe, T., & Nakahara, T. (1998). Cloning and sequence analysis of a polyurethane esterase of *Comamonas acidovorans* TB-35. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(4), 339-345.

Rajo, F. (2010). Enzymes for aerobic degradation of alkanes. *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, 2, 781-797.

Oberbeckmann, S., Osborn, A. M., & Duhaime, M. B. (2016). Microbes on a bottle: substrate, season and geography influence community composition of microbes colonizing marine plastic debris. *PLoS One*, 11(8), e0159289.

OCEANWIDE. (s/f). Isla Paulet. [Oceanwide-expeditions.com](https://oceanwide-expeditions.com). Recuperado el 10 de enero de 2024, de <https://oceanwide-expeditions.com/es/destacados/experiencias/isla-paulet>

Oelschlägel, M., Rückert, C., Kalinowski, J., Schmidt, G., Schlömann, M., & Tischler, D. (2015). *Sphingopyxis fribergensis* sp. nov., a soil bacterium with the ability to degrade styrene and phenylacetic acid. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(9), 3008–3015.

Oelschlägel, M., Zimmerling, J., Schlömann, M., & Tischler, D. (2014). Styrene oxide isomerase of *Sphingopyxis* sp. Kp5.2. *Microbiology (Reading, England)*, 160(Pt 11), 2481–2491.

Oksanen, J., *et al.* "vegan: Community Ecology Package. 2019. R package version 2.5-6." (2019).

Othman, A. R., Hasan, H. A., Muhamad, M. H., Ismail, N. I., & Abdullah, S. R. S. (2021). Microbial degradation of microplastics by enzymatic processes: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(4), 3057-3073.

Pan, Q., Wang, F., Zhang, Y., Cai, M., He, J., & Yang, H. (2013). Denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting of soil bacteria in the vicinity of the Chinese Great Wall Station, King George Island, Antarctica. *Journal of Environmental Sciences*, 25(8), 1649-1655.

Panasiuk, A., Wawrzynek-Borejko, J., Musiał, A., & Korczak-Abshire, M. (2020). *Pygoscelis* penguin diets on King George Island, South Shetland Islands, with a special focus on the krill *Euphausia superba*. *Antarctic Science*, 32(1), 21-28.

Panke, S., Witholt, B., Schmid, A., & Wubbolts, M. G. (1998). Towards a biocatalyst for (S)-styrene oxide production: characterization of the styrene degradation pathway of *Pseudomonas* sp. strain VLB120. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2032–2043.

- Park, M. S., Bae, J. W., Han, J. H., Lee, E. Y., Lee, S. G., & Park, S. H. (2006). Characterization of styrene catabolic genes of *Pseudomonas putida* SN1 and construction of a recombinant *Escherichia coli* containing styrene monooxygenase gene for the production of (S)-styrene oxide. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(7), 1032-1040.
- Pathak, V. M., & Navneet, K. (2017). Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1), 15.
- Pfeiffer, S., & Peter, H. U. (2004). Ecological studies toward the management of an Antarctic tourist landing site (Penguin Island, South Shetland Islands). *Polar Record*, 40(4), 345-353
- PlasticsEurope, E. P. R. O. (2022). *Plastics—the facts 2022*. An analysis of European latest plastics, 570. Disponibilidad online: <https://plasticseurope.org> (Acceso 10 noviembre 2023)
- Préndez, M., Barra, C., Toledo, C., & Richter, P. (2011). Alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in marine surficial sediment near Antarctic stations at Fildes Peninsula, King George Island. *Antarctic Science*, 23(6), 578-588.
- Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A., & Korobeynikov, A. (2020). Using SPAdes de novo assembler. *Current Protocols in Bioinformatics*, 70(1), e102.
- Ramírez-Fernández, L., Orellana, L. H., Johnston, E. R., Konstantinidis, K. T., & Orlando, J. (2021). Diversity of microbial communities and genes involved in nitrous oxide emissions in Antarctic soils impacted by marine animals as revealed by metagenomics and 100 metagenome-assembled genomes. *Science of The Total Environment*, 788, 147693.
- Ramírez-Fernández, L., Trefault, N., Carú, M., & Orlando, J. (2019). Seabird and pinniped shape soil bacterial communities of their settlements in Cape Shirreff, Antarctica. *PLoS One*, 14(1), e0209887.
- Reed, S., Clark, M., Thompson, R., & Hughes, K. A. (2018). Microplastics in marine sediments near Rothera research station, Antarctica. *Marine Pollution Bulletin*, 133, 460-463.
- Rojas Mujica, C. L. (2009). Determinación e identificación de hidrocarburos en suelo de la Base Antártica Chilena O'Higgins.
- Roth, C., Wei, R., Oeser, T., Then, J., Föllner, C., Zimmermann, W., & Sträter, N. (2014). Structural and functional studies on a thermostable polyethylene terephthalate degrading hydrolase from *Thermobifida fusca*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(18), 7815-7823.
- Rudolph, I., Chiang, G., Galbán-Malagón, C., Mendoza, R., Martínez, M., González, C., ... & Barra, R. (2016). Persistent organic pollutants and porphyrins

biomarkers in penguin faeces from Kopaitic Island and Antarctic Peninsula. *Science of the Total Environment*, 573, 1390-1396.

Rummel, C. D., Jahnke, A., Gorokhova, E., Kühnel, D., & Schmitt-Jansen, M. (2017). Impacts of biofilm formation on the fate and potential effects of microplastic in the aquatic environment. *Environmental Science & Technology Letters*, 4(7), 258-267.

Santana, M. F. M., Ascer, L. G., Custódio, M. R., Moreira, F. T., & Turra, A. (2016). Microplastic contamination in natural mussel beds from a Brazilian urbanized coastal region: rapid evaluation through bioassessment. *Marine Pollution Bulletin*, 106(1-2), 183-189.

Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26(3), 246-265.

Sievers, F. & Higgins, D. G. 2014. Clustal Omega. *Curr. Protoc. Bioinform.* 48: 1.25.1- 1.25.33.

Silva, C., Da, S., Silva, N., Matamá, T., Araújo, R., Martins, M., Chen, S., Chen, J., Wu, J., Casal, M., & Cavaco-Paulo, A. (2011). Engineered *Thermobifida fusca* cutinase with increased activity on polyester substrates. *Biotechnology journal*, 6(10), 1230-1239.

Simon, C., & Daniel, R. (2011). Metagenomic analyses: past and future trends. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1153-1161.

Stern, R. V., & Howard, G. T. (2000). The polyester polyurethanase gene (*pueA*) from *Pseudomonas chlororaphis* encodes a lipase. *FEMS Microbiology Letters*, 185(2), 163-168.

Strycker, N., Wethington, M., Borowicz, A., Forrest, S., Witharana, C., Hart, T., & Lynch, H. J. (2020). A global population assessment of the Chinstrap penguin (*Pygoscelis antarctica*). *Scientific Reports*, 10(1), 19474.

Suaría, G., Perold, V., Lee, J. R., Lebouard, F., Aliani, S., & Ryan, P. G. (2020). Floating macro- and microplastics around the Southern Ocean: Results from the Antarctic Circumnavigation Expedition. *Environment International*, 136, 105494.

Sulaiman, S., Yamato, S., Kanaya, E., Kim, J. J., Koga, Y., Takano, K., & Kanaya, S. (2012). Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(5), 1556-1562.

Suresh Yedase, G., Venugopal, S., P, A., & Reddy Yatham, V. (2022). Catalyst-free Hantzsch Ester-mediated Organic Transformations Driven by Visible light. *Asian Journal of Organic Chemistry*, 11(10), e202200478.

Tabassum, N., Lee, J. H., Lee, S. R., Kim, J. U., Park, H., Kim, H. W., & Kim, J. H. (2022). Molecular Diet Analysis of Adélie Penguins (*Pygoscelis adeliae*) in the Ross Sea Using Fecal DNA. *Biology*, 11(2), 182.

Takarada, H., Sekine, M., Hosoyama, A., Yamada, R., Fujisawa, T., Omata, S., ... & Harayama, S. (2005). Comparison of the complete genome sequences of *Rhodococcus erythropolis* PR4 and *Rhodococcus opacus* B4. Submitted (MAR-2005) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases (eg Entry names: COZQM2_RHOE4).

Tenchov, R. (15 de marzo 2021). ¿Pueden las superenzimas devoradoras de plástico resolver nuestro problema con la capacidad destructiva de los plásticos? Recuperado de <https://www.cas.org>

The UniProt Consortium, UniProt: the Universal Protein Knowledgebase (2023). *Nucleic Acids Research*, 51(D1)6: D523–D531.

Tischler, D., Eulberg, D., Lakner, S., Kaschabek, S. R., van Berkel, W. J., & Schlömann, M. (2009). Identification of a novel self-sufficient styrene monooxygenase from *Rhodococcus opacus* 1CP. *Journal of Bacteriology*, 191(15), 4996–5009.

Tiwari, N., Santhiya, D., & Sharma, J. G. (2020). Microbial remediation of micro-nano plastics: Current knowledge and future trends. *Environmental Pollution*, 115044.

Toda, H., & Itoh, N. (2012). Isolation and characterization of styrene metabolism genes from styrene-assimilating soil bacteria *Rhodococcus* sp. ST-5 and ST-10. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(1), 12-19.

Tscherko, D., Bölter, M., Beyer, L., Chen, J., Elster, J., Kandeler, E., ... & Blume, H. P. (2003). Biomass and enzyme activity of two soil transects at King George Island, Maritime Antarctica. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 35(1), 34-47.

Urbanek, A. K., Rymowicz, W., & Mirończuk, A. M. (2018). Degradation of plastics and plastic-degrading bacteria in cold marine habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(18), 7669-7678.

Van Beilen, J. B., Li, Z., Duetz, W. A., Smits, T. H., & Witholt, B. (2003). Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & gas science and technology*, 58(4), 427-440.

Van Beilen, J. B., & Funhoff, E. G. (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 13-21.

Van Cauwenberghe, L., Vanreusel, A., Mees, J., & Janssen, C. R. (2013). Microplastic pollution in deep-sea sediments. *Environmental Pollution*, 182, 495-499.

- Vega, R. E., Main, T., & Howard, G. T. (1999). Cloning and expression in *Escherichia coli* of a polyurethane-degrading enzyme from *Pseudomonas fluorescens*. *International biodeterioration & biodegradation*, 43(1-2), 49-55.
- Vianna, J. A., Fernandes, F. A., Frugone, M. J., Figueiró, H. V., Pertierra, L. R., Noll, D., ... & Bowie, R. C. (2020). Genome-wide analyses reveal drivers of penguin diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(36), 22303-22310.
- Waller, C. L., Griffiths, H. J., Waluda, C. M., Thorpe, S. E., Loaiza, I., Moreno, B., ... & Hughes, K. A. (2017). Microplastics in the Antarctic marine system: an emerging area of research. *Science of The Total Environment*, 598, 220-227.
- Waller, C., Waluda, C., Griffiths, H., Thorpe, S., Alamo, I. L., Moreno, B., ... & Hugues, K. A. (2018). Microplastic Pollution in the Southern Ocean. In *MICRO 2018. Fate and Impact of Microplastics: Knowledge, Actions and Solutions* (p. 141). MSFS-RBLZ.
- Wang, N. F., Zhang, T., Zhang, F., Wang, E. T., He, J. F., Ding, H., ... & Zang, J. Y. (2015). Diversity and structure of soil bacterial communities in the Fildes Region (maritime Antarctica) as revealed by 454 pyrosequencing. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1188.
- Wickham, H. (2009). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. doi:10.1007/978-0-387-98141-3_6
- Williamson, C. E., Neale, P. J., Hylander, S., Rose, K. C., Figueroa, F. L., Robinson, S. A., ... & Worrest, R. C. (2019). The interactive effects of stratospheric ozone depletion, UV radiation, and climate change on aquatic ecosystems. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 18(3), 717-746.
- Yang, Y., Li, T., Liu, P., Li, H., & Hu, F. (2022). The formation of specific bacterial communities contributes to the enrichment of antibiotic resistance genes in the soil plastisphere. *Journal of Hazardous Materials*, 436, 129247.
- Yevchun, H., Dykyi, E., Kozeretka, I., Fedchuk, A., Karamushka, V., & Parnikoza, I. (2021). Minimizing tourist impact on the Argentine Islands ecosystem, Antarctic Peninsula, using visitor site guidelines approach.
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., ... & Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). *Science*, 351(6278), 1196-1199.
- Yuan, J., Ma, J., Sun, Y., Zhou, T., Zhao, Y., & Yu, F. (2020). Microbial degradation and other environmental aspects of microplastics/plastics. *Science of The Total Environment*, 715, 136968.
- Zadjelovic, V., Chhun, A., Quareshy, M., Silvano, E., Hernandez-Fernaund, J. R., Aguilo-Ferretjans, M. M., ... & Christie-Oleza, J. A. (2020). Beyond oil

degradation: enzymatic potential of *Alcanivorax* to degrade natural and synthetic polyesters. *Environmental Microbiology*, 22(4), 1356-1369.

Zadjelovic, V., Erni-Cassola, G., Obrador-Viel, T., Lester, D., Eley, Y., Gibson, M. I., ... & Christie-Oleza, J. A. (2022). A mechanistic understanding of polyethylene biodegradation by the marine bacterium *Alcanivorax*. *Journal of Hazardous Materials*, 436, 129278.

Zavala-Araiza, D., Lyon, D., Alvarez, R. A., Palacios, V., Harriss, R., Lan, X., ... & Hamburg, S. P. (2015). Toward a functional definition of methane super-emitters: Application to natural gas production sites. *Environmental Science & Technology*, 49(13), 8167-8174.

Zdanowski, M. K., Zmuda, M. J., & Zwolska, I. (2005). Bacterial role in the decomposition of marine-derived material (penguin guano) in the terrestrial maritime Antarctic. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), 581-595.

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., Perez-Garcia, P., Dierkes, R. F., Applegate, V., Schumacher, J., Chibani, C. M., ... & Streit, W. R. (2022). The Bacteroidetes *Aequorivita* sp. and *Kaistella jeonii* produce promiscuous esterases with PET-hydrolyzing activity. *Frontiers in Microbiology*, 12, 3874.

Zhang, Y., Kang, S., Allen, S., Allen, D., Gao, T., & Sillanpää, M. (2020). Atmospheric microplastics: A review on current status and perspectives. *Earth-Science Reviews*, 203, 103118.

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), e02155-21.

9. ANEXOS

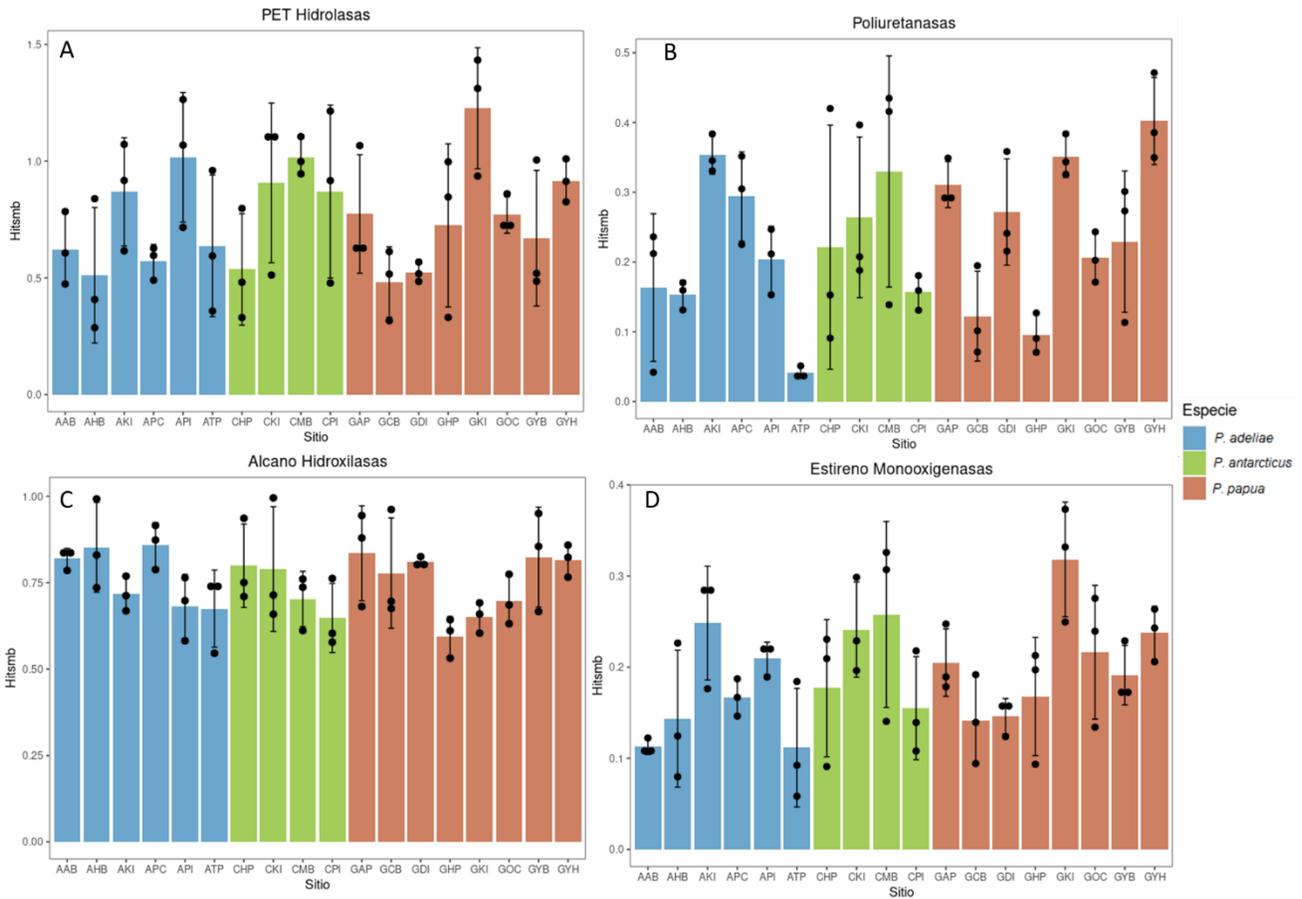


Figura A1. Gráfico de abundancias promedio de hits por millón de bases para cada sitio impactado por pingüinos *Pygoscelis*. En azul *P. adeliae*, en verde *P. antarcticus* y en café *P. papua*. Las barras de error indican la desviación estándar entre los triplicados de los sitios, los que se representan con un punto negro. (A) Promedio de abundancias para las PET hidrolasas. (B) Promedio de abundancias para las Poliuretanasas. (C) Promedio de abundancias para las alcano hidroxilasas. (D) Promedio de abundancias para las estireno monooxigenasas.

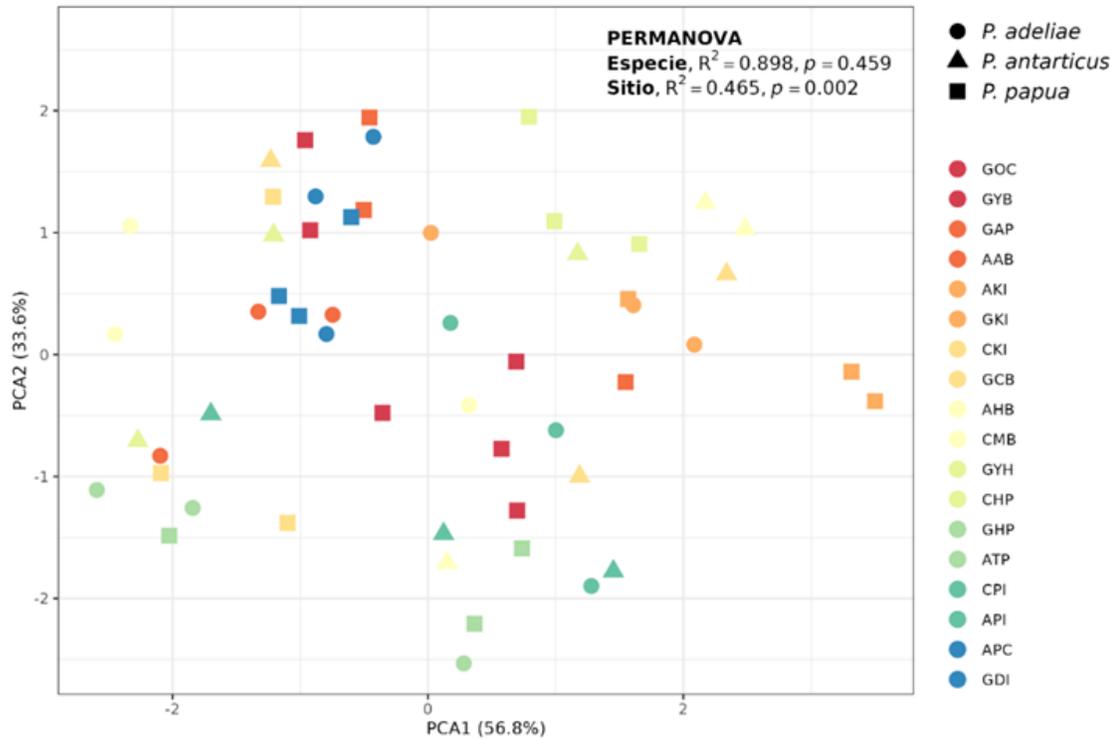


Figura A2. Análisis de componentes principales (PCA) de la abundancia de genes (hits/Mb) que codifican enzimas relacionadas con la degradación de microplásticos. Los colores representan las réplicas de cada uno de los sitios de recolección. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba PERMANOVA para ver la significancia de las variables en la agrupación de las muestras.

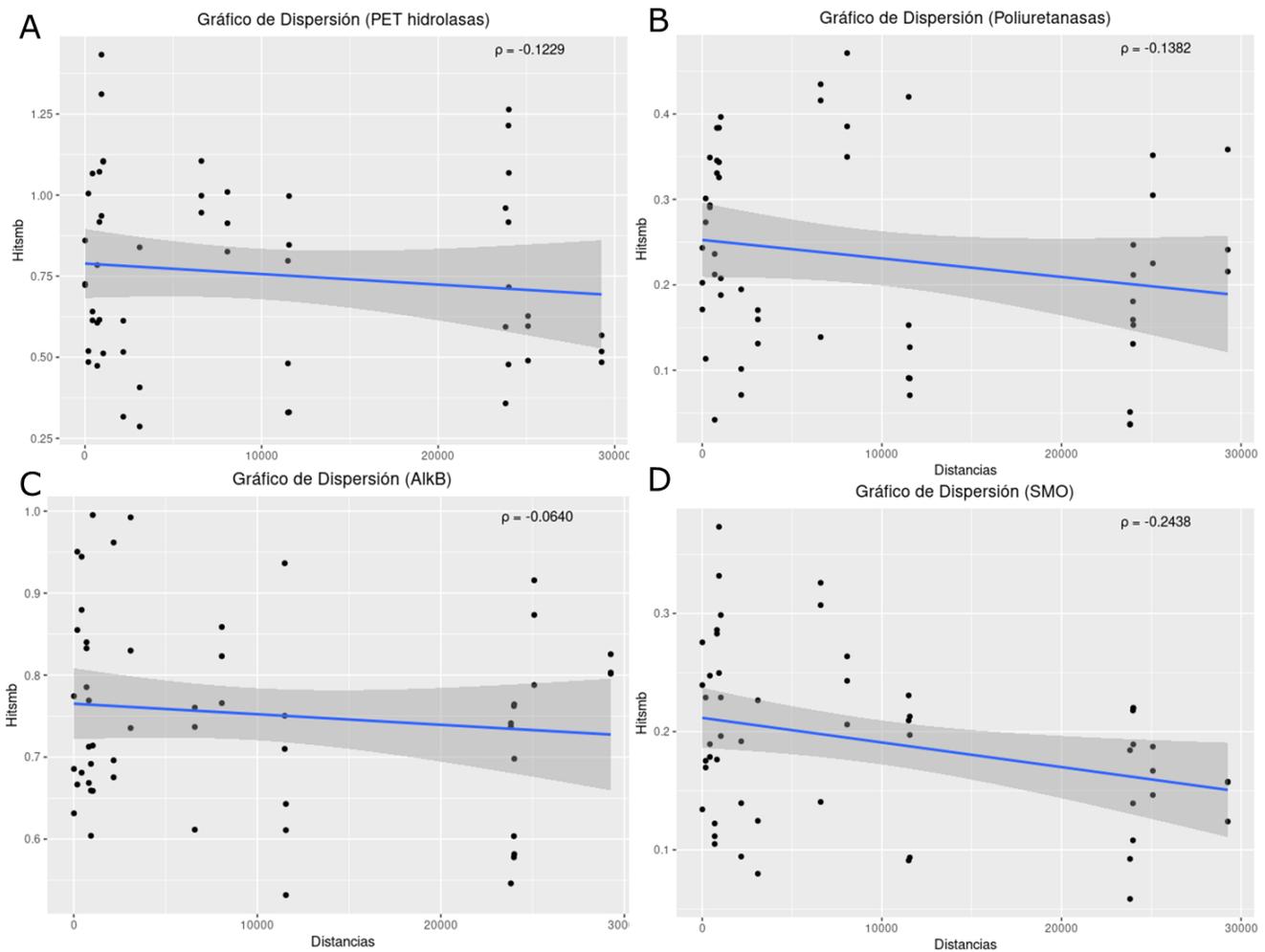


Figura A3. Gráficos de dispersión que representan el promedio de abundancia (hits/Mb) para cada grupo de enzimas respecto a la distancia de cada una de las réplicas de los sitios ($n=54$) a asentamientos humanos. (A) PET hidrolasas. (B) Poliuretanasas. (C) Alcano hidroxilasas (AlkB). (D) Estireno monooxigenasas (SMO). Se representa el coeficiente de Spearman con la letra rho (ρ); si $\rho > 1$ se considera una correlación positiva entre las variables, si $\rho = 0$ es una correlación nula y si $\rho < 0$ se considera una correlación negativa entre las variables.