



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

### BIODEGRADACIÓN DE UN BARNIZ DE POLIÉTER POLIURETANO ACRÍLICO POR COMUNIDADES MICROBIANAS SELECCIONADAS DE UN BASURERO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

**M.C. Itzel Gaytán Enríquez**

TUTOR PRINCIPAL

**Dra. Herminia Loza Tavera**

Facultad de Química-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dr. Alejandro Sosa Peinado**

Facultad de Medicina-UNAM

**Dr. Víctor Manuel Luna Pabello**

Facultad de Química-UNAM

Ciudad de México. Marzo, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Herminia Loza Tavera por su valioso apoyo en la dirección de esta tesis, la cual se realizó en el laboratorio 105 del Departamento de Bioquímica, en el conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (PAPIIT-DGAPA-UNAM), por los financiamientos otorgados para la realización de este trabajo (IN223317, IN227620).

Al Programa de Apoyo para la Investigación y Posgrado de la Facultad de Química, UNAM (PAIP-FQ-UNAM), por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo (5000-9117).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo a través del Programa CONACYT-PRONAES (Programa Presupuestario F003 "Programas Nacionales Estratégicos de Ciencia, Tecnología y Vinculación con los sectores Social, Público y Privado") 101737.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado (CVU 270518).

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP-UNAM) por el apoyo para la asistencia a congresos nacionales e internacionales

Al comité tutor, conformado por el Dr. Alejandro Sosa Peinado (Facultad de Medicina, UNAM) y el Dr. Víctor Manuel Luna Pabello (Facultad de Química, UNAM), por sus valiosas críticas y sugerencias para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Javier Cruz (Facultad de Química, UNAM), por considerarme una más de sus estudiantes y permitirme el uso de su laboratorio, reactivos, equipos (cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas) y por los aportes intelectuales que realizó al proyecto, en particular con la propuesta de la estructura química del copolímero de PE-PU-A y productos de degradación.

Al Dr. Manuel Burelo (Facultad de Química, UNAM), por la contribución experimental e intelectual con las técnicas de resonancia magnética nuclear por protón, calorimetría diferencial de barrido y cromatografía de permeación en gel, que fueron la base para la propuesta de la estructura del copolímero y sus cambios físicos tras la biodegradación.

Al Dr. Ayixon Sánchez (Instituto de Biotecnología, UNAM), por todas las contribuciones intelectuales y por el análisis metagenómico de las comunidades, que

realizó junto con la Dra. Herminia Loza, y que permitió enriquecer este trabajo y las publicaciones derivadas de él.

Al Dr. Martín Vargas-Suárez (Facultad de Química, UNAM), por su apoyo técnico en el Laboratorio 105, pero sobre todo por sus críticas y aporte intelectual durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Lilianha Domínguez Malfavón y al M.C. Ricardo Alfonso González Hernández por su apoyo en los inicios de este trabajo, con su orientación en las técnicas de cultivo y de caracterización.

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química, UNAM. Principalmente al Q. Rafael Iván Puente Lee, al M.I. Víctor Hugo Lemus Neri, a la Q. Marisela Gutiérrez Franco y a la Q. Elvira del Socorro Reynosa, por su apoyo en las técnicas SEM, composición elemental, FT-IR y análisis térmicos, respectivamente.

Al M.C. Fernando de Jesús Rosas Ramírez (Facultad de Química, UNAM) por su orientación en el uso del cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas.

A los M.C. Gerardo Cedillo, Salvador López y Karla E. Reyes (Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM) por su apoyo técnico en los análisis de resonancia magnética nuclear, cromatografía de permeación en gel y calorimetría diferencial de barrido.

A los Alumnos Eduardo Jiménez Lara y Leonel Rodríguez Rosas, que como parte de su servicio social y estancia de investigación respectivamente, apoyaron en los cultivos y cuantificación de actividades enzimáticas de la comunidad BP6.

**Jurado asignado:**

Dra. Amelia María de Guadalupe Farrés González Sarabia	PRESIDENTE
Dra. Liliana Pardo López	VOCAL
Dra. Selena Gutiérrez Flores	VOCAL
Dra. María del Carmen Sánchez Hernández	VOCAL
Dra. Marcela Ayala Aceves	SECRETARIO

**Lugar donde se realizó la tesis Doctoral:**

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM

## ABREVIATURAS

<b><sup>1</sup>H-MNR</b>	Resonancia Magnética Nuclear de protón (Proton-Magnetic Nuclear Resonance)
<b>2-BE</b>	2-butoxietanol
<b>CBPM</b>	Compuesto de bajo peso molecular
<b>DSC</b>	Calorimetría diferencial de barrido (Differential Scanning Calorimetry)
<b>GC-MS</b>	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)
<b>DPGs</b>	Dipropilen glicoles
<b>DPGBE</b>	Dipropilen glicol butil éter
<b>DPGME</b>	Dipropilen glicol metil éter
<b>dTGA</b>	Análisis por termogravimetría derivativa (Derivative Thermogravimetric Analysis)
<b>FT-IR</b>	Espectroscopía de infrarojo acoplada a la transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
<b>HSC</b>	Hidrofobicidad de superficie celular
<b>IE<sub>24</sub></b>	Índice de emulsificación evaluado por 24 horas
<b>IP</b>	Isopropanol
<b>MDA</b>	Metilen diamina
<b>MDI</b>	Metilen difenil diisocianato
<b>MM</b>	Medio mineral
<b>MM-PL</b>	Medio mineral con PolyLack®
<b>NMP</b>	<i>N</i> -metil-2-pirrolidona
<b><i>M<sub>n</sub></i></b>	Peso molecular promedio en número
<b><i>M<sub>w</sub></i></b>	Peso molecular promedio en masa
<b>PE-PU</b>	Poliéter poliuretano
<b>PE-PU-A</b>	Poliéter poliuretano acrílico
<b>IPd</b>	Índice de polidispersión
<b>PPG</b>	Polipropilen glicol
<b>PS-PU</b>	Poliéster poliuretano
<b>PU</b>	Poliuretano
<b>PUU</b>	Poliuretano insaturado (unsaturated polyurethane)
<b>PU<sub>s</sub></b>	Poliuretanos
<b>PUS</b>	Poliuretano saturado (saturated polyurethane)
<b>T<sub>5%, 20%, 30%</sub></b>	Temperatura a la que se pierde el 5, 20 o 30% de masa
<b>T<sub>onset</sub></b>	Temperatura a la que inicia la pérdida de masa
<b>TDA</b>	2,4-Tolueno diamina
<b>TDI</b>	2,4-Tolueno diisocianato
<b>T<sub>g</sub></b>	Temperatura de transición vítrea (glass transition temperature)
<b>TGA</b>	Análisis por termogravimetría
<b>T<sub>m1-3</sub></b>	Temperatura de fusión (melting temperature)
<b>tr</b>	Tiempos de retención
<b>μ</b>	Velocidad específica de crecimiento

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	i
<b>ABREVIATURAS</b> .....	iv
<b>1. RESUMEN</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	14
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	17
3.1 Poliuretanos: síntesis, estructura y aplicaciones.....	17
3.2 Problemas ambientales con los PUs y manejo de sus residuo.....	19
3.3 Biodegradación del poliuretano.....	20
3.3.1 Factores que afectan la biodegradación de PU.....	22
3.3.2 Enzimas involucradas en la degradación de poliuretano.....	23
3.3.3 Microorganismos involucrados en la biodegradación de poliuretano.....	26
3.3.4 Comunidades microbianas biodegradadoras de poliuretano.....	28
3.4 Antecedentes directos del proyecto.....	32
3.5 Análisis del efecto de las comunidades BP8 y BP6 sobre el PolyLack e identificación de su composición microbiana.....	33
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	35
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	36
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	37
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	38
7.1 Materiales.....	38
7.2 Composición del barniz comercial PolyLack®.....	37
7.3 Recolección, enriquecimiento y conservación de las comunidades microbianas.....	39
7.4 Cultivo de las comunidades.....	39
7.5 Determinación del crecimiento de las comunidades.....	39
7.6 Interacciones célula-sustrato.....	40
7.6.1 Hidrofobicidad de superficie celular (HSC).....	40
7.6.2 Índice de emulsificación 24 (IE <sub>24</sub> ).....	40
7.6.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	41
7.7 Análisis de las modificaciones químicas y físicas generadas por las comunidades microbianas sobre el PolyLack®.....	41
7.7.1 Preparación de muestras.....	41
7.7.2 Carbono total.....	42
7.7.3 Determinación de la estructura química del PU por RMN- <sup>1</sup> H.....	42
7.7.4 Cambios en enlaces y grupos funcionales por espectroscopía infra roja acoplada a la transformada de Fourier (FT-IR).....	42
7.7.5 Termogravimetría (TGA) para análisis de pérdida de masa por descomposición térmica.....	42
7.7.6 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) para análisis de cambios en la estructura tridimensional del PE-PU-A.....	42
7.7.7 Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	43
7.7.8 Determinación de los pesos moleculares promedio del copolímero PE-PU-A por cromatografía de permeación en gel (GPC).....	44
7.8 Ensayos de actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de poliuretano.....	44
7.8.1 Obtención de proteínas de membrana, citoplasma y extracelular.....	44
7.8.2 Cuantificación de proteína (Método de Bradford).....	45
7.8.3 Cuantificación de actividades enzimáticas.....	45

7.8.3.1 Esterasas.....	45
7.8.3.2 Ureasas y uretanasas.....	46
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
8.1 Las comunidades microbianas BP8 y BP6 crecen utilizando el barniz PolyLack® como fuente de carbono.....	47
8.2 Los aditivos del barniz, incluyendo los compuestos con éter, sustentan el crecimiento de las comunidades BP8 y BP6.....	52
8.3 Las comunidades BP8 y BP6 catabolizan al copolímero de PE-PU-A del barniz PolyLack®.....	54
8.3.1 Ataque a los grupos funcionales característicos del copolímero de PE-PU-A: Análisis por espectroscopía infrarroja acoplada a la transformada de Fourier (FT-IR).....	55
8.3.2 Cambios en las propiedades térmicas del copolímero de PE-PU-A y en su microestructura: Análisis por termogravimetría (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	61
8.3.3 Rompimiento de cadenas poliméricas y generación de compuestos de bajo peso molecular: Análisis por cromatografía de permeación en gel (GPC).....	65
8.4 Las comunidades BP8 y BP6 generan productos de degradación complejos a partir del copolímero y desde los primeros tiempos de cultivo.....	68
8.5 Las comunidades BP8 y BP6 despliegan actividades hidrolíticas relacionadas con el ataque a enlaces éster y C-N durante la degradación del copolímero de PE-PU-A.....	76
8.6. Análisis de posibles mecanismos de degradación de los aditivos y el copolímero PE-PU-A identificados en las comunidades BP8 y BP6.....	81
8.6.1 Metabolismo hidrolítico.....	82
8.6.2 Metabolismo oxidativo.....	84
8.6.3 Metabolismo de éteres.....	87
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>89</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>91</b>
<b>11. REFERENCIAS.....</b>	<b>92</b>
<b>12. ANEXOS.....</b>	<b>100</b>
<b>13. PRODUCTOS RELACIONADOS CON ESTA INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>127</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### Figuras

<b>Figura 1</b>	a) Síntesis de PU por una reacción de policondensación, generando el enlace uretano. b) Estructuras de algunos diisocianatos y diferentes tipos de polioles comúnmente utilizados en la síntesis de PU. c) copolímero de PU, alternando segmentos suaves (poliol) y segmentos duros (diisocianato, extensor de cadena, enlaces uretano). d) segregación de fases del PU.	18
<b>Figura 2</b>	Evolución de las etapas de la biodegradación en polímeros de poliuretano.	21
<b>Figura 3</b>	Mecanismos de hidrólisis enzimática del éster, uretano y urea presentes en un polímero de PU.	25
<b>Figura 4</b>	Estrategia experimental del proyecto.	37
<b>Figura 5</b>	Curva patrón para determinación del contenido de proteína.	45
<b>Figura 6</b>	Crecimiento celular y consumo de carbono de las comunidades BP8 y BP6 en medio mineral con el barniz de poliéter poliuretano acrílico PolyLack® como única fuente de carbono.	48
<b>Figura 7</b>	Evaluación de mecanismos celulares para favorecer el acceso a las fuentes de carbono en las comunidades BP8 y BP6: hidrofobicidad de superficie celular (HSC) e índice de emulsificación (IE <sub>24</sub> ).	50
<b>Figura 8</b>	Microscopía electrónica de barrido de medio de cultivo con las comunidades BP8 y BP6.	51
<b>Figura 9</b>	Análisis cromatográficos de los sobrenadantes de cultivo de las comunidades microbianas BP8 y BP6 sobre aditivos en el MM-PL®.	53
<b>Figura 10</b>	Estructura química propuesta para el copolímero PE-PU-A presente en PolyLack®.	55
<b>Figura 11</b>	Espectros FT-IR del copolímero de PE-PU-A presente en el PolyLack® a diferentes tiempos de cultivo con la comunidad BP8.	57
<b>Figura 12</b>	Espectros FT-IR del copolímero de PE-PU-A presente en el PolyLack® a diferentes tiempos de cultivo con la comunidad BP6.	60
<b>Figura 13</b>	Termogramas y termogramas diferenciales del copolímero PE-PU-A presente en PolyLack® degradado por las comunidades BP8 y BP6 A a diferentes tiempos de cultivo.	62
<b>Figura 14</b>	Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la biodegradación del PE-PU-A presente en PolyLack, a diferentes tiempos de cultivo con las comunidades BP8 y BP6.	65
<b>Figura 15</b>	Cromatogramas de los sobrenadantes de cultivo con la comunidad BP8 en MM-PL a diferentes tiempos.	69
<b>Figura 16</b>	Identificación y abundancia de productos de degradación de PolyLack® generados por la actividad degradativa de la comunidad BP8 a diferentes tiempos de cultivo.	70

<b>Figura 17</b>	Cromatogramas de los sobrenadantes de cultivo con la comunidad BP6 en MM-PL a diferentes tiempos.	72
<b>Figura 18</b>	Identificación y abundancia de productos de degradación de PolyLack® generados por la actividad degradativa de la comunidad BP6 a diferentes tiempos de cultivo.	73
<b>Figura 19</b>	Propuesta de mecanismos y productos de degradación resultantes de las diferentes actividades enzimáticas de BP8 y BP6, sobre los grupos funcionales característicos del PE-PU-A.	74
<b>Figura 20</b>	Actividad específica de esterasa en diferentes fracciones celulares de BP8 y BP6 cultivadas en MM-PL.	78
<b>Figura 21</b>	Actividad específica de ureasas y uretanasas para el rompimiento de enlaces C-N.	80

## **Tablas**

<b>Tabla 1</b>	Biodegradación de diferentes tipos de PU por comunidades microbianas.	31
<b>Tabla 2</b>	Composición y características de los aditivos presentes en PolyLack® Aqua Brillante UB-0800.	38
<b>Tabla 3</b>	Asignación de grupos funcionales a las diferentes señales identificadas en el MM-PL.	56
<b>Tabla 4</b>	Índices de cambio para las señales obtenidas de los espectros FT-IR del copolímero PE-PU-A presente en PolyLack® a diferentes tiempos de cultivo generados por la acción de las comunidades BP8 y BP6.	58
<b>Tabla 5</b>	Parámetros de estabilidad térmica y características de las diferentes etapas de descomposición térmica del copolímero PE-PU-A presente en PolyLack® a diferentes tiempos de cultivo por las comunidades BP8 y BP6.	63
<b>Tabla 6</b>	Peso molecular e índice de polidispersión del copolímero PE-PU-A del PolyLack durante el cultivo de las comunidades PB8 y BP6.	67

## 1. RESUMEN

Los plásticos son los polímeros sintéticos más usados en el mundo, y aunque han permitido el desarrollo de dispositivos funcionales, su alta durabilidad y el manejo deficiente de sus residuos han ocasionado un grave problema de contaminación ambiental. Los poliuretanos (PUs), son un tipo de plásticos con estructuras bastante complejas que les permiten ser parte de una amplia gama de productos en el mercado. Si bien, la versatilidad química de los PUs les confiere ventajas comerciales, también representa un desafío ambiental al final de su vida útil, ya que actualmente los métodos para disponer de estos polímeros son limitados para mitigar la contaminación. Una alternativa verde para reducir este problema es el desarrollo de herramientas biotecnológicas para la biodegradación y el bio-reciclaje de los PUs. En nuestro grupo de investigación se han estudiado diversas comunidades microbianas ambientales, las cuales han demostrado su capacidad para crecer en diferentes barnices de poliéster-PU (PS-PU), como única fuente de carbono, atacando la estructura química del polímero. Sin embargo, se ha explorado muy poco su potencial degradativo sobre barnices de poliéster poliuretano acrílico (PE-PU-A), producto en el cual los microorganismos se encontrarían frente a uno de los PUs más recalcitrantes por contener el enlace éter. Así, en esta investigación, mediante el uso de diversos análisis químicos, físicos, microbiológicos y bioquímicos, se examinó la capacidad degradativa y actividades enzimáticas que las comunidades, denominadas BP8 y BP6, emplean para degradar y metabolizar al copolímero de PE-PU-A y un grupo de aditivos xenobióticos que componen al barniz comercial (Polylack®).

Debido a la naturaleza de sus enlaces químicos y diversidad de estructuras moleculares, el PolyLack® es una fuente de carbono compleja y de limitada biodisponibilidad. Sin embargo, las comunidades BP8 y BP6 fueron capaces de utilizar el PolyLack® para su crecimiento, describiendo un comportamiento diáuxico, característico de ambientes con múltiples fuentes de carbono, y empleando mecanismos como la adhesión celular que facilitaron la interacción entre las células de las comunidades y los sustratos a biodegradar. Aunque no hay diferencias significativas en la cantidad de biomasa producida por cada una de las comunidades, los perfiles y cantidad de carbono si son diferentes, sugiriendo que a pesar de que BP8 y BP6 tienen un mismo contexto ambiental (Basurero Bordo Poniente) y que son capaces de degradar al barniz, podrían tener diferentes mecanismos para lograrlo.

Con el objetivo de analizar cuáles son los componentes del barniz que sustentan el crecimiento, e identificar las modificaciones y mecanismos que las comunidades ejercen sobre la estructura química de los componentes del barniz, se realizaron diversos análisis químicos y

físicos a los sobrenadantes de cultivo. De acuerdo con un análisis previo del metagenoma de las comunidades, ambas están compuestas por microorganismos como *Alicyclophilus denitrificans*, *Paracoccus* sp., *Ochrobactrum intermedium*, *Sphingobacterium* y *Achromobacter*, que poseen potencial genético para degradar a los diferentes aditivos del PolyLack<sup>®</sup>, incluso aquellos con el enlace éter. En este trabajo, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS), se confirmó la capacidad de BP8 y BP6 para degradar parcial o completamente a los aditivos del PolyLack<sup>®</sup>, aportando parte de la fuente de carbono que sustenta su crecimiento durante los primeros días de cultivo. Además de los aditivos, las comunidades también utilizan el copolímero de PE-PU-A como fuente de carbono, desde inicios de cultivo. De acuerdo con los estudios realizados, la degradación del copolímero del barniz ocurre vía el rompimiento de los enlaces éster, uretano, grupos aromáticos, alifáticos e incluso el éter, posiblemente a través de mecanismos enzimáticos hidrolíticos y oxidativos. Estos rompimientos ocurrieron en los segmentos suaves y segmentos duros del copolímero, disminuyendo su peso molecular y generando diversos compuestos de bajo peso molecular (productos de degradación), que podrían ser metabolizados por las comunidades. En este sentido, la comunidad BP6 generó productos de degradación más pequeños y en menor tiempo que BP8, lo que demuestra una mayor efectividad para degradar el copolímero de PE-PU-A y sugiere mayor disponibilidad de recursos metabólicos, como la producción de enzimas y la generación de surfactantes que favorecen el proceso degradativo. Por otro lado, los productos de degradación de las comunidades se agruparon en compuestos aromáticos, nitrogenados, ésteres, éteres, alifáticos, alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos, algunos de ellos con posible aplicación en industrias como la química, cosmética e incluso alimentaria, por lo que BP8 y BP6 podrían ser sistemas biológicos atractivos para el bio-reciclaje, estrategia que contempla la revalorización de compuestos resultantes de procesos biodegradativos. La cuantificación de actividades enzimáticas hidrolíticas reveló que tanto BP8 como BP6 producen enzimas tipo esterasa, ureasa y uretanasa en diferentes compartimentos celulares. Estas actividades enzimáticas podrían relacionarse al rompimiento de los segmentos suaves (vía hidrólisis de ésteres) y segmentos duros (vía hidrólisis del uretano) del copolímero de PE-PU-A, así como al catabolismo de los productos de degradación que contienen estos grupos. Finalmente, se identificó que las comunidades BP8 y BP6 son fuente de microorganismos que producen enzimas con capacidad para degradar mezclas complejas de xenobióticos, por lo que podrían ser utilizadas en procesos biotecnológicos para mitigar la contaminación ambiental.

## 1. ABSTRACT

Plastics are the most used synthetic polymers in the world, although they have allowed the development of functional devices, their high durability and poor waste management have caused a serious environmental pollution problem. Polyurethanes (PUs) are a type of plastics with complex structures, which allow them to be part of a wide diversity of products on the market. While the chemical versatility of PUs is a commercial advantage, it is also an environmental challenge at the end of their useful life, since currently the methods to dispose of these polymers are limited to mitigate contamination. A green alternative to reduce this problem is the development of biotechnological tools for the biodegradation and bio-recycling of PUs. In our research group, various environmental microbial communities have been studied, which have demonstrated their ability to grow in different polyester-PU (PS-PU) varnishes, as the only carbon source, attacking the chemical structure of the polymer. However, very little is known about its degradative potential on acrylic polyether polyurethane (PE-PU-A) varnishes, products in which microorganisms would have to proliferate in one of the most recalcitrant PUS, because it contains the ether bond. Thus, in this research the degradative capacity and enzymatic activities that the communities, called BP8 and BP6, use to degrade and metabolize a commercial varnish (Polylack<sup>®</sup>), composed by a PE-PU-A copolymer and a group of xenobiotic additives was studied. For this purpose, various chemical, physical, microbiological, and biochemical analyses were performed.

Due to the nature of its chemical bonds and diversity of molecular structures, PolyLack<sup>®</sup> is a complex carbon source with limited bioavailability. However, the BP8 and BP6 communities were able to use PolyLack<sup>®</sup> for their growth, describing a diauxic behavior, characteristic of environments with diverse carbon sources, and displaying mechanisms such as cell adhesion that facilitated the interaction between the cells of the communities and the biodegradable substrates. Although there are no significant differences in the amount of biomass produced by the communities, the profiles and amount of carbon are different, suggesting that despite BP8 and BP6 have the same environmental context (Bordo Poniente landfill) and that they are capable to degrade the varnish, they could have different mechanisms to achieve it. To analyze which components of the varnish, support the growth of the communities, and to identify modifications and mechanisms that the communities exert on the chemical structure of the varnish components, various chemical and physical analyzes were performed on the culture supernatants. According to a previous metagenomic analysis, both communities are integrated with microorganisms such as *Alicyclophilus denitrificans*, *Paracoccus* sp., *Ochrobactrum intermedium*, *Sphingobacterium* and

*Achromobacter*, which have the genetic potential to degrade the different PolyLack® additives, even those with ether bond. In this work, it was confirmed, through gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), that BP8 and BP6 can partially or completely degrade the PolyLack® additives, contributing to the carbon source that sustains their growth during the first days of culture. In addition to the additives, the communities also use the PE-PU-A copolymer as a carbon source since the beginning of culture. According to results, the degradation of the copolymer occurs via the breakage of esters, urethanes, aliphatics, aromatics and even ether bonds, possibly through hydrolytic and oxidative enzymatic mechanisms. These breakages occurred in the soft and hard segments of the copolymer, decreasing its molecular weight, and generating low molecular weight compounds (degradation products), which could be metabolized by the communities. In this context, the BP6 community generated smaller degradation products and in less time than BP8, exhibiting a greater effectiveness to degrade the PE-PU-A copolymer and suggesting that BP6 has a greater availability of metabolic resources, such as enzyme production and synthesis of biosurfactants that promote biodegradation process. On the other hand, the degradation products of the communities were grouped into aromatic, nitrogen-containing, ester, aliphatic, alcohol, aldehyde, and organic acid compounds, some of them with possible application in industries such as chemical, cosmetic and even food. Hence, BP8 and BP6 could be attractive biological systems for bio-recycling, a strategy that contemplates the revalorization of compounds resulting from biodegradation processes. Quantification of hydrolytic enzyme activities revealed that both BP8 and BP6 produce esterase-, urease-, and urethanase-type enzymes in different cellular compartments. These enzymatic activities could be related to the breakdown of the soft segments (via ester hydrolysis) and hard segments (via urethane hydrolysis) of the PE-PU-A copolymer, also to the catabolism of the degradation products that contain these groups. Finally, it was identified that the BP8 and BP6 communities are sources of microorganisms that produce enzymes able to degrade complex mixtures of xenobiotics, so they could be used in biotechnological processes to mitigate environmental pollution.

## 2. INTRODUCCIÓN

Los plásticos son materiales extremadamente útiles, que han facilitado el desarrollo de la vida moderna y transformado nuestra sociedad. Desde sus orígenes, la manufactura de los plásticos ha incrementado exponencialmente, con una producción de 15 millones de toneladas (Mt) en los años 60's, cerca de 370 Mt en el 2019 y el triple de esto pronosticado para el 2050 (Plastics Europe, 2019). Estos materiales son tan relevantes en la actualidad que se han considerado como un marcador estratigráfico para la época actual, conocida como Antropoceno, época geológica que se distingue por el inicio de cambios biológicos y geofísicos provocados por los seres humanos (Zalasiewicz et al. 2016). Dentro de los plásticos, los poliuretanos (PUs) son el sexto polímero más utilizado a nivel mundial, siendo uno de los materiales más versátiles disponibles en el mercado.

Químicamente, son polímeros sintetizados por reacciones de condensación entre diisocianatos ( $R(N=C=O)_{n>2}$ ) y polioles ( $R'-(OH)_{n>2}$ ), que al reaccionar generan el grupo uretano ( $-NHCOO$ ). Como polímeros de condensación, los PU no están formados por unidades repetidas de monómeros, pero consisten en segmentos conectados por diferentes enlaces químicos (Kemonna & Piotrowska 2020). Para su síntesis, existe una gran variedad de sustratos, de los cuales los diisocianatos como el metileno difenil diisocianato (MDI) y el tolueno diisocianato (TDI), y diferentes tipos de polioles como poliéteroles, poliésteroles, acrílicos polioles, etc), son los más empleados. Además de los sustratos principales, durante su manufactura se pueden utilizar aditivos, tales como agentes espumantes, rellenos, extensores de cadena, retardantes de flama y disolventes. La gran disponibilidad de precursores de PUs se traduce en múltiples combinaciones generando diversos tipos de materiales con propiedades particulares. Así, los PUs han reemplazado materiales de origen natural (cuero) y sintéticos (PVC, caucho, poliestireno) y se usan en productos como partes de automóviles, zapatos, espumas para muebles y aislamiento térmico, dispositivos médicos, fibras elásticas para ropa, elastómeros, barnices, adhesivos y selladores (Plastics Europe, 2021).

Debido a la variedad de aplicaciones y el éxito comercial del PU, cada año se generan mayores cantidades de residuos, cuyo destino más común son los basureros y rellenos sanitarios. Sin embargo, estos vertederos ocupan mucho espacio, son fuentes de contaminación y plagas y son económicamente injustificados. Dado el agotamiento de las reservas mundiales de petróleo y la disminución de espacio en los vertederos, el procesamiento de residuos de PU ha ganado importancia alrededor del mundo en años recientes (Kemonna & Piotrowska, 2020). Por ello, a la fecha existen numerosos métodos para su procesamiento, aunque aún hay un largo camino para



mejorarlos, disminuir los costos y aplicarlos a gran escala. Dentro de estos métodos, la degradación biológica, que implica el rompimiento de sustancias orgánicas por organismos o sus enzimas, se ha contemplado como una alternativa altamente prometedora, que puede aplicarse a residuos post-consumo o post-producción (Shah et al. 2008). Esta técnica es más amigable con el ambiente en comparación a la degradación química y no requiere altas temperaturas o reactivos complejos y tóxicos. El proceso biodegradativo del PU lleva a la reducción de su peso molecular, y bajo condiciones favorables, podría incluso resultar en su completa mineralización. No obstante, al ser un polímero tan complejo, se requiere de la actividad de una gama de distintas enzimas, las cuales es poco probable que puedan ser encontradas en una sola especie, por lo que más de una especie de microorganismos es necesaria para lograr la mineralización completa (Patowary et al. 2016). Las comunidades microbianas desempeñan un papel esencial en diversos procesos, como la salud humana, la biodegradación de polímeros naturales o en biorremediación ambiental. Los miembros de estas comunidades pueden intercambiar metabolitos y realizar reacciones específicas para lograr un trabajo metabólico integral, una característica importante para su desarrollo y adaptación, sobre todo en ambientes adversos (Brenner et al. 2008). A pesar de su alto potencial, pocos trabajos se han enfocado en la habilidad de las comunidades microbianas para degradar PU. Hasta ahora se han identificado comunidades de hongos y bacterias con capacidad de modificar características químicas, propiedades físicas como la resistencia a la tracción y pérdida de masa en piezas sólidas de poliéster-PU (PS-PU) (Genovese et al. 2016; Huang et al. 2016; Oprea et al. 2016; Shah et al. 2016; Das et al. 2017).

En nuestro laboratorio, se han estudiado comunidades microbianas aisladas de piezas de PU deterioradas, provenientes del basurero Bordo Poniente. Éstas han demostrado habilidad para crecer en medio mineral conteniendo diferentes tipos de barnices de PS-PU y acrílico como única fuente de carbono y energía, atacando la estructura química del polímero (Vargas-Suárez et al. 2019, Vargas-Suárez et al., 2021). En la actualidad, no existen reportes en la literatura que analicen el potencial degradativo de comunidades microbianas sobre barnices de poliéter poliuretano acrílico (PE-PU-A), producto en el cual los microorganismos se encontrarán frente a uno de los PU más recalcitrantes por contener enlaces éter en su estructura, además de un conjunto de aditivos xenobióticos. Por otro lado, se desconocen las rutas catabólicas involucradas en la degradación de PE-PU. Así, en esta investigación, mediante el uso de diversos análisis químicos, físicos y microbiológicos, se examinó la capacidad degradativa que las comunidades ambientales, denominadas BP8 y BP6, poseen para degradar y metabolizar al PE-PU-A y los aditivos xenobióticos presentes en un barniz comercial. Simultáneamente, los resultados de este

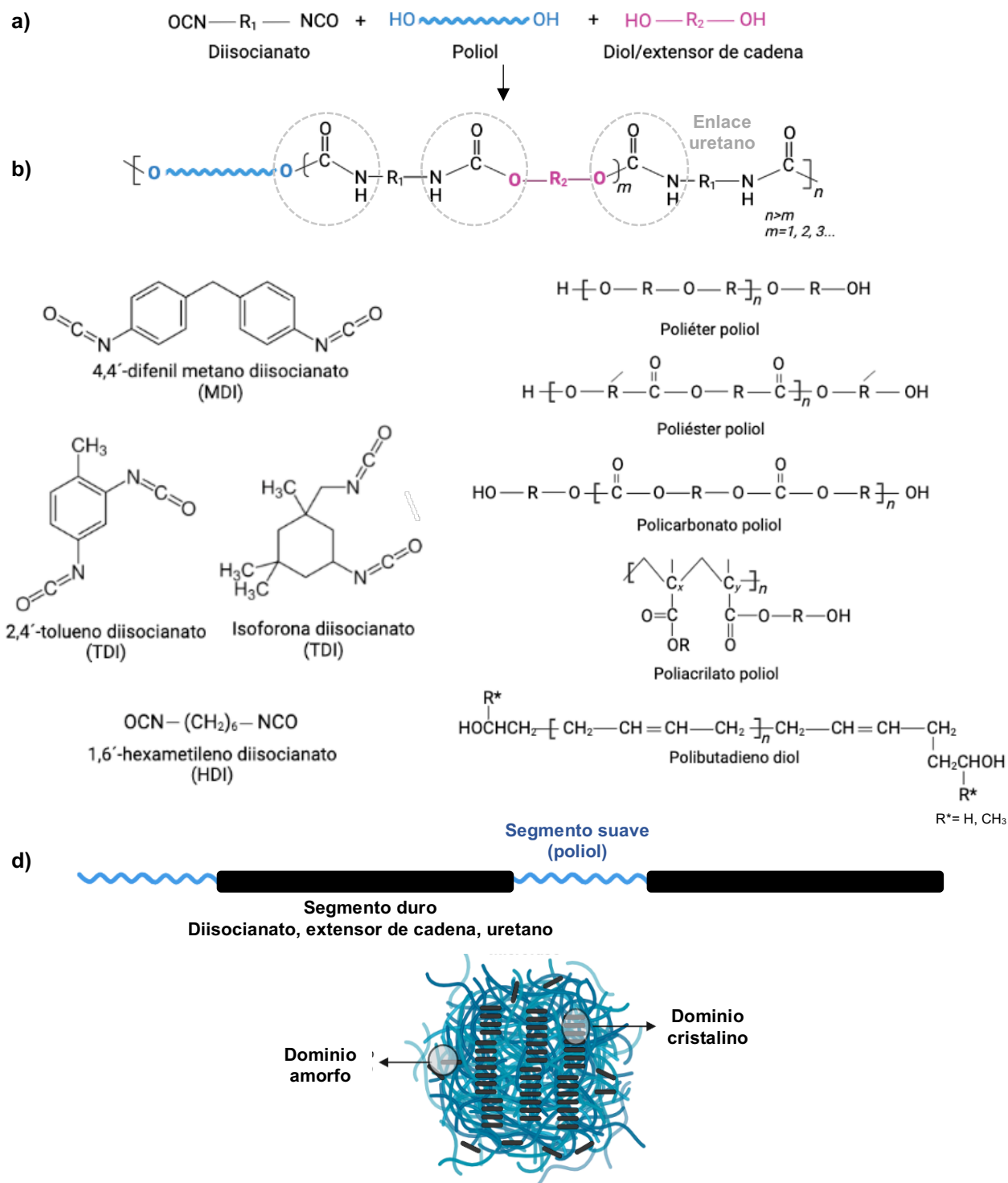
trabajo se conjuntaron con el análisis metagenómico de cada una de las comunidades, permitiendo develar su diversidad y el potencial genómico para degradar el barniz.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Poliuretanos: síntesis, estructura y aplicaciones

Los PUs son polímeros sintéticos muy versátiles sintetizados por primera vez en los años 30s por el químico Otto Bayer. El uso de este polímero se extendió durante la segunda Guerra Mundial reemplazando la producción de caucho natural, y después de un tiempo, se diversificó a mercados como el de la aviación y el textil, muebles y otros. En 2020, debido a sus múltiples aplicaciones, se produjeron 28.7 Mt (millones de toneladas) de PU, lo que representó el 8% de la producción global de plásticos (Plastics Europe, 2021). Los PUs se sintetizan catalíticamente por una reacción de policondensación entre el grupo  $-OH$  de un poliol y el  $-CNO$  de un diisocianato, produciendo un pre-polímero con un grupo  $-CNO$  libre, que reacciona con un diol de cadena corta o extensor de cadena, generando el enlace uretano o carbamato característico de estos polímeros. (Fig. 1a) (Akindoyo et al. 2016; Burelo et al. 2022). Algunos sustratos comúnmente empleados en la síntesis de PUs son diisocianatos como el 4,4'-difeníl metano diisocianato (MDI), el 2,4'-toluen diisocianato (TDI) y el 1,6'-hexametileno diisocianato (HDI); poliéter polioles como el polipropilen glicol o el polietilen glicol; poliácrlato polioles como el polimetilmetacrilato, entre otros (Fig. 1b). Para su síntesis, también se pueden utilizar catalizadores, plastificantes, entrecruzadores, pigmentos, surfactantes, emulsificantes, retardantes de flama y retardantes de humo, haciendo la estructura de estos polímeros compleja y variable, con una amplia gama de propiedades físicas y químicas que se aprovechan para diversas aplicaciones (Akindoyo et al. 2016). Dependiendo de los sustratos usados para su síntesis, se clasifican generalmente en poliéster poliuretano (PS-PU) y poliéter poliuretano (PE-PU), aunque también existen combinaciones con acrilatos y carbonatos.

En general, la estructura molecular de los PU se organiza en copolímeros en bloque, alternando dos tipos de segmentos (duros y suaves ) que se unen por enlaces covalentes (Fig. 1c). Los segmentos duros se constituyen por los diisocianatos y extensores de cadena (dioles de cadena corta), poseen una alta densidad de uretanos, son polares y con alto punto de fusión, al agruparse forman dominios o regiones cristalinas, que confieren estabilidad térmica y resistencia a solventes. Por su parte, los segmentos suaves se forman por los polioles, son apolares y con bajo punto de fusión, al agruparse dan lugar a dominios o regiones amorfas, las cuales proporcionan al polímero flexibilidad y elasticidad (Fig. 1c) (Lem et al. 2013; Mahajan et al. 2015). Existe una incompatibilidad entre los segmentos duros y segmentos suaves que genera una separación o segregación de las fases en la estructura del PU, la cual es responsable de las propiedades particulares de cada PU (Fig. 1d)(Carbonell, 2013).



**Figura 1.** a) Síntesis de PU por una reacción de policondensación, generando el enlace uretano. b) Estructuras de algunos diisocianatos y diferentes tipos de polioliés comúnmente utilizados en la síntesis de PU. c) copolímero de PU, alternando segmentos suaves (polioli) y segmentos duros (diisocianato, extensor de cadena, enlaces uretano). R\* H, CH<sub>3</sub>. d) segregación de fases del PU, donde se observan los dominios duros (agrupación de segmentos duros) y dominios amorfos (agrupación de segmentos suaves) (modificada de Cakić et al. 2012, Carbonell, 2013; Akindoye et al. 2016; Burelo et al. 2022 ).

El tamaño y la naturaleza segmentos de un PU impacta significativamente la relación estructura-propiedades y a su vez afecta las características del producto final (Lem et al. 2013). Por otro lado, la estructura compleja y la amplia gama de reactivos empleados para la síntesis de este polímero deriva en una gran variedad de presentaciones, pudiendo encontrarlo como espumas (rígidas y suaves), barnices, adhesivos y selladores, elastómeros y aglutinantes, que se utilizan para la fabricación de colchones, cojines, interiores de autos, empaques, protectores de computadoras y celulares, dispositivos médicos como corazones artificiales, tubos de hemodiálisis, pinturas, ropa, zapatos, entre otros (Akindoyo et al. 2016; Kemonna et al. 2020). El común denominador en la mayoría de estos productos es que se usan por largos periodos, por lo que se diseñan para resistir factores ambientales, degradación, abrasión e hidrólisis (Magnin et al. 2020).

### **3.2 Problemas ambientales con los PUs y manejo de sus residuos**

A pesar de que el PU es uno de los polímeros más producidos y utilizados en numerosos sectores, y aunque existen diversos métodos de tratamiento de sus desechos, el manejo de estos al final de su vida útil es complejo, debido a la diversidad de estructuras físicas y químicas que puede presentar. Como todos los materiales plásticos, los PUs tienen un impacto negativo en el ambiente. En ecosistemas marinos, la presencia de pequeños fragmentos de PU ha sido ampliamente observada (Reddy et al. 2006; Frère et al. 2016; Turner & Lau, 2016; Tursi et al. 2022), mostrando el alto nivel de contaminación por este polímero. Los residuos de PUs se procesan a gran escala por métodos como el reciclaje mecánico y la incineración. El primero implica la trituración de los residuos sólidos, convirtiéndolos en materiales de menor tamaño (hojuelas, gránulos o polvos) que se pueden utilizar como rellenos o como sustratos para procesos posteriores, aunque la limitación es que la técnica no es económica y los productos son de baja calidad. La incineración se aplica principalmente a los productos que no pueden reciclarse, como aquellos que están contaminados o fusionados con otros materiales como madera, cuero o tela. Aunque la incineración permite la reducción de hasta un 99% en volumen, se liberan compuestos tóxicos y carcinogénicos, como el monóxido de carbono, cianuro de hidrógeno y óxido de nitrógeno (Kemonna et al. 2020). Existen también métodos químicos, que generan unidades de hidrocarburos que podrían utilizarse para la síntesis de polímeros de segunda generación. El procesamiento químico para desechos de PU involucra reacciones que rompen las cadenas poliméricas como la hidrólisis, glicólisis o aminólisis. La hidrólisis requiere de una alta demanda energética para generar altas presiones y temperaturas, mientras que sus

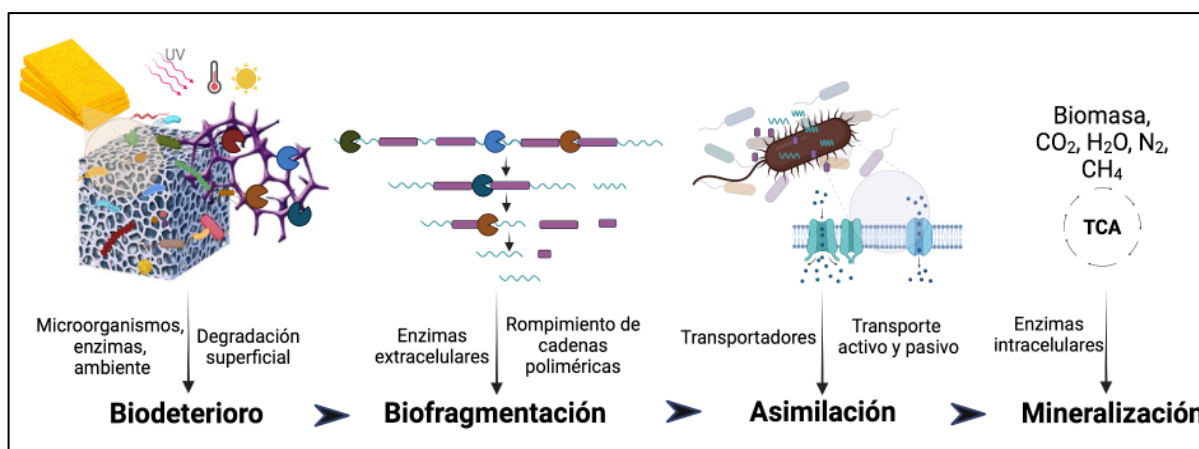
productos son de bajo valor. La glicólisis consiste en una reacción de transesterificación donde se intercambia el grupo éster por un hidroxilo y se generan poliéter polioles. La mayor limitación de este método es la temperatura de procesamiento que alcanza los 190 °C. La aminólisis, también llevada a cabo a altas temperaturas, se realiza en presencia de amonio o hidróxido de amonio y como resultado se obtienen aminas, polioles y ureas (Kemoná et al. 2020; Liu et al. 2021). Por otro lado, aunque existen varios métodos para aprovechamiento de residuos de PU, debido a su heterogeneidad estructural y su estabilidad física, química y biológica, su destino más común son los vertederos a cielo abierto o los rellenos sanitarios, potenciales vectores de contaminación en los que factores ambientales como lluvia, viento o calor degradan desechos y arrastran los compuestos tóxicos liberados de éstos, afectando directamente la calidad del agua, suelo y aire (Jambeck et al. 2015; Kemoná et al. 2020; Utomo et al. 2020). En los últimos años los espacios en vertederos se han reducido y, al menos en países europeos, se cuenta con regulaciones para disminuir la cantidad de basura plástica que se deposita en ellos, por lo que el procesamiento del PU ha ganado importancia. Sin embargo, la mayoría de los métodos que existen actualmente reducen la calidad de los productos, requieren de altas temperaturas o generan compuestos tóxicos. A pesar de su origen xenobiótico los PUs han demostrado ser parcialmente biodegradables al menos a condiciones de laboratorio, por lo que se ha propuesto a la biodegradación como una estrategia adicional para mitigar su impacto ambiental. La biodegradación se considera un método amigable con el ambiente, capaz de generar compuestos monoméricos u oligoméricos fundamentales para el bio-reciclaje y la economía circular, importante para el manejo de plásticos (Gaytán et al. 2020; Liu et al. 2020).

### **3.3 Biodegradación del poliuretano**

La degradación es un proceso que induce cambios en las propiedades de un polímero debido a reacciones físicas y químicas que resultan en el rompimiento de enlaces, transformaciones y formación de nuevos grupos funcionales (Shah et al. 2008; Gaytán et al. 2021). Cuando estos cambios se inducen por la acción de microorganismos o sus enzimas se le conoce como biodegradación. La degradación biológica o biodegradación de polímeros ocurre en diferentes etapas (Fig. 2):

- a) Biodeterioro: Primera etapa, causada por los microorganismos que se adhieren o colonizan la superficie del polímero. Resulta en la degradación superficial, así como en cambios químicos, mecánicos y físicos del polímero. Los cambios durante esta etapa se incrementan o potencian por condiciones bióticas o externas, como la luz, radiación UV y temperatura del

ambiente en que ocurre el proceso. En esta etapa es importante que la superficie del polímero sufra modificaciones fisicoquímicas para promover la adhesión de microorganismos, ya que tan pronto como lo logren, continuarán proliferando y utilizándolo como fuente de carbono (Magnin et al. 2019; Skleničková et al. 2020; Amobonye et al. 2021) (Fig. 2).



**Figura 2.** Evolución de las etapas de la biodegradación en polímeros de poliuretano (modificado de Siracusa, 2019 y Amobonye et al. 2021).

- b) **Biofragmentación:** consiste en la depolimerización, la cual involucra el rompimiento catalítico del polímero deteriorado en pequeñas unidades, por la acción de enzimas extracelulares, y radicales libres generados por microorganismos (Amobonye et al. 2021). La fragmentación es necesaria para facilitar las acciones subsecuentes, que atacarán principalmente a compuestos de bajo peso molecular (Restrepo-Flórez et al. 2014). Las enzimas de esta fase se caracterizan por ataques tipo *endo* y *exo*. Los primeros dan origen a monómeros y oligómeros que pueden ser fácilmente asimilados. Los ataques *exo* resultan en productos de alto peso molecular que requieren posterior degradación antes de ser asimilados (Pathak, 2017; Magnin et al. 2019; Skleničková et al. 2020; Amobonye et al. 2021) (Fig.2).
- c) **Asimilación:** Los compuestos de bajo peso molecular producidos durante la biofragmentación son reconocidos por receptores celulares y transportados al interior de la célula. Aunque el proceso de asimilación de polímeros plásticos a través de la membrana no se ha definido, se ha postulado que como en los hidrocarburos, el proceso involucra transporte activo y pasivo (Magnin et al. 2019; Skleničková et al. 2020; Amobonye et al. 2021) (Fig.2).

d) Mineralización: Una vez que los derivados del polímero son transportados dentro de las células, experimentan una serie de reacciones enzimáticas que conducen a su degradación completa en biomasa microbiana y metabolitos como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub> y CH<sub>4</sub>. Alternativamente, los intermediarios pueden ser canalizados hacia diferentes rutas metabólicas. Por ejemplo, se ha propuesto que la degradación de polietileno procede a través de la formación de ácido acético, que puede entrar a ciclo de Krebs vía la formación del acetil-CoA o puede canalizarse a la formación de lípidos (Wilkes & Aristilde, 2017). El paso de mineralización de los PU incluye diferentes enzimas como esterases, lipasas y oxido- reductasas (Magnin et al. 2019; Skleničková et al. 2020; Amobonye et al. 2021) (Fig. 2).

Dado que los PUs son materiales constituidos de carbono, nitrógeno, oxígeno e hidrógeno, diversos hongos y bacterias han evolucionado en su capacidad de utilizar algunos tipos como fuentes de carbono y energía (Álvarez-Barragán et al. 2016; Kemoná & Piotrowska, 2016). Sin embargo, de acuerdo con las normas europeas, norteamericanas y australianas, se consideran materiales biodegradables, los que alcanzan niveles de biodegradación de 90% en seis meses, bajo condiciones de compostaje y sin formar productos de degradación tóxicos (European Norm EN 13432, ASTM D6400, AS4736), lo cual no ha sido reportado para ningún PU.

### **3.3.1 Factores que afectan la biodegradación de PU**

La susceptibilidad de los PUs al ataque biológico depende de su composición química, donde factores como el peso molecular, entrecruzamiento, polaridad (hidrofilicidad o hidrofobicidad), área superficial y presencia de ciertos grupos funcionales (alifáticos, aromáticos, ésteres, éteres, uretanos), pueden ser importantes. Otro elemento determinante que influye en la biodegradabilidad de los PUs son segmentos duros y suaves, que dan lugar a la formación de dominios amorfos y cristalinos (Fig. 1d) (Magnin et al. 2019; Skleničková et al. 2020). Los dominios cristalinos se degradan a menor velocidad que los amorfos, por ser zonas compactas, de difícil acceso para los microorganismos y sus enzimas. En las regiones amorfas se encuentran fracciones hidrolizables con enlaces éster, cuyo rompimiento biológico ha sido bien documentado. Por otro lado, si el polioli utilizado para la síntesis del PU es un poliéter, los éteres conformarán su dominio amorfo y al ser grupos funcionales químicamente estables, tendrán alta resistencia al ataque de microorganismos (White et al. 1996). Los mecanismos bioquímicos asociados al rompimiento biológico de los éteres son complejos y han sido poco estudiados; los resultados obtenidos hasta ahora han sugerido que este tipo de enlaces son escasamente



susceptibles a la degradación y que un mecanismo oxidativo podría estar relacionado con su catabolismo (Nakajima-Kambe et al. 1999; Stepien et al. 2017; Faccia et al. 2021). Asimismo, el grupo uretano resulta poco accesible al ataque microbiano por las características intrínsecas a los segmentos duros donde se encuentra (Fig. 1). De acuerdo con lo anterior, incrementar los tamaños de los segmentos duros afecta negativamente la degradación biológica, por el contrario, un incremento de tamaño de los segmentos suaves resulta en mayor susceptibilidad a la biodegradación (Kim & Kim, 1997), sobre todo si predomina el enlace éster.

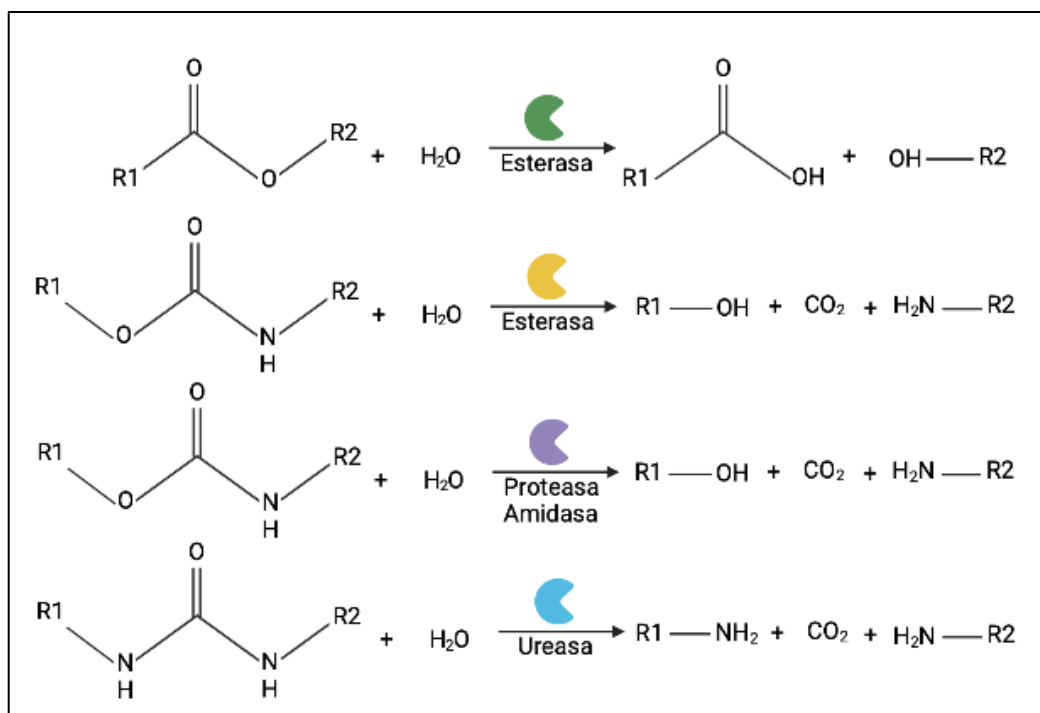
Por sus características poliméricas, como el alto peso molecular, la polaridad y solubilidad, los PU son sustratos de difícil acceso para los microorganismos. Sin embargo, algunos microorganismos emplean mecanismos como el consumo interfacial directo y la secreción de biosurfactantes para mejorar la obtención de nutrientes. En el primer caso, las bacterias colonizan las superficies de los sustratos poliméricos por adhesión y los consumen en el punto de contacto a través de difusión. En este fenómeno, la hidrofobicidad de la superficie celular (HSC) juega un papel importante, ya que los microorganismos son capaces de modificar su membrana para acceder al sustrato (Mikherji & Ghosh, 2012). Para el PU se ha reportado que enzimas extracelulares, asociadas a la membrana erosionan la superficie, incrementando el área de contacto, favoreciendo la adhesión celular y acelerando la biodegradación (Nakajima-Kambe et al. 1999; Cregut et al. 2013). Por otro lado, la producción de biosurfactantes, que es otro mecanismo que adoptan algunos microorganismos para degradar nutrientes complejos, facilita el intercambio entre fases hidrofóbicas e hidrofílicas, y favorece la penetración de especies microbianas a la superficie del polímero. Se ha demostrado que la secreción de estos compuestos al medio de cultivo mejora la degradación de xenobióticos como fenantreno, petróleo, etc., dado que mejoran su solubilización y/o contribuyen con la HSC (Mikherji & Gosh, 2012). Sin embargo, en la biodegradación de PU, la participación de surfactantes biológicos no ha sido estudiada.

### **3.3.2 Enzimas involucradas en la degradación de poliuretano**

La degradación microbiana de PU es mediada principalmente por dos mecanismos: hidrólisis y oxidación, y las enzimas responsables de la ruptura inicial del polímero se encuentran asociadas a la membrana o son extracelulares (Akutsu-Shigeno et al. 1998). En ambos casos actúan rompiendo diferentes grupos funcionales en el PU y generando compuestos de bajo peso molecular, que son introducidos a las células y metabolizados (Fig. 2). En plásticos como el polietileno, las óxido-reductasas: lacasas, oxigenasas y peroxidasas han demostrado capacidad

para degradar al polímero (Restrepo-Flórez et al. 2014; Jeon & Kim, 2015; Sowmya et al. 2015; Zhang et al. 2022). Sin embargo, en los PUs, la efectividad de estas enzimas y sus mecanismos de oxidación han sido poco estudiados. Se ha visto que la peroxidasa de rábano no tiene efectos significativos en el rompimiento en PS-PU o PE-PU (Santerre et al. 1994); mientras que, peroxidases y lacasas de *Aspergillus* sp. demostraron su capacidad para degradar un polietileno adipato uretano mezclado con bajas concentraciones de lignina (4.2 y 9.3%). De acuerdo con la información de espectroscopía infrarroja por la transformada de Fourier (FT-IR), ambas enzimas deterioran fuerte o completamente a la lignina, pero también reducen la intensidad de señales específicas para el PU, representadas por vibraciones en los enlaces C-N, N-H del uretano, así como C=C y C-H del isocianato, indicando su rompimiento (Ignat et al. 2011). Por el contrario, los mecanismos de hidrólisis enzimática de PUs (Fig. 3) han sido ampliamente estudiados, siendo el más común, el rompimiento de las fracciones éster del polímero. Las esterasas hidrolizan el enlace éster liberando ácidos carboxílicos y alcoholes (Fig. 3). Algunas lipasas y cutinasas, que también son esterasas, se han reportado como degradadoras de PU (Schmidt et al. 2017). Recientemente, se identificaron comunidades microbianas ambientales con prominente actividad esterasa extracelular al cultivarse en un barniz de PS-PU durante 21 días de incubación (Vargas-Suárez et al. 2019). Poliéster hidrolasas de los actinomicetos termófilos *Thermobifida fusca* KW3 y *Thermomonospora curvata* DSM43183, denominadas TfCut2, Tcur0390 y Tcur1287, así como la LC-cutinasa, obtenida de un metagenoma de composta, mostraron capacidad para hidrolizar *in vitro* tanto al Impranil® DLN como a los PU termoplásticos Elastollan B85A-10 y C85A-10 (Schmidt et al. 2017). En otra aproximación, la generación y metabolismo de compuestos éster, resultantes de la degradación del Impranil®, empleado como fuente de carbono para cultivar al hongo *Cladosporium pseudocladosporioides* T1.PL.1, sugirió la participación de esterasas (Álvarez-Barragán et al. 2016). Por otro lado, se ha demostrado que la enzima de membrana PudA de *Commamonas acidovorans* TB-35 hidroliza el enlace éster mediante una reacción que involucra la adsorción hidrofóbica de la enzima en la superficie del PU y el consecuente rompimiento del enlace (Nakajima-Kambe et al. 1997; Akutsu et al. 1998). Si bien el enlace éster es altamente susceptible al ataque de esterasas, se ha sugerido que estas enzimas hidrolizan el enlace uretano, produciendo aminas y CO<sub>2</sub> (Labow et al. 1999; Santerre et al. 1994) (Fig. 3). Sin embargo, no existen estudios más específicos al respecto, en los que se analice el rompimiento del uretano en sustratos que solo contengan grupos carbamato, ya que ha resultado complicado diferenciar su hidrólisis (Magnin et al. 2020).

El enlace uretano es química y estructuralmente similar al enlace peptídico y al de la urea, por lo que su rompimiento puede ser catalizado por proteasas y ureasas de baja especificidad (Fig. 3) (Magnin et al. 2019). Una comunidad microbiana ambiental constituida por *Acinetobacter* sp., *Paracoccus* sp., *Bacillus* sp., *Hydrogenophaga* sp., y *Microbacterium* sp., presentó actividad proteasa al cultivarse en presencia de Neo-Rez, un barniz de PS-PU, esta actividad se correlacionó con una disminución en la señal de grupos funcionales amina, identificados por FT-IR (Vargas-Suárez et al. 2019).



**Figura 3.** Mecanismos de hidrólisis enzimática del éster, uretano y urea presentes en un polímero de PU (modificada de Magnin et al. 2020 y Liu et al. 2021).

Proteasas comerciales recombinantes de distintos orígenes biológicos como la papaína,  $\alpha$ -quimiotripsina y bromelina, se utilizaron para degradar PUs comerciales como el Biomer<sup>®</sup>, un PU basado en trietilen glicol/hexametilen diisocianato y PUs segmentados de urea. En todos los casos, mediante análisis por FT-IR se identificó el rompimiento de los enlaces uretano (Phua et al. 1987; Yamamoto et al. 2007; Campiñez et al. 2013). Los grupos urea en poliuretano se forman de manera inducida o espontánea durante su síntesis. Los poli (urea-uretanos) se inducen por reacciones de poliadición entre dioles, diaminas y diisocianatos (Hernández-Sampelayo et al. 2021), mientras que las ureas se generan espontáneamente durante la síntesis de PU, cuando hay un exceso de diisocianatos (Janik et al. 2014). Las ureasas, son enzimas hidrolíticas que

actúan sobre enlaces C-N de la urea liberando aminas y CO<sub>2</sub> (Fig. 3). Los resultados del efecto *in vitro* de una ureasa comercial sobre un PE (urea-uretano), sugieren su actividad en la hidrólisis de la urea contenida en los segmentos duros del polímero (Phua et al. 1987). Por otro lado, se ha encontrado actividad ureasa en procesos degradativos de PUs en los que no se incluye urea en su estructura, por lo que se cree podrían estar involucradas en el rompimiento del uretano (Magnin et al. 2019), sin embargo, hay pocos estudios al respecto. Por ejemplo, se observó un incremento en la actividad ureasa a los 21 días de cultivo de una comunidad microbiana, aislada de espumas de PU en descomposición, cultivada en un barniz de PS-PU (Vargas-Suárez et al. 2019). En otra investigación se aislaron microorganismos de espumas de PU desechadas y se evaluó su actividad para producir enzimas potencialmente útiles para la degradación del PU. Los resultados mostraron que nueve de estos microorganismos lograron crecer en PU sólido y producir ureasas, entre ellos *Epicoccum nigrum*, *Penicillium* spp., *Trichoderma harzianum*, *Arthrobacter* spp., *Microbacterium* spp., *Rhodococcus* spp. (Kemon & Pitrowska, 2016). De este análisis se concluye que la actividad ureasa sobre PU no está demostrada, por lo que son necesarios más estudios para confirmarla. Hasta ahora se conocen pocas amidases relacionadas con la degradación de PU. Recientemente, se realizó un estudio que combinó la acción combinada de una esterasa E3576 y una amidasa E4143 comerciales, encontrando que la esterasa inicia el rompimiento de un PS-PU y genera intermediarios de bajo peso molecular, que resultan más accesibles para que la amidasa hidrolice el enlace uretano (Magnin et al. 2020). Además, se identificó que una amidasa producida por *Nocardia farcinica* y reportada como degradadora de poliamidas y compuestos relacionados, hidrolizó un PS-PU (Gamerith et al. 2016). Uno de los estudios más icónicos al respecto reportó a una enzima obtenida de *Rhodococcus equi* TB-60, que presentó actividad uretano-hidrolasas sobre éster de ácido toluen-2,4-dicarbámico. La enzima, se purificó y caracterizó, encontrando que se trata de una amidasa/esterasa, con capacidad de romper uretanos aromáticos y alifáticos (Akutsu-Shigeno et al. 2006).

### **3.3.3 Microorganismos involucrados en la biodegradación de poliuretano**

La mayor parte de los estudios sobre biodegradación de PUs se han realizado con cepas o aislados de bacterias y hongos identificados por medio de herramientas moleculares. Dentro de las bacterias, las más reportadas para biodegradación de PS-PU son miembros de los géneros *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, y *Corynebacterium*. *Pseudomonas putida* A12 utilizó 92% de un barniz comercial de PS-PU (Impranil DLS) como fuente de carbono en 30

días de cultivo. Los análisis por FT-IR del barniz degradado demostraron una disminución en grupos éster, así como la producción de amidas (Peng et al. 2014). *Comamonas* sp. TB-35 degradó completamente 50 mg de PS-PU, suministrados al medio como única fuente de carbono, generando ácido adípico y dietilen glicol como productos de degradación después de siete días de cultivo. Sin embargo, al eliminar la fuente de nitrógeno en el medio, el rendimiento de degradación disminuyó 48% (Nakajime-Kambe et al. 1997). *Bacillus subtilis* MZA-75 y *Pseudomonas aeruginosa* MZA-85 tuvieron capacidad para utilizar películas PS-PU como sustrato para su crecimiento y fueron capaces de mineralizar a los intermediarios 1,4-bunanodiol y ácido adípico en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (Shah et al. 2016). La habilidad para degradar PU también se ha identificado en una gran variedad de hongos, tales como *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Penicillium*, los cuales degradan principalmente materiales sólidos. Recientemente, nuestro grupo de investigación demostró que el hongo *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 degradó eficientemente espumas saturadas e insaturadas, de bajo peso molecular, constituidas únicamente por segmentos duros. Los resultados demostraron que *C. tenuissimum* A3.I.1 reduce entre 36% y 51% el peso molecular de las espumas y rompe el grupo uretano, éster y éter, generando ácidos carboxílicos como productos de degradación (Burelo et al. 2022). Este hongo fue aislado e identificado junto con otras siete cepas que crecieron en un medio mineral con un barniz de PS-PU como única fuente de carbono. Entre los microorganismos estudiados, los mejores degradadores pertenecen al complejo *Cladosporium cladosporioides* e incluyó a las especies *C. tenuissimum*, *C. asperulatum*, *C. montecillanum* y otros identificados como *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium chrysogenum*. El mejor degradador de impranil fue *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1, que degradó hasta 87% después de 14 días de incubación. La degradación ocurrió mediante el rompimiento de los grupos carbonilo, ester y uretano, y se correlacionaron a esterasas y ureasas extracelulares (Álvarez-Barragán et al. 2016). *Aspergillus* sp. S45 aislada de un vertedero, utilizó películas de PS-PU como única fuente de carbono, reduciendo 20% la masa inicial del polímero después de 28 días de cultivo (Osman et al. 2018). Una cepa de *Aspergillus flavus*, aislada también de suelo de vertedero, redujo 60% la masa inicial de una película de PS-PU, al cultivarse por 30 días (Mathur y Prasad, 2012).

Son pocos los microorganismos reportados como degradadores de PE-PU, entre las bacterias destacan nuevamente los géneros de *Pseudomonas*, *Comamonas* y *Bacillus*, además de *Staphylococcus*. Un estudio comparativo del potencial degradativo de *Pseudomonas denitrificans*, *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis*, sobre dos PE-PU comerciales, uno aromático y otro alifático, durante cinco meses, fue reportado. Los análisis se enfocaron a

explorar cambios físico-químicos en la superficie de los polímeros, revelando que ambos sufren pequeñas pero notables modificaciones. Los cultivos con el PE-PU aromático resultaron en un incremento en la Tg (temperatura de transición vítrea), rompimiento de los segmentos suaves, disminución en la absorbancia de las señales FT-IR para éter y sobre todo erosiones en la superficie de las muestras analizadas por SEM. Para los PE-PU alifáticos los cambios identificados sugirieron degradación progresiva, que se atribuyó al rompimiento de los segmentos suaves y duros, disminución en las bandas FT-IR del éter y uretano. Entre las bacterias estudiadas, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* mostraron mayor potencial degradativo sobre ambos tipos de polímero. El estudio, concluye que los PE-PU aromáticos son menos susceptibles a la degradación en comparación a los PE-PU alifáticos, lo que puede correlacionarse a la estabilidad de los anillos de benceno (Stepien et al. 2017). Por otro lado, la bacteria *Staphylococcus epidermis* KH11, aislada de un catéter infectado, demostró su capacidad para utilizar PE-PU en ausencia de nutrientes orgánicos. El análisis del PE-PU después de 30 días de incubación con *S. epidermis* KH11 indicó un incremento en su hidrofiliidad, disminución en la temperatura de descomposición térmica y reducción en el contenido de N<sub>2</sub> (Jansen et al. 1991). Para los hongos, se ha reportado a *Cladosporium*, *Aspergillus* y *Alternaria* como potenciales degradadores de PE-PU. Algunas especies de *Cladosporium* (*C. tenuissimum* A2.PP.5 y A3.I.1, *C. asperulatum* BP3.1.2, *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1), *Aspergillus* (*A. fumigatus* A2.PL.1) y *Penicillium chrysogenum* BP3.I.7 invadieron la superficie y el interior de espumas de PE-PU, modificando su forma, tamaño y peso, en comparación a los controles no inoculados y tras 21 días de incubación. El peso inicial de las espumas se redujo entre 6-65% y se identificaron daños estructurales que adelgazaron las paredes y generaron poros en las celdas de estos materiales (Álvarez-Barragán et al. 2016). El hongo *Alternaria* sp. PURDK2, incubado por 70 días en medio Luria-Bertani glucosa, disminuyó 27.5% el peso de espumas de PE-PU y promovió cambios estructurales, que analizados por SEM revelaron celdas de la espuma rotas, adelgazadas y derretidas. Además, se demostró que el hongo lleva a cabo el proceso degradativo vía la disminución de peso molecular inducida por rompimientos de uretano y urea (Matsumiya et al. 2010).

### **3.3.4 Comunidades microbianas biodegradadoras de poliuretano**

En el ambiente, los procesos degradativos de xenobióticos son llevados a cabo por comunidades microbianas, es decir, por asociaciones locales de microorganismos que interactúan entre sí y con el ambiente, a través de mecanismos como adhesión, intercambio de metabolitos primarios

y secundarios, entre otros (Brenner et al. 2008; Konopka, 2009; Che & Men, 2019). La diversidad metabólica y división de labores permite a las comunidades microbianas realizar funciones complejas de forma más efectiva y eficiente que sus miembros individuales. Además, los grupos microbianos exhiben mayor resistencia y resiliencia a los cambios ambientales en comparación a las cepas puras (Kato et al. 2008). De hecho, numerosos estudios con compuestos complejos naturales y sintéticos como lignina, colorantes, hidrocarburos, bifenilos policlorados y otros contaminantes orgánicos, han demostrado que los grupos microbianos tienen un desempeño biodegradativo superior en comparación con cultivos axénicos (Mikesková et al. 2012; Tsoi et al. 2019). En este sentido, el uso de comunidades microbianas o de consorcios, representa una estrategia interesante para estudiar la degradación de PUs. En este tipo de enfoque, predominan como sistema de estudio los microorganismos de suelo, seguidos de compostas y consorcios diseñados, mientras que los sustratos van desde barnices de PS-PU hasta espumas y termoplásticos de PS-PU. Como los PUs son materiales recalcitrantes, los experimentos para estudiar su biodegradación por comunidades microbianas se realizan comúnmente en periodos largos, de 20 días a dos años de incubación (Tabla 1). En una de las investigaciones más recientes generadas en nuestro laboratorio, se seleccionaron comunidades microbianas de piezas de PUs en descomposición colectadas en un basurero municipal. Los microorganismos ambientales se sometieron a un proceso de enriquecimiento en un barniz de PS-PU alifático (NeoRez™ R-9637), y posteriormente se cultivaron por 21 días en este barniz. Los resultados revelaron que las comunidades crecen mejor que sus miembros individuales en el barniz. Además, por FT-IR se identificaron cambios estructurales en los enlaces éster, éter y uretano, así como en grupos alifáticos y aromáticos. Algunos de estos cambios químicos, cuantificados en una de las comunidades cultivadas (BP1h), correlacionaron con actividades esterasa, proteasa y ureasa extracelulares. Se encontró también que a inicios del cultivo BP1h presenta actividad esterasa y proteasa más marcada, mientras que la ureasa tiende a ser más alta hacia el final del cultivo. Con base en estos datos se sugirió que la comunidad produce enzimas extracelulares involucradas en el rompimiento de diferentes componentes del barniz (Vargas-Suárez et al. 2019). En otra aproximación, se evaluó la biodegradabilidad de termoplásticos de PS-PU en combinación con lignina, almidón y celulosa, utilizando un consorcio diseñado que combinó *Aspergillus niger* ATCC16404 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027. Se encontró que al incubar los termoplásticos con el consorcio, los materiales pierden de 18-20% de su masa, mientras que los cultivos axénicos promueven pérdidas de 6-11.5%. Adicionalmente, los termoplásticos se enterraron en suelo durante seis meses, utilizando a los microorganismos

autóctonos como sistema degradativo. Al término del tratamiento se registraron pérdidas de masa superiores al 50%, con evidencia de modificaciones estructurales en los enlaces éster y uretano. En general, el estudio demostró por dos métodos que las comunidades microbianas son más eficientes para degradar PS-PU que los cultivos axénicos, resultando una opción prometedora para minimizar el impacto ambiental de los PUs (Fernandes et al. 2016). De forma similar se evaluó la biodegradación de películas de PS-PU en presencia de un consorcio formado por *Bacillus subtilis* MZA-75 y *Pseudomonas aeruginosa* MZA-85. En este estudio se corroboró la ventaja de usar la sinergia entre microorganismos, los resultados mostraron que la velocidad de degradación y la actividad esterasa del consorcio son superiores a las de las cepas puras. Además, el consorcio degrada los segmentos duros y suaves del polímero y altera la estructura física de las películas generando pozos en la superficie. Como resultado del proceso degradativo se identificaron butano diol y ácido adípico, sugiriendo que el consorcio puede ser utilizado para bio-reciclaje (Shah et al. 2016). Recientemente, mediante análisis FT-IR de PE-PU expuestos a una comunidad de suelo, se detectaron disminuciones en la señal asociada al enlace éter ( $1110\text{ cm}^{-1}$ ), sugiriendo rompimiento oxidativo de estos grupos funcionales (Faccia et al. 2021).



**Tabla 1.** Biodegradación de diferentes tipos de PU por comunidades microbianas.

Comunidad microbiana	Fuente	Sustrato (material)	Tiempo de incubación	Efectos sobre el PU	Referencia
<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Paracoccus</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Microbacterium</i> sp.	Espumas deterioradas	PS-PU (Barniz)	21 días	Modificaciones en grupos funcionales, cuantificación de actividades enzimáticas esterasa, ureasa y proteasa.	Vargas-Suárez et al. 2019
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC902, <i>Aspergillus niger</i> ATCC16404 y NI	Consorcio construido, cepas de colección	PS-PU (Termoplástico)	30 días 6 meses	Pérdida de masa, modificaciones estructurales.	Fernandes et al. 2016
NI	Suelo	PS-PU (Espuma)	320 días	Modificaciones en grupos funcionales, cambios en propiedades térmicas.	Gómez et al. 2016
NI	Suelo	PU (Barniz)	12 meses	Modificaciones en grupos funcionales, cambios en propiedades térmicas.	Lu et al. 2016
<i>P. aeruginosa</i> , <i>B. subtilis</i>	Suelo	PS-PU (Película)	20-30 días	Pérdida de masa, modificaciones en grupos funcionales, identificación de productos de degradan, actividad esterasa.	Shah et al. 2016
<i>Fusarium solani</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Thermomyces lanuginosus</i> , etc.	Composta	PS-PU (Termoplástico)	12 semanas	Disminución en fuerza tensil y elongación al corte.	Zafar et al. 2013
NI	Composta	PS-PU y PE-PU (Termoplástico)	24 meses	Disminución de masa, fuerza tensil, cambio en propiedades térmicas.	Krasowska et al. 2012
<i>Bacillus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp.	Suelo	PS-PU (Termoplástico)	6 meses	Modificaciones en grupos funcionales.	Shah et al. 2008
<i>Geomyces pannorum</i> , <i>Nectria</i> sp., <i>Alternaria</i> sp.	Suelo	PS-PU (Termoplástico) PS-PU (Barniz)	6 meses	Disminución de propiedades físicas como fuerza tensil y aclaramiento de Impraniil.	Cosgrove et al. 2007
<i>Penicillium ochroloron</i> , <i>Geomyces pannorum</i> , <i>Nectria gliocladioides</i>	Suelo	PS-PU (Termoplástico) PS-PU (Barniz)	44 días	Reducción de fuerza tensil, aclaramiento de agar con PU (Impraniil).	Barratt et al. 2003

NI: No investigada

A pesar del escaso número de trabajos sobre comunidades microbianas, es evidente la utilidad, ventaja y potencial de usarlos en la biodegradación de PUs. Este potencial se basa en la diversidad genética, enzimas y rutas catabólicas que se integran en un proceso degradativo comunitario. Así, el estudio de comunidades microbianas, sobre todo de zonas contaminadas son fuente de conocimiento con miras a proponer un proceso biotecnológico aplicable a la degradación de desperdicios de PUs.

### **3.4 Antecedentes directos del proyecto**

En nuestro laboratorio se aislaron ocho comunidades microbianas provenientes de ocho trozos de espumas deterioradas, colectadas en el basurero Bordo Poniente, Ciudad Nezahualcóyotl, Edo. Mex. Las espumas se incubaron en medio mineral con PolyLack<sup>®</sup> (MM-PL), un barniz complejo y altamente recalcitrante por su formulación, en la que se encuentran grupos funcionales tipo éter, acrílico, aromáticos y alifáticos. Así, el barniz contiene un copolímero de poliéter poliuretano acrílico (PE-PU-A) y aditivos xenobióticos como el isopropanol (IP), 2-butoxietanol (2-BE), *N*-metil-2-pirrolidona (NMP), dipropilén glicol butil éter (DPGBE) y dipropilén glicol metil éter (DPGME). Después de siete días, los cultivos de las espumas en MM-PL mostraron turbidez, un signo de la presencia de microorganismos. Se tomaron dos mL de estos cultivos y se reinocularon en MM-PL incubando por siete días. Este proceso se repitió dos veces más, y los cultivos resultantes se utilizaron para conservar las comunidades preparando glicerol que se almacenaron a -70 °C (Casarrubias, 2010). Estas ocho comunidades microbianas se denominaron BP1 a BP8. Todas las comunidades crecieron en PolyLack, siendo BP5 y BP6 aquellas con un crecimiento más alto, cuantificado a los cinco días de cultivo (Savín Gámez, 2016). La capacidad degradativa de las comunidades sobre el PolyLack<sup>®</sup> se demostró por FT-IR en cultivos de 21 días. El estudio de los cambios químicos al final del cultivo indicó que los grupos éster y uretano fueron los más afectados por la actividad degradativa de todas las comunidades y que en particular BP3, BP6 y BP8 rompen el grupo éter, uno de los más recalcitrantes en la estructura química del PolyLack<sup>®</sup>. Se analizó la composición microbiana de algunas de las comunidades, mediante electroforesis de DNA con gradiente desnaturizante (DGGE) de la región V3 del gen 16S rDNA. Los resultados revelaron una preponderancia de los órdenes *Rhizobiales* y *Micrococcales*, además se identificaron géneros como *Paracoccus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Advenella*, *Bordetella*, *Microbacterium*, *Castellaniella* y *Populibacterium*, algunos de estos degradadores de xenobióticos y potencialmente degradadores de PUs (Vargas-Suárez et al. 2021).

### 3.5 Análisis del efecto de las comunidades BP8 y BP6 sobre el PolyLack e identificación de su composición microbiana.

En el presente trabajo se realizó un análisis detallado del proceso de degradación que las comunidades BP8 y BP6 ejercen sobre el barniz PolyLack®. El análisis involucró la caracterización del crecimiento, consumo de carbono, así como de la identificación de los cambios químicos en la estructura de los componentes del barniz. De forma simultánea con este trabajo, se realizó la secuenciación de los metagenomas de las comunidades BP8 y BP6 mediante Hi-C, una técnica novedosa que permite reconstruir los genomas individuales de especies microbianas utilizando interacciones físicas entre secuencias dentro de las células (Burton et al. 2014). Tanto la secuenciación como el análisis bioinformático que permitió reconstruir los metagenomas y estudiar el potencial en el fenotipo de ambas comunidades, fueron realizados por el Dr. Ayixon Sánchez-Reyes durante su estancia posdoctoral en el laboratorio de la Dra. Herminia Loza Tavera. Los resultados y análisis detallados de la degradación de PU y del análisis metagenómico de la comunidad BP8 se publicaron en Gaytán et al. 2020. Los resultados de la comunidad BP6 correspondientes a los efectos de la degradación y análisis metagenómico se publicarán en Sánchez-Reyes et al. 2023. Brevemente, para analizar los metagenomas se prepararon dos bibliotecas (Hi-C y shotgun) a partir de células provenientes de 5 días de cultivo en 50 mL de MM-PL de cada una de las comunidades. Ambas bibliotecas se secuenciaron por extremos emparejados o terminales mediante la plataforma NextSeq 500 Illumina y se realizaron los ensamblajes *de novo* de las lecturas crudas de cada una de las comunidades. Posteriormente, las lecturas Hi-C se alinearon con los contigs de la biblioteca shotgun, obteniendo un ensamblaje a partir del cual se obtuvieron los genomas individuales para cada comunidad. Para determinar el perfil taxonómico de las comunidades se partió de las lecturas shotgun, utilizando las herramientas MetaPhlAn y Krona para BP8 y BP6, respectivamente. En el análisis filogenético se utilizaron la subunidad A de la DNA girasa y las proteínas ribosomales L3 y S5 como marcadores moleculares.

Para obtener el perfil taxonómico de BP8 se utilizaron 17'282,414 lecturas, a partir de estas lecturas se detectaron cinco órdenes bacterianos (abundancia): *Rhodobacterales* (83%), *Rhizobiales* (8.9%), *Burkholderiales* (6.8%), *Actinomycetales* (0.83%), *Sphingobacterales* (0.08%), y un orden viral *Caudovirales* (0.33%). Las bacterias correspondieron a 16 géneros, siendo *Paracoccus* (83%) y *Ochrobactrum* (8.7%) los más abundantes. Después de analizar contigs mayores a 1,000 pb, se obtuvo un ensamblaje de

5,339 contigs con un tamaño total de 21'228,807 pb. Después, se mapearon las lecturas Hi-C sobre el ensamble shotgun, generando 3,072 contigs con una longitud total de 17'618,521 pb. Finalmente, se logró la deconvolución de cinco genomas, tres casi completos (>95% de completud) y dos substancialmente completos (89 y 71% de completud). El análisis filogenético mostró clados bien soportados de *Paracoccus*, *Chryseobacterium*, *Parapedobacter*, un miembro de la familia de *Microbacteriaceae* y *Ochrobactrum intermedium*.

El análisis del perfil taxonómico de BP6 realizado con Krona, empleó 187'683,048 lecturas, detectando al menos siete ordenes bacterianos (abundancia): *Rhizobiales* (25%), *Burkholderiales* (37%), *Bacteroidetes* (9%), *Micrococcales* (8%), *Flavobacteriales* (3%), *Xanthomonadales* (4%) y *Rhodobacterales* (5%) y algunas bacterias sin asignación. En el ensamble *de novo* se obtuvieron 36,199 contigs con un tamaño total de 168'201,929 pb. El mapeo de lecturas Hi-C sobre el ensamble *de novo* generó 8,299 contigs con longitud de 137'382,052 pb. Posteriormente, se deconvolucionaron 35 genomas, de los cuales 29 mostraron más de 90% de completud y menos del 5% de contaminación. El análisis muestra que el nicho ocupado por BP6 está dominado por microorganismos como (abundancia): *Achromobacter insolitus* (6%), *Cupriavidus gillardii* (6%), *Achromobacter denitrificans* (5%), *Castellaniella defragans* (5%), *Achromobacter xylosoxidans* (4%), *Paracoccus denitrificans* (4%), *Ochrobactrum antropi* (2%), *Sphingobacterium* sp. (1%), *Alicyciphylus denitrificans BC* (1%), *Alicyciphylus denitrificans K601* (1%), *Rhizobium* sp. (1%), *Achromobacter* sp. (0.9%), *Hydrogenophaga* sp. (0.8%), *Mezorhizobium ciceri* (0.8%), además de géneros como *Micrococcaceae*, *Cryseobacterium*, *Shinella*, *Acidovorax*, entre otros.

#### **4. HIPÓTESIS**

El crecimiento de las comunidades microbianas BP8 y BP6 utilizando un barniz de poliéter poliuretano acrílico como única fuente de carbono, dependerá inicialmente de su capacidad enzimática para degradar a los aditivos del barniz, componentes con estructuras químicas sencillas y posteriormente, los microorganismos producirán enzimas degradadoras del poliuretano.

## **5. OBJETIVOS**

### **General**

Determinar la capacidad degradativa de las comunidades microbianas BP8 y BP6 sobre la estructura química y propiedades de un barniz comercial de poliéter poliuretano acrílico (PolyLack®) y evaluar la actividad de algunas enzimas involucradas en la degradación.

### **Específicos**

- I. Establecer la cinética de crecimiento de las comunidades BP8 y BP6 al cultivarse en el barniz de poliéter poliuretano acrílico como única fuente de carbono.
- II. Identificar interacciones célula-sustrato que pudiesen influenciar la degradación del barniz.
- III. Establecer la capacidad de las comunidades para degradar los diferentes aditivos del barniz.
- IV. Evaluar el efecto de las comunidades microbianas sobre los diferentes grupos funcionales, peso molecular y propiedades térmicas del polímero de poliuretano.
- V. Cuantificar actividades enzimáticas involucradas en la degradación del barniz: esterasa, ureasa y uretanasa.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se planteó una estrategia experimental en tres etapas, correspondientes a la caracterización cinética del crecimiento celular en un intervalo de 25 días (etapa I), análisis de cambios químicos y físicos asociados a la biodegradación del PolyLack® (etapa II) y finalmente, la cuantificación de actividades enzimáticas asociadas al proceso biodegradativo del polímero (Fig. 4).

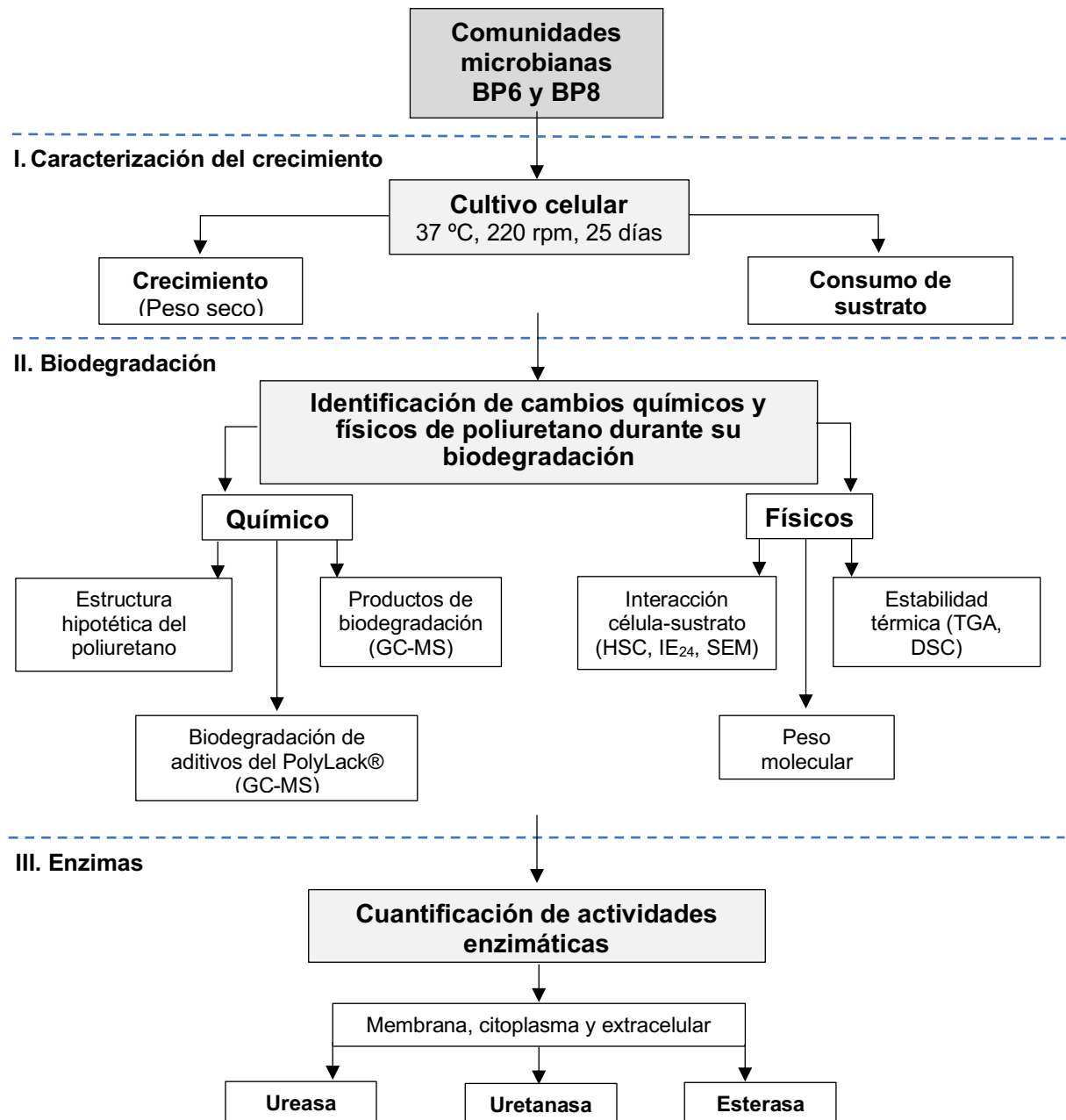


Figura 4. Estrategia experimental del proyecto.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Materiales

En este trabajo se utilizaron los siguientes materiales: micropipetas Eppendorf (1000, 200 y 20  $\mu$ L), balanza analítica, desecador, tubos Falcon (50 y 15 mL), tubos Eppendorf (1.5 mL), termómetro, agitadores magnéticos, espátulas, filtros Whatman PVDF (tamaño de poro 0.45  $\mu$ m), pisetas, jeringas plásticas (20 mL). Materiales de vidrio como probetas (50, 100, 250 mL), matraces Erlenmeyer (250 y 125 mL), tubos de ensayo (15 mL), vasos de precipitado (50, 250, 500 mL), frascos Corning (250 mL y 1 L), pipetas Pasteur. Los equipos empleados fueron: balanza analítica (Explorer-Ohaus), autoclave (SM-300 de Yamato), incubadora con agitación (MaxQ600 de Eppendorf), estufa al vacío (Precision Scientific), sistema de filtración al vacío, baño María (180 S, Precisión Scientific), parrilla de calentamiento con agitación (MS7 -H550-S de DLAB), campanas de extracción y de flujo laminar (Veco), equipo de ultrafiltración (Millipore), microcentrífuga (Microfuge 16 de Beckman Coulter), centrífuga (5417c de Eppendorf), ultracentrífugas (optima XL100K de Beckman), sonicador. La marca y modelo de equipos como el espectro infra-rojo, cromatógrafos, analizador elemental y microscopio electrónico de barrido se incluyen en las siguientes secciones. Además, para el desarrollo de las diferentes técnicas se utilizaron reactivos grado ACS, HPLC, espectrofotométrico, entre otros. Los detalles de cada reactivo se presentan en el anexo A.

### 7.2 Composición del barniz comercial PolyLack®

El trabajo se realizó empleando como modelo de estudio de la biodegradación del PU al barniz comercial PolyLack® Aqua Brillante (Sayer Lack, Prod. Num. UB-0800, México). De acuerdo con el fabricante, se trata de una dispersión de copolímero uretano aromático/acrílico, adicionado con disolventes orgánicos y agua. El barniz contiene los aditivos indicados en la Tabla 2, destacando los dipropilén glicoles por contener éter, uno de los enlaces con más resistencia a la mineralización biológica.

**Tabla 2.** Composición y características de los aditivos presentes en PolyLack® Aqua Brillante UB-0800.

Aditivo	Concentración (%)	Tipo de compuesto
Copolímero acrílico uretano	<30	Poliuretano
N-metil-2-pirrolidona (NMP)	<6	Lactama
2-butoxietanol (2-BE)	<5	Glicol éter
Dipropilenglicol butil éter (DGBE)	<2	Glicol éter
Dipropilenglicol monometil éter (DGME)	<1	Glicol éter
Isopropanol (IP)	<3	Alcohol terciario



### **7.3 Recolección, enriquecimiento y conservación de las comunidades microbianas**

Las comunidades BP6 y BP8 se obtuvieron de espumas de PU deterioradas, recolectadas en el basurero Bordo Poniente (Nezahualcóyotl, Estado de México), como parte de un trabajo previo de nuestro grupo de investigación (Vargas-Suárez et al. 2019; Vargas-Suárez et al. 2021). Las muestras se identificaron visualmente en pilas de basura y lixiviados, se colectaron y se guardaron en bolsas de plástico estériles para su transporte al laboratorio. Para el enriquecimiento, se cortaron piezas de estas espumas ( $\sim 1 \text{ cm}^3$ ) bajo condiciones estériles. Las piezas se depositaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 25 mL de medio mineral (Nakajima-Kambe et al. 1995) con PolyLack® (0.3% p/v) (MM-PL), como única fuente de carbono. Los matraces se incubaron a 30°C, 220 rpm por 7 días. Al final de este tiempo, se transfirieron 2 mL del cultivo a MM-PL fresco y se incubaron nuevamente. El proceso se repitió 2 veces más, completando un total de 28 días, antes de conservar a las células en MM-PL-glicerol (30%) a -70°C. Una alícuota de 500  $\mu\text{L}$  de los cultivos almacenados en glicerol se inocularon en matraces de 125 mL con 25 mL de MM-PL. Los matraces se incubaron por 7 días y se utilizaron para preparar lotes de gliceroles (30%), colocando alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  en tubos Eppendorf. Los lotes se almacenaron a -70°C (Thermo Scientific TSE series) y se utilizaron en el desarrollo de este trabajo (Vargas-Suárez et al. 2021).

### **7.4 Cultivo de las comunidades**

Cada experimento inició con un pre-cultivo, que consistió en inocular 500  $\mu\text{L}$  de la comunidad de interés, conservada desde su selección en MM-PL-glicerol a -70°C, en matraces de 250 mL con 50 mL de llenado con MM-PL, estos se incubaron a 37°C, 220 rpm por 48 h. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 11,963 x *g*, por 10 min a 4°C (Sorvall RC5-C, Rotor SS34), se eliminó el sobrenadante y se determinó su peso fresco. Las células se resuspendieron en un volumen de MM-PL necesario para alcanzar una concentración de 3 mg/mL (peso fresco). Esto correspondió a 830 mg de células resuspendidas en 275 mL de MM-PL, que se distribuyeron en 11 matraces estériles de 125 mL con 25 mL de llenado. Cada matraz correspondió a los tiempos de cultivo analizados (0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 25 días) ya que se empleaba un matraz para cada análisis. Los matraces se incubaron a 37°C y 220 rpm. Como control de cultivo se utilizó MM-PL sin inocular y se sometió a las condiciones de incubación descritas.

### **7.5 Determinación del crecimiento de las comunidades**

Se centrifugaron los 25 mL de medio de cultivo de un matraz a 11,963 x *g*, por 10 min a 4 °C (Sorvall RC5-C, Rotor SS34), se descartó el sobrenadante y las células se lavaron para eliminar residuos del barniz. Los lavados celulares consistieron en resuspender el pellet celular en buffer

de fosfatos (50 mM, pH 7) y centrifugar a las mismas condiciones. Este proceso se repitió dos veces más o hasta que el buffer de lavado se tornó translúcido. Las células lavadas se centrifugaron y resuspendieron en 5 mL del buffer de fosfatos. La suspensión celular se filtró al vacío, a través de filtros Whatman 0.45  $\mu\text{m}$  puestos previamente a peso constante. Los filtros con células se colocaron en una estufa al vacío durante tres días a 37°C y se calculó el crecimiento por diferencia de peso.

## **7.6 Interacciones célula-sustrato**

**7.6.1 Hidrofobicidad de superficie celular (HSC):** La HSC se determinó utilizando un método bifásico, buffer (con células resuspendidas)-disolvente no polar (*n*-hexadecano), el cual evalúa la afinidad de las células por un ambiente hidrofóbico versus uno hidrofílico (Rosenberg et al. 1980; Danchik & Casadevall, 2021). El principio básico de este método implica que una disminución en la turbidez de la fase acuosa, después de un proceso de agitación, correlaciona con la hidrofobicidad de las células y con su capacidad para adherirse a zonas alifáticas en el copolímero de PE-PU-A. Las células de diferentes tiempos de cultivo se cosecharon por centrifugación y los sobrenadantes se reservaron. Posteriormente, las pastillas celulares se lavaron 3 veces con buffer de fosfatos (50 mM, pH 7), centrifugando a 11,963 x *g* por 10 min a 4° C (Sorvall RC5-C, Rotor SS34) y se resuspendieron en el mismo buffer de lavado hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.6 a 600 nm. En un tubo de ensayo se colocaron 2 mL de suspensión celular y enseguida 2 mL de *n*-hexadecano, observando dos fases. El tubo se agitó vigorosamente en vórtex durante 3 min y se dejó reposar por 30 min, permitiendo la separación de fases. Después de ese tiempo, con una pipeta Pasteur se colectó la fase acuosa (suspensión celular) y se leyó la DO a 600 nm. Una DO menor a 0.6 indica que una fracción de las células se mantuvo en la fase con *n*-hexadecano. La HSC se expresó como porcentaje de adherencia a *n*-hexadecano y se calculó:  $100 \times [1 - (\text{DO}_{600} \text{ de la suspensión celular después de 30 min} / \text{DO}_{600} \text{ de la suspensión celular inicial})]$  (Rosenberg et al. 1980).

**7.6.2 Índice de emulsificación 24 (IE<sub>24</sub>).** El método IE<sub>24</sub> se aplica a los sobrenadantes de cultivo libres de células, para hacer una determinación indirecta de la presencia de biosurfactantes, moléculas anfipáticas que reducen la tensión superficial entre dos fases poco miscibles, permitiendo la formación de emulsiones (Cooper & Goldenberg, 1987). En un tubo de ensayo, se agregaron 2 mL del sobrenadante previamente reservado y 3 mL de *n*-hexadecano. El tubo se agitó vigorosamente en un vórtex por 3 min y se dejó reposar durante 24 h a temperatura ambiente. Al término de este tiempo, la presencia de pequeñas gotas en la fase orgánica (emulsión) sugiere la existencia de algún biosurfactante en el MM-PL. El IE<sub>24</sub> se calculó de la

siguiente manera:  $100 \times$  [altura de la fase de emulsión/altura total de las dos fases] (Cooper & Goldenberg, 1987). Es importante que el material utilizado para los ensayos de HSC e IE<sub>24</sub> sea de vidrio y esté libre de grasa y otros residuos orgánicos, por lo que deben lavarse en caliente con jabón.

**7.6.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM).** SEM es una técnica que se fundamenta en la emisión de un haz de electrones que interactúan con los átomos de una muestra y producen señales. Las señales son captadas por detectores y transformadas en imágenes de alta definición (López de la Rosa et al. 2021). Para el análisis de las comunidades BP8 y BP6 cultivadas en MM-PL se colocaron 0.5 mL de medio de cultivo en un tubo Eppendorff y se añadió un volumen igual de glutaraldehído (3% en buffer de fosfatos 50 mM, pH 7). El tubo se agitó suavemente por inversión y se almacenó a 4 °C durante la noche. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con buffer de fosfatos (50 mM, pH 7) a 2,700 x g por 5 min (Eppendorf 5417R, rotor F-45-30-11). Al final del último lavado se descartó el sobrenadante y se realizó una deshidratación secuencial de la pastilla celular empleando etanol a concentraciones crecientes (30, 50, 70, 85 y 100%). Por cada concentración de etanol se centrifugó la pastilla celular a 2,700 x g por 5 min (Eppendorf 5417R, rotor F-45-30-11). Se eliminó el sobrenadante del último paso de deshidratación (etanol 100%) y se evaporó al vacío a temperatura ambiente. El análisis se realizó en un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5900 LV) al alto vacío, electrones secundarios y recubrimiento de oro.

## **7.7 Análisis de las modificaciones químicas y físicas generadas por las comunidades microbianas sobre el PolyLack®**

**7.7.1 Preparación de muestras.** Un volumen de 25 mL de medio de cultivo se centrifugó a 11,963 x g, por 10 min a 4° C (Sorvall RC5-C, Rotor SS34). Se descartaron las células y el sobrenadante se filtró al vacío (filtros Whatman, 0.45 µm), para eliminar cualquier residuo celular. La mitad del sobrenadante se colocó en tubos Falcon y se refrigeró a 4°C, hasta su procesamiento para los análisis de productos de degradación, concentración de aditivos y pesos moleculares por técnicas cromatográficas. El volumen restante del sobrenadante se colocó en un tubo de vidrio y se llevó a sequedad en una estufa al vacío a 37°C por una semana. El sobrenadante seco se pulverizó con una espátula y se utilizó para los análisis de determinación de carbono total por análisis elemental, las modificaciones del PU por biodegradación mediante espectroscopía infra-rojo por la transformada de Fourier (FT-IR), termogravimetría (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Para la propuesta de la estructura química del PU por resonancia magnética nuclear de protón (RMN-<sup>1</sup>H) se analizaron el MM-PL y el barniz, ambos secos y pulverizados.

**7.7.2 Carbono total.** El contenido de carbono total se determinó en un analizador elemental Perkin Elmer 2400 CHN/O, Series II, colocando  $2\pm 0.2$  mg de barniz seco a  $975^{\circ}\text{C}$  bajo una atmósfera de nitrógeno.

**7.7.3 Determinación de la estructura química del PU por RMN- $^1\text{H}$ .** La RMN es una técnica espectroscópica que permite la identificación y determinación estructural de moléculas orgánicas, se fundamenta en la absorción de radiofrecuencias por núcleos magnéticamente activos, es decir, núcleos atómicos con un número impar de protones y/o neutrones como  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ , y  $^{31}\text{P}$  (Hatzakis, 2019). Para la propuesta de una estructura química de copolímero de PE-PU-A del PolyLack<sup>®</sup>, se utilizó un espectrofotómetro Bruker modelo Avance III HD, con una sonda de BBI 400 MHz para el  $^1\text{H}$ . Las muestras se prepararon disolviendo el barniz o el MM-PL seco en un volumen suficiente de piridina- $\text{d}_5$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) para alcanzar una concentración de 30 mg/mL. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se reportan en partes por millón y se relacionan con tetrametilsilano como referencia interna (TMS,  $\delta = 0.00$  ppm).

**7.7.4 Cambios en enlaces y grupos funcionales por FT-IR.** La técnica de FT-IR se basa en que un gran número de moléculas absorben luz en la región IR del espectro electromagnético. Al absorber energía IR las moléculas de una muestra vibran. La absorción, que se mide como función de longitud de onda  $\text{cm}^{-1}$ , es característica de la naturaleza de los enlaces químicos en la muestra analizada (Jung et al. 2018). Los análisis por FT-IR de los sobrenadantes de cultivo con las comunidades BP8 y BP6 se realizaron en un espectrómetro Perkin Elmer Spectrum 400 con una celda ATR de diamante. Los espectros representan el promedio de 64 escaneos con resolución de  $4 \text{ cm}^{-1}$  en un intervalo de  $500\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$ .

**7.7.5 TGA para análisis de pérdida de masa por descomposición térmica.** La TGA es una técnica analítica que se basa en la medición de los cambios de masa de una sustancia en función de la temperatura o del tiempo en una atmósfera controlada, permitiendo caracterizar su composición, reacciones de descomposición y temperatura de descomposición (Saadatkhan et al. 2019). Para los sobrenadantes de cultivo de las comunidades, se pesaron alrededor de 2.5 mg de PU y se analizaron en un termo-gravímetro Perkin Elmer TGA 4000. La muestra se calentó de  $30\text{-}500^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de  $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ . La adquisición de datos y la primera derivada se realizó con el software Pyris de Perkin Elmer.

**7.7.6 DSC para análisis de cambios en la estructura tridimensional del PE-PU-A.** Esta técnica mide la diferencia de temperatura entre una muestra y una referencia interna en función de la temperatura, permitiendo determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia cuando se calienta o enfría a una velocidad constante en un intervalo de temperaturas (Raudino

et al. 2013). Para el análisis DSC de este trabajo, muestras de 10 mg de PU seco se analizaron en un calorímetro diferencial de barrido TA Instrument Q2000 calentando a una velocidad de 10°C/min, de 20 a 600°C, bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Los datos obtenidos se graficaron y analizaron con el Software Origin 8.0-8.2.

#### **7.7.7 Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).**

La GC-MS es una técnica híbrida que permite separar, identificar y cuantificar componentes volátiles o semivolátiles de una mezcla compleja. La GC se basa en el principio de la partición (distribución diferencial) de un compuesto volátil entre dos fases, una móvil (gas acarreador) y una estacionaria (superficie adsorbente). A medida que los componentes se separan, eluyen a diferentes tiempos de retención y son ionizadas por el espectrómetro de masas, que se fundamenta en la separación de partículas de acuerdo con su masa y su carga (Wang et al. 2020). Para el análisis de los productos de degradación de BP8 y BP6 se realizó una extracción en fase sólida de los sobrenadantes de los medios de cultivo, utilizando cartuchos SupelClean LC-18 de Supelco (6 mL). Para activar los cartuchos se pasaron 6 mL de metanol, seguido por 6 mL de agua destilada. En el caso de cartuchos re-utilizados se hizo un pre-acondicionamiento para eliminar impurezas, pasando 6 mL de cloroformo, seguido por metanol y agua destilada. Después del acondicionamiento, 25 mL sobrenadante de cada tiempo de cultivo se pasaron por los cartuchos a un flujo de 2 mL/min. Los compuestos de interés se retuvieron en el empaque de los cartuchos y se eluyeron con 2 mL de cloroformo:metanol (1:1). Este volumen se filtró a través de filtros Whatman PVDF de 0.45 µm, se colocó en viales para cromatografía y se concentró hasta 0.5 mL. Se inyectó 1 µL de las muestras en un cromatógrafo Agilent GC 7890B, utilizando dos columnas de 5% fenil metil polixilosano (15 m x 250 µm x 0.25 µm). El horno se calentó de 50°C a 300°C a 20°C/min. El He se utilizó como gas acarreador a 1 mL/min y el inyector se empleó a 300°C. La identificación de los compuestos se realizó con un analizador de masas cuadrupolar (Agilent 5977A MSD) con energía de ionización de electrones (1450 EMV) y un escaneo de intervalo de masas de 30-500 amu. La velocidad de escaneo fue de 2.8 spec/s. La adquisición de datos se realizó con los programas Enhanced MassHunter (comunidad BP8) y AMDIS (comunidad BP6). La identificación se basó en comparación de los espectros de masas generados contra la base de datos NIST-2002, usando como criterios los valores de similitud, R y R-match > 700 y probabilidades ≥ 20%. Cabe mencionar que, por las características del método de extracción y el equipo de cromatografía, se identificaron compuestos no polares y moderadamente polares. En el caso de los aditivos xenobióticos, una vez identificados los picos correspondientes se calculó la concentración de éstos en los sobrenadantes utilizando curvas

estándar, elaboradas a partir del 2-BE, NMP, DGBE y DGME puros (Sigma-Aldrich Chemicals  $\geq$  98% de pureza). En el caso de los dipropilen glicoles, que son una mezcla de isómeros, se sumó la concentración de cada uno para obtener su concentración total.

**7.7.8 Determinación de los pesos moleculares promedio del copolímero PE-PU-A por cromatografía de permeación en gel (GPC).** La GPC es una técnica analítica que permite la separación de moléculas con base a su tamaño. El peso molecular promedio en número ( $M_n$ ), peso molecular promedio en masa ( $M_w$ ) y el índice de polidispersidad (IP) del PE-PU-A y sus productos durante la degradación, se determinaron por GPC. Para este análisis, las muestras del sobrenadante se obtuvieron de forma similar que para el análisis GC-MS, pero los 2 mL extraídos con cloroformo:metanol (1:1) se evaporaron a sequedad a 25-30°C. La muestra seca se resuspendió en tetrahidrofurano (THF) a una concentración de 15 mg/mL, se filtró a través de filtros Whatman PVDF de 0.45  $\mu$ m y se inyectó en un cromatógrafo de líquidos Waters Alliance 2695 a 30°C. Se utilizó una columna universal, a una velocidad de flujo de 0.3 mL/min, usando el THF como agente eluyente. El equipo se calibró empleando estándares de poliestireno monodisperso. Cada muestra proveniente de diferentes tiempos de cultivo se corrió por triplicado.

## **7.8 Ensayos de actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de poliuretano**

**7.8.1 Obtención de proteínas de membrana, citoplasma y extracelular.** Se centrifugaron 250-300 mL de medio cultivo a 14,475 x  $g$ , por 10 min a 4°C (Sorvall RC5-C, Rotor SS34), se separó el sobrenadante y se almacenó en refrigeración a 4°C. La pastilla celular se lavó en las condiciones previamente descritas, repitiendo el lavado hasta eliminar los residuos del barniz. Se preparó una suspensión celular al 25% peso fresco/volumen y se sonicó en frío con una amplitud de 21% por 6 ciclos (15 s ON y 15 s OFF). Las fracciones correspondientes a membranas y citoplasma se separaron por centrifugación a 20,816 x  $g$  por 15 min a 4°C (Eppendorf 5417R, rotor F-45-30-11). El citoplasma (sobrenadante) se concentró con centricones (10 kDa), centrifugando a 3,000 x  $g$  por 30 min a 4°C (Eppendorf 5804R, rotor S-4-72). Las membranas (pastilla) se resuspendieron en buffer de fosfatos (50 mM, pH 7), se sonicaron y centrifugaron antes de conservarse en frío (4°C). Para obtener las proteínas extracelulares, el sobrenadante frío del medio de cultivo se ultracentrifugó a 125,862 x  $g$  por 1 h a 4°C (Beckman, rotor Type 70 Ti), esto permitió eliminar residuos del barniz y de células. El sobrenadante libre de PolyLack<sup>®</sup> se ultrafiltró con un equipo Amicon<sup>®</sup> y una membrana de 10 kDa. Una vez que se redujo el volumen (10 mL aprox.), se transfirió a centricones (10 kDa), centrifugando a 3,000 x  $g$  por 30 min a 4°C (Eppendorf 5804R, rotor S-4-72). La cantidad de proteína en cada fracción se determinó utilizando el método de Bradford.

**7.8.2 Cuantificación de proteína (Método de Bradford).** El método de Bradford se basa en una reacción colorimétrica de proteínas con el colorante azul de Commassie. Las proteínas se unen al colorante en un medio ácido, induciendo una variación en su absorbancia y la generación de un color azul, el cual es proporcional a la concentración de proteínas en solución (Kruger et al. 2009). Para la cuantificación de proteínas de las diferentes fracciones, se mezcló una alícuota (5-20  $\mu\text{L}$ ) de los concentrados obtenidos en la sección anterior (7.7.1) con la cantidad de buffer de fosfatos suficiente para completar 800  $\mu\text{L}$ , se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford, y se agitó vigorosamente, leyendo a 595 nm en un espectrofotómetro (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000). Simultáneamente, se corrió una curva patrón, que se preparó utilizando 1, 2, 4, 8, 12, 16 y 20  $\mu\text{g}$  de proteína a partir de un stock de albúmina (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) (Fig. 5).

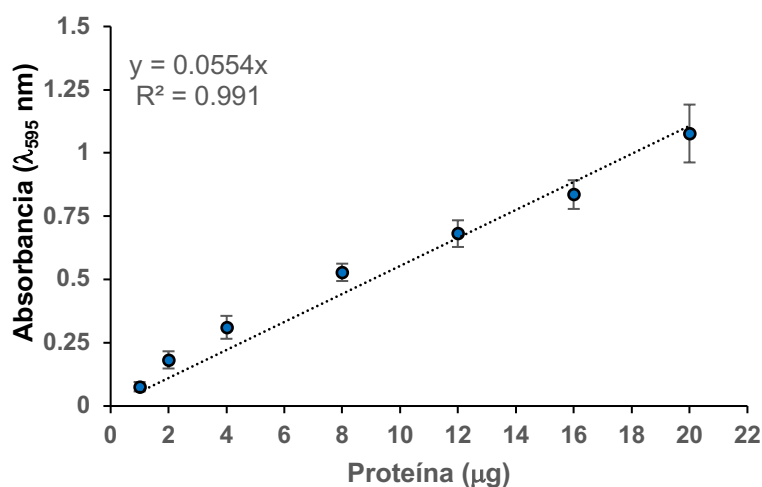


Figura 5. Curva patrón para determinación de contenido de proteína.

### 7.8.3 Cuantificación de actividades enzimáticas

**7.8.3.1 Esterasas.** La actividad esterasa en las diferentes fracciones celulares se determinó espectrofotométricamente empleando como sustrato *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA), un éster de cadena acíclica. La hidrólisis del éster resulta en ácido acético y *p*-nitrofenol (*p*-NP), el cual posee una absorción máxima a 405 nm, por lo que el transcurso de la reacción puede medirse por la aparición de este producto. El ensayo se realizó en un espectrofotómetro de microplaca (Epoch de Biotek). La reacción se preparó mezclando la fuente de proteína (10-25  $\mu\text{g}$ ) con buffer de fosfatos (50 mM, pH 7) hasta completar un volumen de 190  $\mu\text{L}$ . La mezcla se incubó por 10 min a 37°C, se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de sustrato (*p*-PNA 100 mM, disuelto en acetonitrilo) y se agitó en vórtex para leerse a 405 nm, tomando lecturas cada 30 segundos durante 5 min. Durante cada ensayo se corre un blanco de reacción, un control positivo y un control negativo. El blanco de

reacción se prepara mezclando 190  $\mu$ L de buffer de fosfatos (50 mM, pH 7) con 10  $\mu$ L de sustrato (*p*-PNA 100 mM, disuelto en acetonitrilo). Los resultados de absorbancia del blanco de reacción se restan a los de las muestras. Como control positivo de la actividad esterasa se utilizaron 0.1 U (unidades) de esterasa (lipasa) de *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich, Número de catálogo: 62285). Una unidad de actividad esterasa se define como la cantidad de enzima capaz de liberar un  $\mu$ mol de *p*-PN por minuto a 37 °C, bajo las condiciones especificadas. Como control negativo se utilizó MM-PL sometido al mismo tratamiento que los sobrenadantes de cultivo (7.1.1). La curva de calibración se corrió utilizando un stock de *p*-NP 100 mM.

**7.8.3.2 Ureasas y uretanasas.** La cuantificación espectrofotométrica de actividad ureasas y uretanasa en las comunidades microbianas, se hizo mediante la reacción de Betherlot. En esta reacción, el sustrato (urea o uretano) es hidrolizado por la enzima en amonio y CO<sub>2</sub>. El amonio generado, reacciona con hipoclorito alcalino y salicilato de sodio en presencia de nitroprusiato de sodio, como agente acoplador, para generar un cromóforo verde (Witte & Medina-Escobar 2001). El ensayo se realizó en un espectrofotómetro de microplaca (Epoch de Biotek). La cinética se preparó para 12 min, corriendo una reacción por cada tiempo a analizar (0, 3, 6, 9 y 12 min). Cada reacción consistió en mezclar por inversión la fuente de proteína (15  $\mu$ g) y el buffer de fosfatos (50 mM, pH 7), incubar por 5 min a 37°C y adicionar el sustrato. Una vez adicionado el volumen de urea o uretano (100 mM), se mezcló por inversión y se incubó a 37°C por 0, 3, 6, 9, 7 y 12 min. Al término de cada tiempo se adicionaron 20  $\mu$ L del reactivo fenol-nitroprusiato, 40  $\mu$ L de reactivo de hipoclorito y se incubó por 30 min a 37°C. Finalmente, se leyeron a 636 nm en el espectrofotómetro. Como control positivo se utilizaron 0.25 U de ureasa de *Canavalia ensiformis* (Sigma-Aldrich, Número de catálogo: U-1500). Una unidad de ureasa se define como la cantidad de enzima capaz de catalizar la conversión de un  $\mu$ mol urea o uretano en amonio por minuto, bajo las condiciones especificadas en este ensayo. Como control negativo se utilizó MM-PL sometido al mismo tratamiento que los sobrenadantes de cultivo (7.7.1). Durante cada ensayo se corrió una curva de calibración, utilizando un stock de NH<sub>4</sub>Cl 100 mM.



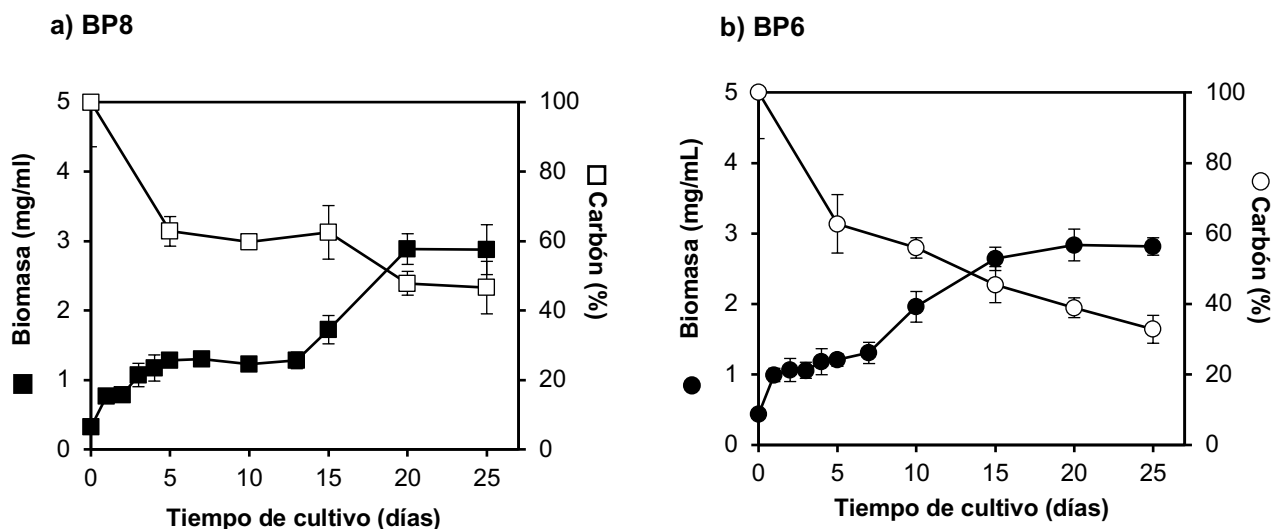
## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la actividad biodegradativa de la comunidad BP8 sobre el PolyLack® fueron publicados en el artículo: **Itzel Gaytán\***, Ayixon Sánchez-Reyes\*, Manuel Burelo, Martín Vargas-Suárez, Ivan Liachko, Maximilian Press, Shawn Sullivan, M. Javier Cruz-Gómez and Herminia Loza-Tavera. 2020. Degradation of recalcitrant polyurethane and xenobiotic additives by a selected landfill microbial community and its biodegradative potential revealed by proximity ligation-based metagenomics analysis. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02986>. \*These authors contributed equally (Anexo B). En esta tesis se presentarán los resultados obtenidos de la comunidad BP6 comparándolos con los de la comunidad BP8, analizando las diferencias entre ellas y su posible implicación en la biodegradación del barniz comercial PolyLack®.

### 8.1 Las comunidades microbianas BP8 y BP6 crecen utilizando el barniz PolyLack® como fuente de carbono

El crecimiento de las dos comunidades en un medio mineral con el barniz de PU PolyLack® (MM-PL) como única fuente de carbono se cuantificó por 25 días. Durante ese periodo BP8 presentó un comportamiento diáuxico, con una primera fase de crecimiento exponencial desde el inicio del cultivo hasta 5 días ( $\mu=0.012 \text{ h}^{-1}$ ), seguida por una etapa estacionaria de 5 a 13 días. Posteriormente, las células retomaron el crecimiento ( $\mu=0.005 \text{ h}^{-1}$ ) hasta 20 días, con una biomasa máxima de 2.9 mg/mL y una segunda fase estacionaria en los últimos 5 días del cultivo (Fig. 6a, Fig. 1A en Gaytán et al. 2020). La comunidad consumió el 50.3% del carbono suministrado en el MM-PL, del cual 37% se metabolizó a una velocidad de 0.098 g C/g células·h, durante los primeros 5 días y el restante 13% se consumió entre 15 y 20 días a 0.012 g C/g células·h (Fig. 6a, Fig. 1A en Gaytán et al. 2020). La comunidad BP6, también presentó cuatro etapas de crecimiento. La primera fase exponencial ocurrió durante el primer día de cultivo ( $\mu=0.034 \text{ h}^{-1}$ ), de allí hasta los 7 días mostró una fase de desaceleración ( $\mu=0.002 \text{ h}^{-1}$ ) posiblemente relacionado con un periodo de adaptación. Posteriormente, la comunidad mostró un crecimiento activo hasta los 15 días ( $\mu=0.004 \text{ h}^{-1}$ ), para luego entrar a la segunda fase estacionaria hasta el término del cultivo donde se alcanzó un crecimiento máximo de 2.8 mg/mL (Fig. 6b). Una disminución total de 67% en el carbono inicial del MM-PL (Fig. 6b) evidenció la habilidad de BP6 para utilizar el barniz como fuente de carbono. El consumo ocurrió en dos etapas, en los primeros 5 días se metabolizó el 37% a una velocidad de consumo de 0.09 g C/g célula·h y en la segunda etapa (5-25 días) el carbono restante se asimiló a una velocidad 15

veces más baja que la inicial (0.006 g C/g célula·h). Aunque las comunidades invirtieron cantidades similares de carbono en su crecimiento, logrando concentraciones de biomasa de 2.8-2.9 g/L, hay diferencias respecto a los tiempos y velocidades en que ocurren las distintas etapas. Por ejemplo, entre 7 y 15 días de cultivo, BP8 se mantiene en fase estacionaria, mientras que BP6 se encuentra en fase exponencial (Fig. 6). Además, BP6 consumió 17% más carbono que BP8 y con distintos perfiles de agotamiento de este nutriente. Particularmente, se observó que en la segunda fase estacionaria de crecimiento (15-25 días), BP6 aún consume un porcentaje importante de carbono (13%), fenómeno posiblemente relacionado con una etapa de metabolismo secundario que no se identificó para la comunidad BP8. Lo anterior, indica que a pesar de que BP6 y BP8 se originan del mismo contexto ambiental (Basurero Bordo Poniente) y son grupos microbianos con habilidad para degradar el PolyLack®, podrían tener diferentes mecanismos para lograrlo, siendo BP6 la comunidad con mayor capacidad para metabolizar el barniz. Es probable que la ventaja degradativa de BP6 sobre el copolímero de PE-PU-A, radique en el mayor número de especies que la integran, ya que éste es proporcional a las características y propiedades de la comunidad. Así, una comunidad con alta diversidad microbiana tendrá una alta diversidad funcional y operará más eficientemente en el ecosistema en donde se desenvuelva (Tilman et al. 2001). Otros factores que no se pueden descartar, son las interacciones positivas y negativas que podrían existir entre los miembros de la comunidad. Sin embargo, también debe considerarse la posibilidad de que se reduzca la diversidad microbiana de BP6, como resultado de una presión de selección debida al medio y las condiciones de cultivo.



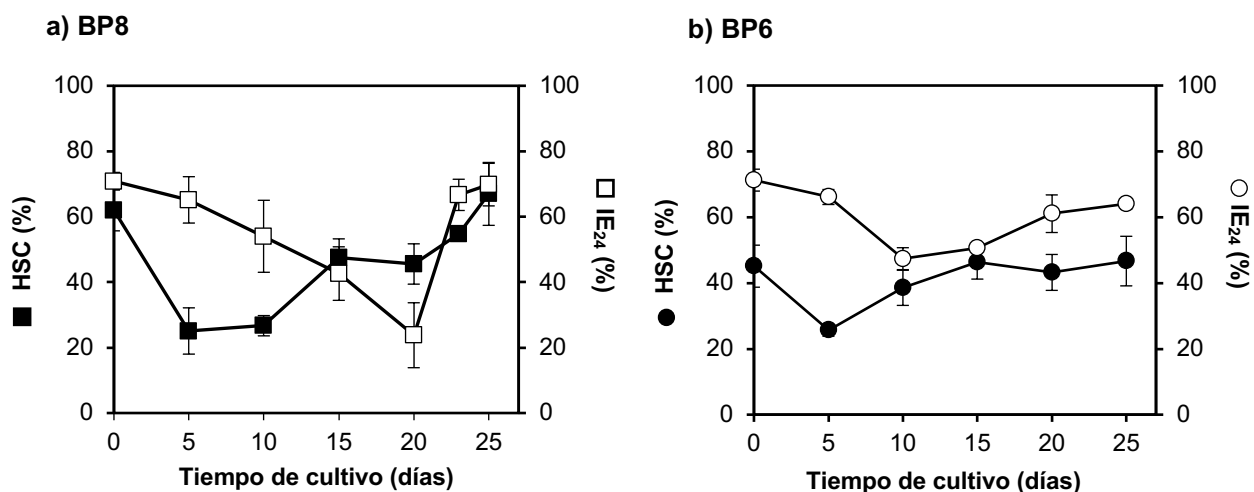
**Figura 6.** Crecimiento celular y consumo de carbono de las comunidades BP8 y BP6 en medio mineral con el barniz de poliéter poliuretano acrílico PolyLack® como única fuente de carbono, n=3.

En un trabajo previo en el que se midió el crecimiento de BP8 y BP6 durante 5 días en MM-PL se observaron valores semejantes a los encontrados en esta investigación (Savín Gámez, 2016). Sin embargo, el análisis de crecimiento por un período más largo (Fig. 6) reveló algunos aspectos interesantes: a) que los microorganismos de las comunidades continuaron desarrollándose después de los 5 días de cultivo; b) que el crecimiento describió un comportamiento multifásico, característico de ambientes multi-nutrientes (Chu & Barnes, 2016; Pacciani-Mori et al. 2020; Wang et al. 2021), como en los suelos o aguas contaminados, donde existen mezclas complejas de compuestos químicos de origen antropogénico, que funcionan como fuentes de carbono para los microorganismos (Brandt et al. 2004; Hammershøj et al. 2019; Cao et al. 2022). Respecto al PolyLack<sup>®</sup>, utilizado en este trabajo como fuente de carbono, cabe mencionar que contiene un copolímero de PE-PU-A y diferentes aditivos (IP, 2-BE, NMP, DPGBE, DPGME), lo que podrían explicar el perfil de crecimiento multifásico identificado para BP8 y BP6 (Fig. 6).

Debido a la naturaleza de sus enlaces químicos y diversidad de estructuras moleculares, el PolyLack<sup>®</sup> es una fuente de carbono compleja y de limitada biodisponibilidad. A pesar de estas características, ambas comunidades metabolizan el barniz. Para determinar si BP8 y BP6 emplean mecanismos que les permitan contender con las barreras nutricionales propias del barniz, se midieron dos propiedades facilitadoras de la interacción entre microorganismos y los compuestos químicos a biodegradar, mismas que han sido relacionadas con el mejoramiento durante el proceso biodegradativo de petróleo, plásticos y otros xenobióticos (Gianfreda & Rao, 2004; Mukherji & Ghosh, 2012), la hidrofobicidad de superficie celular (HSC) y el índice de emulsificación (IE<sub>24</sub>) (Fig. 7). Tanto la HSC como el IE<sub>24</sub> se evaluaron utilizando *n*-hexadecano como referencia. En la HSC el *n*-hexadecano representa las zonas alifáticas del copolímero presente en el barniz, mientras que en el IE<sub>24</sub> representa un compuesto oleoso, que formará pequeñas gotas al mezclarse con algún surfactante.

BP8 inició con una HSC de 62%, mostrando capacidad para adherirse a las regiones alifáticas del copolímero, la cual decayó a 25% a los 5 días y remontó hasta alcanzar 67% al final del ensayo. En BP6, las células presentaron menor capacidad de adhesión que BP8 al inicio del cultivo, con una HSC de 45%, la cual disminuyó 26% a los 5 días, posteriormente, presentó un incremento hasta 47% (Fig. 7). De acuerdo con los resultados de HSC, las células de ambas comunidades tienen potencial para interactuar por contacto con las zonas alifáticas o hidrofóbicas del copolímero, aunque de acuerdo con los valores y la tendencia en el comportamiento de esta propiedad, los mecanismos de interacción y de degradación, son diferentes en BP8 y BP6. En

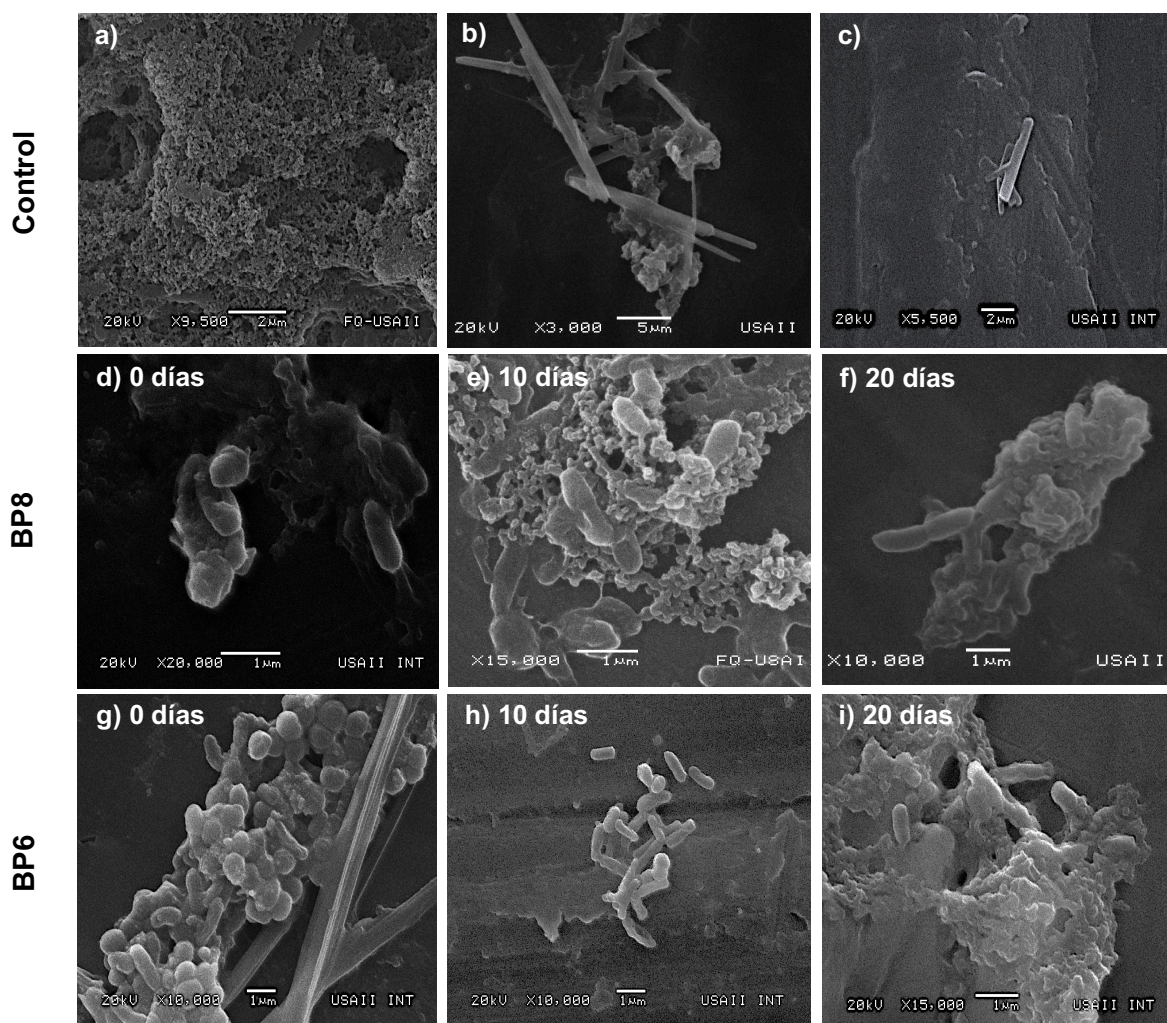
general, se esperaría que una vez adheridas al PE-PU-A, se inicie el proceso degradativo en el que enzimas de membrana y extracelulares interactúan con el material rompiendo zonas hidrofóbicas, que inducirán la exposición o producción de fracciones hidrofílicas en la superficie del polímero, tales como alcoholes y ácidos carboxílicos, que favorecerán la biodegradación (Cregut et al. 2013; Magnin et al. 2019). Para sustentar mejor estas observaciones, sería necesario realizar los ensayos de HCS utilizando otros compuestos de referencia, quizá hidrocarburos más largos que el *n*-hexadecano o incluso moléculas modelo de PU, que resulten un sistema más aproximado al copolímero de PE-PU-A.



**Figura 7.** Evaluación de mecanismos celulares para comunidades BP8 y BP6: hidrofobicidad de superficie celular (HSC) e índice de emulsificación (IE<sub>24</sub>), n=3.

El IE<sub>24</sub> del MM-PL fue de 71%, sugiriendo que los componentes del PolyLack® confieren características surfactantes al MM-PL, las cuales disminuyen gradualmente hasta 24% a los 20 días de cultivo con BP8, y posteriormente, alcanzaron valores cercanos al inicial (Fig. 7a, Fig. 1B en Gaytán et al. 2020). El IE<sub>24</sub> de BP6 disminuyó a 47% por actividad microbiana a 10 días de cultivo, seguido de un incremento a 64% al final del cultivo (Fig. 7b). Los componentes del barniz, en particular los aditivos, no solo juegan un papel relevante como sustrato para los microorganismos de BP8 y BP6, sino que en conjunto confieren propiedades intrínsecas al medio de cultivo, como la capacidad emulsificante inicial (IE<sub>24</sub>:71%), parámetro que presentó un comportamiento variable durante el cultivo de las comunidades. La disminuciones observadas, podrían estar relacionadas con la degradación de los aditivos, ya que, al bajar su concentración, también disminuiría la capacidad emulsificante. Por otro lado, los aumentos en el IE<sub>24</sub>, podrían resultar de la acumulación de productos de degradación con propiedades surfactantes o de la síntesis de biosurfactantes.

Para observar las interacciones célula-sustrato se realizaron análisis por SEM de las comunidades en MM-PL a diferentes momentos del cultivo (Fig. 8). Las micrografías muestran al copolímero de PE-PU-A como un material con morfología granular (Fig. 8a) y con algunos filamentos rugosos (Figs. 8b y 8c). En la comunidad BP8 se observaron principalmente bacilos con tamaños de 1 y 1.5  $\mu\text{m}$  (Figs. 8d-g, Fig. 1C en Gaytán et al. 2020), mientras que BP6 se compone de células en conglomerados, donde abundan los cocos y algunos bacilos con tamaños de 1-2  $\mu\text{m}$  (Figs. 8g-i). Las micrografías apoyan los datos de HSC que proponen interacciones físicas entre las células de las comunidades y el copolímero.



**Figura 8.** Microscopía electrónica de barrido de medio de cultivo con las comunidades BP8 y BP6. a-c) Morfología de los copolímeros del MM-PL, d-f) células de BP8 con morfología bacilar, adheridas al copolímero, g-i) células de BP6 con morfología de cocos y bacilos, adheridas al copolímero.

En conjunto, los resultados de crecimiento y consumo de carbono sugieren que BP8 y BP6 metabolizan más de un componente del barniz, y que diferentes microorganismos o grupos

de ellos podrían ser responsables de degradar las fuentes de nutrientes disponibles en las distintas fases de degradación. Además, las células de las comunidades tienen el potencial de adherirse a superficies hidrofóbicas (*n*-hexadecano) y modificar la capacidad emulsificante del medio de cultivo, posiblemente por la producción de surfactantes, mecanismo microbiano que ha demostrado una alta correlación con la degradación de cantidades significativas de petróleo (>40%) (Obuekwe et al. 2009; Mukherji & Ghosh et al. 2012).

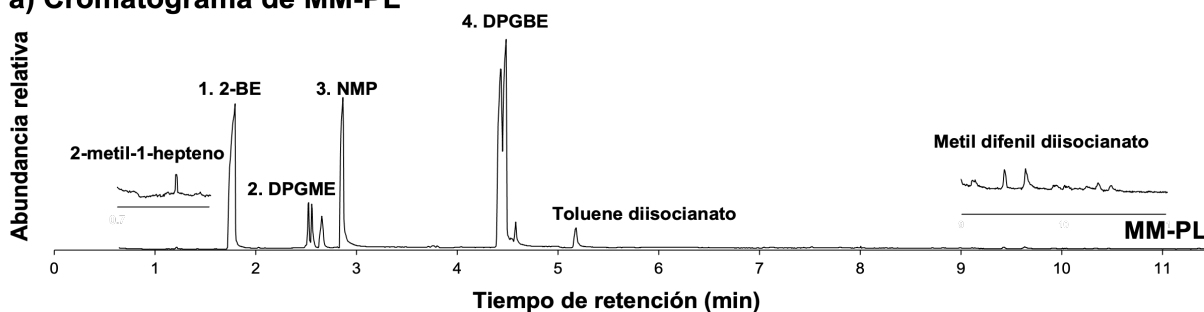
## **8.2 Los aditivos del barniz, incluyendo los compuestos con éter, sustentan el crecimiento de las comunidades BP8 y BP6**

Se realizaron diversos análisis químicos y físicos a los sobrenadantes de cultivo con el objetivo de detectar e identificar las modificaciones que los microorganismos de BP8 y BP6 ejercen sobre la estructura química de los diferentes componentes del barniz. Para ello se emplearon técnicas como GC-MS, <sup>1</sup>H-MNR, FT-IR, TGA y DSC, que permitieron probar la hipótesis de este trabajo y detallar el alto potencial catabólico de las comunidades. Mediante GC-MS se detectaron algunos de los aditivos del barniz, ubicados a diferentes tiempos de retención (tr) en el cromatograma, tales como 2-BE (tr:1.7 min), isómeros de DPGME (tr: 2.5-2.6 min), NMP (tr: 2.9 min), e isómeros de DPGBE (tr: 4.4-4.5 min), así como otros compuestos como 2,4-dimetil-1-hepteno (tr: 1.2 min), derivados de TDI (tr: 5.2 min) y de MDI (tr: 9.7 min), posibles residuos de la síntesis del PU (Fig. 9a). Además, utilizando curvas estándar se cuantificó el porcentaje residual de aditivos en cada tiempo de cultivo (Figs. 9b y 9c).

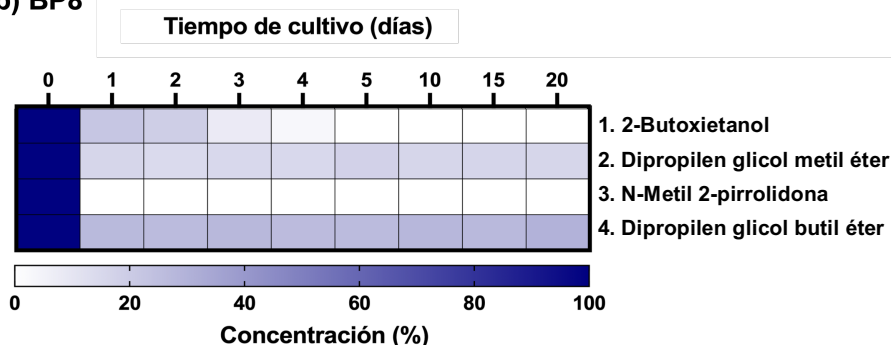
La comunidad BP8 utilizó a los aditivos para desarrollarse, consumiendo entre 73-85% del 2-BE y dipropilén glicoles (DPGs), así como el 100% del NMP durante el primer día de cultivo. A los 4 días degradó todo el 2-BE; sin embargo, no metabolizó por completo los DPGs, quedando un remanente constante hasta el fin del cultivo (Fig. 9b, Fig. 2A en Gaytán et al. 2020). Con base en estos datos se encontró que, durante los primeros días de cultivo, parte de la fuente de carbono que sustenta el crecimiento de BP8 es aportada por los aditivos. De acuerdo con el análisis metagenómico de BP8 (realizado por el Dr. Ayixon Sánchez-Reyes y la Dra. Herminia Loza-Tavera), esta comunidad posee genes que codifican proteínas con similitud significativa a enzimas relacionadas con la degradación de NMP, IP y DPGs (Gaytán et al. 2020). Genes con similitud (>40%) a enzimas responsables de la degradación de NMP en *Alicyclophilus denitrificans* BQ1 (Solís-González et al. 2018) se encontraron en diversos genomas de la comunidad. En particular, en *Paracoccus* sp. se identificó un grupo de genes comparables al clúster *nmp* de BQ1. Por otro lado, los genomas de *Paracoccus* sp. y *Ochrobactrum intermedium*, codifican enzimas que complementan una ruta metabólica para la transformación de IP a acetil-CoA, la cual alimenta

el ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA) (Fig. 7A en Gaytán et al. 2020). Para los DPGs, se encontró que BP8 posee algunos genes con posibilidad de metabolizarlos, lo que permitió proponer vías metabólicas que podrían dar cuenta de su metabolización (Gaytán et al. 2020). Debido a su relevancia, un análisis detallado del metabolismo de éteres de esta comunidad se presentará al final de este capítulo.

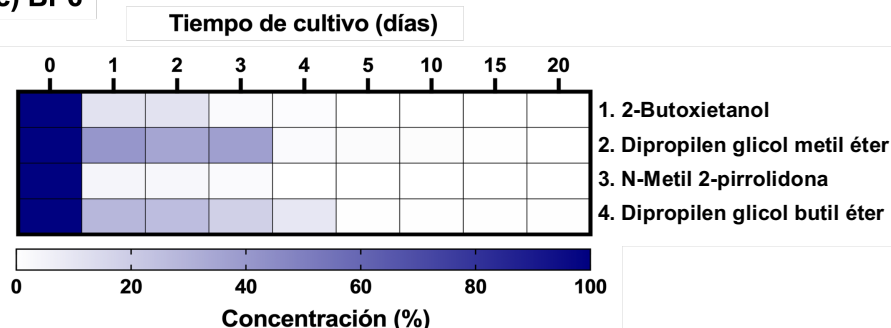
### a) Cromatograma de MM-PL



### b) BP8



### c) BP6



**Figura 9.** Análisis cromatográficos de los sobrenadantes de cultivo. a) Identificación de aditivos en MM-PolyLack®. Consumo (degradación) de aditivos durante 20 días de incubación con las comunidades b) BP8 y c) BP6, n=3. La determinación de la concentración (%) se realizó con base curvas estándar elaboradas con 2-BE, NMP, DPME y DPGBE (Sigma-Aldrich, pureza  $\geq 98\%$ )

La comunidad BP6 degradó los aditivos con disminuciones de 89%, 59%, 96% y 72% para el 2-BE, NMP, DGME, DPBE, respectivamente, agotándolos entre el día 1 y 4 de cultivo (Fig. 9c). Al igual que en BP8, los aditivos podían sustentar parte del crecimiento de BP6 en los primeros

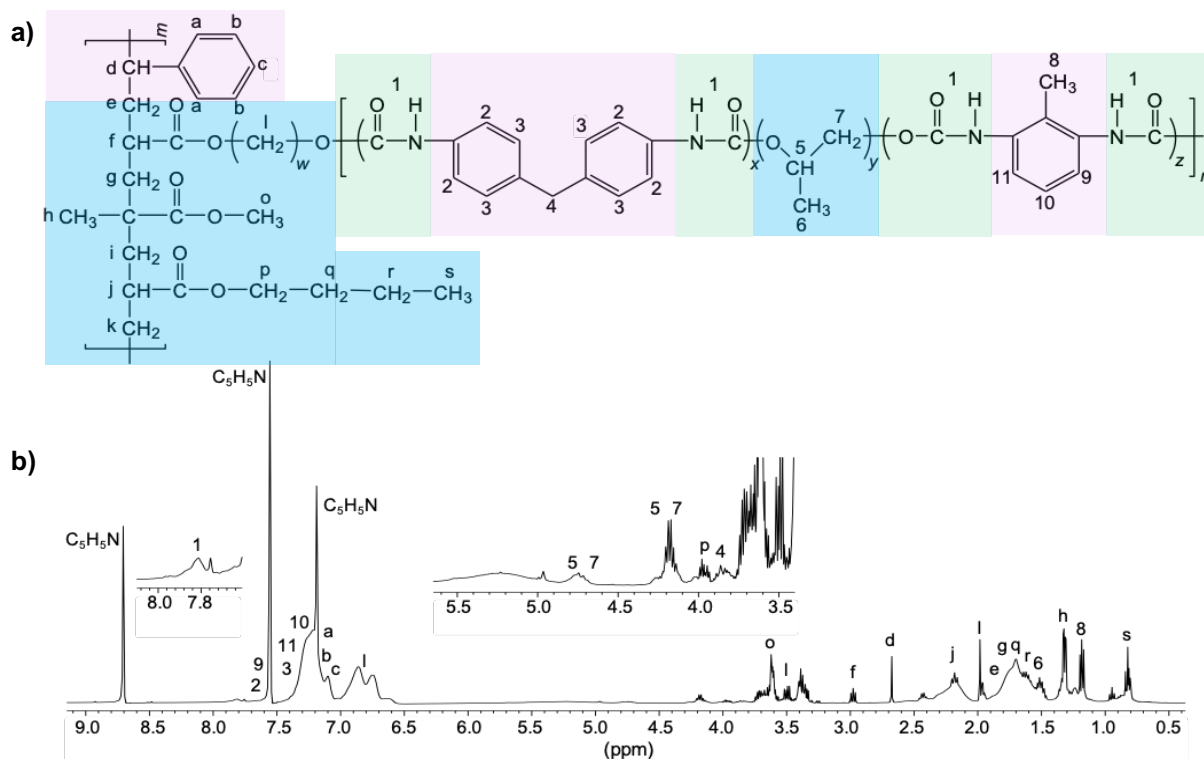
días de cultivo. El metagenoma de esta comunidad es actualmente analizado como parte de la tesis de Maestría del alumno Julián Pulido-García, realizada en el Laboratorio de la Dra. Herminia Loza-Tavera. Sin embargo, un análisis previo hecho por el Dr. Ayixon Sánchez, demostró que esta comunidad contiene géneros de microorganismos reportados previamente como degradadores de algunos de los compuestos químicamente relacionados con los aditivos del PolyLack®. Entre estos géneros destacan *Paracoccus*, *Hydrogenophaga*, *Sphingobacterium* y *Achromobacter*. Se ha encontrado que *Paracoccus denitrificans* y algunas especies de *Sphingobacterium* lograron metabolizar hasta 16 g/L de isopropanol (Mohammad et al. 2007; Geng et al. 2014). Además, algunas especies de *Paracoccus* se reportaron como degradadoras de NMP (Cai et al. 2014). Distintos miembros de BP6 se han correlacionado con el rompimiento oxidativo o hidrolítico de éteres. El análisis de este metabolismo se presenta al final del capítulo.

### **8.3 Las comunidades BP8 y BP6 catabolizan al copolímero de PE-PU-A del barniz PolyLack®**

Debido a que el PolyLack® es un producto comercial, la estructura del copolímero no se conoce. A fin de realizar un análisis detallado de los cambios promovidos por BP8 y BP6 se propuso una estructura química para el copolímero (Fig. 10, Fig. 2 en Gaytán et al. 2020) basada en los datos técnicos del fabricante, los sustratos de uso más frecuente en la síntesis de barnices de PU (Pardini & Amalvy, 2008, Gite et al. 2010, Maurya et al. 2018), algunos compuestos identificados por GC-MS en el MM-PL (Fig. 10a, Fig. 2 en Gaytán et al. 2020) y principalmente en el análisis por <sup>1</sup>H-MNR del barniz llevado a cabo en el Instituto de Materiales, UNAM y analizado por los Dres. Manuel Burelo Torres y Javier Cruz Gómez, de la Facultad de Química-UNAM.

El espectro de resonancia <sup>1</sup>H-NMR muestra señales asociadas a protones de grupos funcionales y compuestos como el carbamato (señal 1), aromáticos (señales a, b, c, 2, 3, 4-8, 9-11), un glicol como el PPG (señales 5-7) y acrilatos (señales e-l, o-s) (Fig. 10). En conjunto, los datos sugieren que la síntesis del copolímero ocurre por la policondensación de PPG con TDI y/o MDI, formando el enlace uretano que genera un oligómero terminado en isocianato que reacciona con los acrílicos hidroxifuncionales (metil metacrilato, butil acrilato, hidroxialquil acrilato, etc.), que flanquean la cadena de PU, dando origen a la molécula de PE-PU-A (Fig. 10a, Fig. 2 en Gaytán et al. 2020). Así, el PE-PU-A consiste en zonas alifáticas correspondientes a los acrilatos y a PPG (Fig. 10a, azul); zonas aromáticas relacionadas con los diisocianatos precursores y algunos acrilatos y el grupo uretano (Fig. 10a, rosa) y zonas del enlace uretano (Fig. 10a, verde).





**Figura 10.** Estructura química propuesta para el copolímero PE-PU-A presente en PolyLack® (Gaytán et al. 2020). La estructura se planteó con base a datos teóricos y análisis por GC-MS y  $^1\text{H-NMR}$ , realizada en colaboración con el Dr. Manuel Burelo y el Dr. Javier Cruz Gómez de la Facultad de Química-UNAM. Se sugirió que el polímero se compone principalmente de zonas aromáticas (rosa), alifáticas (azul) y las correspondientes al uretano (verde).

### 8.3.1 Ataque a los grupos funcionales característicos del copolímero de PE-PU-A: Análisis por espectroscopía infrarroja acoplada a la transformada de Fourier (FT-IR)

La naturaleza de los grupos funcionales del PE-PU-A se determinó experimentalmente por FT-IR. Los espectros del control no inoculado (MM-PL) mostraron señales que corresponden a aminas, hidroxilos, metilos, metilenos, carbonilos, aromáticos, uretanos, éteres, alifáticos y vinilos (Figs. 11 y 12; Tabla 3). Las modificaciones de estas señales en los espectros sometidos a tratamiento biológico con BP8 y BP6 se asocian a su potencial degradativo, por lo que se evaluaron de forma cualitativa (aumentos, disminuciones, desapariciones) y semi-cuantitativa. En el análisis semi-cuantitativo se calcularon los índices de cambio de cada grupo funcional, como el de carbonilo, vinilo, amino, etc. (Tabla 4). El cálculo se realizó mediante el método de línea base modificado, que determina la relación entre el área de la señal de un grupo funcional y el área de una señal sin variaciones significativas (Kay et al. 1993; Zhang et al. 2013; Almond et al.

2020). En los cultivos de BP8 la señal sin cambio significativo correspondió a los metilos ( $2850\text{ cm}^{-1}$ ) y en BP6 a los alifáticos/dioles reaccionados ( $520\text{ cm}^{-1}$ ) (Tabla 4). El análisis estadístico que permitió la selección de estas señales se muestra en el Anexo C.

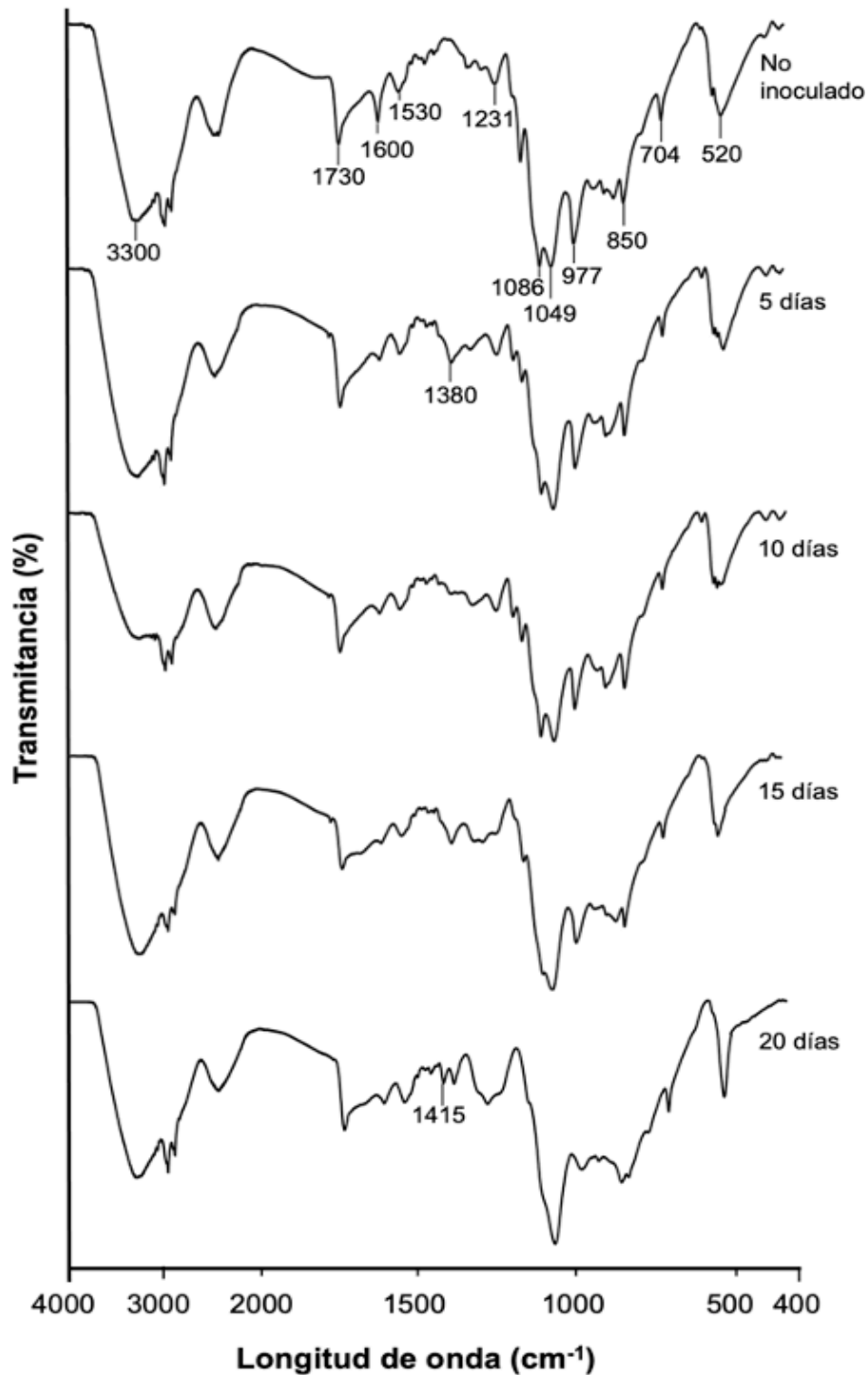
**Tabla 3.** Asignación de grupos funcionales a las diferentes señales identificadas en el MM-PL.

Grupo funcional	Regiones del PE-PU-A a que pertenece	$\lambda\text{ (cm}^{-1}\text{)}$
N-H/hidroxis	Uretano y alcoholes producidos	3500-3200
Metilenos (-CH <sub>2</sub> -)	Alifáticos en diol reaccionado (PPG) y acrilatos	2920
Metilos (-CH <sub>3</sub> )		2850
Carbonilo (C=O)	Éster de acrilatos y enlace uretano	1700-1735
Aromáticos-I (C=C)	Diisocianatos reaccionados (TDI, MDI) y acrilatos	1600
Aromáticos (C-C)		1380
Uretano-I (N-H + C-N)	Enlace uretano del PE-PU	1530
Uretano-II (C-N)		1231
Éter-I (C-O-C)	Alifáticos de PPG reaccionado y uretano	1086
Éter-II (C-O-C)	Uretano	1049
Éter-III (C-O-C)	Alifáticos de PPG reaccionado y uretano	970-980
Aromáticos-II (C-H)	Diisocianatos reaccionados (TDI, MDI) y acrilatos	820
Alifáticos-I (-C=C-)	Vinilos libres y alquenos	704
Alifáticos-II (C-C)	Alifáticos en acrilatos y diol reaccionado del PE-PU	520

La asignación se hizo con base a McCarthy et al. 1997.

Los análisis por FT-IR mostraron que BP8 induce cambios en diversos grupos funcionales del polímero (Fig. 11, Tabla 4, Fig. 4A en Gaytán et al. 2020). La intensidad de la señal carbonilo presente en el uretano y los acrilatos ( $1,730\text{ cm}^{-1}$ ) incrementó a 5 días (27%), y posteriormente, disminuyó con relación al control (11-29%), sugiriendo la hidrólisis y subsecuente catabolismo de estos grupos funcionales. Las señales para el C=C ( $1,600\text{ cm}^{-1}$ ) y C-H ( $820\text{ cm}^{-1}$ ) de aromáticos disminuyeron 74% y 91%, respectivamente, a los 20 días. En conjunto, estos resultados indican que BP8 rompe a los compuestos aromáticos de la cadena polimérica y los metaboliza, posiblemente por actividad oxidativa. La señal correspondiente al N-H más el C-N ( $1,550\text{ cm}^{-1}$ ) disminuyó (33%) a los 10 días y se mantuvo constante hasta el final del cultivo, mientras que la de CN ( $1,231\text{ cm}^{-1}$ ) se modificó ligeramente (25%) hasta los 20 días, evidenciando el ataque al uretano. La intensidad de señal del C-O-C del uretano ( $1,086$ ,  $1,049\text{ cm}^{-1}$ ,  $977\text{ cm}^{-1}$ ) se redujo (67-70%) durante el cultivo, indicando la actividad de BP8 sobre el éter del copolímero. De igual forma, los microorganismos de esta comunidad promovieron disminuciones significativas en las

cadenas alifáticas ( $704$  y  $520$   $\text{cm}^{-1}$ ) (Fig. 11, Tabla 4, Fig. 4A en Gaytán et al. 2020), lo que demuestra el rompimiento del copolímero de PE-PU-A, posiblemente por actividad oxidativa.



**Figura 11.** Espectros FT-IR del copolímero de PE-PU-A presente en el PolyLack® a diferentes tiempos de cultivo que muestran las modificaciones a los grupos funcionales del polímero debida a la actividad degradativa de la comunidad BP8, n=3 (Gaytán et al. 2020)

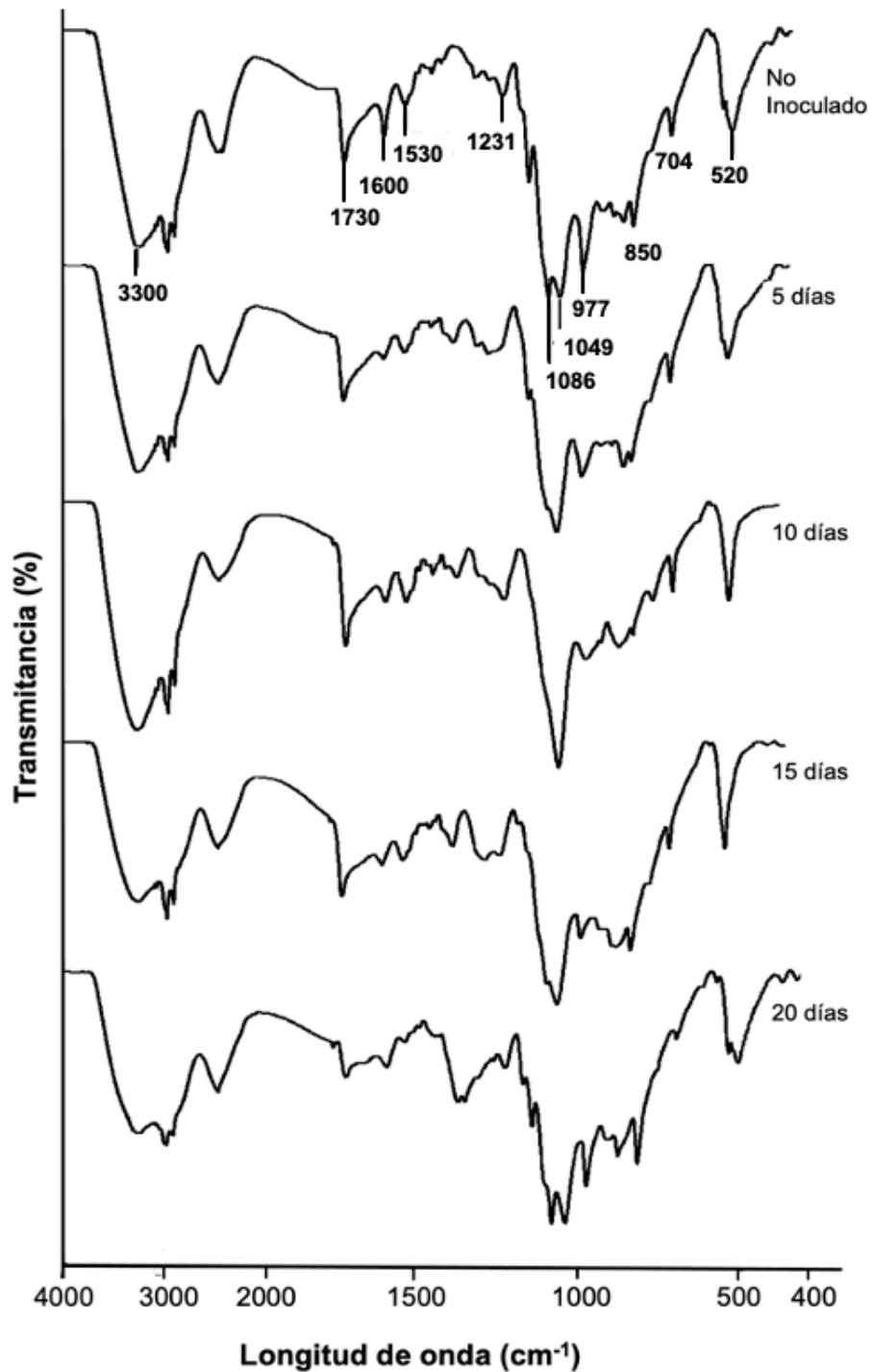
**Tabla 4.** Índices para las señales obtenidas de los espectros FT-IR del copolímero PE-PU-A presente en PolyLack® a diferentes tiempos de cultivo generados por la acción de las comunidades BP8 y BP6.

Señal	Tiempo de cultivo (días)				
	0	5	10	15	20
<b>Comunidad BP8</b>					
<b>Aminas/hidroxilos</b>	98.3 ± 6	73.8 ± 5	52 ± 9	78.1 ± 7	77.5 ± 9.0
<b>Metilenos</b>	1.6 ± 0.2	2.0 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.25 ± 0.2	1.2 ± 0.2
<b>Carbonilo</b>	5.6 ± 0.6	7.1 ± 0.4	4.5 ± 1.5	5.0 ± 0.6	4.0 ± 0.5
<b>Aromático-I</b>	2.7 ± 0.5	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.2
<b>Uretano-I</b>	3.0 ± 0.3	2.7 ± 0.3	2.0 ± 0.15	2.0 ± 0.35	1.8 ± 0.2
<b>Uretano-II</b>	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.4	2.0 ± 0.3	2.0 ± 0.2	1.5 ± 0.3
<b>Éter I</b>	3.8 ± 0.4	3.7 ± 0.5	2.8 ± 0.4	1.9 ± 0.2	1.6 ± 0.2
<b>Éter-II</b>	2.5 ± 0.4	2.7 ± 0.4	2.2 ± 0.4	2.0 ± 0.3	1.7 ± 0.4
<b>Éter-III</b>	2.8 ± 0.4	2.2 ± 0.3	2.1 ± 0.2	2.0 ± 0.3	1.4 ± 0.2
<b>Aromático II</b>	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.3	1.2 ± 0.2	0.2 ± 0.06	0.1 ± 0.03
<b>Alifático I</b>	1.1 ± 0.2	0.6 ± 0.08	0.6 ± 0.02	0.5 ± 0.07	0.5 ± 0.1
<b>Alifático II</b>	15.4 ± 1.0	14.3 ± 1.2	14 ± 2.0	12 ± 2.0	11 ± 1.6
<b>Comunidad BP6</b>					
<b>N-H/hidroxilos</b>	8.1 ± 1.73	7.2 ± 0.5	9.0 ± 0.6	5.6 ± 0.3	5.4 ± 0.6
<b>Metilenos</b>	0.3 ± 0.05	0.2 ± 0.03	0.3 ± 0.04	0.2 ± 0.03	0.2 ± 0.02
<b>Metilos</b>	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.03	0.14 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.07 ± 0.01
<b>Carbonilo</b>	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.06	0.4 ± 0.1
<b>Aromático I</b>	0.2 ± 0.05	0.07 ± 0.02	0.12 ± 0.03	0.07 ± 0.01	0.1 ± 0.02
<b>Uretano I</b>	0.17 ± 0.03	0.20 ± 0.04	0.24 ± 0.04	0.16 ± 0.01	0.10 ± 0.01
<b>Uretano II</b>	0.2 ± 0.02	0.2 ± 0.04	0.24 ± 0.04	0.16 ± 0.04	0.10 ± 0.04
<b>Éter I</b>	0.4 ± 0.06	0.12 ± 0.03	0.04 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.04
<b>Éter II</b>	0.2 ± 0.01	0.3 ± 0.06	0.5 ± 0.07	0.3 ± 0.05	0.2 ± 0.03
<b>Éter III</b>	0.3 ± 0.03	0.3 ± 0.03	0.2 ± 0.04	0.1 ± 0.02	0.2 ± 0.03
<b>Aromático II</b>	0.1 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.15 ± 0.05
<b>Alifático I</b>	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.01

Los índices se calcularon con relación a la señal de metilos a 2,850 cm<sup>-1</sup> y alifáticos a 520 cm<sup>-1</sup>, para las comunidades BP8 y BP6, respectivamente. En ningún caso se observaron cambios estadísticamente significativos para esas señales durante el cultivo (Anexo C), n=3.

La comunidad BP6 modificó la señal NH/hidroxiolos ( $3,300\text{ cm}^{-1}$ ) con una reducción en su intensidad (33%) a partir de 15 días de cultivo, las señales de metilenos ( $2,920\text{ cm}^{-1}$ ) y metilos ( $2,850\text{ cm}^{-1}$ ) también disminuyeron (37-41%), mientras que la del carbonilo ( $1,735\text{ cm}^{-1}$ ) aumentó (32%) a los 10 días, seguido de una disminución (55%) hacia el final del cultivo (Fig. 12, Tabla 4). La señal del aromático ( $1,600\text{ cm}^{-1}$ ), correspondiente a los diisocianatos reaccionados, y la del uretano, N-H más C-N ( $1,530\text{ cm}^{-1}$ ), redujeron su área significativamente, 65% y 47% respectivamente, desde los 5 días, e incluso esta última alcanzó una disminución sustancial (91%) al final del cultivo. Por otro lado, el área del C-N a  $1,231\text{ cm}^{-1}$  aumentó (41%) a los 10 días y disminuyó (59%) a los 20 días. Adicionalmente, disminuyeron las señales del éter ( $1,086\text{ cm}^{-1}$  y  $980\text{ cm}^{-1}$ ) (30-80%) entre 5 y 20 días de cultivo, este mismo fenómeno ocurrió con la señal exclusiva del éter del uretano ( $1,049\text{ cm}^{-1}$ ), con una reducción importante (30-60%) a lo largo del cultivo (Fig. 12, Tabla 4). Durante la biodegradación de PU, el rompimiento del éter, metilos y metilenos generalmente requiere de mecanismos oxidativos que producen alcoholes, ácidos orgánicos y aldehídos (McCarthy et al. 1997). En los espectros, no se observaron evidencias de aldehídos ( $1,742\text{ cm}^{-1}$ ). Sin embargo, el aumento en el carbonilo a  $1,730\text{ cm}^{-1}$  y en la señal de hidroxiolos a  $3,300\text{ cm}^{-1}$  correlaciona con la generación de alcoholes y ácidos orgánicos (Oprea & Doroftei, 2011).

La disminución en intensidad de las señales FT-IR, después del ataque de BP8 y BP6, indica que ambas comunidades degradan al copolímero de PE-PU-A y esta degradación ocurre vía el rompimiento de los enlaces éster, uretano, grupos aromáticos alifáticos e incluso el éter. Sin embargo, las diferencias en intensidad de señal para un mismo grupo funcional sugieren que BP8 y BP6 comparten un rol degradativo, pero emplean diferentes mecanismos bioquímicos en el proceso degradativo.

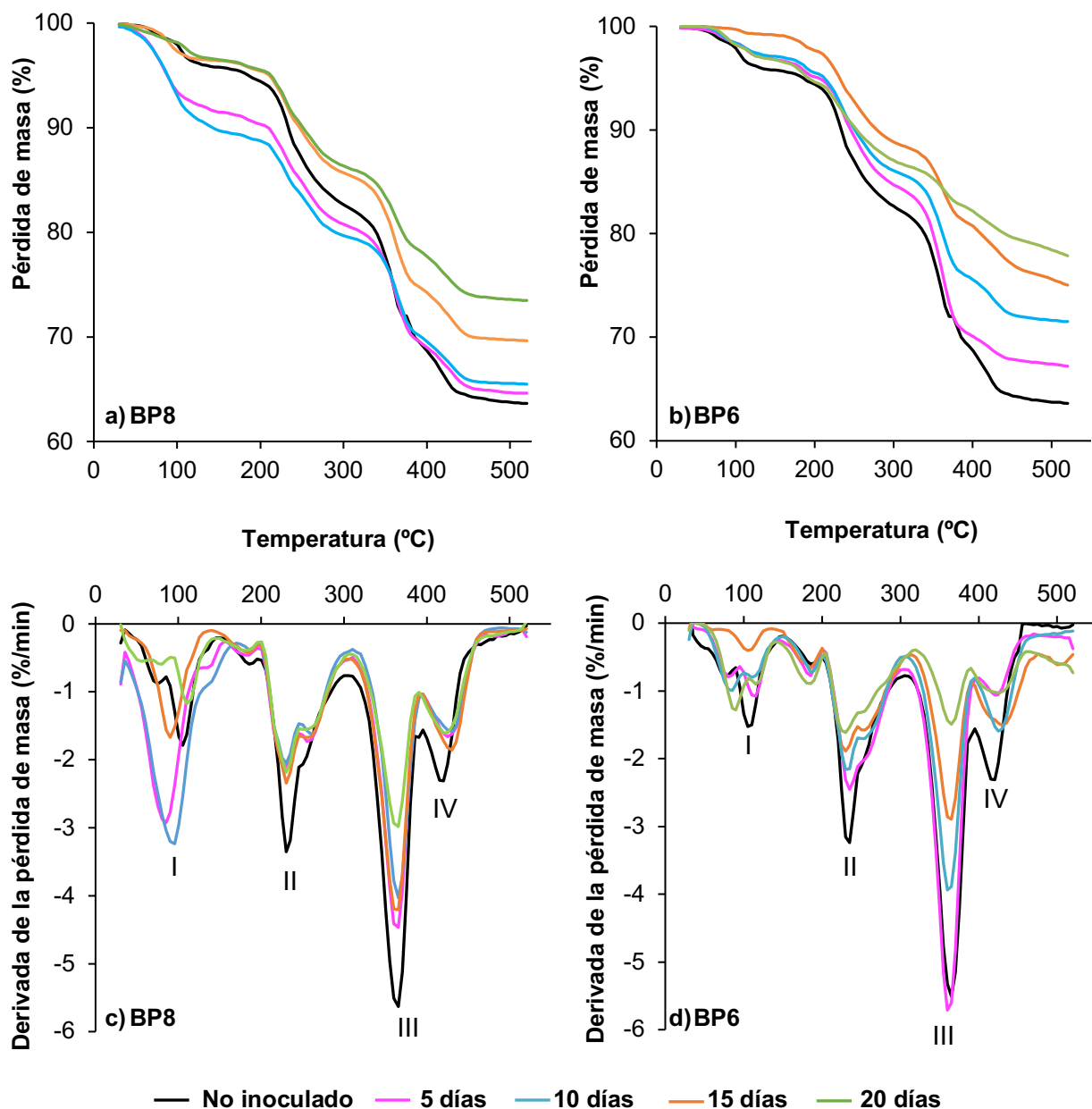


**Figura 12.** Espectros FT-IR del copolímero de PE-PU-A presente en el PolyLack® a diferentes tiempos de cultivo que muestran las modificaciones a los grupos funcionales del polímero debida a la actividad degradativa de la comunidad BP6, n=3.

### 8.3.2 Cambios en las propiedades térmicas del copolímero de PE-PU-A y en su microestructura: Análisis por termogravimetría (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se analizaron las propiedades térmicas del copolímero del PolyLack® por medio de TGA y DSC, para examinar cómo las comunidades BP8 y BP6 modificaron su estructura durante la biodegradación. Ambas técnicas correlacionan y describen cambios en la estructura química de un compuesto (Umare & Chandure, 2008; Magnin et al. 2019), por lo que complementan los resultados de FT-IR. Los termogramas muestran curvas de degradación térmica multi-etapas, que ocurren durante los cambios de pendientes en el rango de temperatura analizado (30-500 °C) (Fig. 13a). Para cada muestra se determinaron parámetros típicos de estabilidad térmica, tales como la temperatura a la que inicia la pérdida de masa ( $T_{onset}$ ), las temperaturas en que se pierde el 5% ( $T_{5\%}$ ), 20% ( $T_{20\%}$ ) y 30% ( $T_{30\%}$ ) de masa, así como la pérdida total de masa al final de la degradación térmica (Tabla 5). En general, los perfiles de degradación térmica mostraron que el copolímero presentó un porcentaje de pérdida de masa el cual disminuye en relación con el control (37%) a partir de los 15 días de cultivo (30%), alcanzando un 27% al final del tratamiento biológico (Tabla 5). La  $T_{onset}$  y las  $T_{5\%}$ ,  $T_{20\%}$  y  $T_{30\%}$  describieron dos fenómenos: a) un corrimiento hacia temperaturas menores que el control durante los primeros 10 días de cultivo, y b) un desplazamiento a temperaturas más altas que el control a partir de los 15 días de cultivo (Fig. 13a, Tabla 5). En el copolímero degradado por BP6 se observó que los porcentajes de pérdida de masa disminuyen en relación con el control (37%) desde tiempos iniciales de cultivo (5 días, 33%), logrando un 22% al final de éste. Por otro lado, la  $T_{onset}$ ,  $T_{5\%}$ ,  $T_{20\%}$  y  $T_{30\%}$  aumentaron con relación al control en cada tiempo de cultivo analizado (Fig. 13b, Tabla 5). Los resultados de pérdida de masa de BP6 y BP8 sugirieron que el proceso biodegradativo incrementa la estabilidad térmica de los copolímeros de PE-PU-A, debido posiblemente a una biodegradación preferencial de grupos funcionales termolábiles. Adicionalmente, los resultados de  $T_{onset}$ ,  $T_{5\%}$ ,  $T_{20\%}$  y  $T_{30\%}$  evidenciaron una diferencia entre los tratamientos con las comunidades. Así, mientras BP8 indujo estabilidad térmica variable (disminución y posterior aumento), BP6 promovió un incremento en estabilidad desde el inicio del proceso degradativo, indicando en ambos casos, cambios estructurales del copolímero por efectos biológicos (Gómez et al. 2014). La etapa de disminución en estabilidad térmica observada en los cultivos de BP8 (primeros 10 días de cultivo) podría ser causada por el rompimiento enzimático de los enlaces y grupos funcionales en la superficie de las partículas del copolímero en suspensión (Pilch-Pitera, 2012). Asimismo, el incremento en estabilidad térmica se ha atribuido a una reducción de uretanos, que es el enlace

más lábil de la cadena polimérica, por lo que en el material remanente después de la biodegradación (analizado en cada tiempo de cultivo), permanecen los enlaces más difíciles de romper y con mayor estabilidad térmica (Gómez et al. 2014). Este mismo fenómeno se ha observado en otros estudios de degradación biológica de PU (Cangemi et al. 2006; Petrović , 2008; Gómez et al. 2014).



**Figura 13.** Termogramas (a, b) y termogramas diferenciales (c, d) del copolímero PE-PU-A presente en PolyLack® degradado por la comunidad: (a, c) BP8 (Gaytán et al. 202) y (b, d) BP6 a diferentes tiempos de cultivo. I. Compuestos de bajo peso moléculas (CBPM), II. Uretano, III. Éster, IV. Éter, n=3. Velocidad de calentamiento: 20 °C/min



**Tabla 5.** Parámetros de estabilidad térmica y características de las diferentes etapas de descomposición térmica del copolímero PE-PU-A presente en PolyLack® a diferentes tiempos de cultivo por las comunidades BP8 y BP6.

Tiempo de cultivo (días)	Pérdida total de masa (%)*	T <sub>onset</sub>	T <sub>5%</sub>	T <sub>20%</sub>	T <sub>30%</sub>	I CBPM	II Uretano	III Éster	IV Éter
		°C				**Área bajo la curva (UA)			
<b>Comunidad BP8</b>									
No inoculado	36	55	185	340	385	89	180	232	100
5	35	45	90	320	386	172	145	225	85
10	35	45	90	290	395	207	135	122	83
15	30	55	210	355	450	75	147	161	91
20	27	55	210	370	>500	71	138	69	82
<b>Comunidad BP6</b>									
No inoculado	36	55	185	340	385	80	174	240	96
5	33	65	205	350	400	65	159	183	55
10	28.5	75	210	360	>500	62	142	178	78
15	25	115	230	410	>500	22	134	159	87
20	22	80	190	440	>500	71	115	32	63

\*Pérdida de masa por degradación térmica del PE-PU-A en diferentes tiempos de cultivo

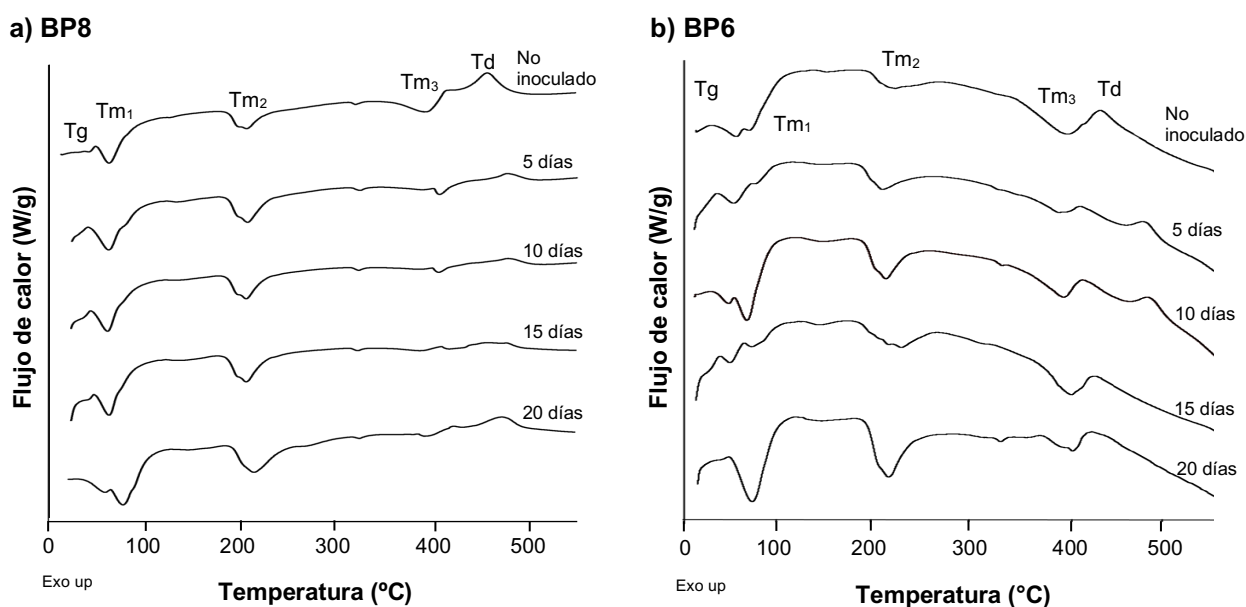
\*\*Las áreas se calcularon utilizando el método trapezoidal en el graficador Prism 9.1

La pérdida de masa por degradación térmica descrita anteriormente ocurre en varias etapas que dependen de la estabilidad de los grupos funcionales del material que se analiza. En un termograma diferencial cada etapa se refleja en diferentes picos ubicados en un intervalo de temperatura. Además, el área de los picos es proporcional a la cantidad relativa del grupo funcional en cuestión. En los copolímeros de PE-PU-A sin tratamiento biológico se observaron cuatro etapas de descomposición térmica (Figs. 13c y 13d). La etapa I ocurre entre 30 y 170 °C y corresponde a compuestos volátiles y de bajo peso molecular (CBPM). La etapa II, de 200 a 310 °C, se asocia al enlace uretano. La etapa III, se identificó entre 315 y 395 °C, y describe a los enlaces éster. Finalmente, la etapa IV se definió entre 400 y 470 °C, mostrando la degradación térmica de enlaces éter (Magnin et al. 2019) (Fig. 13, Tabla 5). Si bien el número de etapas de descomposición es el mismo durante la degradación, se observaron variaciones en el área bajo la curva de éstas. Específicamente, se detectó que BP8 incrementa ~2 veces el área de los CBPM durante los primeros 10 días, posteriormente disminuye hasta 66%, sugiriendo la generación o

acumulación de CBPM provenientes de la cadena polimérica (5-10 días) y su uso como fuente de carbono. En general, el área de uretano, éster y éter se reduce 23, 70 y 18%, respectivamente, en relación con el control y hacia el final del cultivo (Fig. 13c, Tabla 5, Fig. 4B en Gaytán et al. 2020,). Por otro lado, BP6 promueve reducciones de área equivalentes a 73, 34, 87 y 34% para CBPM, uretano, éster y éter, respectivamente y al final del cultivo (Fig. 13d, Tabla 5). Las reducciones en pérdida de masa para cada grupo funcional se han correlacionado con degradación biológica (Cangemi et al. 2006; Mathur & Prasad, 2012; Delebec et al. 2013). Así, los resultados de estos análisis confirman que BP8 y BP6 degradan el copolímero mediante el rompimiento de enlaces éster, uretano y éter. Estos rompimientos generan compuestos de bajo peso molecular (productos de degradación), que podrían ser metabolizados por las comunidades. El hecho de que BP8 y BP6 rompan los mismos grupos funcionales, pero con diferente intensidad (Fig. 13), apoya la hipótesis de que, si bien ambas comunidades degradan al polímero, llevan a cabo el proceso por diferentes mecanismos. Específicamente, BP6 produjo pérdidas de masas más marcadas con relación a las de BP8, por lo que se esperaría que BP6 presentara actividades enzimáticas más altas que BP8 (Figs. 20 y 21).

Los análisis por DSC demostraron variaciones en las propiedades térmicas del PE-PU-A, así como cambios en los segmentos duros y segmentos suaves, debidos a la capacidad degradativa de BP8 y BP6 (Fig. 14). Las curvas de flujo muestran que el copolímero no inoculado posee múltiples transiciones térmicas, comportamiento característico de PUs complejos con diferentes niveles de empaquetamiento y segregación de fases (Cipriani et al. 2013). Así, se definieron 5 transiciones térmicas en el PE-PU-A (Fig. 14): la temperatura de transición vítrea ( $T_g$  a  $50.2\text{ }^\circ\text{C}$ ), que refleja la proporción de segmentos duros y segmentos suaves en el copolímero, las endotermas o temperaturas de fusión ( $T_{m1-3}$ ), que están relacionadas con segmentos suaves ( $T_{m1}$  a  $70 \pm 10\text{ }^\circ\text{C}$ ) o segmentos duros ( $T_{m2}$  a  $210 \pm 8\text{ }^\circ\text{C}$  y  $T_{m3}$  a  $390 \pm 8\text{ }^\circ\text{C}$ ) y una exoterma o temperatura de descomposición ( $T_d$  a  $459 \pm 20\text{ }^\circ\text{C}$ ) (Krasowska et al. 2012; Cipriani et al. 2013). La comunidad BP8 provocó decaimiento en la  $T_g$  de los copolímeros ( $50\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 46\text{ }^\circ\text{C}$ ), mientras que la  $T_{m1}$  ( $70\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 83$ ) y  $T_{m2}$  ( $210\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 221\text{ }^\circ\text{C}$ ) aumentaron hacia el final del cultivo y la  $T_{m3}$  se desplazó a temperaturas aún más altas ( $390\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 405\text{ }^\circ\text{C}$ ) a los 10 días, una tendencia similar se observó para la  $T_d$  (Fig. 14a, Fig. 4C en Gaytán et al. 2020). Los PE-PU-A degradados por BP6 revelaron un corrimiento de la  $T_g$  hacia temperaturas mucho más bajas que las mostradas por BP8 ( $50\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 26\text{ }^\circ\text{C}$ ), implicando un mayor cambio en las proporciones de segmentos duros y suaves en comparación al control. Por otro lado, la  $T_{m1}$  se observó a temperaturas más altas ( $70\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 85\text{ }^\circ\text{C}$ ), mientras que un corrimiento hacia temperaturas más bajas se presentó en la

$T_{m_2}$  (210 °C → 204 °C),  $T_{m_3}$  (390 °C → 388 °C) y  $T_d$  (459 °C → 410) (Fig. 14b). Los cambios en las temperaturas de las transiciones térmicas provocados por BP8 y BP6 en el curso del cultivo demuestran que los microorganismos rompen la microestructura del copolímero compuesta por segmentos suaves (poliol del PE-PU-A) y segmentos duros (diisocianato y enlace uretano del PE-PU-A) (Fig. 14). Estos resultados se confirman con las áreas correspondientes a la zona de segmentos suaves ( $T_{m_1}$ ) y segmentos duros ( $T_{m_2}$ ,  $T_{m_3}$ ), que revelan disminuciones importantes en cada una de las transiciones térmicas, e implican un menor flujo de calor debido a la fractura de los segmentos porque hay una menor densidad de enlaces o grupos funcionales (Capitain et al. 2020). Aunque en diferente medida, la capacidad de las comunidades para degradar los segmentos duros ( $T_{m_2}$ ,  $T_{m_3}$ ) es particularmente importante porque se ha demostrado una correlación directa entre el contenido de éstos con la estabilidad de los PUs (Tang et al. 2001; Zhang et al. 2016), siendo zonas compactas que crean una estructura protectora, la cual dificulta el ataque de los microorganismos o sus enzimas (Zhang et al. 2016).



**Figura 14.** Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la biodegradación del PE-PU-A presente en PolyLack®, a diferentes tiempos de cultivo con las comunidades a) BP8 (Gaytán et al. 2020) y b) BP6, n=3. La  $T_g$ , al igual que las  $T_m$  y la  $T_d$ , se identificaron utilizando el software Universal V4.5A de TA Instruments.

### 8.3.3 Rompimiento de cadenas poliméricas y generación de compuestos de bajo peso molecular: Análisis por cromatografía de permeación en gel (GPC)

Mediante GPC se analizó la evolución en el peso molecular de los copolímeros de PE-PU-A por la actividad degradativa de las comunidades microbianas BP8 y BP6 durante 25 días (Tabla 6).

En estos análisis se determinó el peso molecular promedio en número ( $M_n$ ), un promedio aritmético que divide el peso total de las molécula del polímero, por el número total de las mismas. También, se cuantificó el peso molecular promedio en masa ( $M_w$ ), parámetro que incluye la masa de las cadenas individuales, resultando sensible a cadenas de alto peso molecular. Se determinó además el índice de polidispersidad (IPd), que expresa el grado de heterogeneidad de las cadenas del polímero.

La comunidad BP8 tuvo un efecto discreto en el rompimiento de las cadenas poliméricas a lo largo de 15 días de cultivo, con una disminución de 19% en  $M_n$ . A los 25 días, BP8 redujo 36% el  $M_n$  y 19% el  $M_w$  (Tabla 6; Tabla 1 en Gaytán et al. 2020). Los cambios observados en los pesos moleculares del copolímero indican que BP8 ataca preferencialmente fracciones de bajo peso molecular, no obstante, cadenas más largas son metabolizadas hacia el final del cultivo (20-25 días), sugiriendo que existe un cambio metabólico y por ende en la expresión de genes o una selección de poblaciones microbianas que dan lugar a una comunidad más apta para atacar polímeros de mayor complejidad, lo cual podría estudiarse en futuros trabajos. Recientemente, BP8 se utilizó para evaluar la biodegradabilidad de espumas de PU con enlaces saturados (PUS) e insaturados (PUU) y de bajo peso molecular ( $7 \times 10^3$  g/mol), constituidas principalmente de segmentos duros. Después de dos meses de cultivo con la comunidad se encontró que el  $M_w$  disminuyó 10% en los PUS y 14% en los PUU, mientras que el  $M_n$  se redujo 19-21%, independientemente del material. A pesar de que el rompimiento de las cadenas es más lento, estos resultados revelan el potencial de biodegradación de BP8 sobre materiales sólidos y sugieren que, la presencia de instauraciones en PU favorece la biodegradación del PU (Burelo et al. 2022).

Por su parte, desde los inicios del cultivo (5 días, fase exponencial y de desaceleración), la comunidad BP6 rompió las cadenas poliméricas del PE-PU-A, reduciendo 46% y 7% al  $M_n$  y  $M_w$ , respectivamente. Además, incrementó a 57% el IPd de las muestras analizadas, en comparación al control. La degradación del copolímero continuó en tiempos posteriores hasta alcanzar rompimientos de 59% en  $M_n$  y 37% en  $M_w$ , lo que aumentó hasta 64% el IPd en comparación al control. Cabe destacar la capacidad de BP6 para romper las cadenas de más alto peso molecular, denotado por la evolución en  $M_w$  a partir del día 10 de cultivo (Tabla 6).

**Tabla 6.** Peso molecular e índice de polidispersión del copolímero PE-PU-A del PolyLack® durante el cultivo de las comunidad PB8 (Gaytán et al. 2020) y BP6.

Tiempo de cultivo (días)	<i>Mn</i> (g/mol)	<i>Mw</i> (g/mol)	IPd
<b>Comunidad BP8</b>			
No inoculado	101,896 ± 8,098	208,490 ± 7,600	2.0 ± 0.3
5	96,798 ± 712	210,837 ± 26,094	2.2 ± 0.1
10	89,258 ± 5,825	223,581 ± 18,736	2.5 ± 0.3
15	82,577 ± 1,168	229,372 ± 26,416	2.7 ± 0.3
20	73,406 ± 9,225	187,925 ± 50,737	2.5 ± 0.4
25	65,609 ± 990	169,925 ± 5,080	2.6 ± 0.1
<b>Comunidad BP6</b>			
No inoculado	120,228 ± 7,893	185,653 ± 37,800	1.7 ± 0.6
5	68,480 ± 1,155	171,957 ± 23,395	2.6 ± 0.4
10	68,372 ± 1,793	157,092 ± 11,153	2.3 ± 0.3
15	63,448 ± 1,982	137,790 ± 43,981	2.2 ± 0.1
20	50,805 ± 2,887	136,601 ± 6,193	2.8 ± 0.3
25	49,055 ± 1,165	122,143 ± 5,561	2.2 ± 0.3

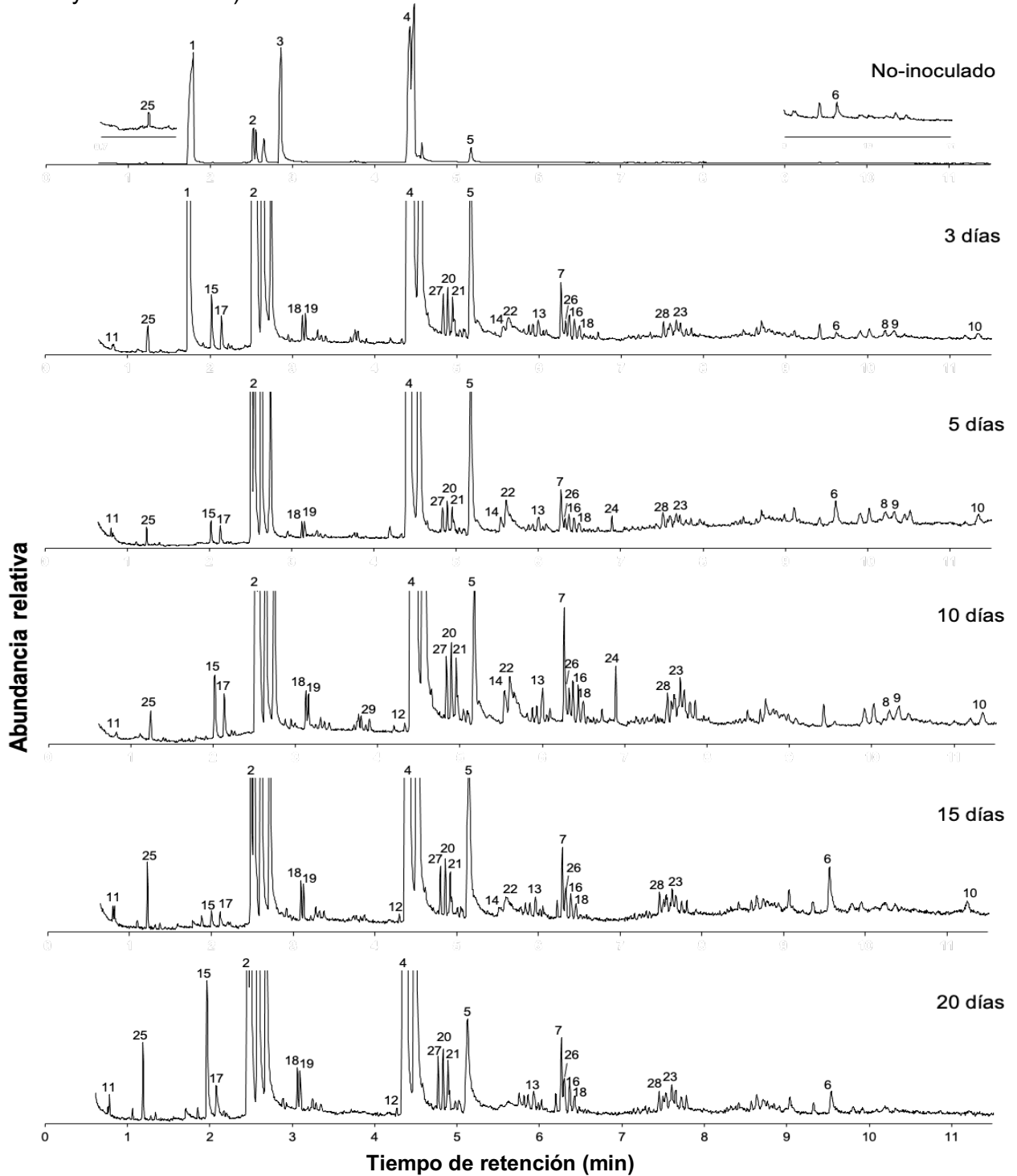
El peso molecular promedio en número (*Mn*), peso molecular promedio en peso (*Mw*) e índice de polidispersión (IPd) fueron calculados por cromatografía de filtración en gel (GPC) con estándares de calibración monodispersos, utilizando THF como eluyente, n=3.

El análisis comparativo de los cambios en los pesos moleculares reveló que BP6 fue más eficiente rompiendo las cadenas del PE-PU-A en comparación a BP8. Específicamente, se observó que BP8 requiere de 25 días para alcanzar un *Mn* de 65,609 g/mol, en tanto que BP6 logra valores similares (60,480 – 63,448 g/mol) entre los 5 y 15 días. En las moléculas de mayor tamaño se observó que a partir del día 5 la comunidad BP6 genera copolímeros con un *Mw* semejante (169,925 g/mol) al de BP8 a los 25 días (171,957 g/mol) (Tabla 6). La capacidad de BP6 para romper el copolímero y generar productos de degradación más pequeños y en menor tiempo que BP8 demuestra la mayor efectividad de la comunidad BP6 para degradar el copolímero PE-PU-A en el PolyLack®, lo cual podría estar relacionado con el número de especies que la integran, ya que en BP8 se identificaron alrededor de 13 especies en el metagenoma, mientras que en BP6 fueron cerca de 35, según los resultados más recientes de nuestro grupo (Sánchez-Reyes et al. 2023). Esta diversidad microbiana, se traduce en diversidad genética y funcional (potencial metabólico) que permite a BP6 mayor disponibilidad de recursos metabólicos, como enzimas hidrolíticas y oxidativas, que permiten transformar o catabolizar el PE-PU-A.

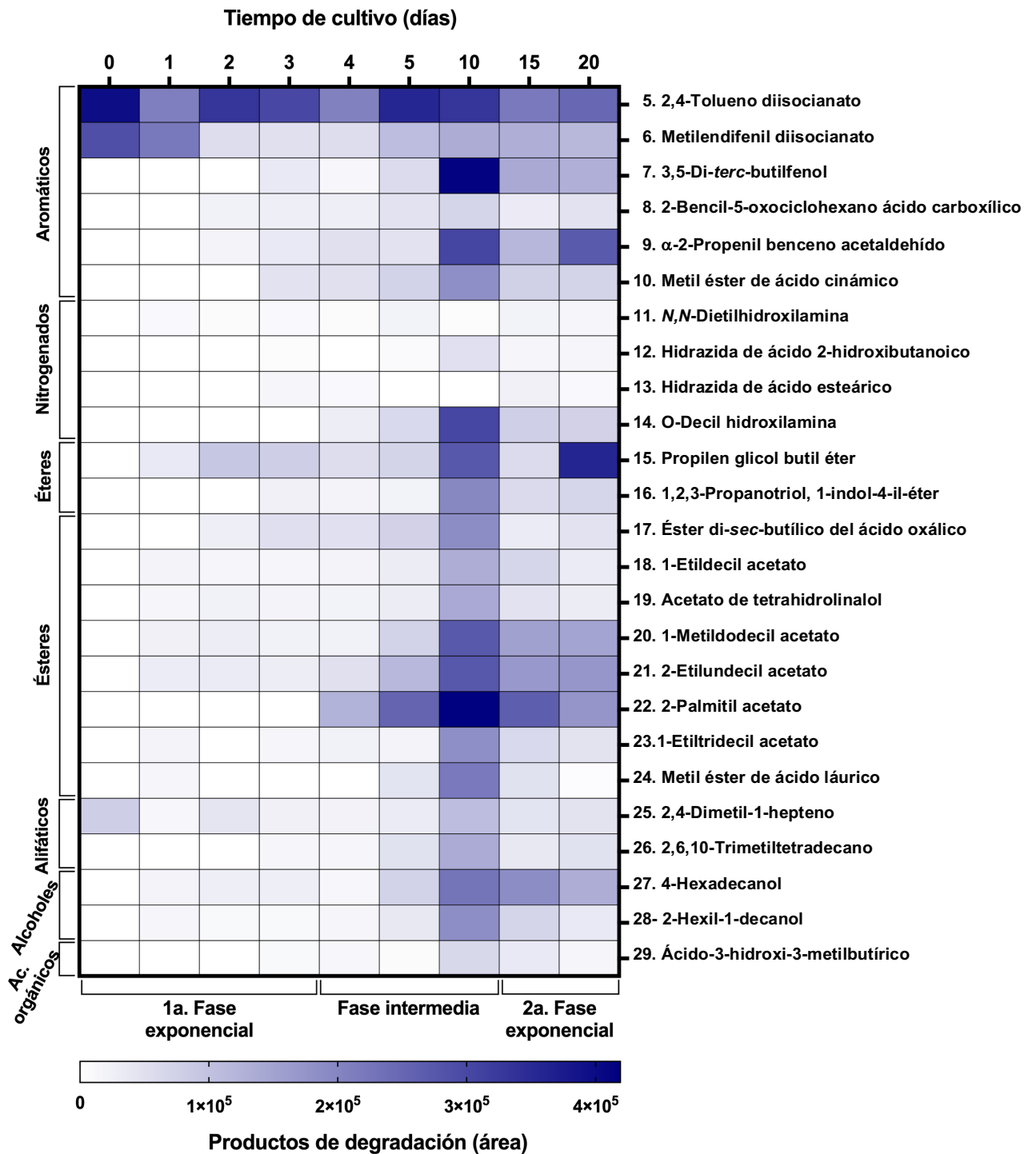
#### **8.4 Las comunidades BP8 y BP6 generan productos de degradación complejos a partir del copolímero y desde los primeros tiempos de cultivo**

Para identificar y analizar los productos de degradación del PolyLack® generados por las comunidades, se realizaron análisis por GC-MS de los sobrenadantes de cultivo a diferentes tiempos. En los cromatogramas resultantes 29 y 28 picos fueron identificados en los sobrenadantes de BP8 y BP6, respectivamente. Los picos corresponden a distintos compuestos químicos y su área (cantidad relativa) varía a diferentes tiempos del cultivo (Figs. 15-18). La identificación de los productos de degradación se basó en una comparación de los espectros de masas de las muestras, con espectros de masas de referencia encontrados en la base de datos NIST-2002 (detalles en Materiales y métodos). El análisis del control no inoculado mostró que además de los aditivos, el barniz contiene derivados de TDI, MDI y 2,4-dimetil hepteno, posibles residuos de la síntesis del copolímero (Figs. 15-18). En el control negativo, incubado en las mismas condiciones que las comunidades (37 °C y 220 rpm), estos compuestos se mantuvieron constantes durante todo el experimento (Anexo D), lo que indica que no se degradan de manera abiótica. En los cultivos de BP8, los productos de degradación pertenecen a diferentes grupos de compuestos, entre ellos aromáticos, nitrogenados, éteres, ésteres, alifáticos, alcoholes y ácidos orgánicos, siendo los aromáticos y los ésteres los más representados durante el proceso degradativo (Figs. 15-16, Fig. 2B en Gaytán et al. 2020). Por su estructura, cada grupo de compuestos podría derivar de diferentes zonas del copolímero, y su desprendimiento de la cadena se relacionaría a actividades enzimáticas hidrolíticas u oxidativas (Fig. 19). Por ejemplo, los aromáticos se originan de la zona del diisocianato polimerizado (TDI o MDI) y de la zona acrílica que flanquea la cadena de PU y contiene anillos aromáticos derivados del estireno. En este sentido, los alifáticos resultan de la zona del diol polimerizado (PPG) y de la zona acrílica (Fig. 19). Ambos productos de degradación, aromáticos y alifáticos, serían resultado de un rompimiento oxidativo. Los alcoholes y ácidos orgánicos resultarían del rompimiento hidrolítico de uretanos y ésteres del diisocianato reaccionado o de los ésteres de la zona acrílica (Fig. 19). Respecto a la cantidad relativa de los productos de degradación, se observó que fue baja durante la fase exponencial (0-3 días) y aumentó en la fase estacionaria intermedia (4-10 días), llegando a un máximo a los 10 días (Fig. 16, Fig. 2B en Gaytán et al. 2020). Dado que la fase estacionaria es un periodo de adaptación celular con cese de crecimiento y privación de nutrientes (Jaishankar & Srivastava, 2017; Perrin et al. 2020), el máximo de concentración observado en esta etapa podría relacionarse a una acumulación en la concentración de compuestos. Por otro lado, después de 10 días de cultivo, en el curso de la segunda fase exponencial, la cantidad relativa

de los productos de degradación disminuyó sustancialmente o desapareció, sugiriendo que, en esta etapa, BP8 utiliza los productos de degradación como fuente de carbono (Fig. 16, Fig. 2B en Gaytán et al. 2020).



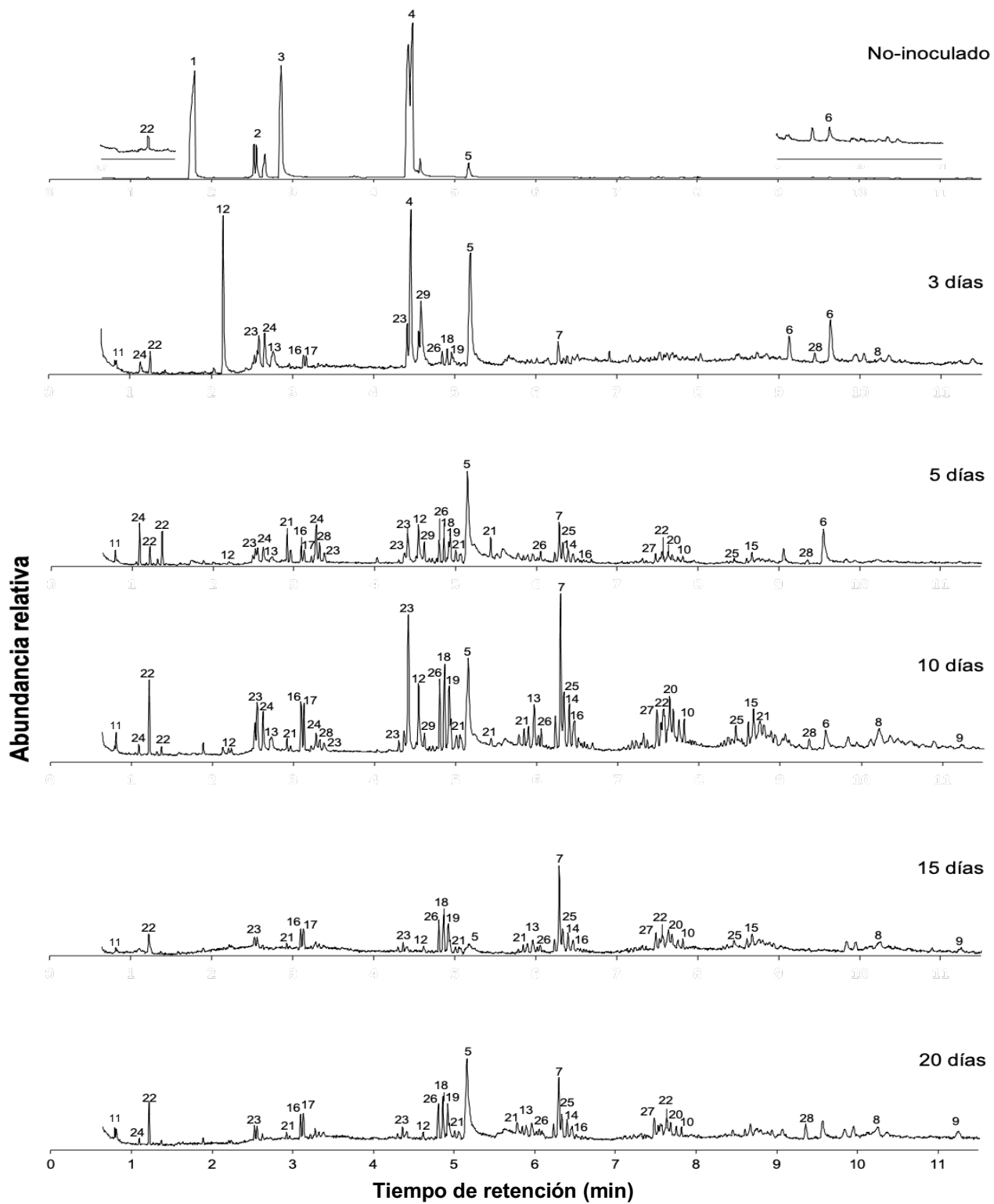
**Figura 15.** Cromatogramas de los sobrenadantes de cultivo con la comunidad BP8 en MM-PL a diferentes tiempos (Gaytán et al. 2020).



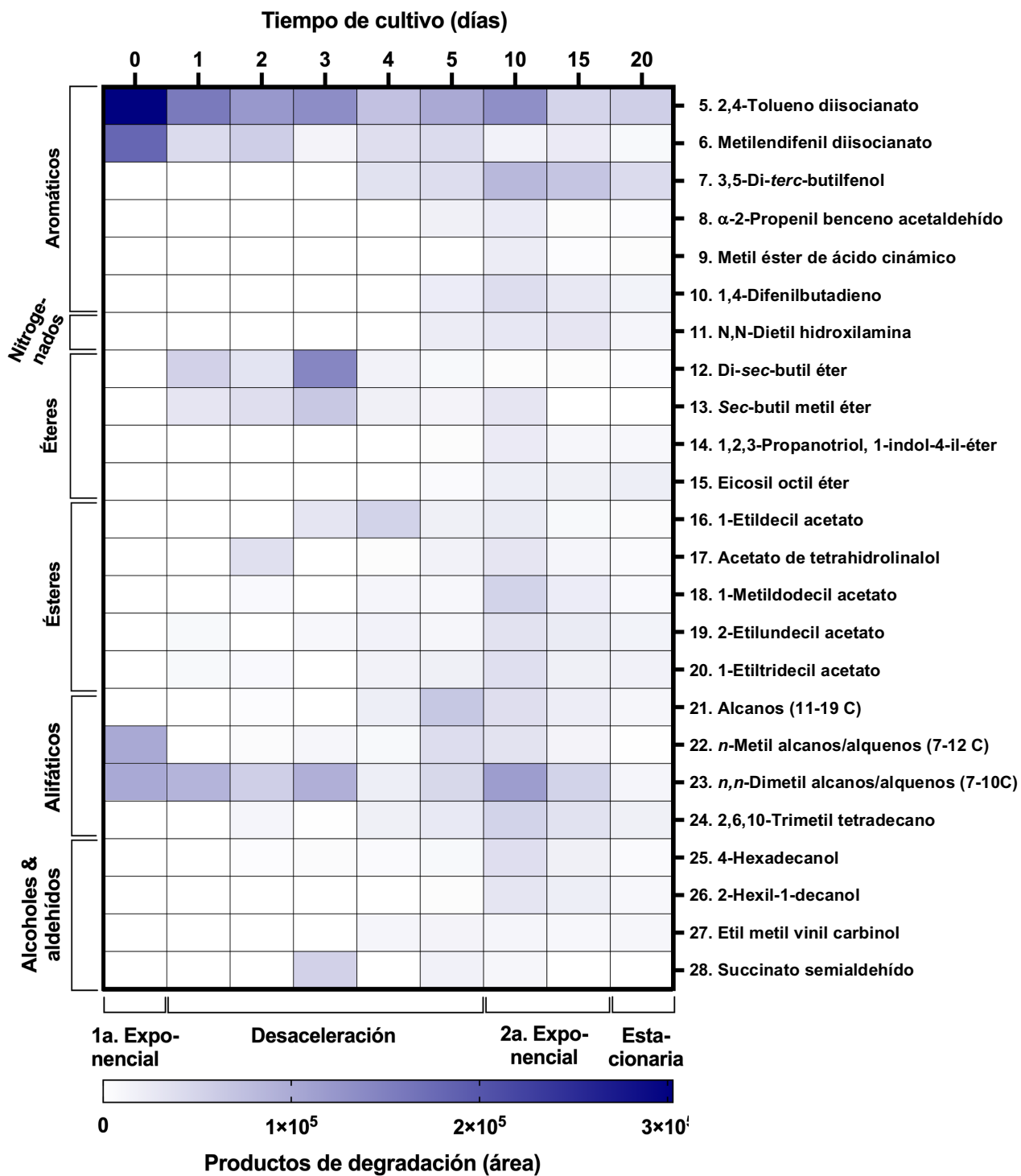
**Figura 16.** Identificación y abundancia de productos de degradación de PolyLack® generados por la actividad degradativa de la comunidad BP8 a diferentes tiempos de cultivo (Gaytán et al. 2020). Los números de los compuestos corresponden a los picos en el cromatograma de la Figura 15.



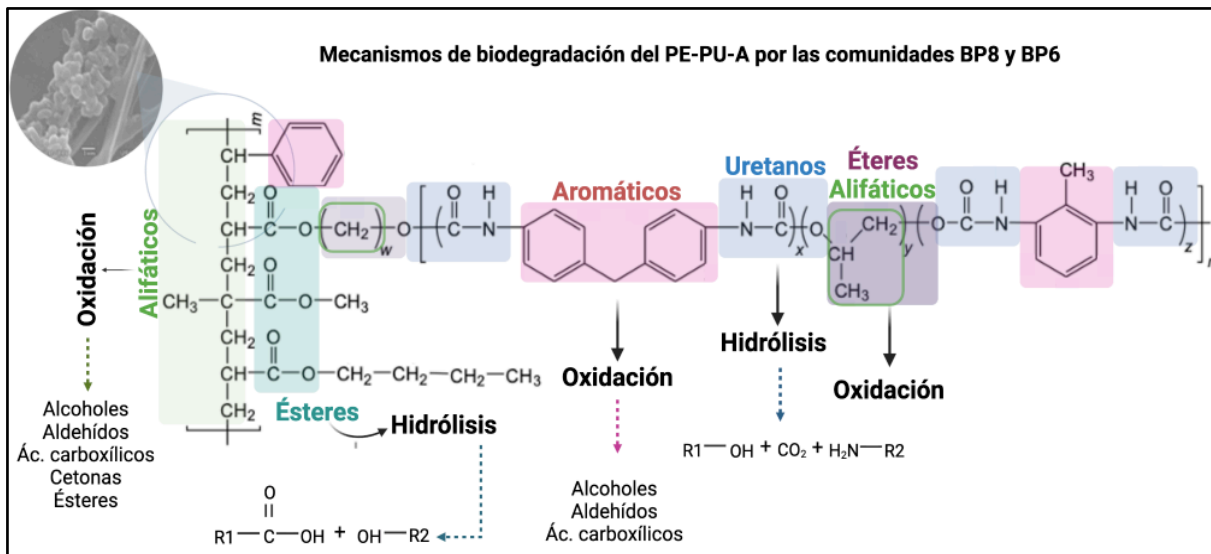
Los productos de degradación identificados en la comunidad BP6 se agruparon en aromáticos, nitrogenados, éteres, ésteres, alifáticos, alcoholes y aldehídos (Fig. 18). Con excepción de los aldehídos, los grupos de compuestos de BP6 son similares a los de BP8 (Figs. 16 y 18), lo que podría sugerir que entre las comunidades se comparten algunos elementos del metabolismo, posiblemente porque géneros de BP8, como *Paracoccus* y *Achromobacter*, forman parte de la comunidad BP6. Al igual que en BP8, los aromáticos derivan de los diisocianatos y de la zona acrílica como producto de oxidación enzimática, mientras que los compuestos nitrogenados, ésteres, alcoholes y aldehídos, se generan del uretano o zona acrílica por ataques hidrolíticos. Los éteres y alifáticos, son producidos por oxidaciones en zona acrílica y PPG (Fig. 19). Excepto para algunos éteres y alifáticos, las cantidades relativas de los productos de degradación fueron bajas para los tiempos de cultivo analizados (Figs. 17 y 18). Es probable que, al igual que BP8, la comunidad BP6 también utilice a los productos de degradación como fuente de carbono. Así, las bajas cantidades relativas detectadas apoyarían la propuesta de que BP6 posee mayor capacidad para metabolizar la fuente de carbono (sección 8.1). Por otro lado, a los 10 días se observaron todos los productos de degradación, posteriormente estos desaparecieron o disminuyeron en el MM-PL, sugiriendo su uso como fuente de carbono.



**Figura 17.** Cromatogramas de los sobrenadantes de cultivo con la comunidad BP6 en MM-PL a diferentes tiempos.



**Figura 18.** Identificación y abundancia de productos de degradación de PolyLack® generados por la actividad degradativa de la comunidad BP6 a diferentes tiempos de cultivo. Los números de los compuestos corresponden a los picos en el cromatograma de la Figura 17.



**Figura 19.** Propuesta de mecanismos y productos de degradación resultantes de las diferentes actividades enzimáticas de BP8 y BP6, sobre los grupos funcionales característicos del PE-PU-A. La propuesta se basa en los grupos de compuestos identificados por GC-MS.

El bio-reciclaje es una estrategia para el tratamiento de la contaminación por plásticos que propone la valorización de los monómeros o moléculas resultantes de procesos biodegradativos (productos de degradación). En este proceso se plantea que los sistemas biológicos atacan a los polímeros plásticos como el PU y liberan compuestos pequeños que pueden ser recuperados para su reutilización (Sklenicková et al. 2020). En la actualidad, existen métodos químicos como la glicólisis que permite la recuperación de polioles, que pueden servir para nuevas síntesis (Sklenicková et al. 2020); sin embargo, se lleva a cabo a temperaturas muy altas (190 °C), haciéndolo poco viable económicamente. En contraste, el bio-reciclaje ofrece la ventaja de trabajar a temperaturas moderadas (30-70 °C). Sin embargo, también se contemplan desventajas como la asimilación parcial de los productos de degradación, o la pérdida de eficiencia catalítica en las enzimas degradativas, en ambos casos se impactaría el rendimiento de los compuestos a recuperar. En este contexto, BP8 produce una diversidad de compuestos, algunos de los cuales, y de acuerdo con la base de datos PubChem, se emplean en la industria química como precursores o co-reactantes en la síntesis de PU (TDI, MDI ó TDA, MDA), antioxidantes y estabilizantes térmicos, inhibidores de corrosión (TDA, MDA, 3,5-di-*terc*-butilfenol, *N-N*-dietil hidroxilamina), solventes, desengrasantes de metales y plastificantes (propilen glicol *n*-butil éter, oxalato de di-*sec*-butil). También, se aplican en la industria cosmética y alimentaria como precursores de aromas y emolientes (tetra hidrolinalil acetato, palmitil acetato, metil laurato), aditivos alimentarios, saborizantes de alimentos y edulcorantes ( $\alpha$ -propenil benceno

acetaldehído, 1,2,3-propanotriol, 1-indol-4-il-éter, palmitil acetato, metil laurato) (Fig. 18; Fig. 2B en Gaytán et al. 2020). Respecto a BP6, el análisis de los usos o funcionalidad de algunos de sus productos de degradación muestra que el di-sec-butil éter, se emplea como agente para intercambio de iones en la industria química, mientras que los diferentes alcanos (11-19 C) son ampliamente utilizados en la industria cosmética como emolientes y delineadores, también se emplean para productos de cuidado personal como de baño, acondicionadores, fragancias, shampoos. De forma interesante se identificó que algunos compuestos de degradación podrían tener roles biológicos, como los *n*-metil alcanos y los *n,n*-dimetil alcanos que son lípidos de membrana y el succinato semialdehído, que es un intermediario en diversas vías metabólicas, como la propuesta en nuestro grupo de trabajo para degradación de N-metilpirrolidona (Solís-González et al. 2017). De acuerdo con lo anterior, BP8 y BP6 podrían resultar sistemas biológicos atractivos para bio-reciclaje, ya que generan productos que al recuperarse podrían utilizarse en diferentes industrias. Desafortunadamente, aún hace falta mucho trabajo de investigación para superar las desventajas que ofrece este proceso. Al comparar los perfiles cromatográficos de ambas comunidades se observan picos similares a los 4.5-5, 5.5-6.5 y 7.5 min (Figs. 15 y 17), que implica la generación de los mismos productos de degradación, tales como el 3,5-di-*terc*-butilfenol, 1-etildecil-acetato, 4-hexadecanol, entre otros (Figs. 16 y 18). Esto sugiere procesos degradativos con actividades enzimáticas semejantes, a pesar de las diferencias en la composición microbiana entre ambas comunidades. Por otro lado, también se detectaron productos de degradación exclusivos para cada comunidad, como las hidroxilaminas, y el propilen glicol butil éter (Fig. 16, compuestos 11, 14 y 15) observados en BP8. Mientras que, el eicosil octil éter y el metil etil vinil carbinol (Fig. 18, compuestos 15 y 27) se identificaron como productos únicos del metabolismo de BP6. Estos resultados permiten deducir que hay procesos degradativos comunes entre comunidades, pero también existen reacciones específicas para cada comunidad. Otra diferencia importante son las menores cantidades relativas de los productos de degradación. Para BP8 se observó una acumulación en las etapas finales del cultivo, y para BP6 las cantidades relativas se mantuvieron en niveles bajos durante el cultivo. Esta diferencia es congruente con la propuesta planteada con base en los resultados de consumo de carbono (sección 8.1), en donde se sugiere que BP6 es metabólicamente más eficiente que BP8 porque posee un mayor número de especies microbianas. Esta eficiencia podría relacionarse a una mayor y más rápida asimilación de los productos de degradación, que se refleja en las bajas concentraciones detectadas (Fig. 18).

Desde los primeros días de cultivo ambas comunidades producen una diversidad de moléculas que por su complejidad química corresponden a productos de la degradación del copolímero (Figs. 16 y 18). Esta observación es relevante porque contrasta la hipótesis de trabajo que plantea una degradación secuencial, iniciando con las moléculas más simples (aditivos), seguida del catabolismo de las complejas (copolímero). Por el contrario, los datos indican que el crecimiento inicial de las comunidades podría sustentarse por el metabolismo simultáneo de ambas fuentes de carbono. Es probable que esta capacidad temprana de las comunidades para degradar a los diferentes componentes del barniz se relacione con el proceso de adaptación previa, estimulada por los métodos de enriquecimiento, preservación y pre-inóculo que siempre se realizaron en el medio MM-PL.

Ambas comunidades son fuente de microorganismos con potencial biotecnológico para degradación de PU y otros xenobióticos. Dado que el PU es uno de los plásticos más producidos a nivel global, se ha previsto como uno de los materiales cuyo reciclaje vía procesos biológicos podría resultar viable. Sin embargo, por su complejidad química y composición variable no se ha logrado una degradación biológica significativa. Así, el descubrimiento y caracterización de microorganismos altamente eficientes y de enzimas capaces de desensamblar el PU en oligómeros y compuestos monoméricos es de fundamental importancia (Utomo et al. 2020; Liu et al. 2021). En este sentido, se han hecho algunas investigaciones en las que se explora la degradación de PU con bacterias como *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter baylyi* y mezclas enzimáticas (esterasa/amidasa), que generan productos comunes de PU, tales como TDA, MDA, 1,4-butanodiol, dietilen glicol, ácido adípico y ácido 6-hidroxicaprónico (Mukherjee et al. 2011; Magnin et al. 2019; Utomo et al. 2020; Liu et al. 2021). Estas moléculas se han considerado como posibles materias primas para la síntesis de PU virgen, poliésteres, aminas y otros compuestos químicos con valor agregado (Liu et al. 2021).

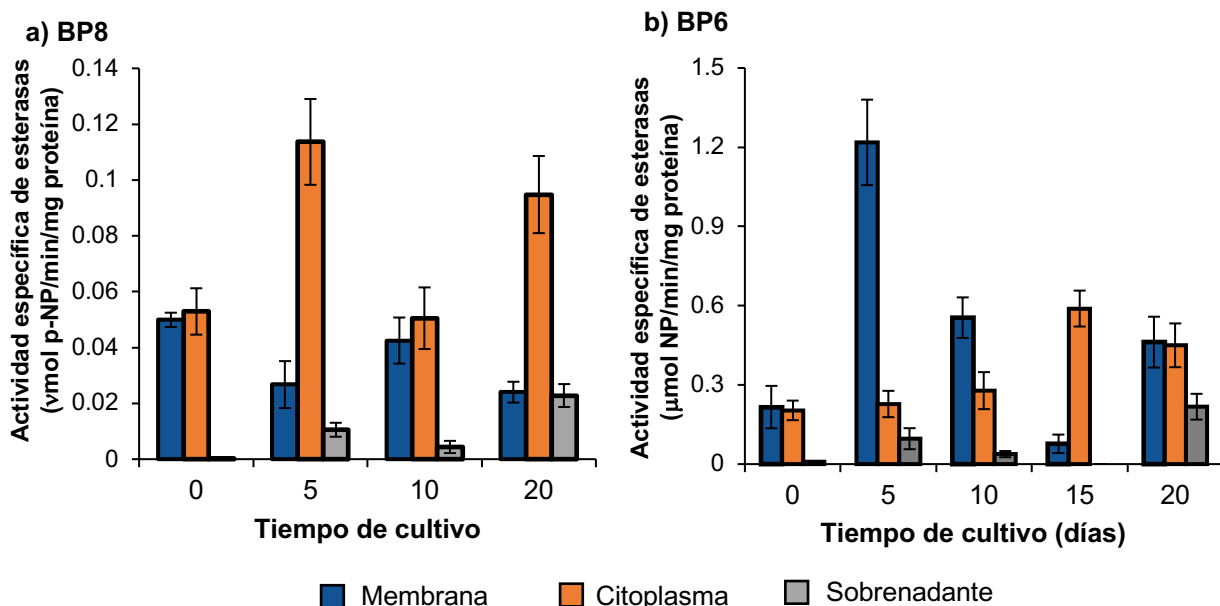
### **8.5 Las comunidades BP8 y BP6 despliegan actividades hidrolíticas relacionadas con el ataque a enlaces éster y C-N durante la degradación del copolímero de PE-PU-A**

La mayor parte de las enzimas microbianas identificadas en la degradación del PU se han descubierto utilizando PS-PU como modelo de estudio. Entre ellas las hidrolasas, como esterases, lipasas, ureasas, proteasas y amidasas, han sido las más estudiadas. Sin embargo, el rompimiento enzimático de los PE-PU, que representan una buena porción de los PU producidos a nivel mundial, ha sido poco explorado. Enzimas como papaína, quimiotripsina y ureasa han presentado actividad hidrolítica sobre PE-PU (Marchant et al. 1987; Campinez et al.

2013). En este trabajo se cuantificaron las actividades hidrolíticas esterasa, ureasa y uretanasa desplegadas en diferentes fracciones celulares de BP8 y BP6 (membrana, citoplasma y sobrenadante) durante su crecimiento en MM-PL (Figs. 20 y 21).

Las esterasas son las enzimas más estudiadas en degradación de PU, hidrolizan los enlaces éster produciendo ácidos carboxílicos y alcoholes (Schmidt et al. 2017; Magnin et al. 2020; Liu et al. 2021). En BP8, el citoplasma fue el compartimento con mayor actividad esterasa en comparación a las fracciones de membrana y extracelular, destacando a los 5 (0.11  $\mu\text{mol } p\text{-NP}/\text{min}/\text{mg}$  proteína) y 20 días (0.095  $\mu\text{mol } p\text{-NP}/\text{min}/\text{mg}$  proteína). La fracción membranal presentó máximos de actividad al inicio (0.05  $\mu\text{mol } p\text{-NP}/\text{min}/\text{mg}$  proteína) y a los 10 días de cultivo (0.04  $\mu\text{mol } p\text{-NP}/\text{min}/\text{mg}$  proteína), esto fue 46% superior en relación con los otros tiempos de cultivo. La actividad extracelular se observó baja, entre 0.004 y 0.023  $\mu\text{mol } p\text{-NP}/\text{min}/\text{mg}$  proteína (Fig. 20a). En BP6 la actividad esterasa fue mayor en membrana, con un máximo a los 5 días (1.2  $\mu\text{mol } p\text{-NP}/\text{min}/\text{mg}$  proteína), 94% más alta que la actividad mínima (0.08  $\mu\text{mol } p\text{-NP}/\text{min}/\text{mg}$  proteína), detectada a los 15 días. Por otro lado, en el citoplasma el máximo fue a los 15 días (0.6  $\mu\text{mol } p\text{-NP}/\text{min}/\text{mg}$  proteína), siendo 62-66% más alto que la actividad mínima (0.2-0.23  $\mu\text{mol } p\text{-NP}/\text{min}/\text{mg}$  proteína), ocurrida entre el inicio y los 5 días de cultivo. En tanto, para la fracción extracelular el máximo ocurrió al final del cultivo (0.22  $\mu\text{mol } p\text{-NP}/\text{min}/\text{mg}$  proteína) (Fig. 20b).

En otros estudios de degradación de PU la actividad esterasa se ha cuantificado generalmente en membrana o en fracciones extracelulares, siendo las esterasas membranales las que poseen actividad más alta en comparación con las extracelulares (Sulaiman et al. 2012; Wei et al. 2014a,b; Schmidt et al. 2017). Hasta ahora, las únicas esterasas citoplásmicas reportadas en degradación de PU son proteínas recombinantes, como la resultante de la expresión del gen estructural *PudA*, de *Comamonas acidovorans* TB-35, en *Escherichia coli* (Nomura et al. 1998), y la proteína CE\_Ubrb que es una carboxil ester hidrolasa proveniente del microbioma de rumen vacuno (Ufarté et al. 2017). Es probable que las esterasas citoplasmáticas de BP8 y BP6 participen en el catabolismo de oligómeros y monómeros tipo éster que entran a las células o bien como parte de la oxidación subterminal de alcanos. El análisis comparativo de las actividades enzimáticas reveló que en general BP6 posee actividad esterasa hasta 45 veces más alta (fracción membranal, 5 días de cultivo) que la de BP8. Esta tendencia correlaciona con los resultados de los termogramas diferenciales (Fig. 13), donde se observan los efectos de las esterasas de BP6, que reducen 87% la cantidad de ésteres en el copolímero degradado.



**Figura 20.** Actividad específica de esterasa en diferentes fracciones celulares de BP8 y BP6 cultivadas en MM-PL. Las actividades enzimáticas a tiempo cero se cuantificaron en el inóculo, el cual fue precultivado en MM-PolyLack®. Como control positivo de la actividad esterasa se utilizaron 0.1 U (unidades) de esterasa (lipasa) de *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich, Número de catálogo: 62285). Se obtuvo una actividad específica de  $2970 \pm 92 \mu\text{mol } p\text{-NP min/mg proteína}$  utilizando *p*-NPA como sustrato. Como control negativo se utilizó MM-PL sin inocular, el cual fue sometido al mismo tratamiento que los sobrenadantes de cultivo (Materiales y métodos).

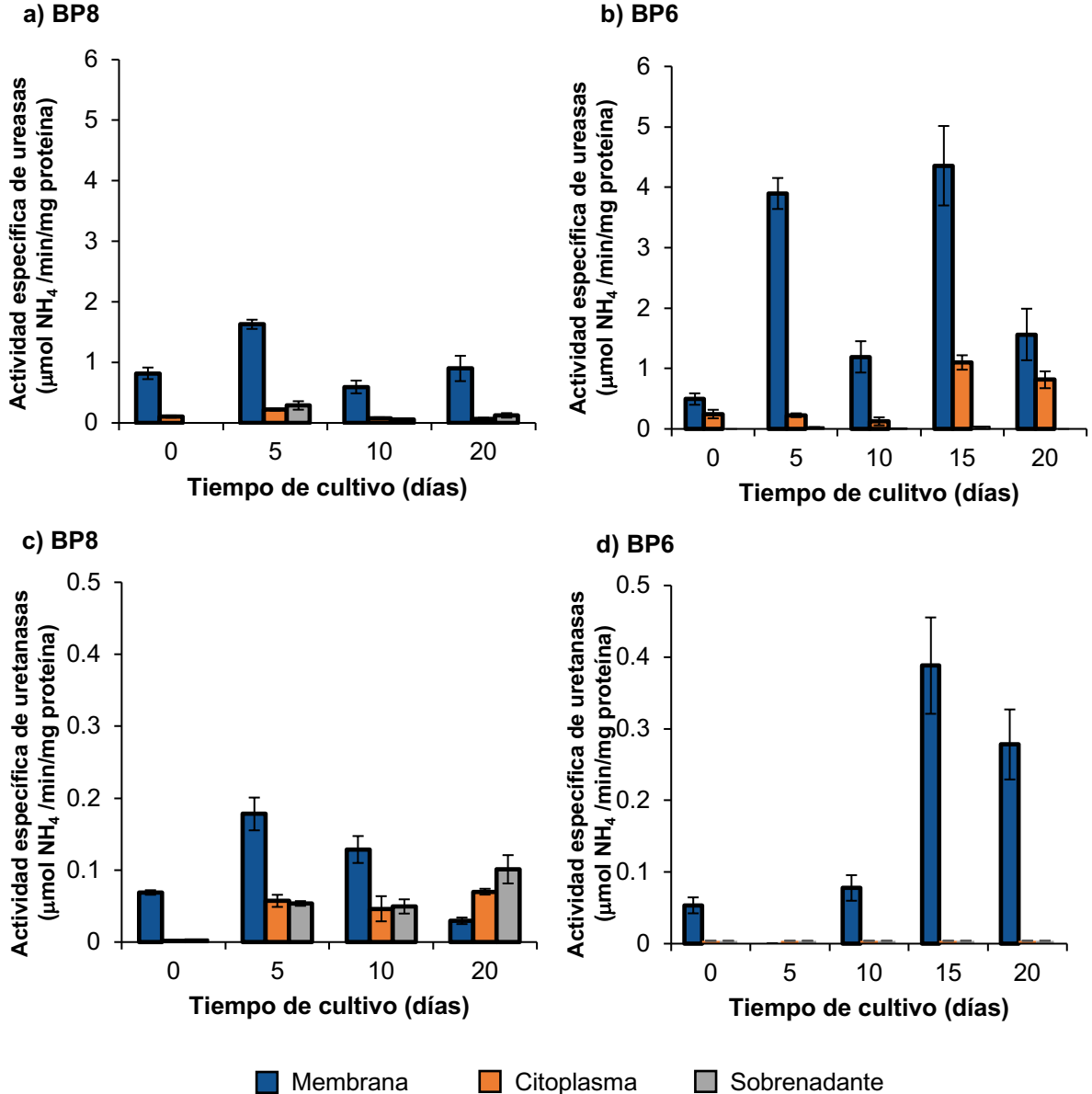
El rompimiento biológico del uretano es también de los más importantes, no sólo porque se trata del enlace representativo del PU, sino porque al formar parte de los segmentos duros y al tener una naturaleza hidrofóbica, resulta poco accesible a las enzimas (Santerre et al. 2005; Liu et al. 2021). A pesar de su relevancia, son pocas las uretano-hidrolasas o uretanasas estudiadas. Entre ellas destaca la uretano hidrolasa de *Rhodococcus equi* TB-60, enzima que hidroliza amidas, anilidas y compuestos de bajo peso molecular relacionados al PU, como el dibutil éster de tolueno 2,4-ácido dicarbámico, cuyo rompimiento genera aminas y alcoholes como productos de degradación (Akutsu-Shigeno et al. 2006). También, se ha reportado a una poliamidasa obtenida de *Nocardia farcinica*, estudiada para comprender el mecanismo de degradación del uretano, mediante la identificación y cuantificación de MDA, uno de los productos del rompimiento de uretano en PU (Gamerith et al. 2016). En este trabajo, se cuantificó la actividad enzimática con capacidad de romper enlaces C-N de la urea y el uretano en diferentes fracciones celulares de cultivos de BP8 y BP6 creciendo en MM-PL (Fig. 21).

En BP8 la membrana fue la fracción con mayor actividad ureasa ( $0.6\text{-}1.6 \mu\text{mol NH}_4\text{/min/mg proteína}$ ), además se detectó actividad en citoplasma ( $0.08\text{-}0.22 \mu\text{mol NH}_4\text{/min/mg proteína}$ ) y



fracción extracelular (0.057-0.29  $\mu\text{mol NH}_4/\text{min}/\text{mg}$  proteína) en los diferentes tiempos de cultivo analizados (0-20 días) (Fig. 21a). En BP6 la membrana también tuvo un nivel alto en el rompimiento de urea como sustrato. Siendo la membrana, la fracción con mayor actividad, ésta resultó más alta a los 5 (3.9  $\mu\text{mol NH}_4/\text{min}/\text{mg}$  proteína) y 15 días (4.4  $\mu\text{mol NH}_4/\text{min}/\text{mg}$  proteína). En el citoplasma, la actividad más alta se registró al final del cultivo (0.8-1.1  $\mu\text{mol NH}_4/\text{min}/\text{mg}$  proteína), y en la fracción extracelular no se detectó esta actividad (Fig. 21b). El análisis de las uretano hidrolasas de BP8 reveló que, entre el inicio y los 10 días de cultivo, las enzimas fueron más activas en la membrana (0.07-0.18  $\mu\text{mol NH}_4/\text{min}/\text{mg}$  proteína), mientras que a los 20 días la actividad de la fracción extracelular (0.1  $\mu\text{mol NH}_4/\text{min}/\text{mg}$  proteína), fue 69% superior a la de membrana (Fig. 21c).

En BP6 la única fracción con actividad uretanasas fue la membrana, con un máximo a los 15 días de cultivo (0.39  $\mu\text{mol NH}_4/\text{min}/\text{mg}$  proteína) (Fig. 21d). Los resultados de rompimientos C-N por actividad enzimática y los análisis físico-químicos previamente descritos son complementarios, ya que los FT-IR y los TGA de BP8 (Figs. 12 y 13, tabla 6) reflejan cambios marcados en los uretanos del PE-PU-A durante los primeros 10 días de cultivo, periodo en el que se identificó la mayor actividad ureasa y uretanasas (Figs. 21a y 21c). En el caso de BP6, y de acuerdo con el análisis por TGA (Fig. 13, tabla 5), el cambio más grande ocurrió entre 15 y 20 días, intervalo de mayor actividad ureasa y uretanasas para esta comunidad (Figs. 21b y 21d). Al contrastar la capacidad de las comunidades para desplegar enzimas que rompen enlaces C-N se encontró que BP6 produce ureasas con actividades hasta tres veces más altas en comparación a las de BP8 (Figs. 21a y 21b). Un fenómeno similar se observó para las uretanasas, dado que las de BP6 presentaron una mayor actividad (Figs. 21c y 21d). La actividad ureasa ha sido propuesta desde los primeros estudios de biodegradación de PU, como una enzima degradadora de este polímero (Phua et al. 1087; Ruíz et al. 199), y aunque no se ha demostrado experimentalmente su participación en el rompimiento del enlace urea del PU, se ha seguido considerando como una posibilidad. Si bien se demostró que BP8 y BP6 rompen enlaces C-N, vale la pena mencionar que no encontramos evidencias para sugerir que el copolímero PE-PU-A contiene grupos urea, por lo que los resultados más representativos del sistema de estudio de este trabajo son los que se describen para la actividad uretanasas (Figs. 21c y 21d).



**Figura 21.** Actividad específica para rompimiento de enlaces C-N. a-b) Ureasa y c-d) uretanasa, en diferentes fracciones celulares de las comunidades BP8 y BP6. Las actividades enzimáticas a tiempo cero se cuantificaron en el inóculo, el cual fue precultivado en MM-PolyLack®. Como control positivo se utilizaron 0.25 U de ureasa de *Canavalia ensiformis* (Sigma-Aldrich, Número de catálogo: U-1500). Se obtuvo una actividad específica de  $30000 \pm 699$   $\mu\text{mol NH}_4/\text{min}/\text{mg}$  proteína con la urea como sustrato y de  $70 \pm 15$   $\mu\text{mol NH}_4/\text{min}/\text{mg}$  proteína con el etil carbamato (uretano) como sustrato. Como control negativos se utilizó MM-PL sin inocular, el cual fue sometido al mismo tratamiento que los sobrenadantes de cultivo (materiales y métodos)

Con base en los resultados, es probable que las esterasas, ureasas y uretanasas identificadas en los compartimentos celulares de BP8 y BP6 ataquen los segmentos suaves (vía hidrólisis de ésteres) y duros (vía hidrólisis del uretano) del copolímero de PE-PU-A, así como a

los diferentes productos de degradación que contienen estos grupos funcionales. En este sentido, los perfiles enzimáticos de cada comunidad podrían asociarse a sus requerimientos nutricionales. Recientemente nuestro grupo de trabajo documentó que actividades esterasa y ureasa de las comunidades BP1, BP2 y BP7, originarias del mismo sitio que BP8 y BP6 (basurero Bordo Poniente), podrían ser parte de los mecanismos enzimáticos para degradar el PolyLack® y además comparten la tendencia de desplegar mayor actividad esterasa y menor actividad ureasa a inicios de cultivo y viceversa (Vargas-Suárez et al. 2021). Sin embargo, para las comunidades BP8 y BP6 no se observó este mismo comportamiento de manera tan clara (Figs. 20 y 21). En otro trabajo nuestro grupo demostró que la bacteria *Alicyclophilus denitrificans* BQ1, aislada del bordo de Xochiaca, degradó un barniz de PS-PU produciendo enzimas con actividad esterasa y uretanasas (extracelular y citoplásmica), que actúan de forma coordinada en un proceso espacial y temporal. En este mecanismo, la esterasa extracelular estuvo activa desde tiempos iniciales de cultivo alcanzando un máximo a las 18 h, tiempo en el que aparece la actividad uretanasas e incrementa su actividad hacia el final del cultivo (48 h). En el citoplasma, esterases y uretanasas presentaron una tendencia similar, pero con niveles de actividad más bajas que las extracelulares (Fuentes-Jaime et al. 2022). En el caso de las comunidades, únicamente BP6 muestra un mecanismo similar en la fracción membranal, en el que la actividad esterasa tiene un máximo a los 5 días (Fig. 20b) y en tiempos posteriores se registra un incremento en la actividad ureasa (Fig. 21d). Sin embargo, en BP8 y el resto de las fracciones de BP6 no se identificaron mecanismos coordinados como el reportado para *A. denitrificans* BQ1 (Fuentes-Jaime et al. 2022).

#### **8.6. Análisis de posibles mecanismos de degradación de los aditivos y el copolímero PE-PU-A identificados en las comunidades BP8 y BP6**

En este trabajo se evaluó la capacidad de las comunidades BP8 y BP6 para degradar un barniz de PE-PU-A denominado comercialmente como PolyLack®. El barniz está compuesto por un grupo de aditivos (IP, NMP, 2-BE, DPGBE, DPGME), y un copolímero de PE-PU-A, haciendo del MM-PL un ambiente nutricionalmente complejo para el crecimiento bacteriano. A pesar de esta característica, las comunidades crecieron empleando el barniz como única fuente de carbono, exhibiendo patrones de crecimiento diáxico (Fig. 6). Además, utilizaron mecanismos como la adhesión celular y cambios en las propiedades surfactantes del medio para promover la interacción microorganismo-sustrato, fenómeno que favorece el proceso degradativo (Figs. 7 y 8). De acuerdo con la literatura, el crecimiento multi-fásico de BP8 y BP6 sería una estrategia de

adaptación en respuesta a las diversas condiciones impuestas por el ambiente multi-nutrientes del MM-PL, donde éstos se consumen a diferentes velocidades dependiendo de su calidad y disponibilidad (Chu & Barnes, 2016; Pacciani-Mori et al. 2020; Wang et al. 2021). Por otro lado, se sabe que hay dos mecanismos principales para el uso multi-fásico de nutrientes, el consumo secuencial y el simultáneo (Perrin et al. 2020; Wang et al. 2021). En el caso de BP8 y BP6, el agotamiento o disminución marcada de aditivos (Fig. 9), junto con la generación de productos de degradación complejos (Figs. 15 a 19) a los primeros días de cultivo, sugieren que estas comunidades utilizan un mecanismo simultáneo o co-utilización de recursos, en donde existe una reprogramación genética flexible para asegurar el uso eficiente de los recursos (Perrin et al. 2020). El consumo simultáneo de nutrientes con comunidades microbianas es una estrategia común en ambientes naturales en donde existen mezclas complejas de compuestos químicos, y ha sido ampliamente estudiada como mecanismo para degradación o biorremediación de pesticidas, herbicidas, petróleo, antibióticos y colorantes, entre otros (Abraham et al. 2014; Saghee et al. 2018; Hammershøj et al. 2019; Cao et al. 2022). Después de confirmar que BP8 y BP6 degradan Polylock® utilizándolo como fuente de carbono (Fig. 6), se realizó un análisis exhaustivo de sus cambios físico-químicos, así como la cuantificación de algunas actividades enzimáticas. A partir de los diferentes resultados y con base en la estructura química del copolímero, se propone que las dos comunidades emplean metabolismos hidrolíticos y oxidativos que les permitan romper los diferentes grupos funcionales de los compuestos presentes en el barniz.

### **8.6.1 Metabolismo hidrolítico**

Los poliuretanos son polímeros altamente versátiles debido a su riqueza estructural, la cual influencia el proceso de biodegradación. Por ejemplo, se ha encontrado que los poliuretanos basados en poliéster dioles, son más susceptibles a ataques microbianos que aquellos basados en poliéter dioles. También se ha sugerido que la longitud de las cadenas, flexibilidad y proximidad de enlaces uretano interfieren con la accesibilidad de las enzimas al polímero (Cregut et al. 2013; Magnin et al. 2019). En el caso del copolímero de PE-PU-A, se identificó que está compuesto por enlaces éster, éter, uretano, así como por anillos aromáticos y cadenas alifáticas (Figs. 10 y 19), que se encuentran formando parte de cadenas poliméricas con  $M_n$  de 101,896 g/mol y  $M_w$  de 208,490 g/mol (Tabla 6).

Debido a la presencia de enlaces éster y uretano en su estructura los PU son susceptibles a hidrólisis enzimática. Se ha propuesto que esterasas y C-N hidrolasas extracelulares y de

membrana inician los mecanismos de degradación, rompiendo los grupos correspondientes y produciendo compuestos de menor peso molecular, que funcionan como sustratos para procesos microbianos posteriores (Shah et al. 2013; Kemoná & Piotrowska, 2020; Skleničková et al. 2020). La actividad de esterasas y C-N hidrolasas también han sido detectadas en el citoplasma durante la degradación de PU (Fuentes-Jaime et al. 2022), lo que sugiere que estas actividades enzimáticas también son necesarias intracelularmente para terminar de degradar las moléculas liberadas de los primeros ataques al polímero y que ya han entrado a las células. Los resultados de este trabajo evidenciaron que tanto BP8 como BP6 producen esterasas, ureasas y uretanasas, en membrana, citoplasma y extracelulares (Figs. 20 y 21), que podrían ser responsables del rompimiento inicial en los ésteres y uretanos, disminuyendo el peso molecular del PE-PU-A (Tabla 6). Los rompimientos de estos enlaces se identificaron mediante modificaciones en los espectros e índices de cambio de los FT-IR (Figs. 11 y 12, señales a 1,730, 1,550 y 1,230  $\text{cm}^{-1}$ ; tabla 4) y por las disminuciones de área en los termogramas diferenciales (Fig. 13 y tabla 5, etapas II y III). Además, los alcoholes y ácidos orgánicos del MM-PL detectados a lo largo del cultivo (Figs. 16 y 18, compuestos 7, 8, 27-29 en BP8 y 7, 25, 26 en BP6), corresponden al tipo de compuestos esperados tras el rompimiento enzimático de los ésteres (Shah et al. 2013; Gamerith et al. 2016; Magnin et al. 2019). En el caso del uretano, su rompimiento genera moléculas nitrogenadas, alcoholes y  $\text{CO}_2$  (Figs. 16, 18 y 19, compuestos 7, 8, 11-14, 27-29 en BP8 y 7, 11, 25, 26 en BP6). Por otro lado, la presencia de diferentes cantidades de grupos éster en los productos de degradación (Figs. 16 y 18) plantea dos aspectos relevantes: a) que debe existir un grupo de enzimas extracelulares con capacidad de romper enlaces C-C en el copolímero y generar ésteres de bajo peso molecular, y b) que el metabolismo hidrolítico de las comunidades no solo actúa sobre la cadena del copolímero, sino que también sobre los productos de degradación.

La propuesta del metabolismo hidrolítico de BP8 se complementa con los resultados del análisis metagenómico, el cual reveló que en los genomas de *Parapedobacter* sp. BP8.3, *Paracoccus* sp. BP8 y *Microbacteriaceae* bacterium BP8.4, existen secuencias de genes con identidad (>30%) y similitud (>43%) a poliuretano esterasas, aril amidasas y amidasas, previamente reportadas para microorganismos como *Delftia acidovorans*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Paracoccus huijuniae* y *Ochrobactrum* sp. (Tabla 4 en Gaytán et al. 2020). Algunos de los microorganismos que integran a la comunidad BP6, tales como *Alicyclophilus denitrificans*, *Chryseobacterium* sp. y *Achromobacter insolitus* contienen genes que codifican para hidrolasas de ésteres carboxílicos, cutinasas-like, amidasas, ureasas, entre otras, que podrían ser responsables de la degradación del PE-PU-A (Oosterkamp et al. 2013; Morohoshi et al. 2014;

Vandamme et al. 2016; Mohapatra, 2018). Recientemente, nuestro grupo demostró que la bacteria *Alicyclophilus denitrificans* BQ1, produce enzimas que degradan ésteres y uretanos en el barniz comercial de poliéster-PU Impranil. De forma interesante, en esta bacteria la degradación de ésteres y uretanos ocurre vía una coordinación espacial y temporal entre ureasas y uretanasas extracelulares y de citoplasma. Es decir, que en los cultivos existe un periodo (tiempos iniciales de cultivo) en el que las esterasas extracelulares y citoplásmicas son las más activas, pero después de un máximo, la actividad de las uretanasas es la que predomina (tiempos finales) (Fuentes-Jaime et al. 2022). Finalmente, *Paracoccus* y *Ochrobactrum*, son otros géneros identificados en BP6 que también fueron identificados en BP8. Ambas bacterias, poseen genes codificantes para esterasas, poliuretano esterasas, amidasas y aril amidasas (Tabla 4 en Gaytán et al. 2020).

### 8.6.2 Metabolismo oxidativo

Aunque se han identificado oxidorreductasas como oxidasas, oxigenasas y peroxidasas, como enzimas potencialmente efectivas en la degradación de estructuras poliméricas rígidas, como el polietileno (Restrepo-Flórez et al. 2014; Jeon & Kim, 2015; Zhang et al. 2022), la efectividad y mecanismos de acción de éstas sobre el PU han sido poco explorados (Santerre et al. 1994; Ignant et al. 2011). Hasta ahora, se ha demostrado que algunas oxidasas fúngicas como peroxidasas y lacasas de *Aspergillus* sp., oxidan un polietileno adipato uretano combinado con bajas cantidades de lignina (<10%), mejoran las características físico-químicas del polímero y favorecen su biodegradación (Ignant et al. 2011). También, se sabe que enzimas comerciales como la peroxidasa de rábano, no lograron la degradación de poliéster PU o PE-PU (Santerre et al. 1994). En este contexto, el presente trabajo generó evidencias que proponen un metabolismo oxidativo como parte de los mecanismos de degradación que utilizan las comunidades BP8 y BP6. Se observó que ambas comunidades rompen los anillos aromáticos y cadenas alifáticas que componen al PE-PU-A (Figs. 11 y 12; señales a 1,600, 820, 704 y 520  $\text{cm}^{-1}$ ; tabla 4). También, se identificaron moléculas con estructura aromática y alifática en los productos de degradación, cuyas variaciones en cantidad durante el desarrollo del cultivo, sugiere que se oxidan (Figs. 16, 18 y 19).

El TDI y el MDI se detectaron como parte de los aromáticos producidos por ambas comunidades (Figs. 16 y 18). Sin embargo, estas moléculas son inestables en agua y es más probable que se trate de compuestos relacionados, como el 2,4-diamino tolueno (TDA) y la 4,4'-metileno dianilina (MDA), reportados como productos de hidrólisis biológica del uretano en PUs

aromáticos (Akutsu-Shigeno et al. 2006; Gamerith et al. 2017; Magnin et al. 2019; Espinosa et al. 2020; Utomo et al. 2020). Recientemente se propuso, mediante análisis genómico, una ruta de degradación preliminar para el TDA, donde su grupo metilo es oxidado, decarboxilado y deaminado para formar 4-amino-catecol, que puede transformarse en 5-amino-2-hidroxil ácido mucónico y posteriormente degradado a través de una ruta metabólica similar a la del ácido catecuico (Espinosa et al. 2020). Por otro lado, la actividad de enzimas oxidativas sobre enlaces C-C adyacentes a los aromáticos del PE-PU-A, podría resultar en derivados con grupos hidroxilo, aldehído o ácidos orgánicos en su estructura, como las moléculas 7-10 y 7-9 de BP8 y PB6, respectivamente (Figs. 16, 18 y 19). En cualquier caso, el catabolismo de aromáticos, observado por la disminución en área de los picos de estos compuestos, implica la participación de monooxigenasas y dioxigenasas que actúan desestabilizando el anillo al introducir grupos hidroxilo para posteriormente producir ácidos carboxílicos (Ladino-Orzuela et al. 2016). El análisis metagenómico de BP8 reveló genes que codifican enzimas requeridas en el metabolismo del benzoato (Tabla 3 en Gaytán et al. 2020), sustentando su capacidad para romper anillos aromáticos. En BP6 algunos de los géneros de microorganismos que la integran están ligados a la degradación de xenobióticos aromáticos, señalando su potencial para catabolizar este tipo de moléculas en el PE-PU-A y productos de degradación. Entre estos microorganismos se encuentra *Hydrogenophaga* que mineraliza completamente al 3-metildifenil éter, compuesto usado en la síntesis de insecticidas (Yang et al. 2016); *Achromobacter xylosoxidans*, reportado como degradador de bisfenol A, usado como plastificante en la manufactura de numerosos productos como empaques plásticos y barnices (Zhang et al. 2007), y *Ochrobactrum anthropi*, que ha demostrado degradación efectiva de varios hidrocarburos aromáticos (Ramasamy et al. 2014).

Las cadenas alifáticas identificadas en los compuestos de degradación tienen una longitud de 7-14 C y podrían derivarse de cortes C-C en la zona acrílica del PE-PU-A (Fig. 19). Como se observa, en los productos de ambas comunidades existen alcanos y alquenos, siendo BP6 la comunidad que acumula mayor cantidad de estas moléculas (Fig. 18). Los alcanos podrían metabolizarse por alcano 1-monooxigenasas, alcohol deshidrogenasas y aldehído deshidrogenasas vía oxidación terminal o subterminal, generando compuestos que pueden ser dirigidos a la  $\beta$ -oxidación. Una oxidación terminal resultaría en alcoholes primarios, que serían transformados en aldehídos, ácidos carboxílicos y acil-CoA, mientras que una oxidación subterminal, daría lugar a alcoholes secundarios generando cetonas, ésteres y ácidos orgánicos (Rojo, 2009; Abbasian et al. 2015). De acuerdo con la gran cantidad de ésteres identificados en los productos de degradación (Figs. 16 y 18), la oxidación sub-terminal podría ser la ruta más

representada para el metabolismo de alifáticos en BP8 y BP6. Actualmente se sabe que las enzimas involucradas en la degradación de cadenas de 7-17 C, son citocromo P450 oxidasas y AlkB monooxigenasas. Por otro lado, los hidrocarburos con cadenas más largas (>18 C) son catabolizados por AlkB y AlmA hidroxilasas (Rojo et al. 2009; Austin et al. 2011; Wang & Shao, 2013; Muriel-Millán et al. 2019). Por esta razón, es posible asumir que los productos de degradación del PE-PU-A tipo alcanos (7-14 C), podrían ser catabolizados por el mismo sistema enzimático. En el metagenoma de BP8 se detectó que *Chryseobacterium* y *Parapedobacter* contienen genes que codifican enzimas complementarias en la oxidación de alcanos, tales como la alcano 1-monooxigenasa, monooxigenasa para alcanos de cadena larga, alcohol y aldehído deshidrogenasas. Además, están codificados todos los genes para las enzimas de la  $\beta$ -oxidación. En BP6, varios de los microorganismos que la componen se han identificado como parte de grupos microbianos degradadores de *n*-alcanos. Por ejemplo, *Sphingobacterium anhuiense* y *Microbacterium oxidans*, son miembros de comunidades distintas (provenientes del Antártico), con las que se demostró que existe preferencia por alcanos de diferentes átomos de carbono, y que esta preferencia determina la estructura de la comunidad (Kuc et al. 2019). Finalmente, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* y *Achromobacter*, forman parte de una población bacteriana (obtenida de un campo petrolero Brasileño), que degrada *n*-alcanos de 13-32 C en 60 días bajo condiciones aerobias (da Cruz et al. 2011).

Para la degradación de alquenos, el mecanismo común en bacterias consiste en la inserción de un átomo de oxígeno en el doble enlace, vía monooxigenasas (alqueno monooxigenasas  $O_2$ -/NADH-dependientes, monooxigenasas con centro activo de flavina) o vía el sistema P450, rindiendo una molécula de epóxido. Después de esto, los microorganismos utilizan óxido hidrolasas, glutatión S-transferasas, carboxilasas o isomerasas para convertir los epóxidos en alcoholes,  $\beta$ -cetoácidos, cetonas o aldehídos (Abbasian et al. 2015), que se pueden metabolizar mediante  $\beta$ -oxidación. En BP8, no se exploró el metabolismo de alquenos en el metagenoma, pero se detectaron monooxigenasas asociadas a la degradación de alifáticos (Tabla 3 en Gaytán et al. 2020). De acuerdo con la base de datos KEGG, algunos de los microorganismos identificados en BP6, como *Achromobacter insolitus*, *Achromobacter xyloxidans*, *Sphingobacterium sp.* y *Achromobacter denitrificans*, poseen genes que codifican enzimas tipo citocromo P450 relacionadas al metabolismo de xenobióticos. Sin embargo, no se reporta algún gen particularmente relacionado a monooxigenasas degradadoras de alquenos.



### 8.6.3 Metabolismo de éteres

La recalcitrancia del éter se atribuye a su alta energía de disociación (360 kJ/mol) y a que su rompimiento es un proceso poco eficiente, porque demanda una apreciable inversión de energía a cambio de bajos rendimientos de carbono (White et al. 1996; Kim & Engesser, 2004; Kim & Engesser, 2005). Así, la presencia de enlaces éter en una estructura química es proporcional a bajos niveles de mineralización biológica. No obstante, se han identificado microorganismos como *Erwinia* sp., *Sphingomonas paucimobilis*, *Rhodococcus* sp. y diferentes especies de *Pseudomonas* que son capaces de asimilar compuestos con éter, como el polietilen glicol (PEG), polipropilen glicoles, alcohol/alquil fenol etoxilatos, etc. (White et al. 1996; Picart et al. 2015; Wang et al. 2015). Para romper el éter, estos microorganismos recurren a mecanismos bioquímicos que incluyen la inserción de oxígeno, dealquilaciones, reducciones e hidrólisis que generalmente producen un hemiacetal, el cual se transforma en alcoholes o aldehídos (Fortin et al. 2001; Kawai, 2002). Estos cambios están mediados por enzimas como mono/di-oxigenasas, citocromo P-450, peroxidasas y liasas (White et al. 1996; Kim & Engesser, 2005; Picart et al. 2015; Paulo et al. 2017; Aoyagi et al. 2018).

El metabolismo de éteres en PU es un tema que ha sido poco explorado. Aunque actualmente se sabe que microorganismos como el hongo *Alternaria* sp. y enzimas comerciales como la colesterol esterasa degradan PE-PU (Christenson et al. 2006; Matsumiya et al. 2010), en los trabajos correspondientes no se proporcionó evidencia del rompimiento del éter. Considerando esta falta de información, los resultados de este trabajo demuestran que las comunidades BP8 y BP6 son fuentes potenciales de enzimas para el catabolismo del éter. De acuerdo con la composición y estructura del barniz PolyLack<sup>®</sup>, los éteres se encuentran como parte de sus aditivos (2-BE, DPGBE, DPGME) y también en el copolímero, específicamente en la zona del polioliol reaccionado (PPG) (Figs. 10 y 19). En concordancia, se observaron compuestos éter como productos de la degradación de las comunidades (Figs. 16 y 18). Para los aditivos, las comunidades lograron su degradación parcial (BP8) o total (BP6) antes de 5 días (Fig. 9), mientras que el rompimiento del éter en el copolímero y sus productos de degradación se reveló por las reducciones en intensidad de señales FT-IR (Figs. 11 y 12, señales a 1,049, 970-980 cm<sup>-1</sup>, Tabla 4) y en las áreas de los termogramas (Fig. 13, Tabla 5, etapa IV).

Para los DPGs, en BP8 se encontraron genes homólogos a enzimas que participan en la degradación de PEG (Ohta et al. 2006; Tani et al. 2007) y diversas enzimas que podrían atacar enlaces éter, tales como alcohol y aldehído deshidrogenasas, peroxidasas, monooxigenasas y superóxido dismutasas. A partir de estos genes, se propusieron rutas catabólicas para el 2-BE,

GPGBE y DPGME que plantean oxidaciones subsecuentes de los grupos hidroxilo terminales de estos compuestos, seguidas de una escisión del enlace éter, resultando en intermediarios como el glioxilato, butiraldehído, propilen glicol y formaldehído, para los cuales BP8 posee el potencial genético que permite su metabolismo (Fig. 8B en Gaytán et al. 2020). Los genes identificados para el catabolismo de DPG, también podrían tener un papel fundamental en el rompimiento del éter del copolímero y en los productos de degradación tipo éter. BP6 contiene algunas bacterias para las que se ha reportado la propiedad funcional de romper este enlace, como *Hydrogenophaga* que degradó 2-BE, produciendo glioxilato y *n*-butanol (Woiski et al. 2020). Por su parte, *Cupriavidus* posee el operón *bphA1-A3*, que codifica para un conjunto de dioxigenasas y deshidrogenasas, que permiten a este microorganismo degradar difenil éter en menos de seis días de cultivo en un medio mineral (Wang et al. 2015). Es importante mencionar que 25% de los microorganismos que componen a BP6 son *Rhizobiales*, principalmente de los géneros *Rhizobium* y *Mesorizobium*, los cuales poseen glutatión S-transferasas, enzimas con un papel importante en el rompimiento de enlaces  $\beta$ -O-4- aril éter en la lignina (Jackson et al. 2017). Aunque en los aditivos del PolyLack<sup>®</sup>, no existen  $\beta$ -O-4 aril éteres, no se descarta la participación de este tipo de enzimas en su catabolismo. Finalmente, se sabe que *Paracoccus denitrificans*, *Achromobacter insolitus*, *Achromobacter denitrificans* y *Alicyclophilus denitrificans* producen enzimas con habilidad oxidativa e hidrolítica para romper los enlaces éter (KEGG, 2022). Debido a las diferencias observadas entre BP8 (degradación parcial) y BP6 (degradación completa) para romper el éter de los aditivos, será interesante el análisis comparativo de los genes que codifican enzimas relacionadas con esta actividad y sobre todo, considerar la posibilidad de éter hidrolasas, que hasta hoy no han sido reportadas como participantes en la degradación de PU.

## 9. CONCLUSIONES

1. Los microorganismos que integran a las comunidades BP8 y BP6 producen enzimas que en sinergia o de forma individual, podrían ser utilizadas para la biodegradación de sistemas complejos de xenobióticos, tales como el PolyLack<sup>®</sup>, que además de un copolímero de poliéter-poliuretano-acrílico (PE-PU-A) contiene diversos compuestos recalcitrantes, principalmente de tipo éter.
2. Las comunidades microbianas BP8 y BP6 mostraron un crecimiento diáuxico al cultivarse en un medio mineral con PolyLack como única fuente de carbono. El comportamiento multifásico está relacionado con el metabolismo de los aditivos y el copolímero de PE-PU-A, que de acuerdo con los análisis por GC-MS, podría tratarse de procesos de degradación simultánea, en los que las moléculas simples (aditivos) y complejas (copolímero) se rompen o metabolizan al mismo tiempo.
3. Ambas comunidades poseen actividad degradativa sobre los diferentes grupos funcionales del copolímero, como ésteres y uretanos. Además, degradan éteres y aromáticos, compuestos altamente recalcitrantes.
4. La biodegradación de grupos éter, anillos aromáticos y cadenas alifáticas en PU ha sido poco documentada, sin embargo, en este trabajo se muestran evidencias que revelan que BP8 y BP6 poseen recursos enzimáticos para romperlos. Por ejemplo, BP6 metaboliza 100% de los aditivos de tipo éter, mientras que BP8 únicamente cataboliza el 80% de estos compuestos.
5. Las enzimas degradadoras producidas por las comunidades son capaces de romper tanto los segmentos suaves, como los segmentos duros del copolímero, destacando el rompimiento de estos últimos por ser zonas compactas y de difícil acceso para los microorganismos.
6. Las comunidades BP8 y BP6 generan algunos productos de degradación en común, sugiriendo procesos catabólicos similares entre las comunidades a pesar de las diferencias en su composición microbiana.
7. Algunos productos de degradación del PU generados por la actividad de las comunidades, como propilen glicol butil éter, di-sec-butil éter, sec-butil metil éter, palmitil acetato y metil éster de ácido láurico, que se emplean en la industria de detergentes, petróleo y cosmética, son fuentes potenciales para síntesis de compuestos de segunda generación.
8. Las comunidades despliegan actividades enzimáticas hidrolíticas de tipo esterasa, ureasa y uretanasa, que se encuentran principalmente en membrana y citoplasma. Estas

actividades podrían estar relacionadas con el rompimiento de ésteres y enlaces C-N presentes en el copolímero de PE-PU-A.

9. Los cambios físicos y químicos generados por ambas comunidades sobre el barniz muestran un proceso degradativo dinámico, producto de una amplia versatilidad metabólica, donde sus capacidades hidrolíticas (sobre ésteres y uretanos) y oxidativas (sobre éteres, alifáticos y aromáticos) juegan un papel significativo en la degradación del PE-PU-A y de los aditivos del barniz.
10. A pesar de que ambas comunidades degradan al barniz vía actividades hidrolíticas y oxidativas, existen características diferenciales en el desempeño de los mecanismos de degradación. En este contexto destaca la comunidad BP6 sobre BP8 porque: a) consume una mayor cantidad de carbono del medio, b) degrada grupos éster, uretano y éter en mayor medida, c) es más eficiente rompiendo las cadenas de alto peso molecular de los copolímeros de PE-PU-A y d) sus hidrolasas (esterasa, ureasa, uretanasa), tienen mayor actividad que las de BP8.
11. El desempeño degradativo de BP6 podría estar relacionado con la mayor diversidad de microorganismos que la constituyen, ya que en su metagenoma codifica una mayor robustez metabólica para adaptarse y crecer a partir de los recursos que provee el barniz. Será interesante el análisis comparativo de los metagenomas a fin de identificar las diferencias genéticas/enzimáticas responsables de la degradación parcial (BP8) o total (BP6) de los compuestos con éter y de las otras características superiores de la comunidad BP6.

## 10. PERSPECTIVAS

- Identificar la composición de las comunidades a diferentes tiempos de cultivo para definir la dinámica de poblaciones. Al conocer la composición será posible correlacionar los diferentes cambios químicos con los microorganismos protagonistas de cada tiempo de cultivo y proponer rutas catabólicas sinérgicas.
- Aislar e identificar sub-grupos microbianos derivados de las comunidades BP6 y BP8, partiendo del desempeño degradativo que mostraron estas comunidades en los diferentes tiempos de cultivo. Así, se podrán generar consorcios más eficientes en la degradación específica de ciertos compuestos, como aquellos que contienen éter, aromáticos o PU de alto peso molecular.
- Caracterizar el proceso degradativo de los consorcios desarrollados a partir de la combinación de microorganismos aislados de las comunidades BP6 y BP8, para evaluar, mediante análisis físico-químicos y microbiológicos, su eficiencia de degradación.
- Analizar los productos de degradación presentes en los sobrenadantes con técnicas cromatográficas que permitan detectar compuestos de naturaleza polar, como HPLC-MS, con el fin de indagar más en el proceso y rutas degradativas llevadas a cabo por los microorganismos de las comunidades.
- Analizar la actividad enzimática oxidativa en ambas comunidades, durante su crecimiento en el barniz PolyLack®.
- Analizar comparativamente los metagenomas de BP8 y BP6 a fin de identificar similitudes, pero, sobre todo, diferencias que hacen de BP6 una comunidad más apta para catabolizar a los grupos más recalcitrantes del PU.

## 11. REFERENCIAS

- Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., Naidu, R. (2015). A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176 (3), 670–699. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1603-5>
- Abraham, J., Silambarasan, S., Logeswari, P. (2014). Simultaneous degradation of organophosphorus and organochlorine pesticides by bacterial consortium. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(5), 2590–2596. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2014.06.014>
- Akindoyo, J. O., Beg, M. D. H., Ghazali, S., Islam, M. R., Jeyaratnam, N., Yuvaraj, A. R. (2016). Polyurethane types, synthesis and applications-a review. *RSC Advances*, 6 (115), 114453–114482. <https://doi.org/10.1039/c6ra14525f>
- Akutsu-Shigeno, Y., Adachi, Y., Yamada, C., Toyoshima, K., Nomura, N., Uchiyama, H., Nakajima-Kambe, T. (2006). Isolation of a bacterium that degrades urethane compounds and characterization of its urethane hydrolase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(4), 422–429. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0071-1>
- Akutsu, Y., Nakajima-Kambe, T., Nomura, N. (1998). Purification and properties of a polyester polyurethane-degrading enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1), 62–67. doi: 10.1128/aem.64.1.62-67.1998
- Almond, J., Sugumaar, P., Wenzel, M. N., Hill, G., Wallis, C. (2020). Determination of the carbonyl index of polyethylene and polypropylene using specified area under band methodology with ATR-FTIR spectroscopy. *E-Polymers*, 20(1), 369–381. <https://doi.org/10.1515/epoly-2020-0041>
- Álvarez-Barragán, J., Domínguez-Malfavón, L., Vargas-Suárez, M., González-Hernández, R., Aguilar-Orsorio, G., Loza-Tavera, H. (2016). Biodegradative activities of selected environmental fungi on a polyester polyurethane varnish and polyether polyurethane foams. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(17), 5225–5235. <https://doi.org/10.1128/AEM.01344-16>
- Amobonye, A., Bhagwat, P., Singh, S., Pillai, S. (2021). Plastic biodegradation: Frontline microbes and their enzymes. *Science of the Total Environment*, 759. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143536>
- Aoyagi, T., Morishita, F., Sugiyama, Y., Ichikawa, D., Mayumi, D., Kikuchi, Y., Ogata, A., Muraoka, K., Habe, H., Hori, T. (2018). Identification of active and taxonomically diverse 1,4-dioxane degraders in a full-scale activated sludge system by high-sensitivity stable isotope probing. *ISME Journal*, 12(10), 2376–2388. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0201-2>
- AS 4736-2006. Australian standard for biodegradable plastic-biodegradable plastics suitable for composting and other microbial treatment.
- ASTM D6400 American standard for compostable product test composting. Standard specification for solid material biodegradation required for labeling of plastics designed to aerobically composted in municipal or industrial facilities.
- Austin, R. N., Groves, J. T. (2011). Alkane-oxidizing metalloenzymes in the carbon cycle. *Metallomics*, 3(8), 775–787. <https://doi.org/10.1039/c1mt00048a>
- Barratt, S. R., Ennos, A. R., Greenhalgh, M., Robson, G. D., Handley, P. S. (2003). Fungi are the predominant microorganisms responsible for degradation of soil-buried polyester polyurethane over a range of soil water holding capacities. *Journal of Applied Microbiology*, 95(1), 78–85. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.01961.x
- Brandt, B. W., Kelpi, F. D., van Leeuwen, I. M., Kooijman, S. A. (2004). Modelling microbial adaptation to changing availability of substrates. *Water research*, 38(4), 1003–1013. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.09.037>
- Brenner, K., You, L., Arnold, F. H. (2008). Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology*, 26(9), 483–489. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.05.004>
- Burelo, M., Gaytán, I., Loza-Tavera, H., Cruz-Morales, J. A., Zárate-Saldaña, D., Cruz-Gómez, M. J., Gutiérrez, S. (2022). Synthesis, characterization and biodegradation studies of polyurethanes: Effect of unsaturation on biodegradability. *Chemosphere*, 136136. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136136>
- Burton, J. N., Liachko, I., Dunham, M. J., Shendure, J. (2014). Species-level deconvolution of metagenome assemblies with Hi-C-based contact probability maps. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(7), 1339–1346. <https://doi.org/10.1534/g3.114.011825>
- Cai, S., Cai, T., Liu, S., Yang, Q., He, J., Chen, L., Hu, J. (2014). Biodegradation of N-Methylpyrrolidone by *Paracoccus* sp. NMD-4 and its degradation pathway. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 93, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.04.022>
- Cakić, S. M., Ristić, I. S., Ristić, O. Z. (2012). Thermal Analysis of Polyurethane Dispersions Based on Different Polyols. In F. Zafar, E. Sharmin (Eds.), *Polyurethane*. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/35800>
- Campiñez, M. D., Aguilar-De-Leyva, Á., Ferris, C., de Paz, M. V., Galbis, J. A., Caraballo, I. (2013). Study of the properties of the new biodegradable polyurethane PU (TEG-HMDI) as matrix forming excipient for controlled drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39(11), 1758–1764. <https://doi.org/10.3109/03639045.2012.736516>
- Cangemi, J., Neto, S., Chiertice, G., Dos Santos A. (2006). Biodegradation of a polymer derived from castor oil. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 16(2), 129–135. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282006000200013>

- Capitain, C., Ross-Jones, J., Möhring, S., Tippkötter, N. (2020). Differential scanning calorimetry for quantification of polymer biodegradability in compost. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 149. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.104914>
- Cao, Z., Yan, W., Ding, M., & Yuan, Y. (2022). Construction of microbial consortia for microbial degradation of complex compounds. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1051233>
- Carbonell, P.B. (2013). Adhesivos de poliuretano termoplástico potencialmente biodegradables obtenidos con derivados de productos naturales. Tesis de Doctorado en Ciencias de Materiales. Universidad de Alicante, España.
- Che, S., Men, Y. (2019). Synthetic microbial consortia for biosynthesis and biodegradation: promises and challenges. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46(9–10), 1343–1358. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02211-4>
- Christenson, E. M., Patel, S., Anderson, J. M., Hiltner, A. (2006). Enzymatic degradation of poly(ether urethane) and poly(carbonate urethane) by cholesterol esterase. *Biomaterials*, 27(21), 3920–3926. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.012>
- Chu, D., Barnes, D. J. (2016). The lag-phase during diauxic growth is a trade-off between fast adaptation and high growth rate. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep25191>
- Cipriani, E., Bracco, P., Kurtz, S. M., Costa, L., Zanetti, M. (2013). *In-vivo* degradation of poly(carbonate-urethane) based spine implants. *Polymer Degradation and Stability*, 98(6), 1225–1235. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2013.03.005>
- Cosgrove, L., McGeechan, P. L., Robson, G. D., Handley, P. S. (2007). Fungal communities associated with degradation of polyester polyurethane in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(18), 5817–5824. <https://doi.org/10.1128/AEM.01083-07>
- Cooper, D.G., Goldenberg, B.G. (1987). Surface-active agents from two bacillus species. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 224–229.
- Cregut, M., Bedas, M., Durand, M. J., Thouand, G. (2013). New insights into polyurethane biodegradation and realistic prospects for the development of a sustainable waste recycling process. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1634–1647. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.011>
- da Cruz, G. F., de Vasconcellos, S. P., Angolini, C. F. F., Dellagnezze, B. M., Garcia, I. N. S., de Oliveira, V. M., dos Santos Neto, E. v., Marsaioli, A. J. (2011). Could petroleum biodegradation be a joint achievement of aerobic and anaerobic microorganisms in deep sea reservoirs?. *AMB Express*, 1(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-47>
- Delebecq, E., Pascault, J. P., Boutevin, B., Ganachaud, F. (2013). On the versatility of urethane/urea bonds: Reversibility, blocked isocyanate, and non-isocyanate polyurethane. *Chemical Reviews*, 113 (1), 80–118. <https://doi.org/10.1021/cr300195n>
- EN 13432 European Norm. Requirements for packaging recoverable through composting and biodegradation. Test scheme and evaluation criteria for the final acceptance of packaging.
- Espinosa, M. J. C., Blanco, A. C., Schmidgall, T., Atanasoff-Kardjalieff, A. K., Kappelmeyer, U., Tischler, D., Pieper, D. H., Heipieper, H. J., Eberlein, C. (2020). Toward Biorecycling: Isolation of a soil bacterium that grows on a polyurethane oligomer and monomer. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00404>
- Faccia, P. A., Pardini, F. M., Agnello, A. C., Amalvy, J. I., del Panno, M. T. (2021). Degradability of poly(ether-urethanes) and poly(ether-urethane)acrylic hybrids by bacterial consortia of soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 160, 105205. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105205>
- Fernandes, I. P., Barbosa, M., Amaral, J. S., Pinto, V., Rodrigues, J. L., Ferreira, M. J., Barreiro, M. F. (2016). Biobased additives as biodegradability enhancers with application in TPU-based footwear components. *Journal of Renewable Materials*, 4(1), 47–56. <https://doi.org/10.7569/JRM.2015.634126>
- Fortin, N. Y., Morales, M., Nakagawa, Y., Focht, D. D., Deshusses, M. A. (2001). Methyl tert-butyl ether (MTBE) degradation by a microbial consortium. *Environmental Microbiology*, 3(6), 407–416. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00206.x>
- Frère, L., Paul-Pont, I., Moreau, J., Soudant, P., Lambert, C., Huvet, A., Rinnert, E. (2016). A semi-automated Raman micro-spectroscopy method for morphological and chemical characterizations of microplastic litter. *Mar. Pollut. Bull.* 113 (1–2), 461–468. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.051>
- Fuentes-Jaime J, Vargas-Suárez M, Cruz-Gómez MJ, Loza-Tavera H. Concerted action of extracellular and cytoplasmic esterase and urethane-cleaving activities during Impranil biodegradation by *Alicyclophilus denitrificans* BQ1. *Biodegradation*. 2022 Aug;33(4):389-406. doi: 10.1007/s10532-022-09989-8. Epub 2022 May 28. PMID: 35633408.
- Gamerith, C., Herrero Acero, E., Pellis, A., Ortner, A., Vielnascher, R., Luschnig, D., Zartl, B., Haernvall, K., Zitzenbacher, S., Strohmeier, G., Hoff, O., Steinkellner, G., Gruber, K., Ribitsch, D., Guebitz, G. M. (2016). Improving enzymatic polyurethane hydrolysis by tuning enzyme sorption. *Polymer Degradation and Stability*, 132, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.02.025>
- Gaytán, I., Burelo, M. Loza-Tavera, H. (2021). Current status on the biodegradability of acrylic polymers: microorganisms, enzymes and metabolic pathways involved. *Appl Microbiol Biotechnol*, 105, 991–1006. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11073-1>

- Gaytán, I., Sánchez-Reyes, A., Burelo, M., Vargas-Suárez, M., Liachko, I., Press, M., Sullivan, S., Cruz-Gómez, M. J., Loza-Taver, H. (2020). Degradation of recalcitrant polyurethane and xenobiotic additives by a selected landfill microbial community and its biodegradative potential revealed by proximity ligation-based metagenomic analysis. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02986>
- Geng, Y., Deng, Y., Chen, F., Jin, H., Tao, K., Hou, T. (2015). Biodegradation of isopropanol by a solvent-tolerant *Paracoccus denitrificans* strain. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45(5), 491–499. <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.923452HA>
- Gianfreda, L., Rao, M. A. (2004). Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(4), 339–354. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.05.006>
- Gite, V. v., Mahulikar, P. P., Hundiware, D. G. (2010). Preparation and properties of polyurethane coatings based on acrylic polyols and trimer of isophorone diisocyanate. *Progress in Organic Coatings*, 68(4), 307–312. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2010.03.008>
- Gómez, E. F., Luo, X., Li, C., Michel, F. C., Li, Y. (2014). Biodegradability of crude glycerol-based polyurethane foams during composting, anaerobic digestion and soil incubation. *Polymer Degradation and Stability*, 102(1), 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.01.008>
- Hammershøj, R., Birch, H., Redman, A. D., Mayer, P. (2019). Mixture effects on biodegradation kinetics of hydrocarbons in surface water: Increasing concentrations inhibited degradation whereas multiple substrates did not. *Environmental science & technology*, 53(6), 3087–3094. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00638>
- Hatzakis, E. (2018). Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy in Food Science: A comprehensive review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 18 1, 189–220. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12408>
- Hernández-Sampelayo, A. R., Navarro, R., Marcos-Fernández, Á. (2021). Preparation of high molecular weight poly(Urethane-urea)s bearing deactivated diamines. *Polymers*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/polym13121914>
- Ignat, L., Ignat, M., Ciobanu, C., Doroftei, F., Popa, V. I. (2011). Effects of flax lignin addition on enzymatic oxidation of poly(ethylene adipate) urethanes. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 1017–1028. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.03.010>
- Jackson, C. A., Couger, M. B., Prabhakaran, M., Ramachandriya, K. D., Canaan, P., Fathepure, B. Z. (2017). Isolation and characterization of Rhizobium sp. strain YS-1r that degrades lignin in plant biomass. *Journal of Applied Microbiology*, 122(4), 940–952. <https://doi.org/10.1111/jam.13401>
- Jaishankar, J., Srivastava, P. (2017). Molecular basis of stationary phase survival and applications. *Frontiers in Microbiology*, 8(2000). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02000>
- Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., Law, K. L. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347(6223), 768–771. <https://doi.org/10.1126/science.1260352>
- Janik, H., Sienkiewicz, M., Kucinska-Lipka, J. (2014). Polyurethanes. In *Handbook of Thermoset Plastics* (pp. 253–295). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3107-7.00009-9>
- Jansen, B., Schumacher-Perdreau, F., Peters, G., Pulverer, G. (1991). Evidence for degradation of synthetic polyurethanes by *Staphylococcus epidermidis*. *Zentralblatt Fur Bakteriologie*, 276(1), 36–45. [https://doi.org/10.1016/S0934-8840\(11\)80216-1](https://doi.org/10.1016/S0934-8840(11)80216-1)
- 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 and Biodegradation*, 103, 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.04.024>
- Jung, M.R., Horgen, F.D., Orski, S.V., Rodriguez C, V., Beers, K.L., Balazs, G.H., Jones, T.T., Work, T.M., Brignac, K.C., Royer, S., Hyrenbach, K.D., Jensen, B.A., Lynch, J.M. (2018). Validation of ATR FT-IR to identify polymers of plastic marine debris, including those ingested by marine organisms. *Marine pollution bulletin*, 127, 704–716. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.12.061>
- Kato, S., Haruta, S., Cui, Z. J., Ishii, M., Igarashi, Y. (2008). Network relationships of bacteria in a stable mixed culture. *Microbial Ecology*, 56(3), 403–411. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9357-4>
- Kawai, F. (2002). Microbial degradation of polyethers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(1), 30–38. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0850-2>
- Kay, M. J., McCabe, R. W., Morton, L. H. G. (1993). Chemical and physical changes occurring in polyester polyurethane during biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 31(3), 209–225. [https://doi.org/10.1016/0964-8305\(93\)90006-N](https://doi.org/10.1016/0964-8305(93)90006-N)
- Kay, M. J., Morton, L. H. G., Prince, E. L. (1991). Bacterial degradation of polyester polyurethane. *International Biodeterioration*, 27(2), 205–222. [https://doi.org/10.1016/0265-3036\(91\)90012-G](https://doi.org/10.1016/0265-3036(91)90012-G)
- Kemona, A., Piotrowska, M. (2020). Polyurethane recycling and disposal: Methods and prospects. *Polymers*, 12(8), 1752. <https://doi.org/10.3390/POLYM12081752>
- Kim, Y. D., Kim, S. C. (1998). Effect of chemical structure on the biodegradation of polyurethanes under composting conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 62(2), 343–352. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(98\)00017-2](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(98)00017-2)
- Kim, Y. H., Engesser, K. H. (2004). Degradation of alkyl ethers, aralkyl ethers, and dibenzyl ether by *Rhodococcus* sp. strain DEE5151, isolated from diethyl ether-containing enrichment cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4398–4401. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4398-4401.2004>



- Kim, Y. H., Engesser, K. H. (2005). Inhibition of diethyl ether degradation in *Rhodococcus* sp. strain DEE5151 by glutaraldehyde and ethyl vinyl ether. *FEMS Microbiology Letters*, 243(2), 317–322. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.12.018>
- Konopka, A. (2009). What is microbial community ecology. *ISME Journal*, 3(11), 1223–1230. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.88>
- Krasowska, K., Janik, H., Gradys, A., Rutkowska, M. (2012). Degradation of polyurethanes in compost under natural conditions. *Journal of Applied Polymer Science*, 125(6), 4252–4260. <https://doi.org/10.1002/app.36597>
- Kruger, N. J. (2009). The Bradford method for protein quantitation. *The protein protocols handbook*, 17–24.
- Kuc, V., Vázquez, S., Hernández, E., Martínez-Alvarez, L., Villalba Primitz, J., mac Cormack, W. P., Ruberto, L. (2019). Hydrocarbon-contaminated Antarctic soil: changes in bacterial community structure during the progress of enrichment cultures with different n-alkanes as substrate. *Polar Biology*, 42(6), 1157–1166. <https://doi.org/10.1007/s00300-019-02508-1>
- Labow, R. S., Meek, E., Santerre, J. P. (1999). The biodegradation of poly(urethane)s by the esterolytic activity of serine proteases and oxidative enzyme systems. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 10(7), 699–713. <https://doi.org/10.1163/156856299X00595>
- Ladino-Orjuela, G., Gomes, E., da Silva, R., Salt, C., Parsons, J. R. (2016). Metabolic pathways for degradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 237, 105–121. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-23573-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-23573-8_5)
- Laurichesse, S., Huillet, C., Avérous, L. (2014). Original polyols based on organosolv lignin and fatty acids: New bio-based building blocks for segmented polyurethane synthesis. *Green Chemistry*, 16(8), 3958–3970. <https://doi.org/10.1039/c4gc00596a>
- Lem, K. W., R. Haw, J., Curran, S., E. Sund, S., Brumlik, C., S. Song, G., S. Lee, D. (2013). Effect of hard segment molecular weight on concentrated solution and bulk properties of ether based thermoplastic polyurethanes. *Nanoscience and Nanoengineering*, 1(1), 71–88. <https://doi.org/10.13189/nn.2013.010110>
- Liu, J., He, J., Xue, R., Xu, B., Qian, X., Xin, F., Blank, L. M., Zhou, J., Wei, R., Dong, W., Jiang, M. (2021). Biodegradation and up-cycling of polyurethanes: Progress, challenges, and prospects. *Biotechnology Advances*, 48, 107730. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107730>
- Lu, P., Zhang, Y., Jia, C., Li, Y., Zhang, M., Mao, Z. (2016). Degradation of polyurethane coating materials from liquefied wheat straw for controlled release fertilizers. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(41). <https://doi.org/10.1002/app.44021>
- Magnin, A., Hoornaert, L., Pollet, E., Laurichesse, S., Phalip, V., Avérous, L. (2019). Isolation and characterization of different promising fungi for biological waste management of polyurethanes. *Microbial Biotechnology*, 12(3), 544–555. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13346>
- Magnin, A., Pollet, E., Perrin, R., Ullmann, C., Persillon, C., Phalip, V., Avérous, L. (2019). Enzymatic recycling of thermoplastic polyurethanes: Synergistic effect of an esterase and an amidase and recovery of building blocks. *Waste Management*, 85, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.12.024>
- Magnin, A., Pollet, E., Phalip, V., Avérous, L. (2020). Evaluation of biological degradation of polyurethanes. *Biotechnology Advances*, 39. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107457>
- Mahajan, N., Gupta, P. (2015). New insights into the microbial degradation of polyurethanes. *RSC Advances*, 5(52), 41839–41854. <https://doi.org/10.1039/c5ra04589d>
- Marchant, R. E., Zhao, Q., Anderson, J. M., Hiltner, A. (1987). Degradation of a poly(ether urethane urea) elastomer: infra-red and XPS studies. *Polymer*, 28(12), 2032–2039. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(87\)90037-1](https://doi.org/10.1016/0032-3861(87)90037-1)
- Mathur, G., Prasad, R. (2012). Degradation of polyurethane by *Aspergillus flavus* (ITCC 6051) isolated from soil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(6), 1595–1602. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9572-4>
- Matsumiya, Y., Murata, N., Tanabe, E., Kubota, K., Kubo, M. (2010). Isolation and characterization of an ether-type polyurethane-degrading micro-organism and analysis of degradation mechanism by *Alternaria* sp. *Journal of Applied Microbiology*, 108(6), 1946–1953. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04600.x>
- Maurya, S. D., Kurmvanshi, S. K., Mohanty, S., Nayak, S. K. (2018). A Review on Acrylate-Terminated Urethane Oligomers and Polymers: Synthesis and Applications. *Polymer - Plastics Technology and Engineering*, 57(7), 625–656. <https://doi.org/10.1080/03602559.2017.1332764>
- Mccarthy, S. J., Meijs, G. F., Mitchell, N., Gunatillake, P. A., Heath, G., Brandwood, A., Schindhelm, K. (1997). *In-vivo* degradation of polyurethanes: transmission-FTIR microscopic characterization of polyurethanes sectioned by cryomicrotomy. *Biomaterials*, 18(21), 1387–1409. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(97\)00083-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(97)00083-5)
- Mikesková, H., Novotný, C., Svobodová, K. (2012). Interspecific interactions in mixed microbial cultures in a biodegradation perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(4), 861–870. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4234-6>
- Mikherji, J., Gosh, I. (2012). Bacterial degradation of high molecular weight polynuclear aromatic hydrocarbons. En Singh, S. N. (Ed). *Microbial Degradation of Xenobiotics*. pp. 189–212. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-23789-8>

- Mohammad, B. T., Wright, P. C., Bustard, M. T. (2006). Bioconversion of isopropanol by a solvent tolerant *Sphingobacterium mizutae* strain. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(12), 975–983. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0143-y>
- Mohapatra, B. R. (2018). Biocatalytic efficacy of immobilized cells of *Chryseobacterium* sp. Alg-SU10 for simultaneous hydrolysis of urethane and urea. *Biocatalysis and Biotransformation*, 36(4), 307–315. <https://doi.org/10.1080/10242422.2018.1445228>
- Morohoshi, T., Wang, W. Z., Someya, N., Ikeda, T. (2014). Complete genome sequence of *Chryseobacterium* sp. strain StRB126, an N-acylhomoserine lactone-degrading bacterium isolated from potato root. *Genome Announcements*, 2(5). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00952-14>
- Mukherjee, K., Tribedi, P., Chowdhury, A., Ray, T., Joardar, A., Giri, S., Sil, A. K. (2011). Isolation of a *Pseudomonas aeruginosa* strain from soil that can degrade polyurethane diol. *Biodegradation*, 22(2), 377–388. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9409-1>
- Muriel-Millán, L. F., Rodríguez-Mejía, J. L., Godoy-Lozano, E. E., Rivera-Gómez, N., Gutierrez-Rios, R. M., Morales-Guzmán, D., ... & Pardo-López, L. (2019). Functional and genomic characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from the southwestern Gulf of Mexico reveals an enhanced adaptation for long-chain alkane degradation. *Frontiers in Marine Science*, 6, 572.
- Nakajima-Kambe T, Shigeno-Akutsu Y, Nomura N, Onuma F, Nakahara T. (1999). Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(2):134-40. doi: 10.1007/s002530051373. PMID: 10091317.
- Nakajima-Kambe, T., Onuma, F., Akutsu, Y., Nakahara, T. (1997). Determination of the Polyester polyurethane breakdown products and distribution of the polyurethane degrading enzyme of *Comamonas acidovorans* Strain TB-35. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83(5). [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)83000-0](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)83000-0)
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(99\)89001-1](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(99)89001-1)
- Obuekwe, C. O., Al-Jadi, Z. K., Al-Saleh, E. S. (2009). Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63(3), 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.10.004>
- Ohta, T., Kawabata, T., Nishikawa, K., Tani, A., Kimbara, K., Kawai, F. (2006). Analysis of amino acid residues involved in catalysis of polyethylene glycol dehydrogenase from *Sphingopyxis terrae*, using three-dimensional molecular modeling-based kinetic characterization of mutants. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 4388–4396. <https://doi.org/10.1128/AEM.02174-05>
- Oosterkamp, M. J., Veuskens, T., Talarico Saia, F., Weelink, S. A. B., Goodwin, L. A., Daligault, H. E., Bruce, D. C., Detter, J. C., Tapia, R., Han, C. S., Land, M. L., Hauser, L. J., Langenhoff, A. A. M., Gerritse, J., van Berkel, W. J. H., Pieper, D. H., Junca, H., Smidt, H., Schraa, G., Stams, A. J. M. (2013). Genome Analysis and Physiological Comparison of *Alicyclophilus denitrificans* Strains BC and K601T. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066971>
- Oprea, S., Doroftei, F. (2011). Biodegradation of polyurethane acrylate with acrylated epoxidized soybean oil blend elastomers by *Chaetomium globosum*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65(3), 533–538. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.09.011>
- Pacciani-Mori, L., Giometto, A., Suweis, S., Maritan, A. (2020). Dynamic metabolic adaptation can promote species coexistence in competitive microbial communities. *PLoS Computational Biology*, 16(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007896>
- Pardini, O. R., Amalvy, J. I. (2008). FTIR, 1H-NMR spectra, and thermal characterization of water-based polyurethane/acrylic hybrids. *Journal of Applied Polymer Science*, 107(2), 1207–1214. <https://doi.org/10.1002/app.27188>
- Pathak, V. M., Navneet. (2017). Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(15). <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0145-9>
- Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M. C., Deka, S. (2016). Development of an efficient bacterial consortium for the potential remediation of hydrocarbons from contaminated sites. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1092. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01092>
- Paulo, A. M. S., Aydin, R., Dimitrov, M. R., Vreeling, H., Cavaleiro, A. J., García-Encina, P. A., Stams, A. J. M., Plugge, C. M. (2017). Sodium lauryl ether sulfate (SLES) degradation by nitrate-reducing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(12), 5163–5173. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8212-x>
- Peng, Y. H., Shih, Y. H., Lai, Y. C., Liu, Y. Z., Liu, Y. T., Lin, N. C. (2014). Degradation of polyurethane by bacterium isolated from soil and assessment of polyurethanolytic activity of a *Pseudomonas putida* strain. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(16), 9529–9537. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2647-8>
- Perrin, E., Ghini, V., Giovannini, M., di Patti, F., Cardazzo, B., Carraro, L., Fagorzi, C., Turano, P., Fani, R., Fondi, M. (2020). Diauxie and co-utilization of carbon sources can coexist during bacterial growth in nutritionally complex environments. *Nature Communications*, 11, 3135. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16872-8>

- Petrović, Z. S. (2008). Polyurethanes from vegetable oils. *Polymer Reviews*, 48(1), 109–155. <https://doi.org/10.1080/15583720701834224>
- Phua, S. K., Castillo, E., Anderson, J. M., Hiltner, A. (1987). Biodegradation of a polyurethane in vitro. *Journal of Biomedical Material Research*, 21(2), 231-246. DOI: 10.1002/jbm.820210207
- Picart, P., de María, P. D., Schallmeyer, A. (2015). From gene to biorefinery: Microbial  $\beta$ -etherases as promising biocatalysts for lignin valorization. *Frontiers in Microbiology*, 6, 916. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00916>
- Pilch-Pitera, B. (2013). Examination of the enzyme resistance of polyurethane powder coatings. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(1), 215–223. <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0519-1>
- PlasticsEurope. (2020). Plastics-the Facts 2020 an analysis of European plastics production, demand and waste data.
- PlasticsEurope. (2021). Plastics-the Facts 2021 an analysis of European plastics production, demand and waste data.
- PlasticsEurope. (2019). Plastics-the Facts 2019 an analysis of European plastics production, demand and waste data.
- Ramasamy, S., Mathiyalagan, P., Chandran, P. (2014). Characterization and optimization of EPS-producing and diesel oil-degrading *Ochrobactrum anthropi* MP3 isolated from refinery wastewater. *Petroleum Science*, 11(3), 439–445. <https://doi.org/10.1007/s12182-014-0359-9>
- Raudino, A., Sarpietro, M.G., Pannuzzo, M. (2013). Differential scanning calorimetry (DSC): theoretical fundamentals. Editor(s): Rosario Pignatello. In *Woodhead Publishing Series in Biomedicine, Drug-Biomembrane Interaction Studies*, Woodhead Publishing. Pages 127-168, ISBN 9781907568053, <https://doi.org/10.1533/9781908818348.127>.
- Reddy, M.S., Shaik, B., Adimurthy, S., Ramachandraiah, G. (2006). Description of the small plastics fragments in marine sediments along the Alang-Sosiya ship-breaking yard, India. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 68 (3-4), 656–660. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2006.03.018>
- Restrepo-Flórez, J. M., Bassi, A., Thompson, M. R. (2014). Microbial degradation and deterioration of polyethylene - A review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 88, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.12.014>
- Rojo, F. (2009). Degradation of alkanes by bacteria: Minireview. *Environmental Microbiology*, 11(10), 2477–2490. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x>
- Rosenberg, M., Gutnick, D., Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9, 29–33. [http://doi.org/10.1016/0378-1097\(80\)90106-8](http://doi.org/10.1016/0378-1097(80)90106-8)
- Saadatkah, N., Carillo, G. A., Ackermann, S., Leclerc, P., Latifi, M., Samih, S., Patience, G., Chaouki, J. (2017). Experimental methods in chemical engineering: Thermogravimetric analysis—TGA. *Can J Chem Eng.* 98(1), 34–43. <https://doi.org/10.1002/cjce.23673>
- Saghee, M. R., & Bidlan, R. (2018). Simultaneous degradation of organochlorine pesticides by microbial consortium. *Biosci Biotechnol Res Commun* 11: 49–54. <https://doi.org/10.21786/bbrc/11.1/7>
- Sánchez-Reyes, A., Gaytán, I., Pulido-García, J., Burelo, M., Vargas-Suárez, M., Cruz-Gómez, J.M., Loza-Tavera, h. (2023). Genetic basis for the biodegradation of a polyether-polyurethane-acrylic copolymer by a landfill microbial community inferred by metagenomic deconvolution analysis. *Sci Tot Env.* Aceptado con correcciones mayores.
- Santerre, J. P., Labow, R. S., Duguay, D. G., Erfle, D., Adams, G. A. (1994). Biodegradation evaluation of polyether and polyester-urethanes with oxidative and hydrolytic enzymes. *Journal of Biomedical Materials Research*, 28(10), 1187–1199. <https://doi.org/10.1002/jbm.820281009>
- Santerre, J. P., Woodhouse, K., Laroche, G., Labow, R. S. (2005). Understanding the biodegradation of polyurethanes: From classical implant to tissue engineering materials. *Biomaterials*, 26(35), 7457–7470. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.079>
- Savín, G. A. (2016). Identificación de miembros de consorcios capaces de crecer en un barniz de poliéter poliuretano. Tesis de Maestría. UNAM.
- Schmidt, J., Wei, R., Oeser, T., Silva, L. A. D. e. S., Breite, D., Schulze, A., Zimmermann, W. (2017). Degradation of polyester polyurethane by bacterial polyester hydrolases. *Polymers*, 9(2), 65. <https://doi.org/10.3390/polym9020065>
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26(3), 246–265. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>
- Shah, Z., Gulzar, M., Hasan, F., Shah, A. A. (2016). Degradation of polyester polyurethane by an indigenously developed consortium of *Pseudomonas* and *Bacillus* species isolated from soil. *Polymer Degradation and Stability*, 134, 349–356. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.11.003>
- Shah, Z., Hasan, F., Krumholz, L., Atkas, D., Shah, A. A. (2013). Degradation of polyester polyurethane by newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* strain MZA-85 and analysis of degradation products by GC-MS. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 77, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.11.009>
- Shah, Z., Krumholz, L., Aktas, D. F., Hasan, F., Khattak, M., Shah, A. A. (2013). Degradation of polyester polyurethane by a newly isolated soil bacterium, *Bacillus subtilis* strain MZA-75. *Biodegradation*, 24(6), 865–877. <https://doi.org/10.1007/s10532-013-9634-5>
- Skleničková, K., Abbrent, S., Halecký, M., Kočí, V., Beneš, H. (2022). Biodegradability and ecotoxicity of polyurethane foams: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52(2), 157–202. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1818496>

- Solís-González, C. J., Domínguez-Malfavón, L., Vargas-Suárez, M., Gaytán, I., Cevallos, M. Á., Lozano, L., Javier Cruz-Gómez, M., Loza-Tavera, H. (2017). Novel metabolic pathway for N-methylpyrrolidone degradation in *Alicyclophilus* sp. strain BQ1. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(1), 1–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02136-17>
- Sowmya, H. v., Ramalingappa, B., Nayanashree, G., Thippeswamy, B., Krishnappa, M. (2015). Polyethylene Degradation by Fungal Consortium. *International Journal of Environmental Research*, 9(3), 823–830.
- Stepien, A. E., Zebrowski, J., Piszczyk, Ł., Boyko, V. v., Riabov, S. v., Dmitrieva, T., Bortnitskiy, V. I., Gonchar, M., Wojnarowska-Nowak, R., Ryszkowska, J. (2017a). Assessment of the impact of bacteria *Pseudomonas denitrificans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* and yeast *Yarrowia lipolytica* on commercial poly(ether urethanes). *Polymer Testing*, 63, 484–493. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2017.08.038>
- 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.06725-11>
- Tang, Y. W., Labow, R. S., Santerre, J. P. (2001). Enzyme-induced biodegradation of polycarbonate-polyurethanes: Dependence on hard-segment chemistry. *Biomaterials*. 24(12), 2003–11. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00563-x](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00563-x).
- Tani, A., Charoenpanich, J., Mori, T., Takeichi, M., Kimbara, K., Kawai, F. (2007). Structure and conservation of a polyethylene glycol-degradative operon in sphingomonads. *Microbiology*, 153(2), 338–346. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/000992-0>
- Tilman, D., Lehman, C. L., Thomson, K. T. (1997). Plant diversity and ecosystem productivity: Theoretical considerations. *Proceedings of the National Academy of Science*, 94(5), 1857–1861. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.5.1857>
- Tsoi, R., Dai, Z., You, L. (2019). Emerging strategies for engineering microbial communities. *Biotechnology Advances*, 37(6). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.011>.
- Turner, A., Lau, K.S. (2016). Elemental concentrations and bioaccessibilities in beached plastic foam litter, with particular reference to lead in polyurethane. *Mar. Pollut. Bull.* 112 (1-2), 265–270. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.08.005>
- Tursi, A., Baratta, M., Easton, T., Chatzisyemon, E., Chidichimo, F., De Biase, M., De Filipo, G. (2022). Microplastics in aquatic systems a comprehensive review: origin accumulation, impact and removal technologies. *RSC Adv*, 12, 28318. <https://doi.org/10.1039/d2ra04713f>
- Ufarté, L., Laville, E., Duquesne, S., Morgavi, D., Robe, P., Klopp, C., Rizzo, A., Pizzut-Serin, S., Potocki-Veronese, G. (2017). Discovery of carbamate degrading enzymes by functional metagenomics. *PLoS ONE*, 12(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189201>
- Umare, S. S., Chandure, A. S. (2008). Synthesis, characterization and biodegradation studies of poly(ester urethane)s. *Chemical Engineering Journal*, 142(1), 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.11.017>
- Utomo, R. N. C., Li, W. J., Tiso, T., Eberlein, C., Doeker, M., Heipieper, H. J., Jupke, A., Wierckx, N., Blank, L. M. (2020). Defined Microbial Mixed Culture for Utilization of Polyurethane Monomers. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8(47), 17466–17474. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c06019>
- Vandamme, P. A., Peeters, C., Inganäs, E., Cnockaert, M., Houf, K., Spilker, T., Moore, E. R. B., LiPuma, J. J. (2016). Taxonomic dissection of *Achromobacter denitrificans* Coenye et al. 2003 and proposal of *Achromobacter agillis* sp. nov., nom. rev., *Achromobacter pestifer* sp. nov., nom. rev., *Achromobacter kerstersii* sp. nov. and *Achromobacter deleyi* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(9), 3708–3717. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001254>
- Vargas-Suárez, M., Fernández-Cruz, V., Loza-Tavera, H. (2019). Biodegradation of polyacrylic and polyester polyurethane coatings by enriched microbial communities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(7), 3225–3236. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09660-y>
- Vargas-Suárez, M., Savín-Gámez, A., Domínguez-Malfavón, L., Sánchez-Reyes, A., Quirasco-Baruch, M., Loza-Tavera, H. (2021). Exploring the polyurethanolytic activity and microbial composition of landfill microbial communities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(20), 7969–7980. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11571-w>
- Vargas-Suárez, M., Savín-Gámez, A., Domínguez-Malfavón, L., Sánchez-Reyes, A., Quirasco-Baruch, M., Loza-Tavera, H. (2021). Exploring the polyurethanolytic activity and microbial composition of landfill microbial communities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(20), 7969–7980. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11571-w>
- Wang, S., Bai, N., Wang, B., Feng, Z., Hutchins, W. C., Yang, C. H., Zhao, Y. (2015). Characterization of the molecular degradation mechanism of diphenyl ethers by *Cupriavidus* sp. WS. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(21), 16914–16926. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4854-3>
- Wang, W., Shao, Z. (2013). Enzymes and genes involved in aerobic alkane degradation. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00116>
- Wang, Z., Goyal, A., Dubinkina, V., George, A. B., Wang, T., Fridman, Y., Maslov, S. (2021). Complementary resource preferences spontaneously emerge in diauxic microbial communities. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27023-y>

- Wei, R., Oeser, T., Zimmermann, W. (2014a). Synthetic polyester-hydrolyzing enzymes from thermophilic actinomycetes. *Advances in Applied Microbiology*, 89, 267–305. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800259-9.00007-X>
- Wei, R., Oeser, T., Then, J., Kühn, N., Barth, M., Schmidt, J., Zimmermann, W. (2014b). Functional characterization and structural modeling of synthetic polyester-degrading hydrolases from *Thermomonospora curvata*. *AMB Express*, 4(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0044-9>
- White, G. F., Russell, N. J., Tidswell, E. C. (1996). Bacterial scission of ether bonds. In *Microbiological reviews*, 60(1), 216–232. doi: 10.1128/mr.60.1.216-232.1996
- Wilkes, R. A., Aristilde, L. (2017). Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 582–593. <https://doi.org/10.1111/jam.13472>
- Witte, C.P., Medina-Escobar, N. (2001). In-gel detection of urease with nitroblue tetrazolium and quantification of the enzyme from different crop plants using the indophenols reaction. *Anal Biochem* 290(1):102–107. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4933>
- Woiski, C., Dobslaw, D., Engesser, K. H. (2020). Isolation and characterization of 2-butoxyethanol degrading bacterial strains. *Biodegradation*, 31(3), 153–169. <https://doi.org/10.1007/s10532-020-09900-3>
- Wolfaardt, G. M., Korber, D. R., Lawrence, J. R. (2007). Cultivation of microbial consortia and communities. En Christon J. Hurst, Ronald L. Crawford, Jay L. Garland, David A. Lipson, Aaron L. Mills, Linda D. Stetzenbach (Ed). *Manual of Environmental Microbiology* (3<sup>rd</sup> Edition, pp. 101–111). Wiley. <https://doi.org/10.1128/9781555815882.ch9>
- Yamamoto, N., Nakayama, A., Oshima, M., Kawasaki, N., Aiba, S. ichi. (2007). Enzymatic hydrolysis of lysine diisocyanate based polyurethanes and segmented polyurethane ureas by various proteases. *Reactive and Functional Polymers*, 67, 1338–1345. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2007.08.011>
- Yang, Q., Cai, S., Dong, S., Chen, L., Chen, J., Cai, T. (2016). Biodegradation of 3-methyldiphenylether (MDE) by *Hydrogenophaga atypical* strain QY7-2 and cloning of the methy-oxidation gene mdeABCD. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep39270>
- Zafar, U., Nzeram, P., Langarica-Fuentes, A., Houlden, A., Heyworth, A., Saiani, A., Robson, G. D. (2014). Biodegradation of polyester polyurethane during commercial composting and analysis of associated fungal communities. *Bioresource Technology*, 158, 374–377. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.077>
- Zalasiewicz, J., Waters, C. N., Ivar do Sul, J. A., Corcoran, P. L., Barnosky, A. D., Cearreta, A., Edgeworth, M., Gałuszka, A., Jeandel, C., Leinfelder, R., McNeill, J. R., Steffen, W., Summerhayes, C., Waprich, M., Williams, M., Wolfe, A. P., Yonan, Y. (2016). The geological cycle of plastics and their use as a stratigraphic indicator of the Anthropocene. *Anthropocene*, 13, 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.ancene.2016.01.002>
- Zhang, C., Zeng, G., Yuan, L., Yu, J., Li, J., Huang, G., Xi, B., Liu, H. (2007). Aerobic degradation of bisphenol A by *Achromobacter xylosoxidans* strain B-16 isolated from compost leachate of municipal solid waste. *Chemosphere*, 68(1), 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.012>
- Zhang, H. R., Pang, H., Zhang, L., Chen, X., Liao, B. (2013). Biodegradability of polyurethane foam from liquefied wood based polyols. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(2), 329–334. <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0542-2>
- Zhang, X., Battiston, K. G., McBane, J. E., Matheson, L. A., Labow, R. S., Paul Santerre, J. (2016). Design of biodegradable polyurethanes and the interactions of the polymers and their degradation by-products within *in vitro* and *in vivo* environments. En Stuart, L. C., Jianjun, G. *Advances in Polyurethane Biomaterials*, pp. 75–114. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100614-6.00003-2>
- Zhang, X., Zhang, Q., Yan, T., Jiang, Z., Zhang, X., Zuo, Y. Y. (2015). Quantitatively predicting bacterial adhesion using surface free energy determined with a spectrophotometric method. *Environmental Science and Technology*, 49(10), 6164–6171. <https://doi.org/10.1021/es5050425>
- Zhang, Y., Nedergaard J.P., Eser, E.B., Guo, Z. (2022). Biodegradation of polyethylene and polystyrene: From microbial deterioration to enzyme discovery. *Biotechnology Advances*. 60, 107991. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107991>

## 12. ANEXOS

### Anexo A Reactivos utilizados en la investigación

Nombre	Formula	CAS	Grado/pureza	Marca
<b>Medio de cultivo/medio de cultivo-glicerol</b>				
PolyLack®	-	-	-	Sayer Lack
Fosfato monobásico de potasio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7778-77-0	ACS	J.T.Baker
Fosfato dipotásico	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7758-11-4	ACS	J.T.Baker
Nitrato de amonio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	6484-52-2	ACS	Sigma-Aldrich
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	10034-99-8	ACS	J.T.Baker
Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	7446-20-0	ACS	Técnica Química
Sulfato cúprico pentahidratado	CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	7758-99-8	ACS	J.T.Baker
Sulfato ferroso heptahidratado	FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	7782-63-0	ACS	J.T.Baker
Sulfato de manganeso tetrahidratado	MnSO <sub>4</sub> •4H <sub>2</sub> O	10101-68-5	ACS	J.T.Baker
Glicerol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	56-81-5	ACS	Sigma-Aldrich
<b>Interacciones célula – sustrato</b>				
Hexadecano	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	544-76-3	ACS	Sigma-Aldrich
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	64-17-5	ACS	Sigma-Aldrich
Glutaraldehído	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	111-30-8	Grado I	Sigma-Aldrich
<b>Técnicas cromatográficas</b>				
Cloroformo	CH <sub>3</sub> Cl	67-66-3	HPLC	Sigma-Aldrich
Metanol	CH <sub>4</sub> O	67-56-1	HPLC	Tecsiquim
Tetrahidrofurano	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O	109-99-9	HPLC	Sigma-Aldrich
N-metil-2-pirrolidona	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO	872-50-4	HPLC	Sigma-Aldrich
2-butoxietanol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	111-76-2	≥99%	Sigma-Aldrich
Dipropilenglicol butil éter	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	34590-94-8	≥99	Aldrich-Aldrich
Dipropilenglicol monometil éter	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	29911-28-2	≥99%	Aldrich-Aldrich
Isopropanol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	67-63-0	99.5%	Aldrich-Aldrich
<b>Ensayos de actividad enzimática</b>				
Reactivo de Bradford	-	-	-	Bio-Rad
Albúmina	-	9048-46-8	Electroforesis	Sigma-
p-nitrofenil acetato	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	830-03-5	-	Sigma-Aldrich
p-nitrofenol	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	100-02-7	Espectrofotométrico	Sigma-Aldrich
Acetonitrilo	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N	75-05-8	HPLC	Sigma-Aldrich
Urea	CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O	57-13-6	ACS	Sigma-Aldrich
Uretano	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	51-79-6	GC	Sigma-Aldrich
Fenol	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O	108-95-2	ACS	Sigma-Aldrich
Nitroprusiato de sodio	Na <sub>2</sub> Fe(CN) <sub>5</sub> NO •2H <sub>2</sub> O	S0501	ACS	Sigma-Aldrich
Hipoclorito de sodio	NaOCl	7681-52-9	Reactivo	Sigma-Aldrich
Cloruro de amonio	NH <sub>4</sub> Cl	12125-02-9	ACS	J.T. Baker
Esterasa (lipasa) de <i>Aspergillus oryzae</i> 50 unidades/mg	-	9001-62-1	-	Sigma-Aldrich
Ureasa de <i>Canavalia ensiformis</i> (Jack bean) 15000-50000 unidades/g	-	9002-13-5	-	Sigma-Aldrich

# Anexo B

## Publicaciones resultantes de la investigación

### Artículo principal



# Degradation of Recalcitrant Polyurethane and Xenobiotic Additives by a Selected Landfill Microbial Community and Its Biodegradative Potential Revealed by Proximity Ligation-Based Metagenomic Analysis

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Ran Wei,  
University of Greifswald, Germany

### Reviewed by:

Wei-Min Wu,  
Stanford University, United States  
Gabriela Vázquez-Rodríguez,  
Autonomous University of the State  
of Hidalgo, Mexico

### \*Correspondence:

Herminia Loza-Tavera  
hloza@unam.mx

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

This article was submitted to  
Microbiotechnology, Ecotoxicology  
and Bioremediation,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

Received: 25 September 2019

Accepted: 10 December 2019

Published: 22 January 2020

### Citation:

Gaytán I, Sánchez-Reyes A,  
Burelo M, Vargas-Suárez M,  
Liachko I, Press M, Sullivan S,  
Cruz-Gómez MJ and Loza-Tavera H  
(2020) Degradation of Recalcitrant  
Polyurethane and Xenobiotic  
Additives by a Selected Landfill  
Microbial Community and Its  
Biodegradative Potential Revealed by  
Proximity Ligation-Based  
Metagenomic Analysis.  
*Front. Microbiol.* 10:2986.  
doi: 10.3389/fmicb.2019.02986

Itzel Gaytán<sup>1†</sup>, Ayixon Sánchez-Reyes<sup>1†</sup>, Manuel Burelo<sup>2</sup>, Martín Vargas-Suárez<sup>1</sup>,  
Ivan Liachko<sup>3</sup>, Maximilian Press<sup>3</sup>, Shawn Sullivan<sup>3</sup>, M. Javier Cruz-Gómez<sup>4</sup> and  
Herminia Loza-Tavera<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico,

<sup>2</sup> Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City,  
Mexico, <sup>3</sup> Phase Genomics Inc., Seattle, WA, United States, <sup>4</sup> Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química,  
Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Polyurethanes (PU) are the sixth most produced plastics with around 18-million tons in 2016, but since they are not recyclable, they are burned or landfilled, generating damage to human health and ecosystems. To elucidate the mechanisms that landfill microbial communities perform to attack recalcitrant PU plastics, we studied the degradative activity of a mixed microbial culture, selected from a municipal landfill by its capability to grow in a water PU dispersion (WPUD) as the only carbon source, as a model for the BP8 landfill microbial community. The WPUD contains a polyether-polyurethane-acrylate (PE-PU-A) copolymer and xenobiotic additives (*N*-methylpyrrolidone, isopropanol and glycol ethers). To identify the changes that the BP8 microbial community culture generates to the WPUD additives and copolymer, we performed chemical and physical analyses of the biodegradation process during 25 days of cultivation. These analyses included Nuclear magnetic resonance, Fourier transform infrared spectroscopy, Thermogravimetry, Differential scanning calorimetry, Gel permeation chromatography, and Gas chromatography coupled to mass spectrometry techniques. Moreover, for revealing the BP8 community structure and its genetically encoded potential biodegradative capability we also performed a proximity ligation-based metagenomic analysis. The additives present in the WPUD were consumed early whereas the copolymer was cleaved throughout the 25-days of incubation. The analysis of the biodegradation process and the identified biodegradation products showed that BP8 cleaves esters, C-C, and the recalcitrant aromatic urethanes and ether groups by hydrolytic and oxidative mechanisms, both in the soft and the hard segments of the copolymer. The proximity ligation-based metagenomic analysis allowed the reconstruction of five genomes, three of them from novel species. In the metagenome,

genes encoding known enzymes, and putative enzymes and metabolic pathways accounting for the biodegradative activity of the BP8 community over the additives and PE-PU-A copolymer were identified. This is the first study revealing the genetically encoded potential biodegradative capability of a microbial community selected from a landfill, that thrives within a WPUD system and shows potential for bioremediation of polyurethane- and xenobiotic additives-contaminated sites.

**Keywords:** biodegradation, microbial community, polyether-polyurethane-acrylate, xenobiotic additives, metagenomics, Hi-C proximity-ligation, community structure, biodegradative potential

## INTRODUCTION

Plastic pollution represents a pervasive anthropogenic threat for the survival of natural ecosystems. Worldwide, plastics have become so abundant that they have been proposed as geological markers for the Anthropocene era (Zalasiewicz et al., 2016). In 2017, a total of 348 million tons of plastics were manufactured (Plastics Europe, 2018) and their production keeps increasing. Polyurethanes (PU) are versatile plastics produced as thermoplastics, thermosets, coatings, adhesives, sealants and elastomers that are incorporated into our daily life in building insulation, refrigerators and freezers, furniture and bedding, footwear, automotive, clothing, coatings, adhesives, and others. PU was ranked as the sixth most used polymer worldwide with a production of 18 million tons in 2016 (Cornille et al., 2017). The extensive utilization of PU generates wastes that are mainly disposed in municipal landfills where, because of its structural complexity will remain as polymeric structures for decades, or are burned generating toxic substances that negatively impact human health and ecosystems (Cornille et al., 2017). Furthermore, some PU such as polyether (PE)-PU are more recalcitrant than others, and additionally, some PU-based liquid formulations contain additives that include secondary alcohols and glycol ethers that function as solvents or coalescent agents. Glycol ethers enter the environment in substantial quantities, are toxic for many microbial species (Kawai, 2010; Varsha et al., 2011; Malla et al., 2018) and represent a potential hazard for human health (Organization for Economic Co-operation and Development, 2003).

Over the last three decades, several research groups have isolated microorganisms capable of attacking PU (Oceguera-Cervantes et al., 2007; Cregut et al., 2013; Álvarez-Barragán et al., 2016; Gamerith et al., 2016; Osman et al., 2018; Magnin et al., 2019) and degrading xenobiotic additives (Ojo, 2007; Varsha et al., 2011). Also, the degradation capabilities of several fungal and bacterial communities over PU in compost, soil or liquid cultures (Zafar et al., 2014; Shah et al., 2016; Vargas-Suárez et al., 2019), and over some xenobiotics in different activated sludges (Ferrero et al., 2018) have been assessed. However, PU biodegradation is still a challenge for environmental and biological disciplines and little is known about structure or potential degradative enzymatic pathways of microbial communities capable of PU biodegradation. Metagenomics provides access to the structure and genetic potential of microbial communities, helping to understand the ecophysiological relationships governing the dynamics of their

populations in the environment. Recently, a new approach has been developed that allows the reconstruction of individual genomes of microbial species using physical interactions between sequences within cells (Burton et al., 2014). This approach involves Hi-C proximity ligation and yields direct evidence of sequences co-occurrence within a genome. It is used for *de novo* assembly, identification of complete and novel genomes (Press et al., 2017) and for testing functional and phylogenetic hypotheses, surpassing other methods for clustering contigs by taxonomic origins (Wu et al., 2014; Breitwieser et al., 2019; Shaiber and Eren, 2019).

To characterize the biodegradation process of the recalcitrant plastic PE-PU by microbial communities, we adopted the commercial water PU dispersion PolyLack® (Sayer Lack, México) that contains a proprietary aromatic polyether-polyurethane-acrylate (PE-PU-A) copolymer and the xenobiotic additives *N*-methylpyrrolidone (NMP), isopropanol (IP) 2-butoxyethanol (2-BE), dipropylene glycol butyl ether (DPGB), and dipropylene glycol methyl ether (DPGM). In this work, we provide comprehensive chemical and physical evidences of the capacity of a selected landfill microbial community to degrade an aromatic PE-PU-A copolymer and the aforementioned xenobiotic additives. In addition, we analyzed the structure and phenotypic potential of this community by applying the Hi-C proximity ligation technology. Based on these analyses, we identified a novel microbial landscape that can deal with PE-PU-A and xenobiotics additives degradation and proposed putative metabolic pathways and genes that can account for these capabilities. This is one of the few studies that combine physical and chemical analyses with metagenomics to elucidate possible metabolic pathways involved in xenobiotics biodegradation. Furthermore, this is the first metagenomic analysis of a polyurethane-degrading enriched landfill community. Understanding these pathways will help to design environmental biotechnological strategies that contribute to mitigate plastics and xenobiotics pollution and to achieve a better environmental quality.

## MATERIALS AND METHODS

### Site Location and Sampling Procedure

Deteriorated PU foam samples were collected at El Bordo Poniente (BP) landfill, located at Nezahualcóyotl Estado de México, México (19°27'10''N; 99°0'58''W). The samples were visually identified in piles of waste and in lixivate waters,



gathered by hand with sterile latex gloves and placed in sterile plastic bags for transportation to the laboratory. Then, they were immediately used to start the enrichment cultures.

## Microbiological Techniques

For obtaining the enriched microbial community from the BP8 sample, approximately 1 cm<sup>3</sup> was cut over a sterile Petri dish using a sterile scalpel. This PU foam piece was inoculated in 125 mL Erlenmeyer flask with 25 mL of minimal medium (MM) (Nakajima-Kambe et al., 1995) containing PolyLack® (0.3% v/v), as the sole carbon source (MM-PolyLack). PolyLack® Aqua Brillante (Sayer Lack, Prod. Num. UB-0800, México), mainly used for coating of wood floors with moderate transit, contains a proprietary aromatic PE-PU-A copolymer ( $\leq 30\%$  w/v), and the additives NMP ( $\leq 6\%$  v/v), 2-BE ( $\leq 5\%$  v/v), IP ( $\leq 3\%$  v/v), DPGB ( $\leq 2\%$  v/v), DPGM ( $\leq 1\%$  v/v), and silica ( $\leq 3\%$  w/v) (Sayer Lack. Hoja de Datos de Seguridad de Materiales. PolyLack® Aqua Brillante, UB-0800. 09.18.2014. Version 4/0. México). The flask was incubated at 30°C and 220 rpm for 7 days. Two ml of this culture were transferred to 25 ml of fresh MM-PolyLack and cultured for 7 days, repeating two more times, for a total of 28 days, before being conserved in MM-PolyLack glycerol 30% at  $-70^{\circ}\text{C}$ . The microbial mixed culture obtained from the landfill community, named as BP8, was propagated and conserved by inoculating 25 ml of fresh MM-PolyLack with a 500  $\mu\text{l}$  glycerol from the original enriched community, incubated for 7 days and used to prepare new glycerols. BP8 growth was quantified by dry weight. For that, flasks with MM-PolyLack (25 ml) were inoculated with fresh cells (3 mg/ml) harvested from pre-cultures grown in MM-PolyLack for 48 h at 37°C, 220 rpm. At different incubation times, cells of one flask were harvested, washed three times with phosphate buffer (50 mM, pH 7) and dried to constant weight.

## Cell-Substrate Interactions Techniques

For Cell surface hydrophobicity (CSH) measurements, cells were washed twice and suspended in phosphate buffer (0.05 M, pH 7) to an optical density (OD) of 0.6 (600 nm). The mixture of cell suspension (2 ml) and *n*-hexadecane was vortexed for 3 min and after that, the organic and aqueous phases were allowed to separate for 30 min. OD was measured in the cell suspension (aqueous phase). CSH is expressed as the percentage of adherence to hexadecane and it was calculated as follows:  $100 \times [1 - (\text{OD}_{600} \text{ of the cell suspension after 30 min}) / (\text{OD}_{600} \text{ of the initial cell suspension})]$  (Rosenberg et al., 1980). Emulsification capacity of the culture medium was determined by mixing 2 ml of cell-free supernatant (CFS) and 3 ml of *n*-hexadecane in glass test tubes. The tubes were vigorously vortexed for 2 min and afterward let to stand at room temperature. The emulsification index (EI<sub>24</sub>) was calculated after 24 h as follows:  $100 \times [\text{emulsified layer height} / \text{total liquid column height}]$  (Cooper and Goldenberg, 1987). To observe cell-copolymer interactions, cells were fixed with 3% (v/v) glutaraldehyde in phosphate buffer (100 mM, pH 7.4), at 4°C overnight, washed three times, dehydrated with serial dilutions of ethanol, coated with gold and analyzed in a JEOL JSM-5900-LV electron microscope.

## Analytical Techniques

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra from dried PolyLack® dissolved in C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N (30 mg/ml) were recorded at 298 K in a Bruker Avance 400 NMR (Billerica, MA, United States) at 400 MHz (<sup>1</sup>H). For most of the analytical techniques, CFS were obtained by centrifugation at  $17,211 \times g$  for 10 min, filtered through Whatman grade 41 paper, and dried at 37°C for 5 days. Carbon content was determined in a Perkin Elmer Elemental Analyzer (2400 CHN/O, Series II, Shelton, CT, United States). For gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) analysis, 25 ml CFS were extracted in 6 ml LC-18 cartridges (Supelco) at a flow rate of 2 ml/min, eluted with 2 ml chloroform:methanol (1:1, v/v) and concentrated to 0.5 ml. Samples were injected in an Agilent GC system (7890B, Santa Clara, CA, United States) using two 5% phenylmethylpolysiloxane columns (15 m  $\times$  250  $\mu\text{m}$   $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ ). Oven was heated from 50 to 300°C at 20°C/min, Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1 ml/min. The injector temperature was 300°C. For the quantification of additives, pure compounds (Sigma-Aldrich Chemicals  $\geq 98\%$  purity) were used for standard curves. Identification of biodegradation products was performed in an Agilent Quadrupole Mass Analyzer (5977A MSD, Santa Clara, CA, United States) with electronic ionization energy of 1459 EMV and the mass range scanned at 30–550 amu. Scan rate was 2.8 spec/s. Data acquisition was performed with the Enhanced MassHunter software system. Compounds were identified based on mass spectra compared to the NIST database (2002 Library). Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analyses were performed in dried CFS, by using a Perkin Elmer spectrometer (Spectrum 400, Waltham, MA, United States) in attenuated total reflection mode; 64 scans with a resolution of 4 cm<sup>-1</sup> were averaged in the range of 500–4000 cm<sup>-1</sup>, processed and analyzed (Spectrum v6.3.5.0176 software). Derivative thermogravimetric analyses (DTG) were performed in a Perkin Elmer Thermogravimetric Analyzer (TGA 4000, Waltham, MA, United States) on 2.5 mg of dried CFS samples heated 30–500°C at a rate of 20°C/min, under a N<sub>2</sub> atmosphere. Differential scanning calorimetry (DSC) was performed analyzing 10 mg of dry CFS in a Q2000 (TA Instrument, New Castle, DE, United States) at a rate of 10°C/min, under a nitrogen flow of 50 ml/min, at a 20–600°C range. For Gel permeation chromatography (GPC) of PE-PU-A copolymers, liquid CFS were extracted in a similar way that described above for GC-MS analysis, but the 2 ml chloroform:methanol (1:1, v/v) elution was evaporated to dryness at 25–30°C. The dried sample was resuspended in tetrahydrofuran (THF) at 15 mg/ml of solids, then filtrated through 0.45  $\mu\text{m}$  Whatman filters and injected in a Waters 2695 Alliance Separation Module GPC (Milford, MA, United States) at 30°C in THF, using a universal column and a flow rate of 0.3 ml/min. All the analyses were performed at least in three replicates.

## Hi-C Proximity Ligation-Based Metagenomic Analysis

BP8 community cells cultured for 5 days in 50 ml of MM-PolyLack were harvested and washed three times with phosphate

buffer. Cells were resuspended in 20 ml TBS buffer with 1% (v/v) formaldehyde (J. T. Baker) (crosslinker) and incubated 30 min with periodic mixing. The crosslinker was quenched with glycine (0.2 g) (Bio-Rad) for 20 min, thereafter cells were centrifuged, lyophilized and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ . For DNA extraction, cell pellets (100  $\mu\text{l}$  of solid cellular material, equivalent to  $10^9 - 10^{10}$  cells) were resuspended in 500  $\mu\text{l}$  of TBS buffer containing 1% (v/v) Triton X-100 and protease inhibitors (Press et al., 2017). DNA was digested with *Sau3AI* and *MluCI* and biotinylated with DNA Polymerase I Klenow fragment (New England Biolabs) followed by ligation reactions incubated for 4 h and then overnight at  $70^{\circ}\text{C}$  to reverse crosslinking. The Hi-C DNA library was constructed by using the HyperPrep Kit (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, United States). A shotgun library was also prepared from DNA extracted from non-crosslinked cells using Nextera DNA Sample Preparation Kit (Illumina). The two libraries were paired-end sequenced using NextSeq 500 Illumina platform (Illumina, San Diego, CA, United States). *De novo* metagenome draft assemblies from the raw reads were made using the metaSPAdes assembler (Nurk et al., 2017). Hi-C reads were then aligned to the contigs obtained from the shotgun library using the Burrows-Wheeler Alignment tool (Li and Durbin, 2010) requiring exact read matching. The ProxiMeta algorithm was used to cluster the contigs of the draft metagenome assembly into individual genomes (Press et al., 2017). Additionally, we performed a community taxonomic profiling from shotgun reads using MetaPhlAn tool (Segata et al., 2012). Genome completeness, contamination, and other genomic characteristics were evaluated using CheckM pipeline (Parks et al., 2015). Phylogenetic analysis was performed using the single copy molecular markers, DNA gyrase subunit A and ribosomal proteins L3 and S5, selected from each deconvoluted genome and compared to homologous sequences from GenBank. Alignments were cured with Gblocks tool<sup>1</sup> and WAG plus G evolutionary models were selected using Smart Model Selection tool (Lefort et al., 2017). Finally, phylogeny was inferred with the graphical interface of SeaView (Gouy et al., 2010) using the Maximum Likelihood method. To compare genetic relatedness, Average Nucleotide Identity (ANI) between the genomes and the closest phylogenetic neighbors was calculated (Yoon et al., 2017). Open reading frames were identified using MetaGeneMark (Zhu et al., 2010). KO assignments (KEGG Orthology) and KEGG pathways reconstruction were performed with GhostKOALA server and KEGG Mapper tool, respectively (Kanehisa et al., 2016). All the xenobiotic degradation pathways were manually curated to only report those pathways in which most of the enzymes were encoded in the BP8 metagenome.

## RESULTS

### Growth and Interactions of BP8 Cells With PolyLack®

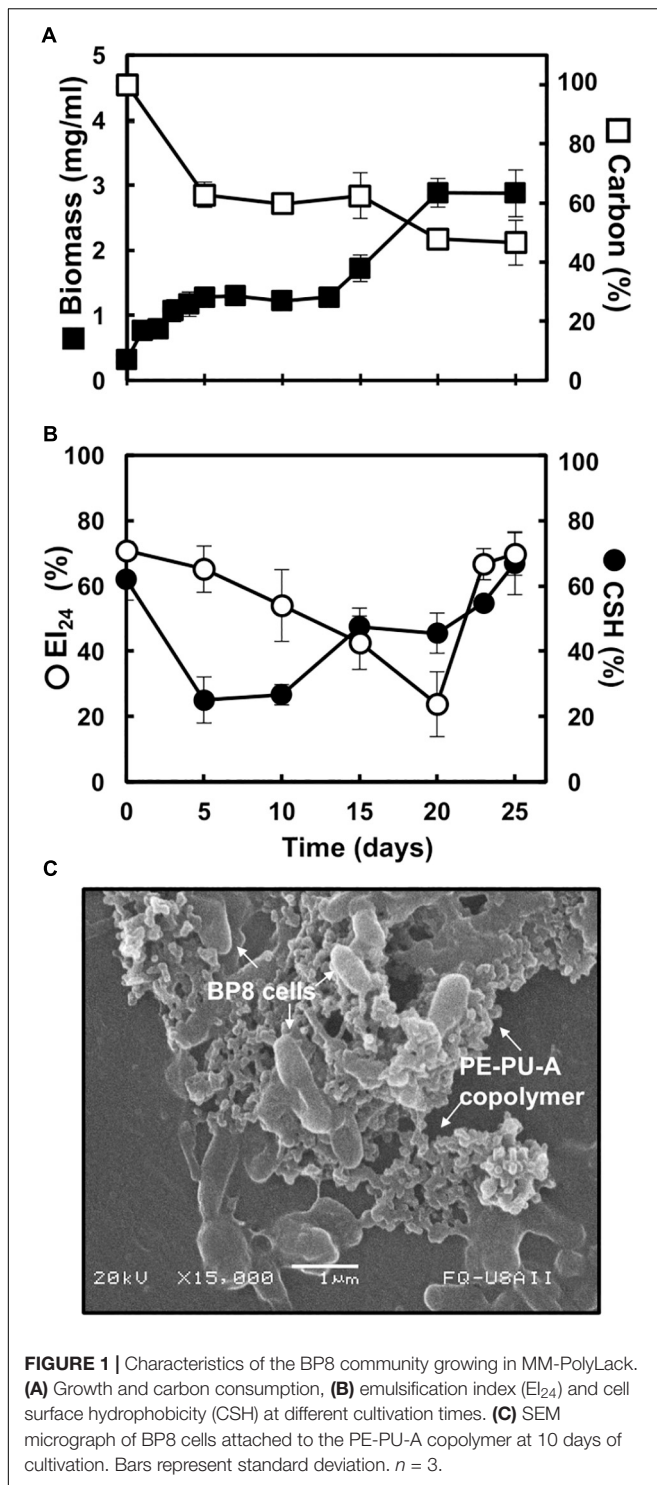
The BP8 community cultivated in MM-PolyLack for 25 days exhibited a biphasic growth with a first phase, from 0 to 13 days,

presenting a growth rate (2–4 days) of  $0.008\text{ h}^{-1}$  and a second phase, from 13 to 25 days, with a growth rate (13–20 days) of  $0.005\text{ h}^{-1}$ . Biomass increased from 0.32 to 2.9 mg/ml and consumed 50.3% of the carbon from the medium at 25 days (Figure 1A).  $\text{EI}_{24}$  initial value was 70%, it decreased to 24% at 20 days and increased again to 70%. CSH started at 62% and decreased to 25% at the first growth phase; thereafter it increased to 42% and remained constant until 20 days to increase to 67% at the end of the second phase (Figure 1B). SEM analysis at 10 days of cultivation revealed multiple-sized (0.5–1.5  $\mu\text{m}$ ) rod-shaped cells aggregated and attached to copolymer particles (Figure 1C).

### Chemical and Physical Changes in PolyLack® Components Generated by the BP8 Community

To characterize the biodegradative activity of the BP8 community on the PolyLack® components, we performed different analytical techniques. GC-MS analysis of the CFS revealed that BP8 metabolized the xenobiotic additives, NMP and IP at the first day of cultivation and 2-BE at the fourth day. DPGM and DPGB were metabolized 84 and 73%, respectively, at the first day and remained constant until the end of the experiment (Figure 2A and Supplementary Table S1). Since the PE-PU-A copolymer structure is unknown, we proposed a hypothetical structure (Figure 3), based on  $^1\text{H-NMR}$ , the manufacturer's technical sheet and in the most frequently used chemicals for the synthesis of this copolymer (Pardini and Amalvy, 2008; Gite et al., 2010; Maurya et al., 2018). Since the first day of cultivation, complex and diverse chemical compounds such as aromatics, nitrogen-containing, ethers, esters, aliphatics, alcohols and organic acids, derived from the copolymer breakdown were observed. During the first 3 days (log phase) the degradation products were low abundant, at 10 days (intermediate lag phase) accumulation occurred, and during the second log phase their abundance decreased. Notably, isocyanates [2,4-toluene diisocyanate (TDI) and methylene diphenyl diisocyanate (MDI)] derivatives were aromatic amines observed maximal at the beginning and diminished throughout the cultivation period (Figure 2B, Supplementary Figure S1, and Supplementary Table S2), suggesting that metabolization of the urethane groups is being achieved. FTIR of dried CFS revealed changes in PE-PU-A functional groups. The signal intensity of the C=O stretch from urethane and acrylate carbonyl groups ( $1730\text{ cm}^{-1}$ ) increased at 5 days and lately decreased, suggesting hydrolysis and subsequent catabolism of urethanes and acrylates. The signal for aromatic groups C=C stretch ( $1600\text{ cm}^{-1}$ ) considerably decreased at 20 days, while the signal for aromatic C-C stretch ( $1380\text{ cm}^{-1}$ ) showed variable intensities at different days, and a new C-C signal for aromatics ( $1415\text{ cm}^{-1}$ ) appeared at 20 days, indicating the cleavage of the aromatic rings. The urethane N-H bending plus C-N stretch signal ( $1550\text{ cm}^{-1}$ ) slightly decreased at 15 days and increased at the end of the cultivation time, whereas urethane C-N stretching band ( $1231\text{ cm}^{-1}$ ) significantly increased, indicating urethane attack. Signals associated with urethane C-O-C stretch ( $1086\text{ cm}^{-1}$ ,  $1049\text{ cm}^{-1}$ ) and C-O-C symmetric stretch ( $977\text{ cm}^{-1}$ ) decreased during the cultivation period, indicating microbial activity on the

<sup>1</sup>[http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/one\\_task.cgi?task\\_type=gblocks](http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/one_task.cgi?task_type=gblocks)

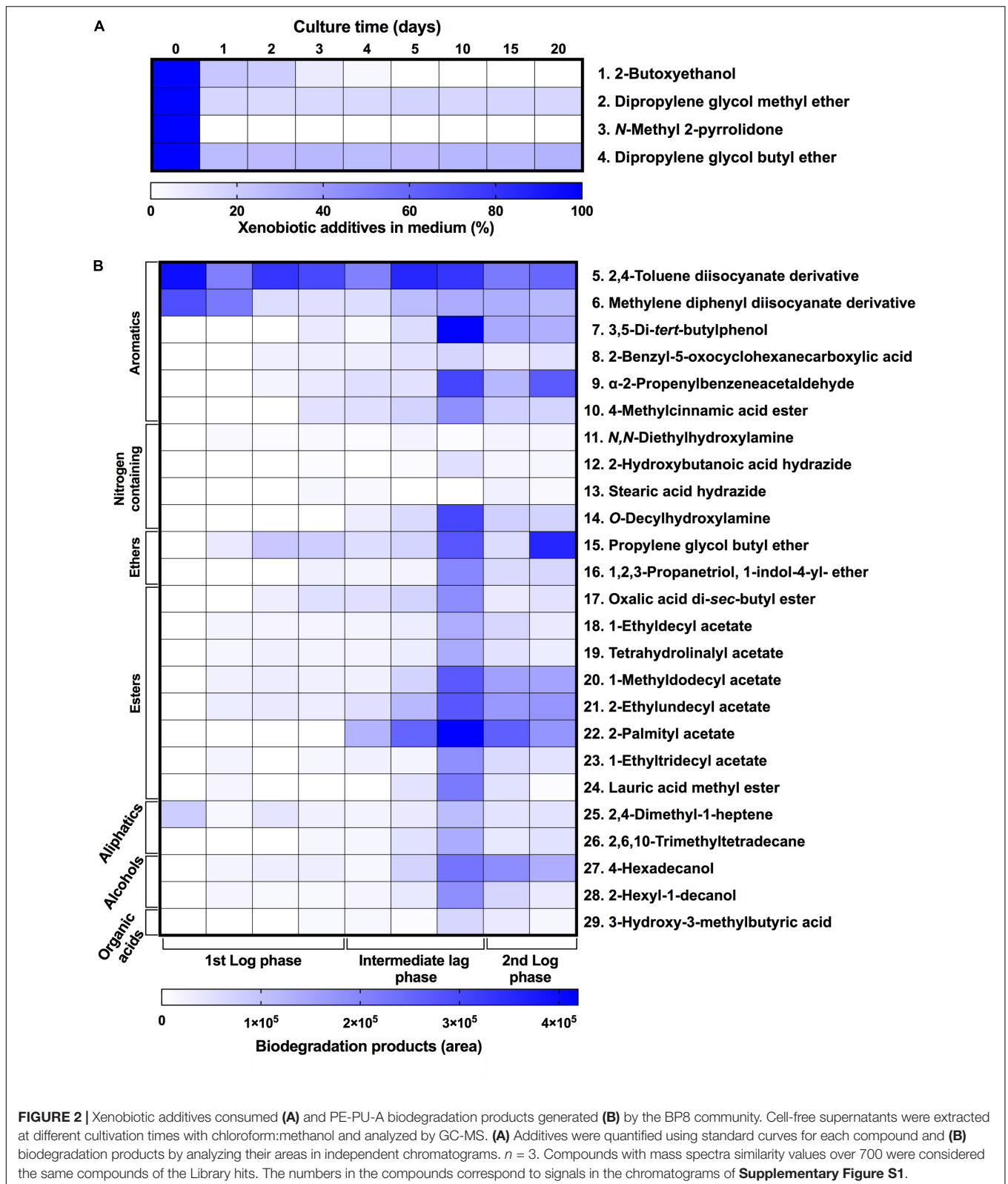


ether groups. The signal for the acrylate's vinyl group  $C=CH_2$  out of plane ( $850\text{ cm}^{-1}$ ) decreased at 20 days, indicating the cleavage of the acrylate component. Also, the aliphatic chain signals ( $704$  and  $520\text{ cm}^{-1}$ ) decreased during the cultivation period (Figure 4A). DTG thermograms exhibited four stages of thermal decomposition corresponding to the functional groups

of the copolymer. Stages II and IV, for urethane and ether groups respectively, reduced their masses at early cultivation times, while stage III, for esters, steadily kept reducing its mass during the whole experimental period. Interestingly, stage I, which accounts for low molecular weight compounds, in this case biodegradation products, showed a fluctuating behavior that increased at 10 days, and decreased afterward (Figure 4B). DSC analysis of the copolymer showed multiple thermal transitions revealing complex microstructures: the glass transition temperature ( $T_g$ :  $50.2^\circ\text{C}$ ) reflects the proportion of soft and hard segments; the three melting temperatures ( $T_m$ -I:  $70^\circ\text{C}$ ,  $T_m$ -II:  $210.6^\circ\text{C}$ ,  $T_m$ -III:  $398.1^\circ\text{C}$ ) are associated with the hard segments of the polymer and the crystallization temperature ( $T_c$ :  $459.6^\circ\text{C}$ ) is attributed to heat-directed crystallization of copolymer chains (Cipriani et al., 2013; Sultan et al., 2014) (Figure 4C). BP8 biodegradative activity caused  $T_g$  decrease ( $46.2^\circ\text{C}$ ), changes in  $T_m$ s, and strong decrease in  $T_c$  area, indicating that BP8 disrupts both, the soft and the hard segments (associated with urethane groups) (Figure 4C and Supplementary Table S3). GPC analysis showed that the number-average molecular weight ( $M_n$ ) of the copolymer steadily decreased 35.6% up to the end of the culture time, meanwhile the weight-average molecular weight ( $M_w$ ) increased about 10%, from 0 to 15 days of cultivation, and then decreased 26% from 15 to 25 days. The Polydispersity index (PDI) increased over 2, at 25 days of cultivation with BP8. Analysis of Molecular weight distribution (MWD) of the degraded samples showed shifts toward higher molecular weights than control up to 20 days of analysis. However, at 25 days, a strong shift to lower molecular weights was observed (Table 1 and Supplementary Figure S2). Abiotic controls of different cultivation times were evaluated and no changes were observed (Table 1). All these results indicate that the degradative activity of the BP8 community generated changes in the soft and hard segments of the copolymer microstructure resulting from the attack to the different functional groups, including the more recalcitrant ether and urethane groups.

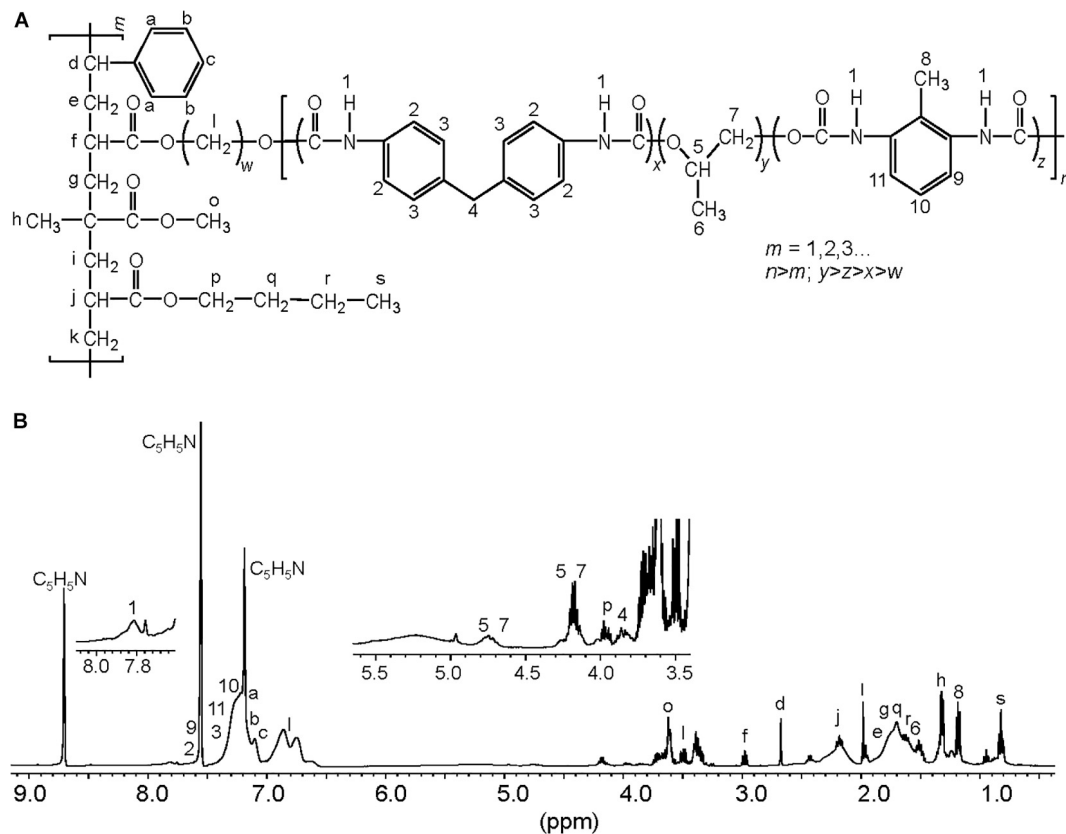
## Community Structure and Metagenomic Deconvolution of the BP8 Community

Analysis of the BP8 community taxonomic profile with MetaPhlAn, by using 17,282,414 reads, detected five bacterial orders (abundance), *Rhodobacterales* (83%), *Rhizobiales* (8.9%), *Burkholderiales* (6.8%), *Actinomycetales* (0.83%), *Sphingobacteriales* (0.08%), and one viral order *Caudovirales* (0.33%). Bacteria included 16 genera, being the most abundant *Paracoccus* (83%) and *Ochrobactrum* (8.7%) (Figure 5). The shotgun Illumina library was used to create a draft *de novo* metagenome assembly. After parsing contigs lesser to 1000 bp, this assembly had 5339 contigs with 21,228,807 bp in size. Subsequently, we mapped the Hi-C reads to the draft shotgun assembly generating 3,072 contigs with a total length of 17,618,521 bp. The alignment of Hi-C reads to this assembly allowed the deconvolution of five genome clusters, three near complete drafts (completeness >95%), and two substantially complete drafts (completeness 89 and 71%) (Parks et al., 2015) (Table 2). The phylogenetic analysis showed well-supported



clades within *Paracoccus*, *Chryseobacterium*, *Parapedobacter*, a member of the *Microbacteriaceae* family, and *Ochrobactrum intermedium* (Figure 6). The deconvoluted genomes of

*Paracoccus* sp. BP8 and *O. intermedium* BP8.5 showed low novelty scores and high ANI values compared to their closest phylogenetic relatives. In contrast, *Chryseobacterium* sp. BP8.2,



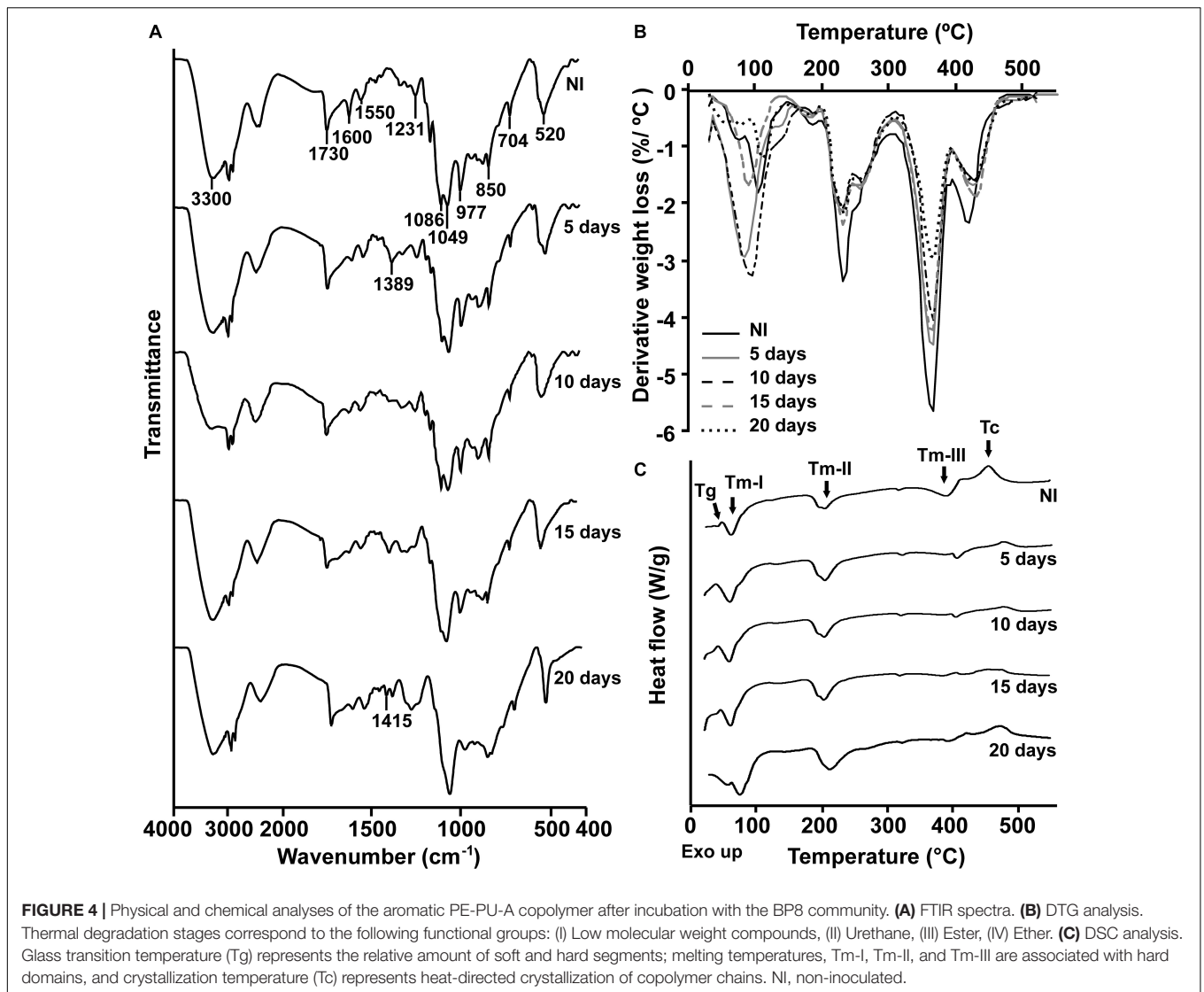
**FIGURE 3 |** Proposed chemical structure for the PE-PU-A copolymer present in PolyLack®. **(A)** This structure was proposed based on the **(B)** <sup>1</sup>H-NMR analysis of dried PolyLack®, the information included in the manufacturer technical manual (SayerLack. Poly Lack Aqua Brillante UB-0800), the GC-MS analysis (**Figure 2**), and the most frequent acrylates used in the synthesis of these types of copolymers (Pardini and Amalvy, 2008; Maurya et al., 2018). Synthesis of PE-PU-A copolymers starts by the polycondensation of polyols [polypropylene glycol (PPG)] (y moiety) and diisocyanates (TDI and MDI) (x and z moieties) followed by end capping with acrylates' mixture (m moiety). From the most frequently used acrylates we selected methyl methacrylate, butyl acrylate, hydroxy acrylate and styrene as representatives in this structure. In the <sup>1</sup>H-NMR spectrum, chemical shifts are provided in parts per million from SiMe<sub>4</sub> as internal reference. Signal 1 is assigned to carbamate groups (NH-COO); signals a, b, c, 2, 3, 9-11 are assigned to the aromatic protons; signals 4 and 8 correspond to the protons of methylene (CH<sub>2</sub>) and methyl (CH<sub>3</sub>) groups in MDI and TDI, respectively; signals 5-7 correspond to PPG; signals l correspond to the hydroxyl proton (CH<sub>2</sub>-O) and methylene groups (CH<sub>2</sub>) in the chain of hydroxy-acrylate; signals f, j, o and p correspond to the acrylic groups (CH-COO, CH<sub>2</sub>-COO or CH<sub>3</sub>-COO), signals d (CH), e, g, i, k, q, r (CH<sub>2</sub>), h and s (CH<sub>3</sub>) are assigned to methylene and methyl groups in the acrylate mixtures.

*Parapedobacter* sp. BP8.3 and the *Microbacteriaceae* bacterium BP8.4 showed high novelty scores and low ANI values (<95%) indicating they are new species. GC content and genomes' sizes were similar to the closest relatives except for the *O. intermedium* BP8.5 genome size, probably because of the low genome completeness (**Table 2** and **Supplementary Table S4**).

## Analysis of the Xenobiotic Metabolism Encoded in the BP8 Metagenome

In all the genomes, except in *O. intermedium* BP8.5, the genes and proteins assigned were in the range reported for the phylogenetically related members (**Table 2** and **Supplementary Table S4**). Reconstruction of the metabolic pathways encoded in the BP8 metagenome was performed with 18,386 ORFs from which 8,637 were annotated into KEGG Orthology groups and the rest was not assigned to any orthologous functional category. Analysis of the BP8

xenobiotic metabolism identified 215 sequences encoding 59 unique proteins participating in pathways for benzoate (ko00362), fluorobenzoate (ko00364), aminobenzoate (ko00627), chlorocyclohexane and chlorobenzene (ko00361), and *n*-alkanes (ko00071) degradation. The most relevant enzymes are listed in **Table 3**. The genes for benzoate metabolism include all the enzymes for benzoate and 4-methoxybenzoate activation as well as 4-methoxybenzoate monooxygenase, an O-demethylating enzyme that transforms methoxybenzoate to hydroxybenzoate, and for their subsequent transformation to β-ketoadipate (first 18 EC numbers in **Table 3**). Two genes encoding carboxymethylene butanolidase that cleaves the ring of cyclic ester dienelactone to produce maleylacetate, acting on the fluorobenzoate and chlorocyclohexane and chlorobenzene metabolisms, were identified. Genes encoding enzymes for the aminobenzoate pathway, such as 4-hydroxybenzoate decarboxylase that participates in the transformation of phenol into hydroxybenzoate, amidase that transforms benzamide



into benzoate, and benzoyl phosphate phosphohydrolase that converts benzoyl phosphate into benzoate, were identified. All the genes encoding enzymes needed for chlorocyclohexane and

**TABLE 1 |** Molecular weight and polydispersity index of the PE-PU-A copolymer during cultivation with the BP8 community.

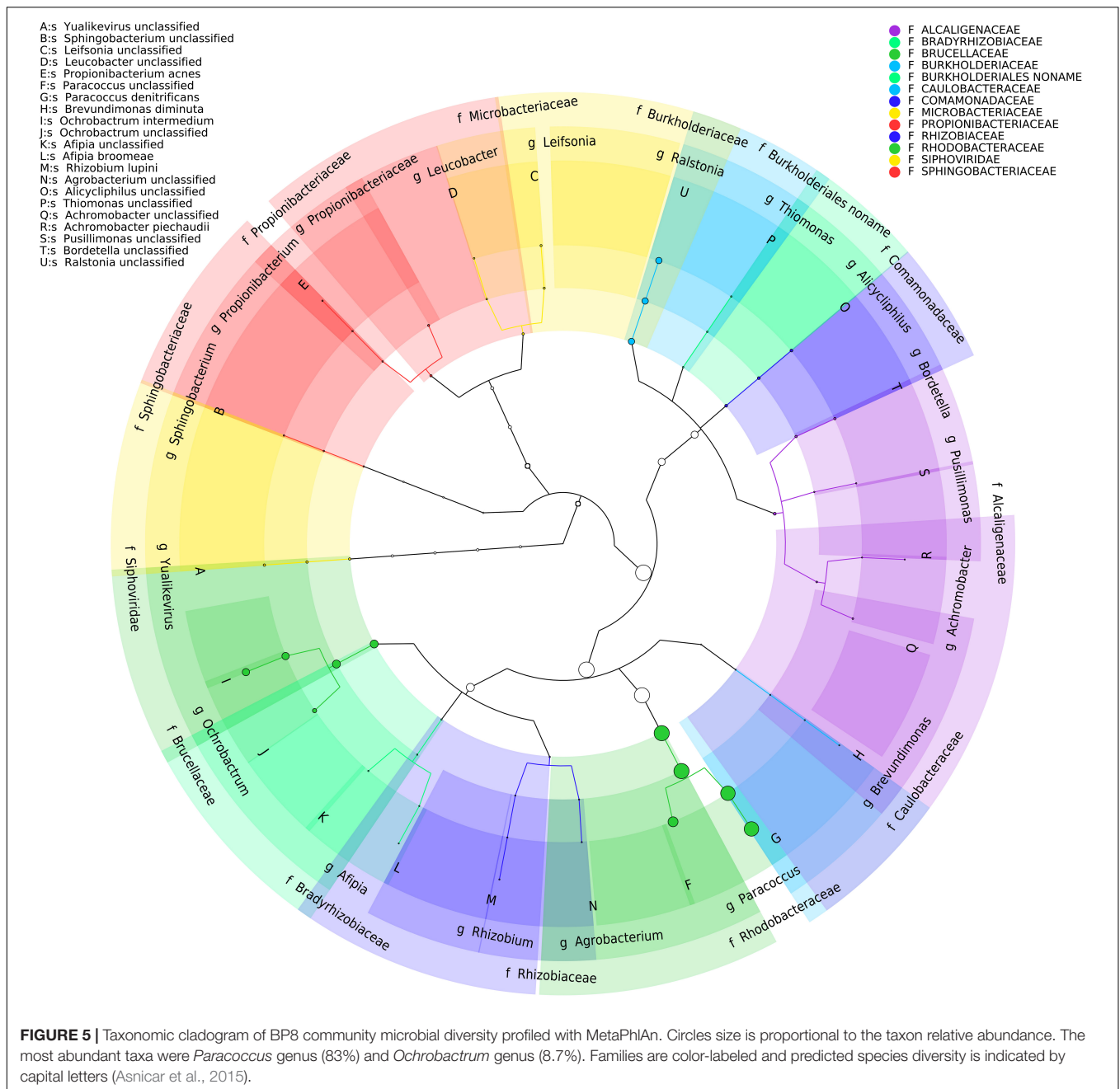
Culture time (days)	Mn (g/mol)	Mw (g/mol)	PDI
Non-inoculated	101,896 ± 8,098	208,490 ± 7,600	2.0 ± 0.3
5	96,798 ± 712	210,837 ± 26,098	2.2 ± 0.1
10	89,258 ± 5,825	223,581 ± 18,736	2.5 ± 0.3
15	82,577 ± 1,168	229,372 ± 26,416	2.7 ± 0.3
20	73,406 ± 9,225	187,925 ± 50,737	2.4 ± 0.3
25	65,609 ± 990	169,925 ± 5,080	2.6 ± 0.2

Number-average molecular weight (Mn), weight-average molecular weight (Mw) and polydispersity index (PDI) were calculated by Gel permeation chromatography with monodisperse polystyrene calibration standards and using THF as eluent.  $n = 3$ .

chlorobenzene degradation, the specific 2,4-dichlorophenol 6-monoxygenase, the enzymes that transform 4-chlorophenol to *cis*-acetylacrylate (EC 1.13.11.1, EC 5.5.1.1, and EC 3.1.1.45), and the 2-haloacid dehalogenase, which eliminates halogens from alkanes, were found. Likewise, genes encoding enzymes for *n*-alkanes degradation (Table 3 Alkanes metabolism), as well as all the enzymes for beta-oxidation were also detected.

### BP8 Community Phenotypic Potential to Biodegrade the Xenobiotic Additives of PolyLack® NMP Degradation

Genes encoding putative proteins for NMP degradation, with significant similarity (>40%) to the enzymes of *Alicyclophilus denitrificans* BQ1 (Solís-González et al., 2018) were identified in several BP8 genomes (Table 3). However, only in *Paracoccus* sp. BP8 a gene cluster (RQP05666.1–RQP05671.1) comparable to the BQ1 *nmp* cluster was identified.



## Isopropanol Degradation

Genes encoding proteins with significant similarity to NAD<sup>+</sup>-dependent secondary alcohol dehydrogenase (ADH) with capability to oxidize IP to acetone were identified in the BP8 metagenome (Kotani et al., 2003), but not the genes encoding the enzymes for the oxidative transformation of acetone. However, the three genes encoding acetone carboxylase that transforms acetone into acetoacetate were identified. Similarly, the genes encoding 3-oxoacid-CoA transferase, in *Paracoccus* sp. BP8, and acetoacetate-CoA ligase, in *O. intermedium* BP8.5, that convert, both of them, acetoacetate into acetoacetyl-CoA, were observed. Besides, genes for acetyl-CoA C-acetyltransferase,

which transforms acetoacetyl CoA to acetyl CoA that enters the TCA pathway, were also found in the BP8 metagenome (Figure 7A and Table 3).

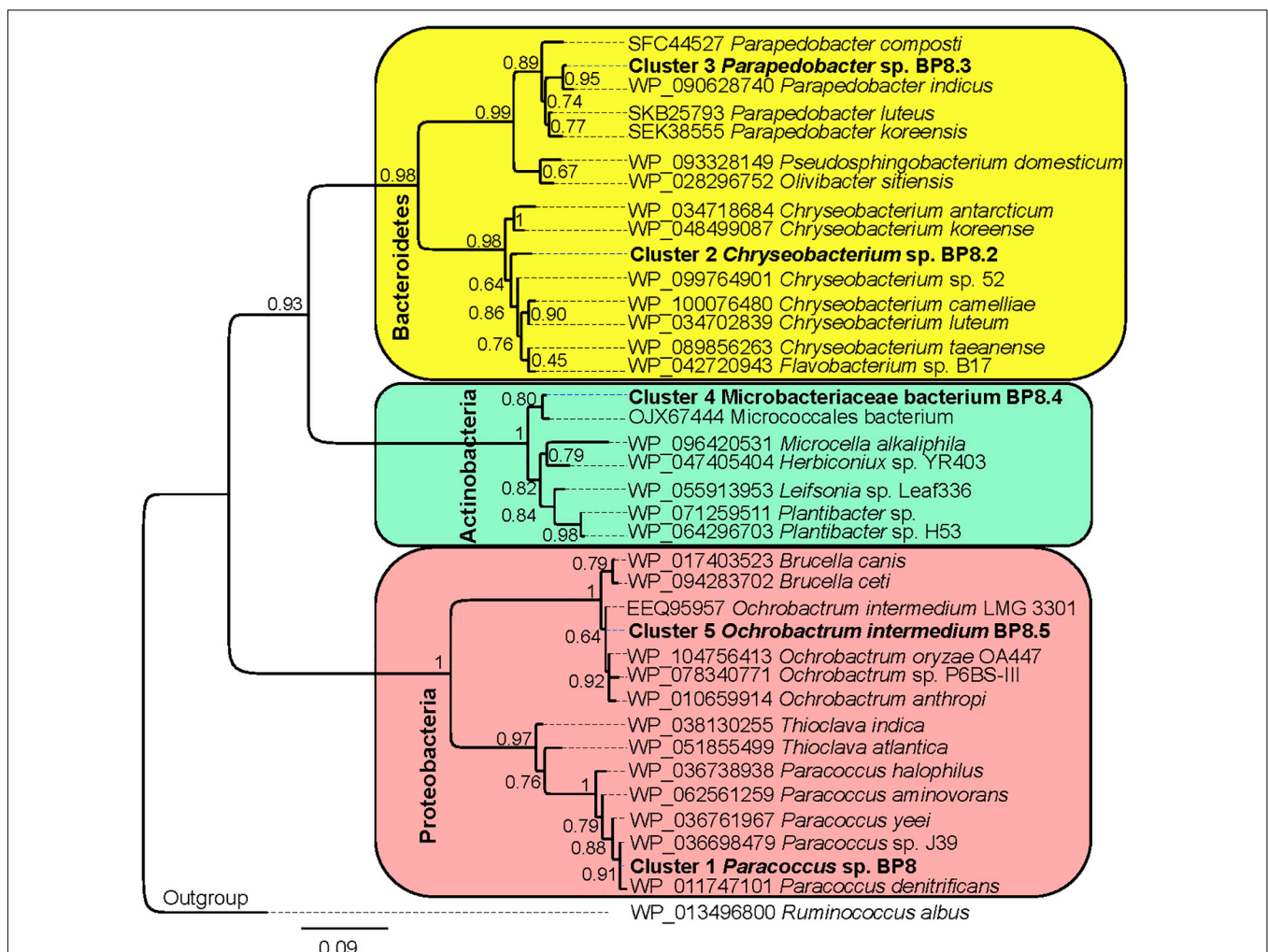
## Glycol Ethers Degradation

In the BP8 metagenome, homologous genes to polyethylene glycol (PEG)-degrading ADHs and aldehyde dehydrogenases (ALDHs) (Ohta et al., 2006; Tani et al., 2007), and diverse enzymes that could attack the ether bonds, such as glycolate oxidase (RQP04511.1, RQP04512.1, RQP04513.1, RQP11464.1, RQP19624.1, RQP19625.1, RQP16322.1, RQP16256.1), dye decoloring peroxidase (RQP04907.1, RQP09154.1) and

**TABLE 2 |** General features of the deconvoluted genomes from the BP8 metagenome.

Cluster ID	Genome Size (bp)	Num Contigs	Contig N50	<sup>a</sup> Completeness (%)	<sup>b</sup> Relative Abundance (%)	Novelty Score (%)	GC (%)	Identification	Genes assigned	Proteins assigned
1	4,275,656	282	51,004	89.4	57.7	1.6	67.8	<i>Paracoccus</i> sp. BP8	4,225	4,073
2	2,157,639	388	7,081	95.6	3.7	98.7	47.3	<i>Chryseobacterium</i> sp. BP8.2	2,253	2,185
3	5,478,545	1098	6,493	95.5	12.5	99.2	48.1	<i>Parapedobacter</i> sp. BP8.3	5,310	5,173
4	2,790,120	158	39,967	97.7	3.6	94.0	71.3	<sup>c</sup> <i>Microbacteriaceae</i> bacterium BP8.4	2,850	2,705
5	2,916,513	1146	2,823	71.0	22.5	2.5	58.4	<i>Ochrobactrum intermedium</i> BP8.5	3,472	3,162

<sup>a</sup>Completeness was calculated based on 40 single copy gene markers (Parks et al., 2015). All the genomes' drafts have at least 18 tRNAs and, except for cluster 5, at least one rDNA gene copy. <sup>b</sup>Relative abundance was normalized according to the reads distribution along the deconvoluted taxon. <sup>c</sup>For *Microbacteriaceae* bacterium BP8.4 no further classification was possible even that nine single-copy markers were analyzed.



**FIGURE 6 |** Maximum likelihood phylogeny for taxonomic delimitation of the deconvoluted genomes from the BP8 metagenome. The analysis was performed with three phylogenetic markers: ribosomal protein L3, ribosomal protein S5 and DNA gyrase A subunit, which generated similar results. The analysis for ribosomal protein L3 is presented. Branch support values are indicated in the corresponding nodes. Bar indicates the number of expected substitutions per site under the WAG + G model. A sequence of *Ruminococcus albus* (Firmicutes) was used as outgroup. Key genome clusters are highlighted in bold and different Phyla are indicated at the left. Sequences for L3 ribosomal proteins of the deconvoluted genomes are accessible in the NCBI GenBank under accession numbers RQP07704.1, RQP15098.1, RQP16503.1, RQP08603.1, and RQP16393.1 for clusters 1–5, respectively.



**TABLE 3** | Distribution of genes encoding relevant proteins involved in xenobiotics degradation in the BP8 metagenome.

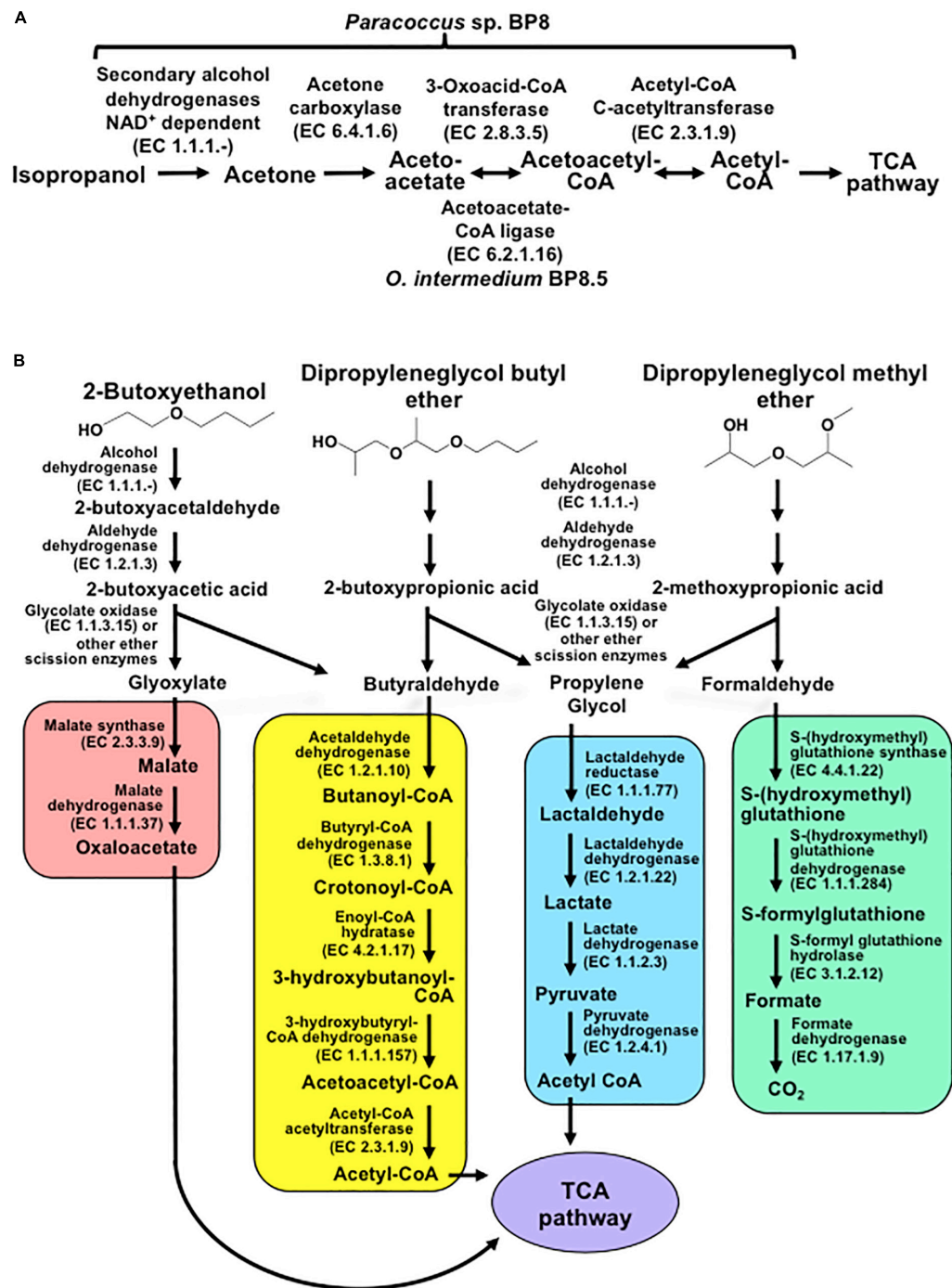
Activity	K Number	EC	Name	<i>Paracoccus</i> sp. BP8	<i>Chryseobacterium</i> sp. BP8.2	<i>Parapedobacter</i> sp. BP8.3	Microbacteriaceae bacterium BP8.4	<i>O. intermedium</i> BP8.5
<b>Benzoate and related compounds metabolism</b>								
Benzoate/toluate 1,2- dioxygenase	K05549	1.14.12.10	<i>benA-xylX</i>	1	–	–	–	–
	K05550		<i>benB-xylY</i>	1	–	–	–	–
	K05784	1.18.1.-	<i>benC-xylZ</i>	1	–	–	–	–
Dihydroxycyclohexadiene carboxylate dehydrogenase	K05783	1.3.1.25	<i>benD-xylL</i>	1	–	–	–	–
<i>p</i> -Hydroxybenzoate 3-monooxygenase	K00481	1.14.13.2	<i>pobA</i>	1	–	–	–	1
Catechol 1,2-dioxygenase	K03381	1.13.11.1	<i>catA</i>	1	–	–	–	–
Catechol 2,3-dioxygenase	K07104	1.13.11.2	<i>catE</i>	1	–	–	1	1
Protocatechuate 3,4-dioxygenase	K00448	1.13.11.3	<i>pcaG-pcaH</i>	1	–	–	–	1
	K00449			1	–	–	–	1
Muconate cycloisomerase	K01856	5.5.1.1	<i>catB</i>	1	–	–	1	–
3-Carboxy- <i>cis, cis</i> -muconate cycloisomerase	K01857	5.5.1.2	<i>pcaB</i>	1	–	–	–	1
Muconolactone isomerase	K01856	5.3.3.4	<i>catC</i>	1	–	–	–	–
4-Carboxymuconolactone decarboxylase	K01607	4.1.1.44	<i>pcaC</i>	2	–	–	–	1
Enol-lactone hydrolase	K01055	3.1.1.24	<i>pcaD</i>	3	–	–	–	1
$\beta$ -ketoacid:succinyl- CoA transferase,	K01031	2.8.3.6	<i>pcaI-pcaJ</i>	1	–	–	–	2
	K01032			1	–	–	–	1
$\beta$ -ketoacid:CoA thiolase	K00632	2.3.1.16	<i>pcaF</i>	–	1	1	1	1
2-Oxopent-4-enoate hydratase (benzoate)	K02554	4.2.1.80	<i>mhpD</i>	–	–	–	1	–
4-Hydroxy 2-oxovalerate aldolase	K01666	4.1.3.39	<i>mhpE</i>	–	–	–	2	–
Acetaldehyde dehydrogenase	K04073	1.2.1.10	<i>mhpF</i>	–	–	–	2	–
4-Methoxybenzoate monooxygenase ( <i>O</i> -demethylating)	K22553	1.14.99.15	CYP199A2	1	–	–	–	–
Carboxymethylene butanolidase	K01061	3.1.1.45	<i>clcD</i>	–	–	–	1	1
4-Hydroxybenzoate decarboxylase	K03186	4.1.1.61	<i>ubiX</i>	2	–	1	–	1
Amidase	K01426	3.5.1.4	<i>amiE</i>	1	–	–	1	1
Benzoyl phosphate phosphohydrolase	K01512	3.6.1.7	<i>acyP</i>	–	–	1	1	–
2,4-Dichlorophenol 6-monooxygenase	K10676	1.14.13.20	<i>tfdB</i>	1	–	–	–	–
2-Haloacid dehalogenase	K01560	3.8.1.2		2	–	–	–	1
<b>Alkanes metabolism</b>								
Alkane 1-monooxygenase	K00496	1.14.15.3	<i>alkB1_B2</i> <i>alkM</i>	2	–	–	–	–
Ferredoxin NAD <sup>+</sup> reductase component	K00529	1.18.1.3	<i>hcaD</i>	2	–	–	–	1
Unspecific monooxygenase	K00493	1.14.14.1		2	–	–	–	1
Long-chain-alkane monooxygenase	K20938	1.14.14.28	<i>LadA</i>	–	–	–	1	–
Alcohol dehydrogenase propanol preferring	K13953	1.1.1.1	<i>adhP</i>	2	–	1	–	1
Aldehyde dehydrogenase (NAD <sup>+</sup> dependent)	K00128	1.2.1.3	ALDH	6	2	–	–	3
Aldehyde dehydrogenase (NADP dependent)	K14519	1.2.1.4	<i>aldH</i>	–	1	–	–	–
Lipocalin family protein	K03098	–	<i>Blc</i>	–	1	1	–	1
Long chain fatty acid transport protein	K06076	–	<i>fadL</i>	1	–	–	–	–

(Continued)

TABLE 3 | Continued

Activity	K Number	EC	Name	<i>Paracoccus</i> sp. BP8	<i>Chryseobacterium</i> sp. BP8.2	<i>Parapedobacter</i> sp. BP8.3	Microbacteriaceae bacterium BP8.4	<i>O. intermedium</i> BP8.5
<b>N-methylpyrrolidone metabolism</b>								
<i>N</i> -methylhydantoin amidohydrolase	K01473	3.5.2.14	<i>nmpA</i>	5	–	–	–	1
	K01474		<i>nmpB</i>	5	–	–	1	–
Aminoacid oxidase	–	–	<i>nmpC</i>	3	–	–	2	1
Succinate-semialdehyde dehydrogenase	K00135	1.2.1.16	<i>nmpF</i>	7	–	1	2	1
<b>Isopropanol metabolism</b>								
<sup>a</sup> Alcohol dehydrogenase propanol preferring	K13953	1.1.1.-	<i>adh1</i>	1	–	–	–	–
Alcohol dehydrogenase	K18369	1.1.1.-	<i>adh2</i>	2	–	–	–	–
<sup>b</sup> Aldehyde dehydrogenase	K00138	1.2.1.-	<i>adh3</i>	1	–	–	1	–
	K10854		<i>acxB</i>	1	–	–	–	–
Acetone carboxylase	K10855	6.4.1.6	<i>acxA</i>	1	–	–	–	1
	K10856		<i>acxC</i>	1	–	–	–	–
3-Oxoacid-CoA transferase	K01028	2.8.3.5		1	1	1	1	–
	K01029			1	1	1	1	–
Acetoacetate-CoA ligase	K01907	6.2.1.16	<i>acsA</i>	–	–	–	–	1
Acetyl-CoA C-acetyltransferase	K00626	2.3.1.9	<i>atoB</i>	10	1	1	3	5
<b>Glycol ethers and polypropylene glycols metabolism</b>								
<sup>c</sup> Alcohol dehydrogenase,	–	1.1.1.-	<i>pegdh</i>	3	–	–	–	3
<sup>d</sup> Aldehyde dehydrogenase	–	1.2.1.3	<i>pegC</i>	3	–	–	1	–
Glycolate oxidase	K00104	1.1.3.15	<i>glcD</i>	1	–	–	–	2
	K11472		<i>glcE</i>	1	–	–	–	1
	K11473		<i>glcF</i>	1	–	–	1	1
Superoxide dismutase	K04564	1.15.1.1	SOD2	–	1	3	1	1
	K04565		SOD1	1	1	–	–	–
Dye decoloring peroxidase	K15733	1.11.1.19	<i>DyP</i>	1	–	–	1	–
Glutathione S-transferase	K00799	2.5.1.18	<i>gst</i>	11	–	–	–	8
Acyl Co-A synthetase	K01897	6.2.1.3	ACSL	2	3	2	2	1
S-(hydroxymethyl) glutathione dehydrogenase	K00121	1.1.1.284	<i>frmA</i>	3	–	–	–	2
S-formylglutathione hydrolase	K01070	3.1.2.12	<i>fghA</i>	1	–	–	–	1

<sup>a</sup>*Adh1* was identified by BLAST analysis using the *adh1* sequence (Acc. num. BAD03962.1) reported for *Gordonia* sp. TY-5 (Kotani et al., 2003) as query (Query cover >99%; E-value =4E-42; Identity 34%). The gene accession number in the BP8 metagenome is RQP06405.1. <sup>b</sup>*Adh3* genes were identified by BLAST analysis using the *adh3* sequence (Acc. num. BAD03965.1) reported for *Gordonia* sp. TY-5 (Kotani et al., 2003) as query (Query cover = 97%; E-value = 1E-97; Identity = 38.8%). The gene accession numbers in the BP8 metagenome are RQP06404.1 and RQP13157.1. These genes were classified as aldehyde dehydrogenases by KEGG, similarly as described in Kotani et al. (2003). <sup>c</sup>*Pegdh* genes were identified by BLAST analysis using the polyethylene glycol dehydrogenase sequence (*pegdh*) from *Sphingopyxis terrae* (Acc. num. BAB61732) (Ohta et al., 2006) as query (Query cover = 97%; E-value = 2.0E-122; Identity = 38.5%). The gene accession numbers in the BP8 metagenome are RQP05609.1, RQP06903.1, RQP07092.1, RQP19606.1, RQP18819.1, RQP20974.1. <sup>d</sup>*Pegc* genes were identified by BLAST using polyethylene glycol aldehyde dehydrogenase sequence from *Sphingopyxis macrogoltabida* (Acc. num. BAF98449.1) (Tani et al., 2007) as query (Query cover = 98%; E-value = 1.0E-80; Identity = 38%; Similarity = 56%). The gene accession numbers in the BP8 metagenome are RQP06197.1, RQP04172.1, RQP06015.1, RQP13157.1. Only RQP06197.1 was identified as K00128 by KEGG.



**FIGURE 7 |** Potential degradation pathways for isopropanol (A) and glycol ethers (B) encoded in the BP8 metagenome. (A) *Paracoccus* sp. BP8 genome encodes ADH enzymes that can oxidize IP to acetone, but genes encoding enzymes for the oxidative metabolism of acetone were not found. Instead, genes encoding the reductive transformation of acetone to acetyl CoA, acetone carboxylase, 3-oxoacid-CoA transferase and acetyl-CoA C-acetyltransferase, were identified. In *O. intermedium* BP8.5 genome, acetoacetate-CoA ligase, which performs the same reaction that 3-oxoacid-CoA transferase, is encoded. All the enzymes for the TCA pathway are encoded in the BP8 metagenome (see **Table 3**). (B) Subsequent oxidations of glycol ethers' hydroxy terminal groups by PEG-DH and PEG-ALDH will produce 2-butoxyacetic acid from 2-BE, 2-butoxypropionic acid from DPGB and 2-methoxypropionic acid from DPGM. Subsequent cleavage of carboxylates' ether bonds by ether scission enzymes such as glycolate oxidase, dye decoloring peroxidase, 4-methoxybenzoate monooxygenase and/or unspecific monooxygenase, would generate the metabolizable intermediaries glyoxylate, butyraldehyde, propylene glycol and formaldehyde. Glyoxylate would be funneled to the glyoxylate metabolism (red rectangle), butyraldehyde to the butanoate metabolism (yellow rectangle), propylene glycol to the pyruvate metabolism (blue rectangle), and formaldehyde to the formate metabolism (green rectangle). Pathways for glyoxylate, butanoate, pyruvate and formate metabolisms as well as the TCA pathway (purple ellipse) were fully reconstructed from the BP8 metagenome based on KEGG annotated genes, using KEGG Mapper.

superoxide dismutase (RQP04715.1, RQP13424.1, RQP09887.1, RQP11889.1, RQP18047.1, RQP18034.1, RQP09190.1, RQP20377.1), as well as genes encoding enzymes involved in glutathione metabolism, which have been proposed to participate in PEG metabolism (Somyoosap et al., 2008) were identified (Figure 7B and Table 3).

## BP8 Community Phenotypic Potential to Biodegrade Polyurethane

Genes encoding PU-esterases verified for PU degradation (Nomura et al., 1998; Stern and Howard, 2000; Ufarté et al., 2017) and confirmed carbamate-hydrolyzing enzymes, i.e., arylamidase A (Zhang et al., 2012), amidase (Yun et al., 2016), urethanase (Liu et al., 2016), and carbaryl hydrolase (Hashimoto et al., 2006), were searched by standalone BLASTP analyses. Six and five sequences with similarity to PU-esterases and carbamate hydrolases were retrieved from the BP8 metagenome, respectively (Table 4). We also identified genes encoding ureases (EC 3.5.1.5), suggested to act on PU degradation (Yang et al., 2015), in *Parapedobacter* sp. BP8 (RQP19536.1, RQP19537.1, RQP19538.1) and *O. intermedium* BP8.5 (RQP17756.1, RQP17448.1, RQP17449.1, RQP17450.1) genomes.

## DISCUSSION

### The BP8 Microbial Community Displays a Diauxic Growth Phase That Seems Not to Be Based on the Utilization of Different Carbon Sources

To elucidate the mechanisms that landfill microbial communities perform to degrade the recalcitrant PE-PU plastic, we studied the degradative activity of the selected BP8 microbial community because of its capability to grow in PolyLack®. PolyLack® is a WPUD that contains a proprietary PE-PU-A copolymer and several xenobiotic additives (NMP, IP, 2-BE, DPGB and DPGM). Chemical and physical analyses demonstrated that BP8 consumes the additives and breaks the copolymer. Hi-C based metagenomic analysis allowed us to unveil the phenotypic potential to degrade PU and xenobiotics of five deconvoluted genomes from the community. The diauxic growth of BP8 observed during 25 days of cultivation in MM-PolyLack suggested that two different metabolic processes were involved in degrading the components of the WPUD. We hypothesized that the additives were consumed during the first phase whereas the copolymer was broken during the second one. However, the biomass increment and the carbon decrease observed in the first growth phase (Figure 1A) resulted not only from additive consumption, but also from the copolymer breakdown (Figures 2, 4, Table 1, Supplementary Figure S1, and Supplementary Tables S1, S2). The simultaneous degradation of additives and copolymer observed in this analysis do not account for the diauxic behavior of the community. Interestingly, based on the slight *M<sub>w</sub>* increase and the continuous *M<sub>n</sub>* decrease of the copolymer observed during the first 15 days of cultivation, clearly observed in the MWD analysis, we suggest that BP8 community might

preferentially attack low molecular weight fractions. Thus, the larger molecules would remain in the culture media and would be cleaved after 15 days of cultivation as evidenced by the continuous decrease in *M<sub>n</sub>* and the steep decrease on *M<sub>w</sub>* observed from 15 to 25 days (Table 1 and Supplementary Figure S2). Changes in these parameters resulting from polymer biodegradation have been reported for polyethylene (Albertsson et al., 1998) and polystyrene (Yang et al., 2018). Therefore, it seems that an enhanced PU-degrading community, able to attack more complex polymers could be selected after 15 days of cultivation, coincidental with the second exponential growth phase. Further studies to test this possibility are needed.

### The BP8 Microbial Community Exhibits Variable Cell-Surface Interactions That Could Be Involved in the Biodegradation Process

PolyLack® additives and copolymer, as well as the degradation products generated by BP8 activity, have effects on the emulsifying capacity of the culture medium, consequently in cell-substrate interactions that have impact on the biodegradation process. PolyLack® has intrinsic emulsifying properties provided by the additives and PE-PU-A copolymers (Honarkar, 2018), which determine the initial *EI<sub>24</sub>* of the culture medium (70%) (Figure 1B). The initial and almost complete additives degradation during the first 5 days of cultivation accounts for a 5% decrement in the *EI<sub>24</sub>* (Figure 2A and Supplementary Table S1). The larger loss of the emulsifier capacity observed from 5 to 20 days must be the result of hydrophilic moieties cleavage from the copolymer. The further increase observed in this parameter might be generated by BP8 biosurfactant production. Surfactants enhance substrate bioaccessibility and modify cell hydrophobicity improving biodegradation (Tzintzun-Camacho et al., 2012). CSH reflects the capability of BP8 cells to attach the PE-PU-A hydrophobic moieties and other hydrophobic components of the culture medium, favoring cell-substrate interactions that enhance biodegradation. The variability in CSH behavior during the cultivation period is consequence of modifications on cell envelopes composition and properties induced by changes in the culture medium. The changes in CSH and *EI<sub>24</sub>* observed in this experiments reveal the complex cell-substrate interactions involved in promoting BP8 accessibility to PolyLack®, hence its biodegradation.

### The BP8 Metagenomic Analysis Allowed to Identify Known Additive- and PU-Degrading Enzymes and to Propose New Activities and Metabolic Pathways Involved in Biodegradation

Exploring the BP8 metagenome, genes encoding enzymes presumably involved in the degradation of the PolyLack® additives were identified in several of the deconvoluted genomes. Genes for NMP degradation, similar to the ones reported for *A. denitrificans* BQ1 (Solís-González et al., 2018) were identified in the *Paracoccus* sp. BP8 genome. *Paracoccus* strains, able

**TABLE 4** | Esterases and carbamate hydrolyzing enzymes encoded in the BP8 metagenome.

Enzyme Query Organism (Accession number)	E.C. num.	Amino acids in the query	Hit in the BP8 metagenome	E value/ <sup>a</sup> Identity/ Similarity	Amino acids in the hit	References
Polyurethane esterase <i>Delftia acidovorans</i> (BAA76305)	3.1.1.6	548	<i>Parapedobacter</i> sp. BP8.3 (RQP17780.1)	1.0E-07/ 32%/48%	640	Nomura et al., 1998
Polyurethanase esterase A <i>Pseudomonas chlororaphis</i> (AAD22743)	3.1.1.-	617	<i>Paracoccus</i> sp. BP8 (RQP07762.1)	4.0E-16/ 34%/50%	783	Stern and Howard, 2000
			<i>Paracoccus</i> sp. BP8 (RQP06646.1)	2.0E-14/ 33%/46%	980	
			<i>Paracoccus</i> sp. BP8 (RQP04598.1)	7.0E-12/ 30%/43%	854	
			<i>Paracoccus</i> sp. BP8 (RQP06839.1)	5.0E-12/ 32%/43%	612	
Esterase CE_Ubrb uncultured bacterium (SIP63154)	3.1.1.-	295	<i>Microbacteriaceae</i> bacterium BP8.4 (RQP12977.1)	8.0E-05/ 35%/48%	309	Ufarté et al., 2017
Arylamidase A <i>Paracoccus huijuniae</i> (AEX92978)	3.4.11.2	465	<i>Paracoccus</i> sp. BP8 (RQP04489.1)	6.0E-25/ 41%/52%	471	Zhang et al., 2012
Amidase <i>Ochrobactrum</i> sp. TCC-2 (ANB41810)	3.5.1.4	474	<i>Microbacteriaceae</i> bacterium BP8.4 (RQP11486.1)	2.0E-47/ 35%/49%	475	Yun et al., 2016
			<i>O. intermedium</i> BP8.5 (RQP19215.1)	6.0E-24/ 39%/50%	326	
Urethanase <i>Lysinibacillus fusiformis</i> (KU353448)	3.5.1.4	472	<i>Microbacteriaceae</i> bacterium BP8.4 (RQP12064.1)	1.0E-60/ 32%/48%	499	Liu et al., 2016
Carbaryl hydrolase <i>cahA</i> <i>Arthrobacter</i> sp. RC100 (BAC15598)	3.6.3.5	506	<i>Paracoccus</i> sp. BP8 (RQP06118.1)	1.0E-15/ 35%/48%	326	Hashimoto et al., 2006

to utilize NMP as carbon source, have been reported (Cai et al., 2014), but the genes sustaining this capability have not been described. IP biodegradation occurs by oxidative pathways in *P. denitrificans* GH3 and *Gordonia* sp. TY-5. In these strains, IP is transformed by NAD<sup>+</sup>-dependent secondary ADH into acetone that is oxidized by a specific monooxygenase to produce methyl acetate, which is transformed to acetic acid and methanol (Kotani et al., 2003; Geng et al., 2015). However, the enzymes for metabolizing acetone by these reactions are not encoded in the BP8 metagenome. Instead, genes encoding the enzymes acetone carboxylase, 3-oxoacid-CoA transferase, and acetyl-CoA C-acetyltransferase were identified. These enzymes would produce acetoacetate, acetoacetyl-CoA and acetyl-CoA, respectively (Schühle and Heider, 2012) (Figure 7A and Table 3). The possibility that IP degradation occurs by transformation to acetyl-CoA, via acetone in BP8 is supported by the observation that in the *Paracoccus* sp. BP8 genome, a gene encoding an ADH (RQP05888.1), homologous to the *Gordonia* sp. TY-5 *adh2*, and genes encoding the acetone carboxylase subunits (RQP05866.1, RQP05867.1, RQP05889.1) are contiguously located. Adjacent to these genes, a sequence encoding a sigma-54-dependent transcriptional regulator (RQP05868.1) was observed, suggesting an operon-like organization. This presumptive IP degradative operon has not been described in any other bacteria. Degradation of 2-BE, DPGM and DPGB, the glycol ethers present in PolyLack®,

has not been reported in bacteria. Degradation pathways for PEG and polypropylene glycol (PPG) reported in *Sphingomonads* species and *Microbacterium* (formerly *Corynebacterium*) sp. No. 7 (Kawai, 2010; Ohtsubo et al., 2015) show similar reactions where the glycols' hydroxyl terminal groups are sequentially oxidized by specific ADHs and ALDHs to produce aldehydes, and thereafter carboxylic acids (Ohta et al., 2006; Tani et al., 2007), suggesting a widespread strategy for glycol ethers metabolism in prokaryotes. Nevertheless, few enzymes involved in scission of ether bonds, present in these compounds, have been identified in bacteria. A glycolic acid oxidase (Yamanaka and Kawai, 1991) and a glycolic acid dehydrogenase (Enokibara and Kawai, 1997) have been reported acting on PEG, although several other enzymes such as superoxide dismutase, monooxygenase, ether hydrolase, carbon-oxygen lyase, peroxidase and laccase have been suggested (Kawai, 2010). Homolog genes for specific ADHs and ALDHs were identified in the *Paracoccus* sp. BP8 genome (Table 3). Therefore, we hypothesize that degradation of 2-BE could be carried out by subsequent oxidations of the hydroxy terminal groups by PEG-DH and PEG-ALDH to produce 2-butoxyacetic acid, followed by scission of the ether bonds by glycolate oxidase or other ether scission enzymes to produce, glyoxylate and butyraldehyde (Tachibana et al., 2002; Kawai, 2010). Glyoxylate would be funneled to the glyoxylate metabolism and butyraldehyde to the butanoate metabolism (Figure 7B, left). DPGB and DPGM can be respectively

degraded, by initial oxidation of the hydroxy terminal groups, to 2-butoxypropionic acid and to 2-methoxypropionic acid that has been reported as a metabolite in the degradation of DPGM by rats (Miller et al., 1986). These carboxylates can be ether-cleaved by ether scission enzymes to produce butyraldehyde and propylene glycol from DPGM and propylene glycol and formaldehyde from DPGM. Propylene glycol can be funneled to the pyruvate metabolism by lactaldehyde and lactate dehydrogenases, as suggested in *P. yeii* TT13 (Lim et al., 2018) and formaldehyde can enter to the formate metabolism where glutathione-dependent enzymes would oxidize it to formate and, subsequently, to CO<sub>2</sub> (Figure 7B and Table 3). Genes encoding homologs for PEG-DH and PEG-ALDH (*pegdh* and *pegc*) from *Sphingopyxis terrae* and *S. macrogotabida*, and for possible ether scission enzymes that could act over the aforementioned carboxylic acids, glycolate oxidase (*glcD*, *glcE*, *glcF*), dye decoloring peroxidase, 4-methoxybenzoate monooxygenase and unspecific monooxygenase were identified in *Paracoccus* sp. BP8 (see Table 3). Besides, the pathways for glyoxylate, butanoate, pyruvate and formate metabolisms as well as the TCA pathway were fully reconstructed from the BP8 metagenome (Figure 7B). Additionally, in PEG metabolism, long chains of PEG-carboxylate can be processed by acyl-CoA synthetase and glutathione-S transferase forming glutathione-conjugates (Somyoonsap et al., 2008). Although these reactions would not be needed for glycol ethers catabolism, they could be required for the degradation of long PPG moieties that are part of the PE-PU-A copolymer (Figure 3A).

By using different analytical techniques, we demonstrate that the BP8 community attacks the main functional groups of the PE-PU-A copolymer; from the more enzymatically susceptible ester bonds, present in acrylate and carbamate, to the more recalcitrant C-C from aliphatics and aromatics, C-N from urethane, and C-O-C from ether bonds of PPG (Figures 2–4). The changes in the chemical and physical properties of the polymer when incubated with BP8, and the generation of diverse degradation products, some of them potential metabolic intermediates in the degradation process, are evidences of the BP8's degradative capability, which is sustained by the diverse xenobiotic degrading enzymes encoded in its metagenome (Table 3). Some of the biodegradation products (Figure 2B and Supplementary Table S2) seem to be the result of oxidative reactions on C-C bonds flanking TDI, MDI or the acrylates' styrene ring (Figures 3A, 4), generating aromatic compounds containing hydroxyl, aldehydes or organic acids. Additionally, the copolymer aromatic compounds could be destabilized by monooxygenases, which introduces hydroxyl groups to the aromatic rings, and by dioxygenases that catalyzes reductive dihydroxylation, generating central intermediates that can be cleaved by dearomatizing dioxygenases producing carboxylic acids (Ladino-Orzuola et al., 2016). The enzymes for the complete benzoate metabolism are encoded in the BP8 metagenome and could account for PE-PU-A aromatic rings catabolism (Table 3). Aliphatic chains from acrylates and PPG can be metabolized by alkane 1-monooxygenases, that activate aliphatic chains by terminal or subterminal oxidations and by the activities of ADHs and ALDHs, generating compounds that can be channeled by beta-oxidation into the fatty acids metabolism (Table 3).

If terminal oxidations are introduced, primary alcohols are generated and transformed into aldehydes, carboxylic acids and acyl-CoA. If subterminal oxidations of aliphatic chains occur, secondary alcohols are formed, which upon breakdown, will produce ketones and thereafter esters, which are hydrolyzed to alcohol and organic acids (Rojo, 2009). Many different esters compounds were identified in the BP8's degradation products, suggesting that sub-terminal oxidation of alkanes could be an important route in PU metabolism (Figures 2–4). The cleavage of ester bonds by PU-esterases would produce alcohols and organic acids and the cleavage of urethane groups by carbamate-hydrolases would produce nitrogen-containing compounds and aromatic isocyanate derivatives. As we detected these degradation products by GC-MS analysis (Figure 2B, Supplementary Figure S1 and Supplementary Table S2), hydrolysis of ester and urethane bonds are accomplished during PE-PU-A degradation by BP8. The identification of several PU-esterases and carbamate hydrolases encoded in most of the BP8 genomes support this conclusion (Table 4).

### The Biodegradative Activity in BP8 Community Seems to Be Dominated by the Most Abundant Species, but Specialized Reactions Seem to Occur in Poorly Represented Species

The metabolic reactions proposed for the degradation of the additives and the PE-PU-A copolymer present in PolyLack® by the BP8 community are based on the phenotypic potential encoded in its metagenome. The use of Hi-C proximity ligation-based technology allowed to define, with high confidence, what genes belong to each of the different species of BP8 (Table 3). In this community, xenobiotic degradation is a niche dominated by *Paracoccus* sp. BP8 and *Ochrobactrum intermedium* BP8.5. In their genomes, key enzymes for different steps of biodegradation are widely represented (Table 3), which must be the reason for their preponderance in the BP8 community. In addition, *Microbacteriaceae* bacterium BP8.4 genome encodes enzymes for the metabolism of aromatic compounds suggesting that metacleavage ring excision and muconate lactone formation might be functional. On the other hand, *Chryseobacterium* sp. BP8.2 and *Parapedobacter* sp. BP8.3 genomes, harbor genes encoding complementary metabolic activities for alkanes oxidation, such as hydrolysis and oxidation of linear intermediates. The finding of such a diverse genetic repertoire in the BP8 metagenome suggests a remarkable metabolic versatility, with strong hydrolytic and oxidative capabilities that can play significant roles in the degradation of diverse environmental contaminants. The abundance and distribution of these catabolic enzymes among the different members of the BP8 community, suggest syntrophic mechanisms driving community behavior. However, incomplete genome reconstruction in the deconvolution analysis, resulting in potential pathway gaps in certain genomes, cannot be ruled out, nor can the collapsing of multiple strains into a single cluster. On the other hand, although *Paracoccus* and *Ochrobactrum* are predominant in the BP8 community by far, we cannot discard that specific enzymatic activities encoded in genomes

of little abundant species can be crucial for the successful performance of BP8.

## The BP8 Microbial Community as a Promising Source for Environmental Biotechnology Strategies

The present work provides deep understanding of the biodegradative activity of a landfill microbial community capable of PU and xenobiotics degradation. Results reveal the taxonomic composition of the BP8 community and its outstanding phenotypic potential, reflected in the catalytic capabilities displayed by its members to cleave different recalcitrant functional groups. This is one of the few studies integrating analytical chemistry with metagenomics for proposing metabolic pathways involved in xenobiotics biodegradation, and the first metagenomic analysis of a PU-degrading selected landfill community. Moreover, the knowledge generated about the members of the BP8 community, the potential metabolic pathways involved in PU and additives degradation, and in which species specific enzymatic reactions are carried out, could be exploited for our benefit. Some possibilities include the assembling of specific consortia for increased PU-degrading ability, the overexpression of additives- or PU-degrading proteins to be used in environmental biotechnology strategies for waste treatment, or the development of new biocatalyzers for novel industrial applications. Altogether, these features place BP8 community as a quite promising source for developing environmental biotechnology strategies contributing to mitigate anthropogenic plastics and xenobiotics pollution, for achieving better environmental quality.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study can be accessed from GenBank under BioProject Accession number: PRJNA488119. The microbial shotgun “*de novo*” assembly and the log file for the assembly run done with metaSPAdes software were deposited at Mendeley: <https://data.mendeley.com/datasets/bkwf2xhytj/1>.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

IG, AS-R, MB, MV-S, IL, and HL-T contributed to conception and design of the study. IG and MB conducted the analytical techniques and interpreted the results along with MC-G and HL-T. IL, MP, and SS performed metagenomics experiments.

## REFERENCES

- Albertsson, A. C., Erlandsson, B., Hakkarainen, M., and Karlsson, S. (1998). Molecular weight changes and polymeric matrix changes correlated with the formation of degradation products in biodegraded polyethylene. *J. Environ. Pol. Degrad.* 6, 187–195. doi: 10.1023/A:1021873631162
- Álvarez-Barragán, J., González-Hernández, R., Domínguez-Malfavón, L., Vargas-Suárez, M., Aguilar-Osorio, G., and Loza-Tavera, H. (2016). Biodegradative activity of selected environmental fungi on a polyester polyurethane varnish

AS-R and HL-T analyzed the metagenomic data. IG, AS-R, MB, MV-S, IL, MC-G, and HL-T wrote the manuscript. All authors contributed to manuscript revision, read and approved the submitted version.

## FUNDING

This work was funded by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México grants IN217114, IN223317, and IN227620, and Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, grant 5000-9117. IL, MP, and SS were supported in part by NIAID grant 2R44AI122654-02A1.

## ACKNOWLEDGMENTS

IG and MB acknowledge Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for their Ph.D. scholarships and to Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM and Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM for the supports granted during their Ph.D. studies. AS-R acknowledges Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, for his scholarship for a postdoctoral position at Facultad de Química, UNAM. We thank Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria, Facultad de Química, UNAM for the analytical support provided by Ch. Marisela Gutiérrez Franco, Ch. Rafael Iván Puente Lee, Ch. Víctor Hugo Lemus, and Ch. Elvira del Socorro Reynosa in the FTIR, SEM, carbon quantification, and DTG, respectively. The technical support of MSc. Fernando de Jesús Rosas Ramírez in the use of the GC-MS equipment is appreciated. Also, we are grateful to Gerardo Cedillo, Salvador López and Karla E. Reyes from Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM-UNAM) for their assistance in NMR, GPC, and DSC analyses, respectively, and to Taylor Reiter and C. Titus Brown for help with metagenomic analysis. This manuscript has been released as a preprint at bioRxiv, first posted online September 8, 2019; <http://dx.doi.org/10.1101/760637> (Gaytán et al., 2019).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02986/full#supplementary-material>

- and polyether polyurethane foams. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 5225–5235. doi: 10.1128/AEM.01344-1316
- Asnicar, F., Weingart, G., Tickle, T. L., Huttenhower, C., and Segata, N. (2015). Compact graphical representation of phylogenetic data and metadata with GraPhlAn. *PeerJ* 3:e1029. doi: 10.7717/peerj.1029
- Breitwieser, F. P., Perteua, M., Zimin, A. V., and Salzberg, S. L. (2019). Human contamination in bacterial genomes has created thousands of spurious proteins. *Genome Res.* 29, 954–960. doi: 10.1101/gr.24537.3.118

- Burton, J. N., Liachko, I., Dunham, M. J., and Shendure, J. (2014). Species-level deconvolution of metagenome assemblies with Hi-C-based contact probability maps. *G3* 4, 1339–1346. doi: 10.1534/g3.114.011825
- Cai, S., Cai, T., Liu, S., Yang, Q., He, J., Chen, L., et al. (2014). Biodegradation of N-methylpyrrolidone by *Paracoccus* sp. NMD-4 and its degradation pathway. *Int. Biodeterior. Biodeg.* 93, 70–77. doi: 10.1016/j.ibiod.2014.04.022
- Cipriani, E., Bracco, P., Kurtz, S. M., Costa, L., and Zanetti, M. (2013). In-vivo degradation of poly(carbonate-urethane) based spine implants. *Pol. Degrad. Stabil.* 98, 1225–1235. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2013.03.005
- Cooper, D. G., and Goldenberg, B. G. (1987). Surface active agents from *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 224–229.
- Cornille, A., Auvergne, R., Figovsky, O., Boutevin, B., and Caillol, S. (2017). A perspective approach to sustainable routes for non-isocyanate polyurethanes. *Eur. Pol. J.* 87, 535–552. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2016.11.027
- Cregut, M., Bedas, M., Durand, M. J., and Thouand, G. (2013). New insights into polyurethane biodegradation and realistic prospects for the development of a sustainable waste recycling process. *Biotechnol. Adv.* 31, 1634–1647. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.08.011
- Enokibara, S., and Kawai, F. (1997). Purification and characterization of an ether bond-cleaving enzyme involved in the metabolism of polyethylene glycol. *J. Ferment. Bioeng.* 83, 549–554. doi: 10.1016/S0922-338X(97)81135-X
- Ferrero, P., San-Valero, P., Gabaldón, C., Martínez-Soria, V., and Peña-Roja, J. M. (2018). Anaerobic degradation of glycol ether-ethanol mixtures using EGSB and hybrid reactors: performance comparison and ether cleavage pathway. *J. Environ. Manag.* 213, 159–167. doi: 10.1016/j.jenvman.2018.02.070
- Gamerith, C., Herrero, A. E., Pellis, A., Ortner, A., Vielnascher, R., Luschning, D., et al. (2016). Improving enzymatic polyurethane hydrolysis by tuning enzyme sorption. *Pol. Degrad. Stabil.* 132, 69–77. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2016.02.025
- Gaytán, I., Sánchez-Reyes, A., Burelo, M., Vargas-Suárez, M., Liachko, I., Press, M., et al. (2019). Degradation of recalcitrant polyurethane and xenobiotic additives by a selected landfill microbial community and its biodegradative potential revealed by proximity ligation-based metagenomic analysis. *BioRxiv* [Preprint]. doi: 10.1101/760637
- Geng, Y., Deng, Y., Chen, F., Jin, H., Tao, K., and Hou, T. (2015). Biodegradation of isopropanol by a solvent-tolerant *Paracoccus denitrificans* strain. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 45:4919. doi: 10.1080/10826068.2014.923452
- Gite, V. V., Mahulikar, P. P., and Hundiwal, D. G. (2010). Preparation and properties of polyurethane coatings based on acrylic polyols and trimer of isophorone diisocyanate. *Prog. Org. Coat.* 68, 307–312. doi: 10.1016/j.porgcoat.2010.03.008
- Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O. (2010). SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221–224. doi: 10.1093/molbev/msp259
- Hashimoto, M., Mizutani, A., Tago, K., Ohnishi-Kameyama, M., Shimojo, T., and Hayatsu, M. (2006). Cloning and nucleotide sequence of carbaryl hydrolase gene (*cahA*) from *Arthrobacter* sp. RC100. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 410–414. doi: 10.1263/jbb.101.410
- Honarkar, H. (2018). Waterborne polyurethanes: a review. *J. Disper. Sci. Technol.* 39, 507–516. doi: 10.1080/01932691.2017.1327818
- Kanehisa, M., Sato, Y., and Morishima, K. (2016). BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *J. Mol. Biol.* 428, 726–731. doi: 10.1016/j.jmb.2015.11.006
- Kawai, F. (2010). The biochemistry and molecular biology of xenobiotic polymer degradation by microorganisms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 1743–1759. doi: 10.1271/bbb.100394
- Kotani, T., Yamamoto, T., Yurimoto, H., Sakai, Y., and Kato, N. (2003). Propane monooxygenase and NAD<sup>+</sup>-dependent secondary alcohol dehydrogenase in propane metabolism by *Gordonia* sp. strain TY-5. *J. Bacteriol.* 185, 7120–7128. doi: 10.1128/JB.185.24.7120-7128.2003
- Ladino-Orzuela, G., Gomes, E., da Silva, R., Salt, C., and Parsons, J. R. (2016). Metabolic pathways for degradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Rev. Environ. Contamination Toxicol.* 237, 105–121. doi: 10.1007/978-3-319-23573-8-5
- Lefort, V., Longueville, J. E., and Gascuel, O. (2017). SMS: smart Model Selection in PhyML. *Mol. Biol. Evol.* 34, 2422–2424. doi: 10.1093/molbev/msx149
- Li, H., and Durbin, R. (2010). Fast and accurate long-read alignment with burrows-wheeler transform. *Bioinformatics* 26, 589–595. doi: 10.1093/bioinformatics/btp698
- Lim, J. Y., Hwang, I., Ganzorig, M., Pokhriyal, S., Singh, R., and Lee, K. (2018). Complete genome sequence of *Paracoccus yeei* TT13, isolated from human skin. *Genome Announc.* 6:e1514-17. doi: 10.1128/genomeA.01514-17
- Liu, X., Fang, F., Xia, X., Du, G., and Chen, J. (2016). Stability enhancement of urethanase from *Lysinibacillus fusiformis* by site-directed mutagenesis. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 32, 1233–1242. doi: 10.13345/j.cjb.150527
- Magnin, A., Hoornaert, L., Pollet, E., Laurichesse, S., Phalip, V., and Averous, L. (2019). Isolation and characterization of different promising fungi for biological waste management of polyurethanes. *Microbial. Biotechnol.* 12, 544–555. doi: 10.1111/1751-7915.13346
- Malla, M. A., Dubey, A., Yadav, S., Kumar, A., Hashem, A., and Abd Allah, E. F. (2018). Understanding and designing the strategies for the microbe-mediated remediation of environmental contaminants using omics approaches. *Front. Microbiol.* 9:1132. doi: 10.3389/fmicb.2018.01132
- Maurya, S. D., Kurmvanshi, S. K., Mohanty, S., and Nayak, S. K. (2018). A review on acrylate-terminated urethane oligomers and polymers: synthesis and applications. *Pol. Plast Technol. Eng.* 57, 625–656. doi: 10.1080/03602559.2017.1332764
- Miller, R. R., Langvardt, P. W., Calhoun, L. L., and Yahrmak, M. A. (1986). Metabolism and disposition of propylene glycol monomethyl ether (PGME) beta isomer in male rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 83, 170–177. doi: 10.1016/0041-008x(86)90334-90330
- Nakajima-Kambe, T., Onuma, F., Kimpara, N., and Nakahara, T. (1995). Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source. *FEMS Microbiol. Lett.* 129, 39–42. doi: 10.1016/0378-1097(95)00131-N
- Nomura, N., Shigeno-Akutsu, Y., Nakajima-Kambe, T., and Nakahara, T. (1998). Cloning and sequence analysis of a polyurethane esterase of *Comamonas acidovorans* TB-35. *J. Ferment. Bioeng.* 86, 339–345. doi: 10.1016/S0922-338X(99)89001-1
- Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., and Pevzner, P. A. (2017). metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Res.* 27, 824–834. doi: 10.1101/gr.213959.116
- Oceguera-Cervantes, A., Carrillo-García, A., López, N., Bolaños-Núñez, S., Cruz-Gómez, M. J., Wacher, C., et al. (2007). Characterization of the polyurethanolytic activity of two *Alicyciphilus* sp. strains able to degrade polyurethane and N-methylpyrrolidone. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6214–6223. doi: 10.1128/AEM.01230-07
- Ohta, T., Kawabata, T., Nishikawa, K., Tani, A., Kimbara, K., and Kawai, F. (2006). Analysis of amino acid residues involved in catalysis of polyethylene glycol dehydrogenase from *Sphingopyxis terrae*, using three-dimensional molecular modeling-based kinetic characterization of mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4388–4396. doi: 10.1128/AEM.02174-05
- Ohtsubo, Y., Nagata, Y., Numata, M., Tsuchikane, K., Hosoyama, A., Yamazoe, A., et al. (2015). Complete genome sequence of a polypropylene glycol-degrading strain, *Microbacterium* sp. No. 7. *Genome Announc.* 3:e1400-15. doi: 10.1128/genomeA.01400-15
- Ojo, O. A. (2007). Molecular strategies of microbial adaptation to xenobiotics in natural environment. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 2, 1–3.
- Organization for Economic Co-operation and Development (2003). *SIDS Initial Assessment Report For SIAM 17. Propylene Glycol Ethers*. Paris: Organization for Economic Co-operation, and Development.
- Osman, M., Satti, S. M., Luqman, A., Hasan, F., Shah, Z., and Shah, A. (2018). Degradation of polyester polyurethane by *Aspergillus* sp. strain S45 isolated from soil. *J. Polym. Environ.* 26, 301–310. doi: 10.1007/s10924-017-0954-950
- Pardini, O. R., and Amalvy, J. I. (2008). FTIR, 1H-NMR spectra, and thermal characterization of water-based polyurethane/acrylic hybrids. *J. Appl. Pol. Sci.* 107, 1207–1214. doi: 10.1002/app.27188
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., and Tyson, G. W. (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* 25, 1043–1055. doi: 10.1101/gr.186072.114
- Plastics Europe (2018). *Plastics – the Facts 2018. An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data*. Association of Plastics Manufacturers. Available at: <http://www.plasticseurope.org> (accessed August 19, 2019).



- Press, M. O., Wiser, A. H., Kronenberg, Z. N., Langford, K. W., Shakya, M., Lo, C.-C., et al. (2017). Hi-C deconvolution of a human gut microbiome yields high-quality draft genomes and reveals plasmid-genome interactions. *BioRxiv* [Preprint]. doi: 10.1101/198713
- Rojo, F. (2009). Degradation of alkanes by bacteria. *Environ. Microbiol.* 11, 2477–2490. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x
- Rosenberg, M., Gutnick, D., and Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9, 29–33. doi: 10.1016/0378-1097(80)90106-8
- Schühle, K., and Heider, J. (2012). Acetone and butanone metabolism of the denitrifying bacterium *Aromatoleum aromaticum* demonstrates novel biochemical properties of an ATP-dependent aliphatic ketone carboxylase. *J. Bact.* 194, 131–141. doi: 10.1128/JB.05895-11
- Segata, N., Waldron, L., Ballarín, A., Narasimhan, V., Jousson, O., and Huttenhower, C. (2012). Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. *Nat. Methods* 9, 811–814. doi: 10.1038/nmeth.2066
- Shah, Z., Gulzar, M., Hasan, F., and Shah, A. A. (2016). Degradation of polyester polyurethane by an indigenously developed consortium of *Pseudomonas* and *Bacillus* species isolated from soil. *Pol. Degrad. Stabil.* 134, 349–356. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2016.11.003
- Shaiber, A., and Eren, A. M. (2019). Composite metagenome-assembled genomes reduce the quality of public genome repositories. *mBio* 10:e725-19. doi: 10.1128/mBio.00725-19
- Solis-González, C. J., Domínguez-Malfavón, L., Vargas-Suárez, M., Gaytán, I., Cevallos, M. A., Lozano, L., et al. (2018). Novel metabolic pathway for N-methylpyrrolidone degradation in *Alicyclophilus* sp. BQ1. *Appl. Environ. Microbiol.* 84:e2136-17. doi: 10.1128/AEM.02136-2117
- Somyoosap, P., Tani, A., Charoenpanich, J., Minami, T., Kimbara, K., and Kawai, F. (2008). Involvement of PEG-carboxylate dehydrogenase and glutathione S-transferase in PEG metabolism by *Sphingopyxis macrogoltabida* strain 103. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 473–484. doi: 10.1007/s00253-008-1635-7
- Stern, R. V., and Howard, G. T. (2000). The polyester polyurethanase gene (*pueA*) from *Pseudomonas chlororaphis* encodes a lipase. *FEMS Microbiol. Lett.* 185, 163–168. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09056.x
- Sultan, M., Islam, A., Gull, N., Bhatti, H., and Safa, Y. (2014). Structural variation in soft segment of waterborne polyurethane acrylate nanoemulsions. *J. Appl. Pol. Sci.* 132:41706. doi: 10.1002/app.41706
- Tachibana, S., Kawai, F., and Yasuda, M. (2002). Heterogeneity of dehydrogenases of *Stenotrophomonas maltophilia* showing dye-linked activity with polypropylene glycols. *Biosci. Biotech. Biochem.* 66, 737–742. doi: 10.1271/bbb.66.737
- Tani, A., Charoenpanich, J., Mori, T., Takeichi, M., Kimbara, K., and Kawai, F. (2007). Structure and conservation of a polyethylene glycol-degradative operon in sphingomonads. *Microbiology* 153, 338–346. doi: 10.1099/mic.0.2006/000992-990
- Tzintzun-Camacho, O., Loera, O., Ramírez-Saad, H. C., and Gutiérrez-Rojas, M. (2012). Comparison of mechanisms of hexadecane uptake among pure and mixed cultures derived from a bacterial consortium. *Int. Biodeterior. Biodeg.* 70, 1–7. doi: 10.1016/j.ibiod.2012.01.009
- Ufarté, L., Laville, E., Duquesne, S., Morgavi, D., Robe, P., Klopp, C., et al. (2017). Discovery of carbamate degrading enzymes by functional metagenomics. *PLoS One* 12, 1–21. doi: 10.1371/journal.pone.0189201
- Vargas-Suárez, M., Fernández-Cruz, V., and Loza-Tavera, H. (2019). Biodegradation of polyacrylic and polyester polyurethane coatings by enriched microbial communities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 3225–3236. doi: 10.1007/s00253-019-09660-y
- Varsha, Y. M., Naga Deepthi, C. H., and Chenna, S. (2011). An emphasis on xenobiotic degradation in environmental clean-up. *J. Bioremed. Biodegradad.* S11, 001. doi: 10.4172/2155-6199.S11-001
- Wu, Y.-W., Tang, Y.-H., Tringe, S. G., Simmons, B. A., and Singer, S. W. (2014). MaxBin: an automated binning method to recover individual genomes from metagenomes using an expectation-maximization algorithm. *Microbiome* 2:26. doi: 10.1186/2049-2618-2-26
- Yamanaka, H., and Kawai, F. (1991). Purification and characterization of a glycolic acid (GA) oxidase active toward diglycolic acid (DGA) produced by DGA-utilizing *Rhodococcus* sp. No. 432. *J. Ferment. Bioeng.* 7, 83–88. doi: 10.1016/0922-338X(91)90228-90229
- Yang, S.-S., Malawi Brandon, A., Andrew Flanagan, J. C., Yang, J., Ning, D., Cai, S.-Y., et al. (2018). Biodegradation of polystyrene wastes in yellow mealworms (larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus): factors affecting biodegradation rates and the ability of polystyrene-fed larvae to complete their life cycle. *Chemosphere* 191, 979–989. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.10.117
- Yang, Y., Kang, Z., Zhou, J., Chen, J., and Du, G. (2015). High-level expression and characterization of recombinant acid urease for enzymatic degradation of urea in rice wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 301–308. doi: 10.1007/s00253-014-5916-z
- Yoon, S.-H., Ha, S. M., Lim, J., Kwon, S., and Chun, J. (2017). A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie Van Leeuwenhoek* 110, 1281–1286. doi: 10.1007/s10482-017-0844-844
- Yun, H., Liang, B., Qiu, J., Zhang, L., Zhao, Y., Jiang, J., et al. (2016). Functional characterization of a novel amidase involved in biotransformation of trichloroan and its dehalogenated congeners in *Ochrobactrum* sp. TCC-2. *Environ. Sci. Technol.* 51, 291–300. doi: 10.1021/acs.est.6b04885
- Zafar, U., Nzerem, P., Langarica-Fuentes, A., Houlden, A., Heyworth, A., Saiani, A., et al. (2014). Biodegradation of polyester polyurethane during commercial composting and analysis of associated fungal communities. *Bioresour. Technol.* 158, 374–377. doi: 10.1016/j.biortech.2014.02.077
- Zalaszewicz, J., Waters, C. N., Ivar do Sul, J. A., Corcoran, P. L., Barnosky, A. D., Cearreta, A., et al. (2016). The geological cycle of plastics and their use as a stratigraphic indicator of the Anthropocene. *Anthropocene* 13, 4–17. doi: 10.1016/j.ancene.2016.01.002
- Zhang, J., Yin, J.-G., Hang, B.-J., Cai, S., He, J., Zhou, S.-G., et al. (2012). Cloning of a novel arylamidase gene from *Paracoccus* sp. strain FLN-7 that hydrolyzes amide pesticides. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4848–4855. doi: 10.1128/AEM.00320-12
- Zhu, W., Lomsadze, A., and Borodovsky, M. (2010). *Ab initio* gene identification in metagenomic sequences. *Nucleic Acids Res.* 38:e132. doi: 10.1093/nar/gkq275

**Conflict of Interest:** IL, MP, and SS are employees and shareholders of Phase Genomics Inc., a company commercializing proximity ligation technology.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Gaytán, Sánchez-Reyes, Burelo, Vargas-Suárez, Liachko, Press, Sullivan, Cruz-Gómez and Loza-Tavera. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Anexo C

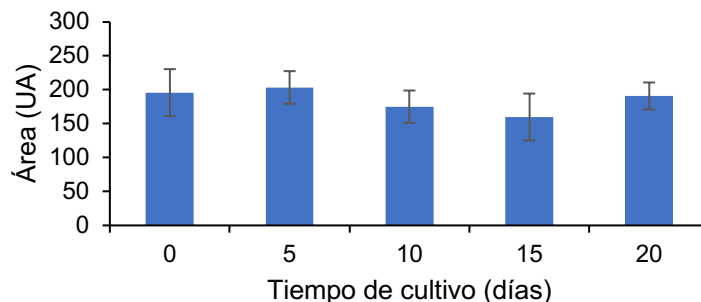
### Análisis estadísticos para la selección de señales de FTIR con variación no significativa para el cálculo de índices de cambio.

Para ambas comunidades se calculó y graficó el área bajo la curva de las diferentes señales, a partir de los gráficos se identificaron aquellas con menor variación y se realizó un análisis estadístico.

En los cultivos con la comunidad BP8 se seleccionó la señal de metilos a  $2,850\text{ cm}^{-1}$  con los siguientes datos:

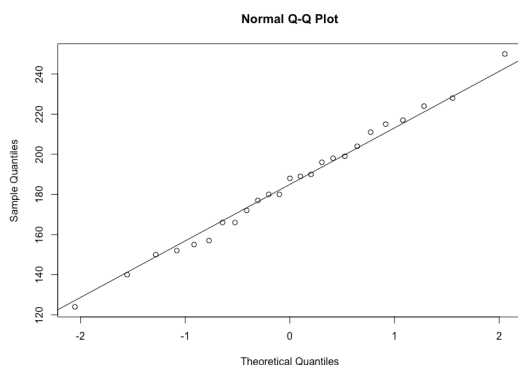
METILO							
Tiempo de cultivo (días)	E1	E2	E3	E4	E5	E Promedio	E stdev
0	204	188	180	157	250	195.8	34.716
5	166	211	228	217	196	203.6	23.985
10	177	152	198	199	150	175.2	23.784
15	215	124.3	154.7	139.5	166	159.9	34.582
20	172	224	189	190	180	191	19.849

Gráfica de áreas promedio de los metilos



### Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas

Gráfica Q-Q y resultados de Shapiro test para identificar distribución de una serie de datos



```
Shapiro-Wilk normality test
data: AREA
W = 0.99403, p-value = 0.9999
```

La gráfica Q-Q y el test de Shapiro ( $p= 0.99$ ,  $p>0.05$ ) muestran que los datos de los metilos presentan una distribución normal.

Además, se realizó el test de Bartlett, mostrando una  $p>0.05$  por lo tanto los datos de los metilos presentan homogeneidad de varianzas.

```
Bartlett test of homogeneity of variances
data: AREA and MUESTRA
Bartlett's K-squared = 1.7891, df = 4, p-value = 0.7745
```

Al cumplirse una distribución normal y homogeneidad de varianzas en una serie de datos podemos realizar un análisis de ANOVA, para hacer la comparación de medias.

```
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
MUESTRA  4  6098  1524.5  1.937  0.144
Residuals 20 15743   787.1
```

Con una  $p>0.05$  ( $p= 0.144$ ) se encontró que las muestras son iguales entre sí.

Se aplicó una prueba posthoc de Tuckey para corroborar

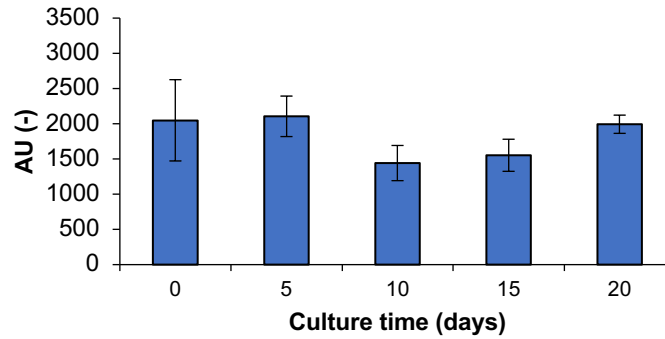
```
$groups
      AREA groups
5_dias 203.6    a
0_dias 195.8    a
20_dias 191.0   a
10_dias 175.2   a
15_dias 160.0   a
```

La prueba de Tukey confirmó que no hay diferencia entre grupos, por lo que es posible utilizar esta señal como constante para calcular los índices de cambio.

En los cultivos con la comunidad BP6 se seleccionó la señal de alifáticos a  $520\text{ cm}^{-1}$ .

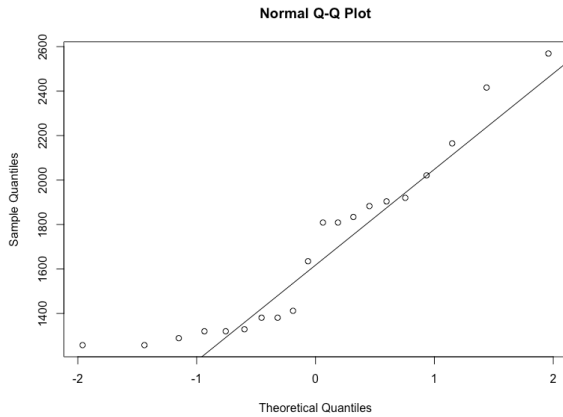
Areas (UA)						
	R1	R2	R3	R4	Promedio	E stdev
0 Horas	1289	1920	2569	2416	2048.5	577.2
5 Días	1773	2200	2001	2449	2105.8	287.8
10 Días	1257.7	1381	1320	1809	1441.9	249.8
15 Días	1329	1412	1635	1834	1552.5	227.8
20 Días	1883	2021	1904	2165	1993.3	129.6

### Gráfica de áreas promedio de los compuestos alifáticos



### Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas

Gráfica Q-Q para identificar distribución de una serie de datos



```
Shapiro-Wilk normality test
data: AREA
W = 0.89206, p-value = 0.02935
```

La gráfica Q-Q y el test de Shapiro ( $p=0.03$ ,  $p<0.05$ ) indican que las áreas de los compuestos alifáticos no presentan una distribución normal.

Al no cumplirse el supuesto de normalidad, se utilizó un análisis no paramétrico

**\*\*Aplicando análisis de homogeneidad de varianzas y significancia en la diferencia entre grupos.**

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "median")
Df F value Pr(>F)
group 4 1.9753 0.1502
15
```

$p=0.1502$ ,  $p > 0.05$  por lo tanto las muestras presentan homogeneidad de varianza

La diferencia entre grupos se determinó con la prueba de Kruskal-Wallis

```
Kruskal-Wallis rank sum test

data: AREA by MUESTRA
Kruskal-Wallis chi-squared = 9.5573, df = 4, p-value = 0.04858
```

Después de aplicar la prueba se encontró que  $p=0.05$  por lo que las muestras son iguales.

Además, se aplicó una prueba de comparaciones múltiples, donde se observa que en todos los casos las  $p>0.05$ , por lo que se confirma que las muestras de cada tiempo de cultivo son iguales.

```
Dunn (1964) Kruskal-Wallis multiple comparison
p-values adjusted with the Bonferroni method.

      Comparison      Z      P.unadj      P.adj
1  DIAS_0 - DIAS_10  1.9750995  0.04825686  0.4825686
2  DIAS_0 - DIAS_15  1.1970300  0.23129486  1.0000000
3  DIAS_10 - DIAS_15 -0.7780695  0.43652804  1.0000000
4  DIAS_0 - DIAS_20 -0.3591090  0.71951355  1.0000000
5  DIAS_10 - DIAS_20 -2.3342085  0.01958481  0.1958481
6  DIAS_15 - DIAS_20 -1.5561390  0.11967504  1.0000000
7  DIAS_0 - DIAS_5   1.9750995  0.04825686  0.4825686
8  DIAS_10 - DIAS_5  0.0000000  1.00000000  1.0000000
9  DIAS_15 - DIAS_5  0.7780695  0.43652804  1.0000000
10 DIAS_20 - DIAS_5  2.3342085  0.01958481  0.1958481
```

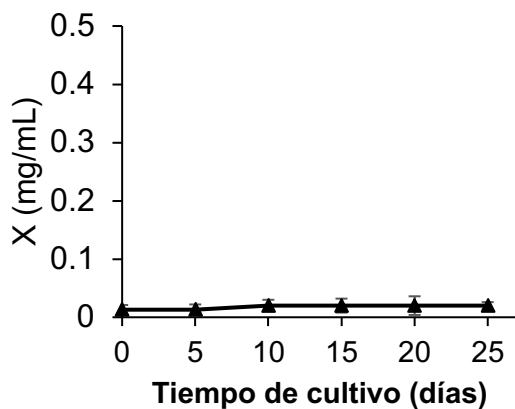
Al no haber diferencias entre los tiempos de cultivo podemos usar esta señal para el cálculo de los diferentes índices

## Anexo D

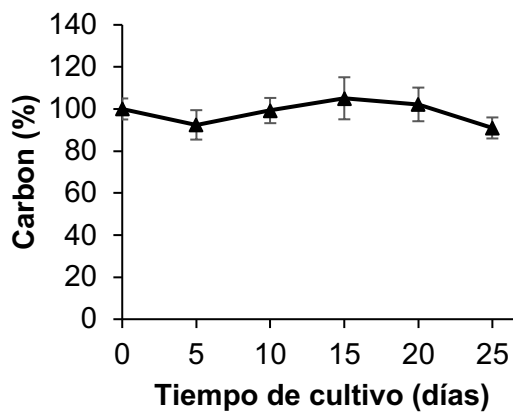
### Controles de los diferentes análisis microbiológicos, físicos y químicos

Las gráficas corresponden a 3 réplicas de controles abióticos (sin inocular) incubados a 37 °C, 220 rpm en un periodo de 20-25 días.

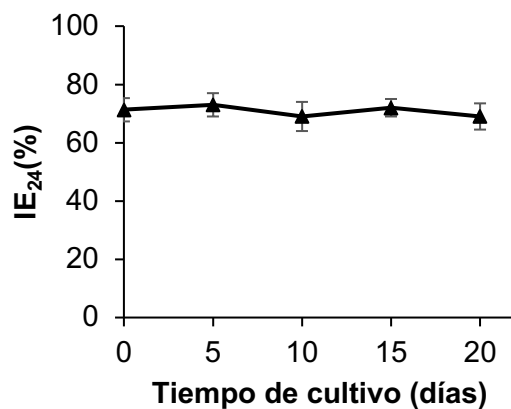
**Crecimiento basado en peso seco (gravimetría)**



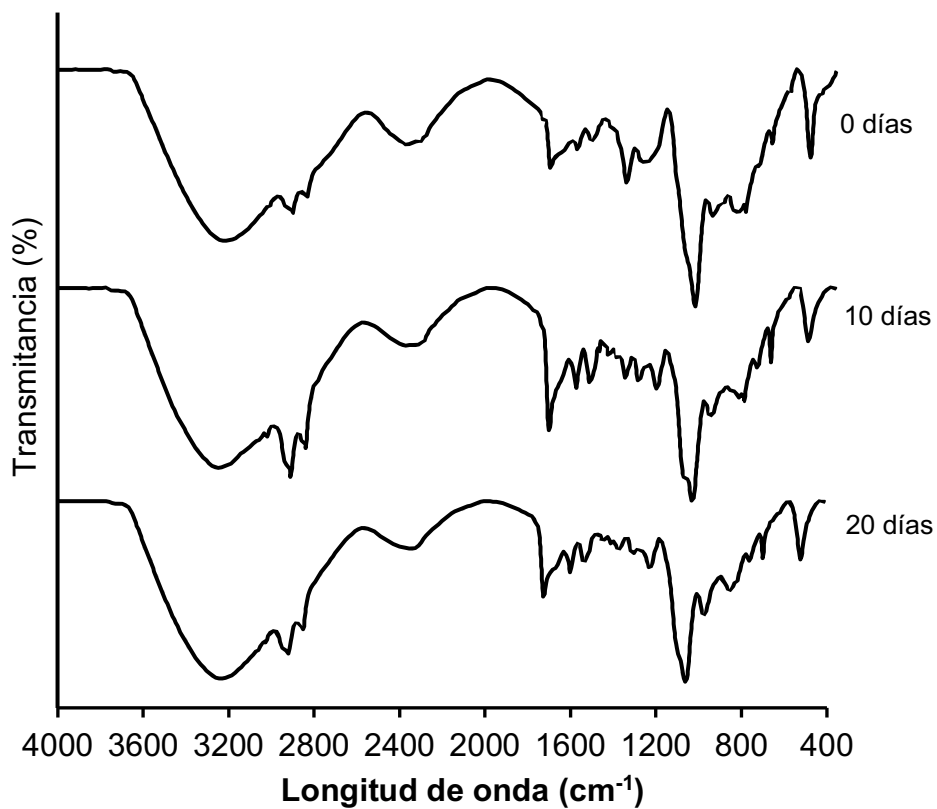
**Consumo de carbono total (composición elemental)**



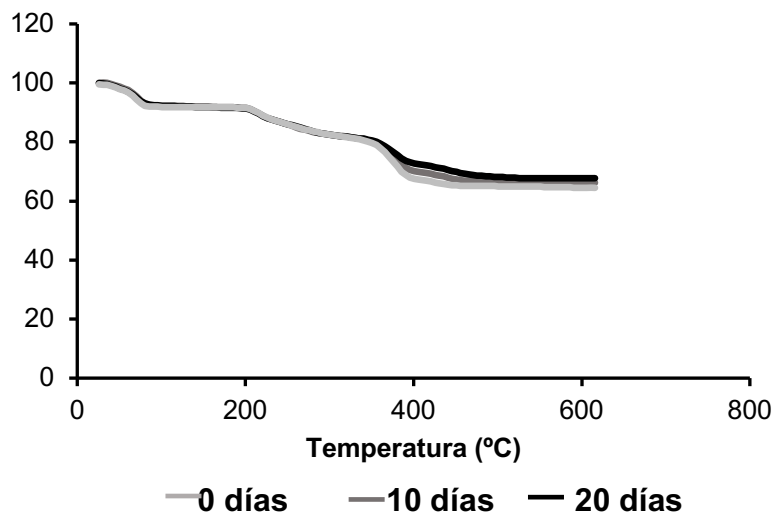
**Índice de emulsificación-24 (mezcla *n*-hexadecano/MM-PL incubado y sin inocular)**



### FT-IR de MM-PL incubado y sin inocular



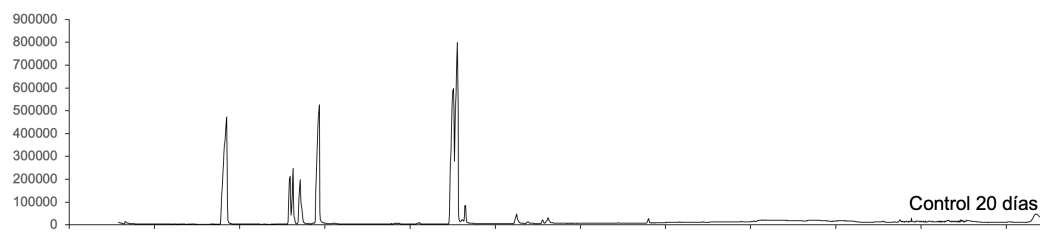
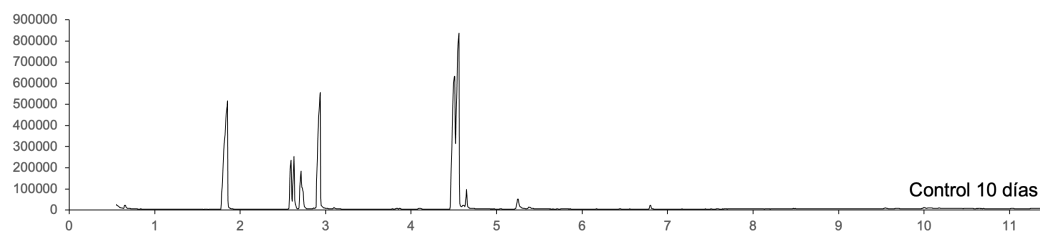
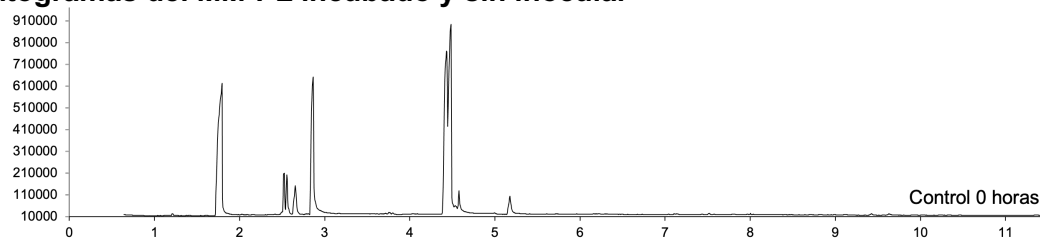
### TGA de MM-PL incubado y sin inocular



### Peso molecular de MM-PL incubado y sin inocular

Tiempo de cultivo (días)	Mn	Mw	PDI
0	120227±9662	185652±6139	1.5±0.2
10	140602±9097	209073±1218	1.5±0.2
20	155581±7426	220781±1527	1.3±0.2

### Cromatogramas del MM-PL incubado y sin inocular





### 13. PRODUCTOS RELACIONADOS CON ESTA INVESTIGACIÓN

#### Artículos publicados en revistas internacionales

Ayixón Sánchez-Reyes\*, **Itzel Gaytán\***, Manuel Burelo, M. Vargas-Suárez, M.J. Cruz-Gómez, Herminia Loza-Tavera. 2021. Genetic basis for the biodegradation of a polyether-polyurethane-acrylic copolymer by a landfill microbial community inferred by metagenomic deconvolution analysis. *Science of the Total Environment*. \*Primera autoría compartida. Aceptado con correcciones.

**Itzel Gaytán**, Manuel Burelo, Herminia Loza-Tavera. 2021. Current status on the biodegradability of acrylic polymers: microorganisms, enzymes and metabolic pathways involved. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11073-1>

**Itzel Gaytán\***, Ayixón Sánchez-Reyes\*, Manuel Burelo, Martín Vargas-Suárez, Ivan Liachko, Maximilian Press, Shawn Sullivan, M. Javier Cruz-Gómez and Herminia Loza-Tavera. 2020. Degradation of recalcitrant polyurethane and xenobiotic additives by a selected landfill microbial community and its biodegradative potential revealed by proximity ligation-based metagenomics analysis. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02986>. \*Primera autoría compartida.

Manuel Burelo, **Itzel Gaytán**, Herminia Loza-Tavera, J.A. Cruz-Morales, M.J. Cruz-Gómez, D. Zárate-Saldaña, S. Gutiérrez. 2021. Synthesis, characterization and biodegradation studies of polyurethanes: Effect of unsaturation on biodegradability. *Chemosphere*. 136136. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136136>

Claudia Julieta Solís-González, Lilianha Domínguez-Malfavón, Martín Vargas-Suárez, **Itzel Gaytán**, Miguel Ángel Cevallos, Luis Lozano, M. Javier Cruz-Gómez, Herminia Loza-Tavera. 2017. A novel metabolic pathway for *N*-Methylpyrrolidone degradation in *Alicyclophilus* sp. Strain BQ1. *Applied and Environmental Microbiology*. 84: 1–18. <https://doi.org/10.1128/aem.02136-17>

#### Trabajos presentados en congresos internacionales

**Itzel Gaytán**, Manuel Burelo, Herminia Loza-Tavera. Biodegradation of polyether-polyurethane-acrylic coating by the environmental community BP8. 8th Congress of European Microbiologists-FEMS. Glasgow, Scotland, Julio 2019. *Cartel*.

**Itzel Gaytán-Enríquez**, M.J. Cruz-Gómez, H. Loza-Tavera. Polyacrylic-polyether-polyurethane coating biodegradation by the enriched microbial community BP8. The sixth international symposium on environmental biotechnology and Engineering. Ciudad Obregón Sonora, México. Noviembre 2018. *Presentación oral*.

#### Trabajos presentados en congresos nacionales

**Itzel Gaytán** & Herminia Loza-Tavera. Potencial metabólico de la comunidad microbiana BP8 capaz de degradar poliuretano y xenobióticos recalcitrantes. XIV Coloquio Invernal de Investigación del departamento de Bioquímica, Facultad de Química-UNAM. Ciudad de México, México. Enero 2020. *Flash talk*.

Manuel Burelo, **Itzel Gaytán**, Herminia Loza-Tavera, Jorge A. Cruz-Morales, Selena Gutiérrez. Síntesis de poliuretanos biodegradables a partir de macrodioles insaturados. Sociedad Polimérica de México. Boca del Río Veracruz, México. Octubre 2019. *Presentación oral*.

Manuel Burelo, **Itzel Gaytán**, Herminia Loza-Tavera, Jorge A. Cruz-Morales, Selena Gutiérrez. Síntesis de poliuretanos biodegradables a partir de recursos naturales. 5º. Congreso de Ciencia Educación y Tecnología. Estado de México, México. Junio 2019. *Presentación oral*.

**Itzel Gaytán** & Herminia Loza-Tavera. Efectos de la biodegradación de dos consorcios microbianos sobre las características químicas y físicas de un barniz de poliéter poliuretano. XII Coloquio Invernal de Investigación del Departamento de Bioquímica, Facultad de Química-UNAM. Ciudad de México, México. Enero 2018. *Presentación oral*.

**Itzel Gaytán**. Caracterización cinética de consorcios microbianos capaces de degradar poliéter poliuretano. XI Coloquio Invernal de Investigación del Departamento de Bioquímica. Facultad de Química-UNAM. Ciudad de México, México. Febrero 2017. *Presentación oral*.

**Itzel Gaytán**, Martín Vargas-Suárez, Herminia Loza-Tavera. Assessing bacterial consortia activity against polyurethane contamination. V Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias. Puebla, México. Octubre 2017. *Cartel*.

#### **Distinciones**

2019. Otorgamiento de beca “FEMS Meeting Attendance Grant” a jóvenes investigadores para asistencia al “8th Congress of European Microbiologists-FEMS”, celebrado en Glasgow, Escocia.



# Current status on the biodegradability of acrylic polymers: microorganisms, enzymes and metabolic pathways involved

Itzel Gaytán<sup>1</sup> · Manuel Burelo<sup>2</sup> · Herminia Loza-Tavera<sup>1</sup>

Received: 11 July 2020 / Revised: 14 December 2020 / Accepted: 23 December 2020  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH, DE part of Springer Nature 2021

## Abstract

Acrylic polymers (AP) are a diverse group of materials with broad applications, frequent use, and increasing demand. Some of the most used AP are polyacrylamide, polyacrylic acid, polymethyl methacrylates, and polyacrylonitrile. Although no information for the production of all AP types is published, data for the most used AP is around 9 MT/year, which gives an idea of the amount of waste that can be generated after products' lifecycles. After its lifecycle ends, the fate of an AP product will depend on its chemical structure, the environmental setting where it was used, and the regulations for plastic waste management existing in the different countries. Even though recycling is the best fate for plastic polymer wastes, few AP can be recycled, and most of them end up in landfills. Because of the pollution crisis the planet is immersed, setting regulations and developing technological strategies for plastic waste management are urgent. In this regard, biotechnological approaches, where microbial activity is involved, could be attractive eco-friendly strategies. This mini-review describes the broad AP diversity, their properties and uses, and the factors affecting their biodegradability, underlining the importance of standardizing biodegradation quantification techniques. We also describe the enzymes and metabolic pathways that microorganisms display to attack AP chemical structure and predict some biochemical reactions that could account for quaternary carbon-containing AP biodegradation. Finally, we analyze strategies to increase AP biodegradability and stress the need for more studies on AP biodegradation and developing stricter legislation for AP use and waste control.

## Key points

- *Acrylic polymers (AP) are a diverse and extensively used group of compounds.*
- *The environmental fates and health effects of AP waste are not completely known.*
- *Microorganisms and enzymes involved in AP degradation have been identified.*
- *More biodegradation studies are needed to develop AP biotechnological treatments.*

**Keywords** Acrylic polymers · Environmental fates · C-C backbone recalcitrance · Biodegradation rates · Biodegradative pathways

## Introduction

Acrylic polymers (AP) are a diverse group of synthetic materials based on acrylate monomers, esters with vinyl groups attached to a carbonyl carbon (Fig. 1). The first AP were prepared in 1880 from methyl acrylate and methacrylic acid (Mosley 2017), although the industrial production began in 1927. Since then, the synthesis of new monomers and the possibility to combine them by polymerization have created a large number of different polymers with broad properties varying from good mechanical performance, transparency, elasticity, flocculation or dispersion to superabsorbent capacity, biocompatibility, and even electric qualities (Cameron et al. 2000; Mosley 2017). Progress in polymer chemistry

✉ Herminia Loza-Tavera  
hlozat@unam.mx

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ave. Universidad 3000. Col. UNAM., 04510 Mexico City, México

<sup>2</sup> Laboratorio de Química Sostenible, Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ave. Universidad 3000. Col. UNAM., 04510 Mexico City, México

has led to the production of a large spectrum of AP products with a widespread use ranging from agriculture across different industries, including food packaging, cosmetic, textile, electronic, automotive, oil, and even medical and pharmaceutical industries (Table 1). Because of their extensive use, large amounts of AP are manufactured, with growing demands predicted for the following years (Esmizadeh et al. 2019) (Table 2). Therefore, vast amounts of wastes, resulting after AP products' lifecycles end or even during their synthesis, are being generated. The different environmental fates an AP product could reach after its useful life will depend on its application, the environmental settings where the polymer was used, and the governments' norms for waste disposal. Ideally, all the AP must be recycled to produce new AP materials. However, for different reasons, this ideal situation is not reached for most of the AP types. In many cases, burning

for energy waste, landfill disposition, or release in wastewaters and soil are AP ultimate fates (Table 2). Thus, some AP wastes can be contained. Others, whose application implies their release to the environment, such as soil amendments, additives in detergents, acrylic fibers, and AP used in the oil industry, cannot. For instance, 700,000 microplastic fibers are discharged in one wash load of polyester clothes (including acrylic and nylon); thus, half an MT of these clothes' fibers end up into the oceans every year, which will damage the life in ocean ecosystems and can become part of the human food chain (Šajn 2019). In any case, deliberate or unintentional releases have led to AP accumulation in the environment, promoting landfills' overflows, greenhouse gas emissions, and pollution of water bodies and soils, posing serious ecological threats (Dell'Ambrogio et al. 2019; Šajn 2019).

**Table 1** Acrylic polymer types and applications

Acrylic polymer	Abbreviation	Applications
Polyacrylic acid	PAA	Hand sanitizing gels, super absorbent polymers (SAP) used in diapers, surgical pads, incontinence, feminine napkins, soil enhancers and hydrogel thickeners, paints, synthetic rubbers, leather sealants, detergent builders, dispersants and flocculants in water treatments, drilling muds for crude oil recovery
Polysodium acrylate	PNaA	SAP, growing toys, dispersants in paper manufacturing, clearing of potable and industrial water, drilling muds for crude oil recovery
Polypotassium acrylate	PKA	SAP, coatings, adhesives, detergents
Polyacrylamide	PAAM	SAP, food-contact papers, dyes, paints, varnishes, gels, adhesives, tapes, toiletries, cosmetics, textile processing, clearing of potable and industrial water, drilling muds for crude oil recovery
<i>Poly(n-alkyl acrylates)</i>		
Polymethyl acrylate	PMA	Coatings and paints
Polybutyl acrylate	PBA	Kitchen countertops, dental materials, electronic screens, adhesives, coatings, paints, plastic wraps, and aircraft windows
Polyhydroxyethyl acrylate	PHEA	Hydrogels, drug delivery systems, coatings, contact lenses and culture flasks
Polyhydroxybutyl acrylate	PHBA	Fibers, adsorbents, surface modifiers of polyurethane tubing for biomedical applications
<i>Poly(n-alkyl methacrylates)</i>		
Polymethyl methacrylate	PMMA	Hydrophobic coatings and paints, adhesives, tissue scaffolds, dental materials, bone cements, corneal prostheses, acrylic sheets, glasses for lenses, electronic screens, and aircraft windows
Polyethyl methacrylate	PEMA	Dental materials, corneal prostheses, bone cements, and contact lenses
Polyhydroxyethyl methacrylate	PHEMA	Hydrogels, contact lenses, cell-culture flasks coatings
<i>Acrylic polymers with cyano groups</i>		
Polyacrylonitrile	PAN	Fibers for clothing, packaging materials, food containers, kitchenware, toys, musical instruments, automotive trim components, material used in 3D printers, safety helmets
Polycyanoacrylate	PCA	Superglue, foams, fibers and implants for bone and tissue substitution
Styrene acrylonitrile copolymer	SAN	Water bottles, food containers, kitchenware, packaging material, computer products, battery cases, and plastic optical fibers
Acrylonitrile styrene acrylate copolymer	ASA	Filaments for 3D printers, mirrors, radiator grillers, electrical panels, furniture, sporting goods, headlights, instrument panel in vehicles
Acrylonitrile butadiene styrene copolymer	ABS	Toys, musical instruments, protective headgear, 3D printers filaments, automotive trim components, automotive bumper bars, colorants for tattoo inks, inhalers, nebulizers, tendon prostheses

**Table 2** Global production, environmental fates, and recycling methods of some acrylic polymers

Acrylic polymer	Global production (MT/year)	Environmental fate of AP wastes	<sup>1</sup> Experimental and *industrial recycling methods	Reference
PAA	2.0/2013	Landfills, wastewaters, sediments, soil humid fractions, surface waters, recycling	Oxidative, photooxidative, and thermal degradation, UV radiation, pyrolysis, *mechanical (FaterSMART technology)	Shukla et al. 2009; Nuss and Gardner 2013; Oksińska et al. 2019; Dell'Ambrogio et al. 2019; Fater 2020
PAAm	1.77/2018	Landfills, wastewaters, sediments, soils, surface waters, groundwaters, recycling	Photolytic, oxidative, thermal, and free-radical degradation, Fenton reaction, hydrolysis, membrane processes (microfiltration), *mechanical (FaterSMART technology)	Caulfield et al. 2002; Wiśniewska 2018; Xiong et al. 2018; Zhao et al. 2019; Dell'Ambrogio et al. 2019; Fater 2020
PMMA	3.36/2019	Landfills, wastewaters, soils, incineration, recycling	Thermal degradation, *pyrolysis (P2L technology), *dissolution/precipitation, *mechanical, *incineration for cement raw materials production, and energy recovery (fuels); cracking (Shimi technology)	Kikuchi et al. 2014; Pemberton and Lohmann 2014; Mosley 2017; Esmizadeh et al. 2019; P2L 2019; Shimi 2020
PAN	2.73/2006	Landfills, wastewaters, soils, surface waters, incineration, recycling	Oxidative and thermal degradation, low-energy ion beam, UV radiation, pyrolysis, mechanical, material separation/blending, *patented Shimi technology	Aggour and Aziz 2000; EURAR 2004; Fischer-Colbrie et al. 2006; Adegbola et al. 2020; Shimi 2020

<sup>1</sup> Most recycling techniques are experimental; only the ones indicated by an asterisk are used in industrial recycling processes

Because of their polymeric nature, i.e., their high molecular weight, AP have been supposed as inert and non-toxic, with low risk of bioaccumulation in plants and animals, as they cannot pass through biological membranes (Xiong et al. 2018; Dell'Ambrogio et al. 2019); however, these must not be assumed. Little information is known about AP persistence and accumulation in the environment, and although several environmental risk assessments have been published recently (De Matos 2019; DeLeo et al. 2020), the impact of AP in ecosystems is almost unexplored, and specific regulations for their use and disposal are scarce and change from country to country (Dell'Ambrogio et al. 2019). Therefore, more studies on environmental risk assessments and international rules for controlling AP waste disposal and treatment are needed. Moreover, some AP monomers, which persist in the final products, to some extent, are considered health threats since they are toxic to human health (Xiong et al. 2018; Dell'Ambrogio et al. 2019). Acrylamide (AAM) monomers penetrate the intact skin, mucous membranes, and digestive tract, exhibiting mutagenic, teratogenic, and carcinogenic effects and inducing neuropathies (Maksimova et al. 2018), while acrylonitrile (AN) monomers are skin, respiratory, and severe eye irritants that cause dermatitis and are potent hepatotoxic, mutagenic, and carcinogenic factors (Abo-Salem et al. 2011). Also, methyl methacrylate monomers are eye, skin, and respiratory tract irritants and promote degenerative and

necrotic lesions in the liver, kidney, and brain and atrophic changes in spleen and bone marrow in rats (Borak et al. 2011). Even though some microorganisms can degrade AAM monomers, biodegradation is not efficient, especially at high concentrations (Bedade and Singhal 2018).

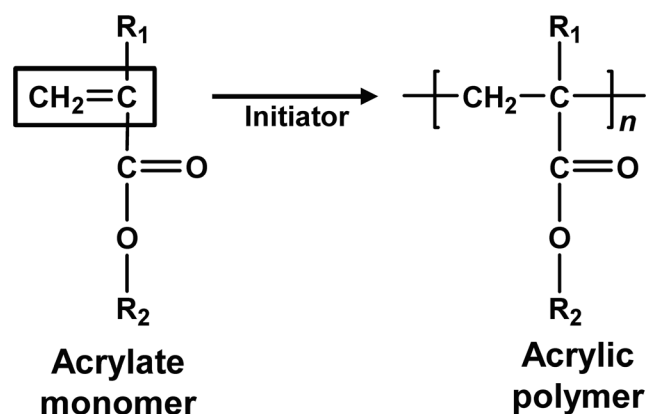
Although recycling is the best alternative to avoid AP waste accumulation, most AP recycling methods are still experimental (Table 2). Only a few types of AP such as polymethyl methacrylate (PMMA), polyacrylonitrile (PAN), and polyacrylic acid (PAA) and PAAm used in diapers, hygienic pads, and incontinence products as superabsorbent polymers (SAP) can be processed and used as raw materials for the synthesis of new products. Unfortunately, recycling methods have been implemented in some EU countries, but in most others, AP waste treatment and disposition are not regulated; thus, landfilling and environmental release are the primary AP fates (Table 2) (P2L 2019; Fater 2020; PMMA 2018; Shimi 2020). Therefore, because of the severe environmental deterioration the planet has reached, generated by different types of pollutants, including the excessive use of plastic polymers, regulations for the utilization, reduction, contention, treatment, and recycling of different types of plastic materials, including AP products, are crucial to avoid larger problems to the environment and human societies.

In this regard, the development of biotechnological approaches for treating AP wastes would be of great help.

Biotechnological approaches would benefit from utilizing AP biodegrading microorganisms that have evolved the capacity to attack them. AP biodegradation has been experimentally tested in bioreactors and activated sludges, with promising results depending on the AP type and microorganisms tested. Assisted bioremediation, a hybrid methodology that combines physical and chemical treatments with biological processes, has been explored for improving AP mineralization (Lu and Wei 2011; Yongrui et al. 2015). Numerous articles have analyzed different aspects of AP biodegradation for almost three decades, mainly focused on PAA and PAAm (Joshi and Abed 2017; Nyssölä and Ahlgren 2019). Nevertheless, since AP is an extensive group of materials with wide-range applications, a broader revision, including biodegradability analyses of other AP types, is needed. In this mini-review, we describe the most relevant AP types and their uses. We analyze the factors that influence AP biodegradation and its quantification (biodegradability), which depends not only on the AP type or the microorganisms involved but also on the technique used for its measurement. We examine the enzymes involved in AP biodegradation, displayed by bacteria and fungi, and the biochemical pathways proposed for the C-C backbone cleavage, the most recalcitrant structure in the AP molecule. Besides, we suggest some reactions that could be involved in the biodegradation of poly(*n*-alkyl methacrylates), an AP that contains quaternary carbons that make the microbial attack a biochemical challenge. We conclude this revision by emphasizing that studies on AP biodegradation are needed for improving the understanding of AP impacts on ecosystems and for developing and improving biotechnological approaches for AP waste treatment. Moreover, legislation to control the use and the treatment of AP wastes are urgently needed.

### Acrylic polymers' chemistry, properties, and applications

AP are produced via free-radical polymerization of acrylic monomers containing a vinyl group with a C-C double bond that acts as an active center that propagates to produce polymer chains (Fig. 1). Depending on the monomers used in polymerization, AP may have diverse qualities, useful for different applications. PAA is synthesized from acrylic acid (AA) monomers. PAA and its salts, polysodium acrylate, and polypotassium acrylate (Fig. 2a) are used to synthesize different products, such as additives in detergents and hand sanitizing gels and for manufacturing SAP. SAP are hydrophilic gels with molecular weight (Mw) ranging from  $10^3$  to  $10^6$  Da, which can absorb 500- to 1000-fold the amount of water relative to their mass (Zohuriaan-Mehr and Kabiri 2008). SAP are widely used as soil enhancers, in diapers and feminine napkins (Table 1). PAAm (Fig. 2a) is a high Mw polymer ( $10^3$  to  $10^7$  Da), synthesized from AAm monomers,



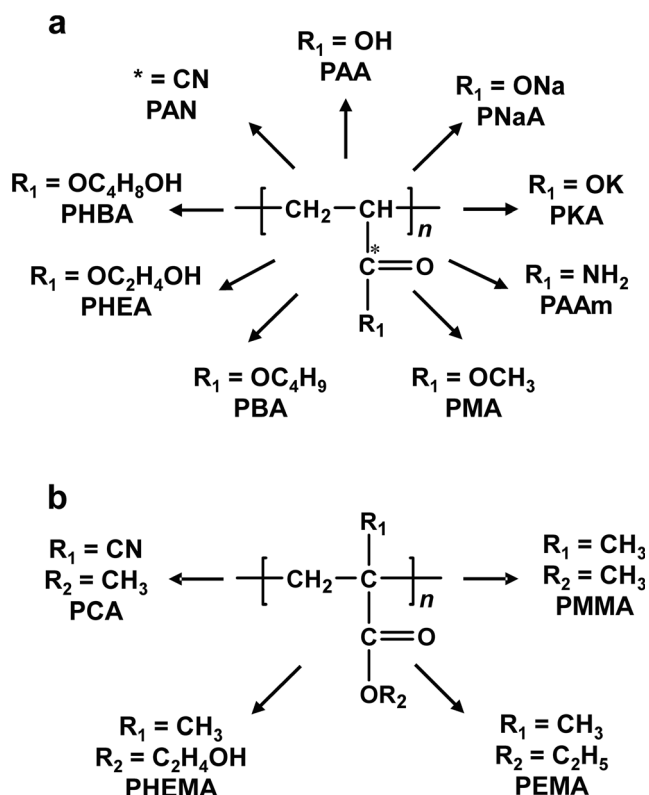
**Fig. 1** Acrylic polymer synthesis. Acrylate monomers containing a vinyl group (box) are polymerized in a free-radical reaction. At initiation, an active center is developed in the double bond, and radicals are produced; then, monomers' addition generates chain's propagation; finally, termination occurs by the radicals' disproportion

using thermal initiators and redox systems. It has multiple applications as homopolymer or copolymer with PAA for SAP production, used as a soil conditioner in agriculture, enhancer of solid/liquid separation in mineral extraction, and other applications (Xiong et al. 2018; Nyssölä and Ahlgren 2019) (Table 1).

Poly(*n*-alkyl acrylates) (PnAA), such as polymethyl (PMA), polyethyl (PEA), polybutyl (PBA), polyhydroxyethyl, and polyhydroxybutyl acrylates, are derived from acrylate monomers having an *n*-alkyl side group (Fig. 2a). This structure confers them peculiar crystallization and thermal and gas permeability properties, making them ideal for the fabrication of complex plastics with specialized purposes in biomedical, agricultural, and electronic industries (Mahalik and Madras 2005; O'Leary and Paul 2006; Morro et al. 2016; Serrano-Aroca 2017) (Table 1).

Poly(*n*-alkyl methacrylates) (PnAMA) are synthesized from acrylic monomers with a methyl substituent in the  $\alpha$ -C and an alkyl, or hydroxyl alkyl, bound by an ester, forming quaternary carbons in their main chain after polymerization. The most used are PMMA, polyethyl methacrylate, and polyhydroxyethyl methacrylate (Fig. 2b). They are very resistant and versatile, with high environmental stability; PMMA, for example, is the material of choice for outdoor applications, used as a glass substitute (casting or extruded acrylic sheets). In the context of the Covid-19 pandemic, a new application for acrylic sheets as protective barriers has emerged across the globe to prevent coronavirus from spreading. Also, PMMA resins are molded for lens production because of their biocompatibility and optical properties (Table 1).

PAN and polycyanoacrylate (PCA) are AP containing cyano substituent bound to the  $\alpha$ -C in their structure (Fig. 2a and b). PCA also contains a methyl group bound by an ester bond to the  $\alpha$ -C. PAN is widely used to produce textile fibers (acrylic) (Serrano-Aroca 2017) and PCA is used as a structural



**Fig. 2** Chemical structures of some acrylic polymers (AP). **(a)** AP derived from acrylate monomers have different functional groups bound to the carbonyl ( $R_1$ ): PAA, polyacrylic acid; PNaA, polysodium acrylate; PKA, polypotassium acrylate; PAAm, polyacrylamide. Poly(*n*-alkyl acrylates) (PnAA) are polymers derived from acrylate monomers with an *n*-alkyl side group: PMA, polymethyl acrylate; PBA, polybutyl acrylate; PHEA, polyhydroxyethyl acrylate; PHBA, polyhydroxybutyl acrylate. PAN, polyacrylonitrile, has a cyano group substituent bound to the  $\alpha$ -C. **(b)** Poly(*n*-alkyl methacrylates) (PnAMA), are synthesized from acrylate monomers with a methyl group attached to the  $\alpha$ -C ( $R_1$ ), and different functional groups bound by an ester ( $R_2$ ): PMMA, polymethyl methacrylate; PEMA, polyethyl methacrylate; PHEMA, polyhydroxyethyl methacrylate. PCA, polycyanoacrylate, has a cyano substituent bound to the  $\alpha$ -C and a methyl bound by an ester

adhesive for plastics, rubbers, and ceramics and can be applied as surgical adhesive (Rustamov et al. 2014). Cyano substituent is also included in some styrene copolymers such as styrene-acrylonitrile (SAN), acrylonitrile styrene acrylate (ASA), and acrylonitrile butadiene styrene (ABS), a widely used group of thermoplastics to produce light, rigid, molded materials for toys, safety helmets, electronics, automobile bumps, and building construction (McKeen 2012) (Table 1).

### Factors affecting acrylic polymers' biodegradability

During AP biodegradation, physical, chemical, and biological processes occur, which are also influenced by environmental factors such as temperature, UV radiation, pH, and humidity.

AP biodegradation involves enzyme-catalyzed reactions that transform the polymer chemical and physical properties. During the initial transformation, usually described as primary biodegradation, low Mw components from the polymeric structure are released and transported into microbial cells. Once inside the cells, ultimate biodegradation or mineralization occurs, using these components as energy and C source for biomass formation, resulting in fully reduced or oxidized products ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ) (Kolvenbach et al. 2014). In the assessment of AP biodegradability, the essential aspects that should be considered are: the polymer structure, the microbial AP attacking capacity sustained by proper culture or environmental conditions, and the techniques used for biodegradation quantitation. Altogether, these aspects will define the time an AP will last for being degraded, that is, its biodegradation rate. The main aspects of AP structure that affect biodegradation include the C-C backbone length, the side groups, quaternary carbons, and molecular organization (linear, branched, or cross-linked). Other characteristics such as purity of the product and degree of hydrolysis also influence AP biodegradability assessment (Seybold 1994; Larson et al. 1997; Kay-Shoemake et al. 1998a; Stahl et al. 2000).

### C-C backbone size and recalcitrance

The C-C backbone confers a very stable, thus recalcitrant molecular structure, whose cleavage is a crucial step in AP mineralization. Even that AP biodegradation rates reported in different articles are diverse, when comparing experiments where similar polymers, microbial systems, laboratory conditions, and analytical techniques were tested, they show an inverse correlation between the size of the C-C backbone and the mineralization rate (Supplementary table S1). For instance, complete biodegradation of acrylic acid monomers and dimers (100%  $\text{CO}_2$  production) was observed in 28–32 days (Freeman et al. 1996; Cook et al. 1997; Larson et al. 1997), while PAA oligomers and PNaA (trimers to decamers) can be extensive but incompletely degraded (60–80%  $\text{CO}_2$  production) in 14–32 days ( $\sim 3\%$  per day) (Hayashi et al. 1993; Freeman et al. 1996; Larson et al. 1997). For PAA and PNaA of 1000 Da, biodegradation values of 30–40% measured as  $\text{CO}_2$  production in 28–32 days ( $\sim 1.16\%$  per day) (Freeman et al. 1996; Larson et al. 1997), 7.4% measured as BOD/ThOD in 10 days (0.74% per day) (Kawai 1993), and 73% measured as total organic carbon (TOC) in 14 days (5.21% per day) (Hayashi et al. 1994) have been reported. For larger polymers (2000–4500 Da), biodegradation levels of 8–20% measured as  $\text{CO}_2$  production in 28–32 days ( $\sim 0.5\%$  per day) (Freeman and Bender 1993; Freeman et al. 1996; Larson et al. 1997), 2–3.9% measured as BOD/ThOD in 10 days ( $\sim 0.3\%$  per day) (Kawai 1993), and 20% measured as TOC in 14 days (1.4% per day) (Hayashi et al. 1994) have been determined. Therefore, the size of the C-C backbone is a critical factor in AP biodegradation. Interesting results were

observed when analyzing long-time biodegradation experiments in soil, with labeled PAA to quantify the C-C backbone cleavage. In microcosm experiments containing soil microorganisms, mineralization rates of 3.6% in 90 days (0.04 per day) or 6% in 42 days (0.14 per day) were observed for  $^{14}\text{C}$ -labeled PAA, previously solubilized in cultures of *Phanerochaete chrysosporium* induced to produce peroxidases or cellobiose dehydrogenase (CDH), respectively (Stahl et al. 2000). In similar experiments, a  $^{13}\text{C}$ -labeled PAA of unknown size was mineralized by soil microorganisms in four common agricultural soils, 0.12–0.24% in 6 months (~0.001% per day) (Wilske et al. 2014) (Supplementary table S1). These results show differences in biodegradation rates between experiments performed in culture media during short times compared to experiments performed in soil during more prolonged periods. These results may have been obtained because short-term analysis measures the more straightforward degradation reactions, but in the more extended experiments, the more complex, late biodegradative reactions are also measured. These also exhibit that the biodegradation rate is not a linear process, which should be considered when planning experiments for measuring this parameter.

### Side groups

The existence of side groups in AP chemical structure must be taken into account in biodegradation assessment. Since they are the first groups cleaved during biodegradation, a quantification analysis based only on the side groups' release will overestimate the polymer biodegradation rate. For instance, removal efficiencies of 70–76% in 5 days (~14.6% per day) for PAAm (16,000 kDa) were reported when the starch-cadmium-iodine (SCI) method that quantifies the release of amides was used for the analysis (Wen et al. 2010). On the other hand, when  $^{14}\text{C}$ -labeled PAAm and more extended monitoring periods were followed, slower biodegradation rates were observed. Thus, mineralization of 22.5% was quantified for a cationic  $^{14}\text{C}$ -labeled PAAm/[2-(acryloyloxy) ethyl] trimethyl ammonium chloride (AETAC) copolymer (6000 kDa) exposed to sludge-treated soils for 2 years (0.03% per day) (Hennecke et al. 2018). Also, a removal efficiency of 32.9% of hydrolyzed PAAm (HPAAm) (22,000 kDa), determined by TOC analysis, was obtained after 20 days of incubation (1.6% per day) with mixed cultures of *Bacillus cereus* and *Rhodococcus* strain EF028124, which was almost three times slower than that measured in a similar system by the SCI method, i.e., 89.8% in 20 days (4.5% per day) (Sang et al. 2015) (Supplementary table S1). Interestingly, evidence that the presence of amide groups facilitates AP biodegradation was shown in experiments where  $^{14}\text{C}$ -labeled PAAm/PAA or PAA were exposed for 76 days to soil microcosms inoculated with *P. chrysosporium*, causing mineralization rates of 7.3% (0.1% per day) and 0.95% (0.01 per day), respectively

(Stahl et al. 2000) (Supplementary table S1). The influence of other side groups, such as nitriles or alkyl groups, as methyl in PnAMA, has not been analyzed in AP biodegradation. Even though the enzymatic elimination of these side groups before the biochemical attack to the AP C-C backbone has to occur, it is unknown if their presence facilitates the whole polymer's biodegradation. Therefore, studies to analyze this possibility are needed. The existence of repetitive quaternary carbons in PnAMA (Fig. 2) increases the C-C backbone's recalcitrance, strongly limiting biodegradation. PnAMA recalcitrance was evident when a sodium methacrylate oligomer was exposed, in a 14-day experiment, to *Arthrobacter* sp. strain NO-18, capable of degrading Na acrylate oligomers, but not the methacrylate oligomer (Hayashi et al. 1993). In a future section, we will suggest, based on what has been observed in other types of compounds with quaternary carbons, that enzymatic reactions attacking quaternary carbons in PnAMA could be possible.

### Residual monomers and linear polymers

Commercial AP are not pure chemical products; they generally contain variable amounts of residual monomers or, in the case of cross-linked AP, they also have linear molecules (Bai et al. 2015; Dell'Ambrogio et al. 2019). Although these components do not contribute to the polymer's functionality, they might affect the polymer biodegradation assessment. No reports analyzing how residual monomers affect AP biodegradation have been published. However, the presence of monomers in polymer products could lead to overestimation of the biodegradation rates. On the other hand, for cross-linked PAA, the linear fraction present in the product is relevant for calculating biodegradation rates. Biodegradation measurements of two different Mw linear PAA were used to calculate their contribution to a cross-linked PAA's biodegradation rate, considering that about 4% remains linear (Bai et al. 2015; Wilske et al. 2014). The analysis showed that short-sized linear polymers have a more considerable contribution than the long-sized linear polymers in the cross-linked polymer's biodegradation rate (Bai et al. 2015). Therefore, since impurities on AP products influence biodegradation assessment, they should be pondered during experiments to avoid overestimating polymers' biodegradability.

### Enzymatic activities and pathways involved in microbial AP degradation

Several environmental microorganisms are capable of biodegrading some AP types, and they have been studied either isolated or in communities (Supplementary table S1). Identifying AP biodegrading microorganisms and elucidating



the catabolic pathways responsible for this capacity are fundamental for understanding the biodegradative process and developing or improving biotechnological techniques for AP waste treatment. Biochemical analysis of AP biodegradation has been mainly focused on PAA or PAAm, and several enzymatic reactions and metabolic pathways have been described, based on the metabolites and the enzymatic activities detected (Joshi and Abed 2017; Nyssölä and Ahlgren 2019). Since all AP have basic structural similarities, we propose that most AP may be biodegraded in a two-phase process.

### First phase: enzymatic elimination of side groups

In this phase, the different AP side groups, i.e., amide, nitrile, or alkyl groups bound by ester bonds, are cleaved from the C-C backbone by hydrolytic enzymatic activities, resulting in PAA or PAA-like molecules and low Mw intermediates (Fig. 3a). Enzymatic activities such as amidases, nitrile-degrading enzymes, esterases, and lipases have been responsible for AP side group modifications (Tauber et al. 2000; Mahalik and Madras 2005; Fischer-Colbrie et al. 2006; Zhao et al. 2019; Gitalis et al. 2019; Huang et al. 2018).

#### Amidases

Amidases or amidohydrolases are ubiquitous and versatile enzymes that cleave C-N bonds (Sharma and Nand 2009). Amidases that hydrolyze amides from AAm monomers, producing ammonium and acrylic acid, have been detected in several bacterial species (Joshi and Abed 2017). Different aspects such as culture conditions for inducing maximal expression, gene regulation, protein purification, and even directed evolution have been studied in amidases degrading AAm monomers (Jebasingh et al. 2013; Joshi and Abed 2017; Silman et al. 1991). However, little is known about PAAm amidases, which are inducible extra- and intracellular enzymes produced by microorganisms isolated from PAAm-treated soils selected by enrichment in cultures with PAAm as the only N source. Since PAAm cannot get across the cell membrane, it has been suggested that PAAm amidase induction is mediated by an unknown metabolite resulting from initial degradation steps (Kay-Shoemake et al. 1998a, b). In *Pseudomonas putida* HI47, a 35–45 kDa PAAm-induced extracellular aliphatic amidase converted the amide groups of a high Mw PAAm (17,000–22,000 kDa) into carboxyl groups under aerobic conditions (Yu et al. 2015). Also, amidase activity was demonstrated to be responsible for transforming PAAm into PAA during anaerobic biodegradation with a wastewater microbial community that includes *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, and others (Dai et al. 2015). Also, urease activity has been correlated with HPAAm degradation in an upflow anaerobic sludge blanket reactor system, where *Proteobacteria*, *Chloroflexi*,

*Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, and others were identified (Zhao et al. 2019). The significant role of ureases on HPAAm biodegradation was demonstrated by enzyme inhibition experiments in aerobic cultures of *Bacillus megaterium* SZK-5. The total nitrogen removal rate was lower at higher urease inhibitor concentration, but the HPAAm Mw was not affected as observed with no inhibitor, suggesting that the polymer backbone's cleavage requires the previous removal of the amide group by urease. This urease activity was mainly detected in the extracellular fraction (Song et al. 2019).

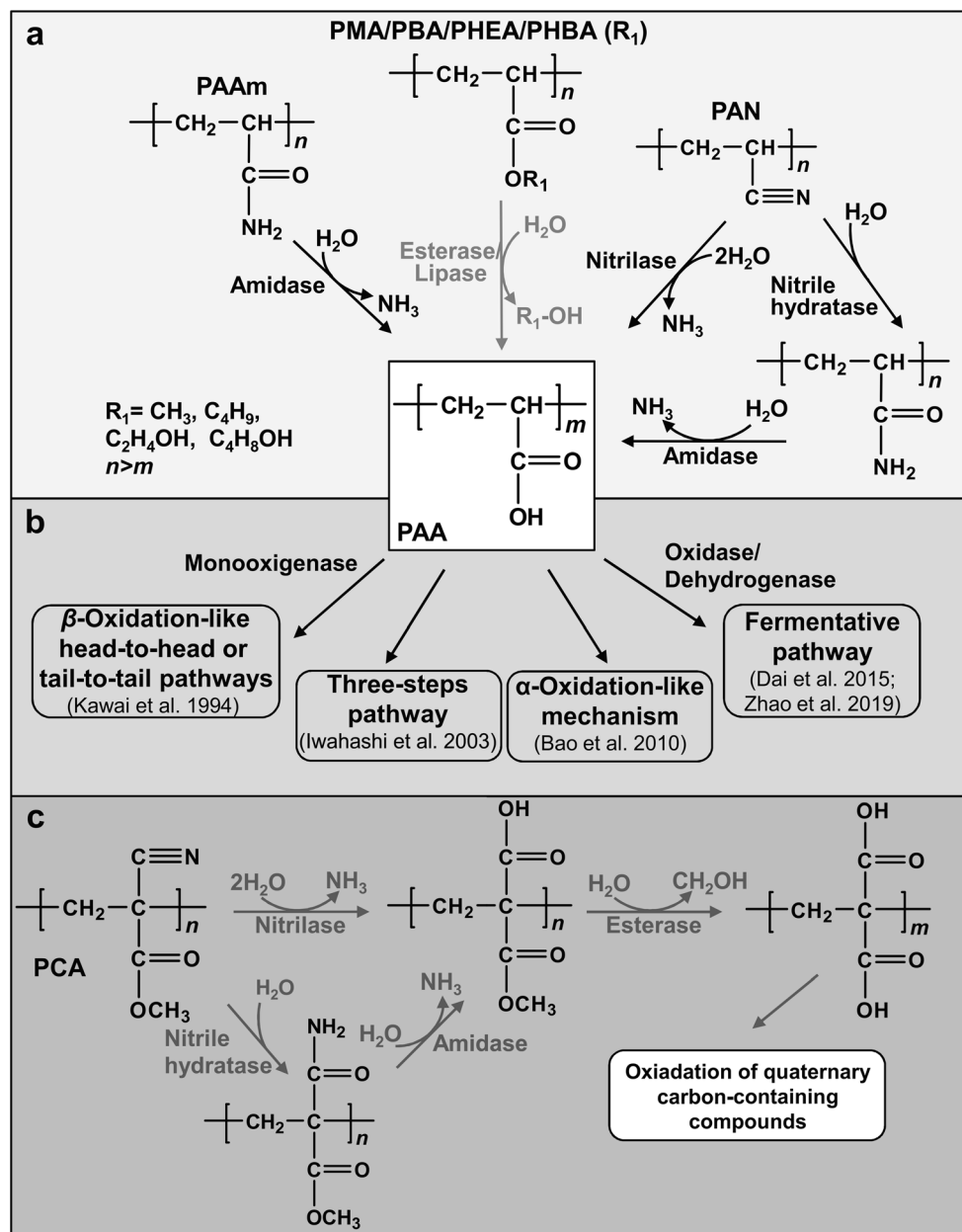
#### Nitrile-attacking enzymes

Nitrilases hydrolyze nitriles to carboxylic acids and NH<sub>3</sub>, while nitrile hydratases catalyze nitriles conversion to amides that subsequently are hydrolyzed to carboxylic acids and NH<sub>3</sub> by amidases (Yamada and Kobayashi 1996; Gong et al. 2012). Several bacteria produce one or both nitrile-attacking enzymes, which transform PAN into PAA (Fig. 3a) (Tauber et al. 2000; Fischer-Colbrie et al. 2006; Matamá et al. 2007). Both enzymes are produced under inducible or constitutive conditions, depending on the nutrients utilized during microbial cultivation (Yamada and Kobayashi 1996; Gong et al. 2012), being an advantage for future studies on PAN waste biodegradation. The direct conversion of PAN into PAA by the action of nitrilases was demonstrated by incubating the polymer with commercial enzymes and measuring ammonia release (Matamá et al. 2007) and analyzing the modifications in nitrilase-treated PAN by ATR-FTIR spectra (Akkaya and Ozseker 2019). The nitrile hydratase/amidase system produced by *R. rhodochrous* NCIMB 11216, induced by propionitrile, hydrolyzes PAN (granular and fibers) measured as ammonia release by spectrometry and confirmed by X-ray photoelectron spectroscopy (Tauber et al. 2000). In *Agrobacterium tumefaciens* BST05, the nitrile hydratase/amidase system was induced in a medium containing acetonitrile. Here, the enzymatic reaction was analyzed on PAN-powder, and the increase in O/C ratio (80%) on its surface indicates the incorporation of oxygen into the polymer, which results from the hydrolysis of nitrile to amide (Fischer-Colbrie et al. 2006). Theoretically, nitrilases and the nitrile hydratase/amidase system could similarly act on PCA, eliminating the cyano group as we propose in Fig. 3c. However, no information exists about the role of these activities on PCA biodegradation. Nitrile-attacking enzymatic reactions are of environmental interest for decontamination of soil and water (Müller and Gabriel 1999; Chand et al. 2004).

#### Esterases

The esterases' role in attacking AP ester bonds (Fig. 3a) was first suggested for the biodegradation of a copolymer of AAm and cationic monomers based on ester-containing compounds

**Fig. 3** Metabolic pathways for acrylic polymers (AP) biodegradation. **(a)** First phase (light gray rectangle): enzymatic attacks to amide, ester, and cyano side groups produce polyacrylic acid (PAA) (white square). **(b)** Second phase (medium gray rectangle): for the oxidation of the PAA C-C backbone, several aerobic and anaerobic metabolic pathways have been proposed. **(c)** Suggested pathway for polycyanoacrylate (PCA) biodegradation (dark gray rectangle). After cyano and ester group cleavage by nitrile-attacking enzymes and esterases, an acrylic acid analog is produced. This intermediate could be further oxidized. Gray arrows indicate hypothetical reactions



(Chang et al. 2005). In other work, esterase activity was detected when the biodegradability of fiberglass acrylic composite filters made of poly(ethylene terephthalate), polyvinyl alcohol, PMA, and PEA by two *Trichoderma harzianum* strains was analyzed (Sein et al. 2009). Studies on biodegradation of dental composites have shown that neutrophils in the oral cavity contain cholesterol esterase-like activities that could contribute to the degradation of methacrylate resins (Gitalis et al. 2019). Recently, studies on biodegradation of a methacrylate restoration tooth composite have shown that an esterase (SMU\_118c) of *Streptococcus mutans* UA159, an etiological agent in dental caries, is capable of catalyzing the hydrolysis of the resinous matrix of polymerized composites and adhesives by overexpression of the esterase gene (Huang et al.

2018). Moreover, our research group found that extracellular esterase activity from microbial communities selected from a landfill was higher when grown in a commercial acrylic dispersion (Bayhydrol®) than when grown in a non-acrylic polyurethane dispersion (Neorez®), used as sole carbon sources. Besides, an increase in FTIR's carbonyl signal when the polymer was exposed to the selected microbial communities supports esterase activity participation in AP biodegradation (Vargas-Suárez et al. 2019). The role of lipases has also been studied in AP biodegradation. In vitro biodegradation of PBA, PEA, and PMA by commercial lipases such as Novozym 435, Lipolase, and an enzyme from porcine pancreas (Sigma) was investigated in different solvents (benzene, toluene, xylene, chlorobenzene) and at various temperatures. The highest

enzymatic degradation rate (PMA > PBA > PEA) was with porcine pancreas activity in toluene at 50 °C (Mahalik and Madras 2005). We suggest that esterases could also be involved in eliminating the methyl group bound by an ester bond in PCA, releasing a compound containing quaternary carbons that could be oxidized (Fig. 3c), similarly to PnAMA, as we will discuss later.

## Second phase: cleavage of the acrylic polymers C-C backbone

### Aerobic pathways

The AP C-C backbone cleavage requires oxidative mechanisms to act after the side groups' initial hydrolysis occurs during the first phase (Fig. 3a and b; Supplementary table S1). Several oxidative pathways have been proposed based on the degradation products and the enzymatic activities detected during AP biodegradation (Fig. 3b). The first aerobic AP biodegradative pathway was suggested based on the propionic acid metabolism carried out by cell-free extracts of *Propionibacterium shermanii* (Kawai 1993). Propionic acid metabolism involves the esterification of propionic acid to acrylyl CoA and its reduction to propionyl CoA (Swick 1962). An analogous mechanism in which PAA activation by acyl-CoA synthetase, a key enzyme in  $\beta$ -oxidation, generates PAA-CoA, was suggested (Kawai 1993). Acyl-CoA synthetase activity was measured in cell-free extracts from *Microbacterium* sp. II-7-12, *Xanthomonas maltophilia* W1, and *Acinetobacter* genospecies 11 W2 axenic cultures able to grow in 1,3,5-pentane tricarboxylic acid (PTCA), a model molecule for studying AP biodegradation (Kawai 1993). Later on, three PTCA metabolic products were identified, supporting the idea that a metabolic pathway similar to  $\beta$ -oxidation accounted for the PTCA metabolism. Moreover, considering the resulting AA polymerization structures, two different mechanisms for PAA biodegradation, a head-to-head and a tail-to-tail pathway, were suggested by analogy to the PTCA metabolism (Kawai et al. 1994). On the other hand, during PNaA biodegradation by the L7-98 consortium, another oxidative mechanism based on the identification of low Mw products was proposed. This mechanism is suggested to occur via a three-step process: (a) oxidation of the terminal methylene ( $\alpha$ -C) to a carbonyl; (b) replacement of the terminal carboxyl by hydrogen during decarboxylation, followed by the formation of a double bond between the  $\alpha$ -C and  $\beta$ -C by dehydrogenation; and (c) oxidation of the terminal aldehyde to a carboxyl, and oxygenation of one of the carbons in the double bond, followed by dehydrogenation and release of acetic acid. The remaining molecule is shortened by repeating steps 2 and 3 (Iwahashi et al. 2003). Years later, a novel metabolic pathway for HPAAm biodegradation by two *Bacillus* species was proposed (Bao et al. 2010). This pathway

integrates side groups' deamination to produce PAA and C-C backbone metabolism by a fatty acids  $\alpha$ -oxidation-like mechanism based on monooxygenase activities. Initially, the  $\alpha$ -C is oxidized to alcohol, transformed into carbonyl, and later to carboxyl, resulting in the main chain's cleavage and low Mw compounds (Bao et al. 2010). In this work, experimental evidence for deamination was presented, but no evidence for the C-C backbone cleavage or the enzymatic activities were offered. Recently, the role of Cytochrome P450 (CytP450) on PAAm biodegradation by *B. megaterium* SZK-5 was demonstrated by enzyme activity inhibition experiments. High concentrations of the inhibitor resulted in a significant decrease of TOC removal rate and the non-reduction of polymer Mw, suggesting that CytP450 participates in the C-C backbone cleavage and carbon biotransformation. Analysis of TOC removal rate by extracellular, periplasmic, and cytoplasmic fractions revealed that the CytP450 activity is located in the cytoplasm and extracellular or a membrane-bound urease activity is previously required for the oxidation of the C-C backbone (Song et al. 2019). Recent studies in our group revealed the catalytic capability of a landfill microbial community selected to aerobically degrade a polyether-polyurethane-acrylate copolymer from a commercial coating (PolyLack®). By FTIR spectroscopy, changes in signal intensity showed the catabolism of the acrylate component. Besides, by a proximity ligation-based-metagenomic analysis, genes encoding oxidative enzymes for alkane metabolism such as alkane 1-monooxygenases, unspecific monooxygenases, long-chain alkane monooxygenases, or reductive enzymes such as alcohol dehydrogenases (ADH) and aldehyde dehydrogenases (ALDH), as well as a large number of genes encoding acetyl-CoA C-acetyltransferases (20 genes) and acyl-CoA synthetases (10 genes), involved in  $\beta$ -oxidation, were revealed. Besides, genes encoding esterases and amidases were also identified. The identification of these genes suggests that some of the encoded proteins could be involved in AP biodegradation. Esterases and amidases would attack AP side groups, monooxygenases would activate the aliphatic acrylate chains (C-C backbone) by terminal or subterminal oxidations, and ADH and ALDH would generate intermediate compounds that can be channeled to  $\alpha$  or  $\beta$ -oxidation (Gaytán et al. 2020).

### Anaerobic pathways

Anaerobic pathways for AP biodegradation have been proposed after demonstrating the biological degradation of PAAm in waste-activated sludges (Dai et al. 2014) and assaying enzymatic activities proposed to participate in PAAm biodegradation (Dai et al. 2015). After amidases convert PAAm to PAA (first phase), PAA's transformation to acetyl-CoA and pyruvic acid occurs. Subsequently, these intermediates were transformed into acetic, butyric, propionic,

or fumaric acids. Increments in amidase, ADH, phosphotransacetylase, acetate kinase, phosphotransbutyrylase, butyrate kinase, oxaloacetate transcarboxylase, and CoA transferase activities were observed in experiments with larger PAAm degradation (Dai et al. 2015). Similar results were observed for HPAAm fermentation by an activated sludge microbial community integrated by *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Chloroflexi*, among others, in which dehydrogenase and urease activities correlated with HPAAm biodegradation. The hydrolysis of C-N by ureases, followed by the participation of dehydrogenases and monooxygenases (non-demonstrated), producing acetyl-CoA, pyruvic acid, and organic acids (acetic, propionic, and butyric) as biodegradation products, was proposed (Zhao et al. 2019).

### Fungal enzymes

The extracellular lignin-degrading system from the fungus *P. chrysosporium*, which involves lignin peroxidases, manganese peroxidases (MnP), versatile peroxidases, and laccases, as well as the extracellular reductases and CDH, has been shown to cleave the AP C-C backbone (Sutherland et al. 1997; Stahl et al. 2000). Culture conditions for the selective expression of these fungal enzymes, based on nitrogen limitation or sufficiency and different carbon sources, have been defined. When the lignin-degrading system is induced,  $^{14}\text{C}$ -labeled cross-linked high Mw PAA and PAA/PAAm were completely depolymerized to water-soluble metabolites in 15–18 days, but only 8% mineralization was reached. In longer incubation times (> 18 days), more than 80% of the radioactivity was detected in fungal mycelia, suggesting that the AP carbon was metabolized and assimilated (Sutherland et al. 1997). The selective participation of enzymes from the lignin-degrading system and their role in the biodegradation of PAA and a PAA/PAAm copolymer was demonstrated in a cooperative process between *P. chrysosporium* and soil microorganisms. This synergistic process was observed in microcosms composed of sawdust inoculated with the fungus and non-sterilized soil for 76 days. Mineralization levels in microcosms containing both biological systems were larger (PAA: 0.95%, PAA/PAAm: 7.3% of  $^{14}\text{CO}_2$ ) than those in which only soil microorganisms (PAA: 0.22%, PAA/PAAm: 0.35% of  $^{14}\text{CO}_2$ ) or only fungus (PAA: 0.76%, PAA/PAAm: 4.3% of  $^{14}\text{CO}_2$ ) were present (Supplementary table S1). Moreover, the polymers incubated with the fungus grown at specific conditions for peroxidases or CDH induction were solubilized. When the fungus-treated polymers were added to a soil microcosm, the mineralization process improved up to 27 times compared to the polymer only treated by the soil microcosm (Stahl et al. 2000) (Supplementary table S1). In other work, at induction conditions for *P. chrysosporium* CDH activity, insoluble cross-linked PAA

and a PAA/PAAm copolymer were solubilized and mineralized. Moreover, the addition of iron improved the biodegradation process (Cameron et al. 2000).

### The biochemical challenge of poly(*n*-alkyl methacrylates) biodegradation: a hypothesis

In PnAMA, the presence of repetitive quaternary carbons in their main chain and the different isomeric structures generated by random polymerization (Fig. 4) make biodegradation a challenging task. Quaternary carbons confer PnAMA high recalcitrance since the oxidative reactions needed for channeling the C-C backbone into  $\beta$ -oxidation are blocked because of the steric hindrance of methyl groups (Chiellini et al. 2003). The few works addressing PnAMA biodegradability by bacteria or fungi are coincident that these materials are highly recalcitrant (Hayashi et al. 1993; Sabatini et al. 2018). However, based on what has been observed in biodegradation studies of other compounds containing quaternary carbons, such as pivalic acid and isooctane (Probian et al. 2003; Solano-Serena et al. 2004), PnAMA biodegradation might be feasible. In the biodegradation mechanisms proposed for these compounds, the activity of mutases and decarboxylases has been suggested, based on the identified biodegradation products. These activities would transform quaternary carbons into tertiary carbon compounds, allowing that other subsequent biochemical reactions may act over them (Probian et al. 2003; Solano-Serena et al. 2004). For PnAMA biodegradation, the esterase hydrolytic attack to cleave the side groups must be the first step. This activity on PnAMA has been observed in neutrophils and *S. mutans* UA159 (Gitalis et al. 2019; Huang et al. 2018). After that, a PAA-like compound with methyl substituents attached to some carbons will be produced. In this compound, the terminal carbon, tertiary or quaternary, will define the biodegradative mechanism's initial step (Fig. 4). In any case, the carboxyl of the terminal unit has to be activated by acyl-CoA transferase. Therefore, polymers with terminal tertiary carbon such as head-to-head and tandem isomers can undergo a  $\beta$ -oxidation cycle (Fig. 4). However, isomers with a terminal quaternary carbon (tail-to-tail) would require mutase activity to integrate the methyl substituent attached to the  $\alpha$ -C into the C-C main chain, which channels it into  $\beta$ -oxidation until a new quaternary carbon would be found. After a first  $\beta$ -oxidation cycle, mutases or decarboxylases would be required to process the polymer's quaternary carbons. Each  $\beta$ -oxidation cycle will shorten the polymer in three or two carbons, producing propionyl CoA as the main product and acetyl-CoA from one of the isomers. By the action of phosphate transferases and kinases, these compounds will be transformed into organic acids as proposed for branched-chain fatty acid metabolism (Narihiro et al. 2016) (Fig. 4). No microorganisms capable of degrading PnAMA

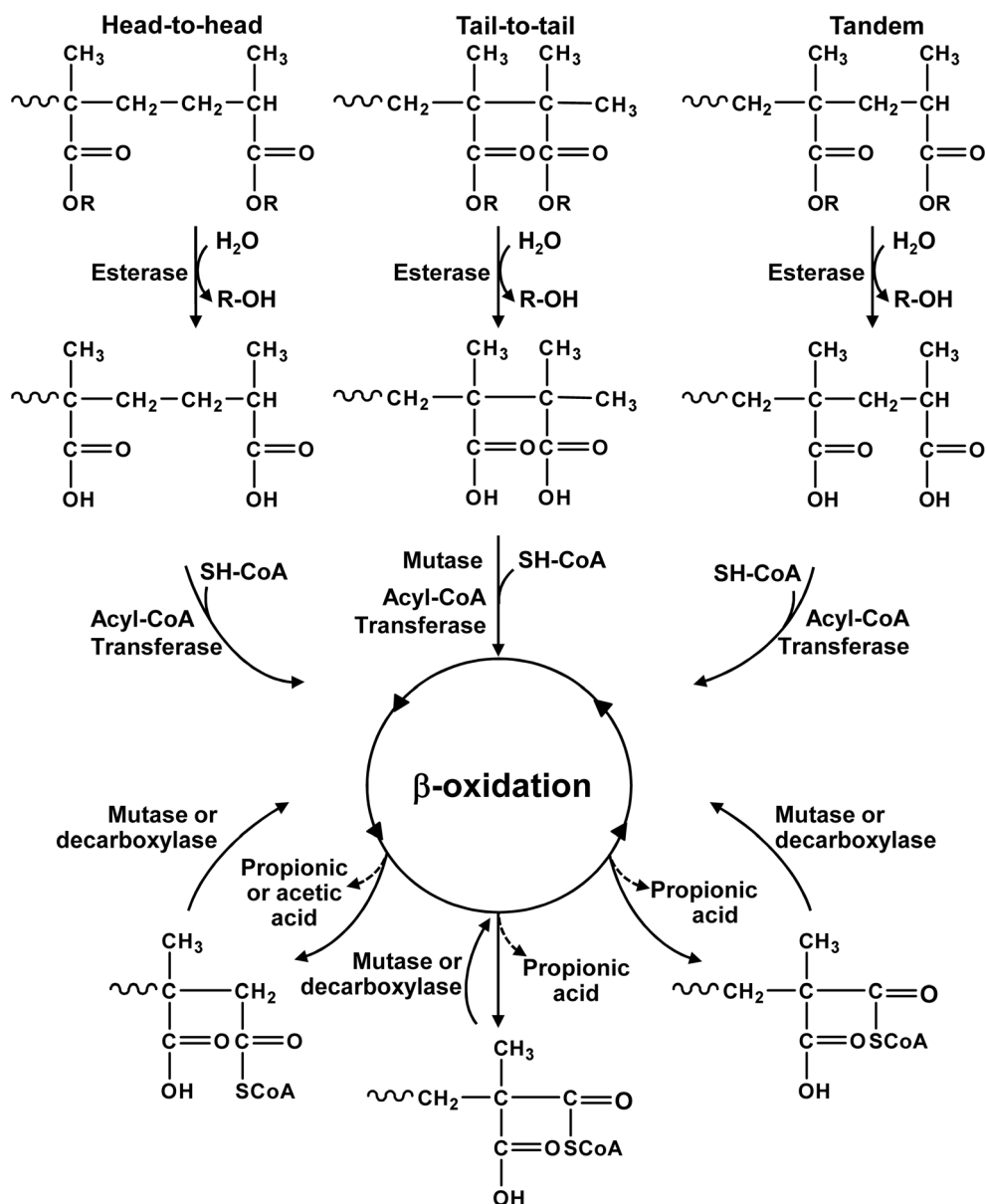
have been reported so far; this might be because the proper conditions for growing microorganisms with this capacity have not been discovered. Besides, some microorganisms might require longer cultivation periods for displaying a unique capacity.

## Strategies to increase AP biodegradability: structure modifications and hybrid degradation methods

AP containing components inducing higher polymer biodegradability have been synthesized as an approach to overcome the limitations imposed by the C-C backbone recalcitrance, and some of them have provided positive results

(Supplementary table S1). This strategy's rationale is to polymerize in the C-C backbone or add, as side groups, some compounds that favor cleavage, decreasing AP size. Radicals generating phenolic compounds such as *p*- and *o*-aminophenol, and non-phenolics such as *p*-aminoaniline and acrolein, have been included as side groups in PAA and cross-linked PAA. After 1 day of incubation with MnP, modified PA decrease Mw (34–63%), and modified cross-linked PAA reduced their insoluble fractions (41%), while non-modified polymers did not display significant changes (Ito et al. 2005). Also, PAN and PAAm C-C backbone grafted with N-benzyl-4-vinylpyridinium chloride (BVP) became more biodegradable. BVP adheres to bacterial cells and maintains their viability favoring grafted polymer biodegradation (Kawabata et al. 2006; Kawabata and Fuse 2006). PAN-*co*-BVP

**Fig. 4** Proposed hypothetical catabolic reactions involved in biodegradation of poly(*n*-alkyl methacrylates) (PnAMA). Different isomeric structures, based on Kawai et al. (1994) and Iwahashi et al. (2003), can be generated during PnAMA polymerization (upper structures). For the biodegradation of the different PnAMA isomers, distinct enzymatic reactions have to occur. Esterases must first cleave the side groups bound by ester bonds to the polymer, releasing alkyl alcohols. After that, the molecule has to be activated for entrance to  $\beta$ -oxidation. However, for the tail-to-tail isomer, mutases must shift the methyl group, from the last quaternary carbon unit, to a linear conformation, which would allow the first  $\beta$ -oxidation cycle. During  $\beta$ -oxidation, 2 or 3 carbons would be eliminated, depending on the isomer, producing CoA derivatives. Further reactions by phosphate transferases and kinases will produce organic acids. The remaining PnAMA polymer will need new reactions by mutases or decarboxylases for additional  $\beta$ -oxidation cycles



copolymers showed a 54–90% weight decrease after treated for 28 days with activated sludge in soil, while the non-modified PAN weight remained constant (Kawabata et al. 2006). Similarly, PAAm-co-BVP exposed to an activated sludge for 7 days showed a TOC reduction up to 80% of its original value at the end of the treatment, while non-modified PAAm was unchanged (Kawabata and Fuse 2006). Also, the biodegradability of different types of AP, grafted with natural components such as storage or structural polysaccharides (cellulose, chitin, starch, or those contained in tamarind kernel powder), has been studied, showing more susceptibility to different enzymatic, bacteria, and fungi treatments than non-grafted AP (Saroja et al. 2000; Wang and Yang 2010; Mittal et al. 2013; Navarchian et al. 2013; Del Real et al. 2015; Saruchi et al. 2015). Although in most cases, AP grafting has been successful in achieving improved AP mineralization levels, there are cases where this strategy did not produce the expected results (Mai et al. 2004). Large size or high Mw of the AP chain might be the reason; thus, specific grafting strategies for each AP type and each biological system must be tested. However, this approach may not be as good as expected since it accelerates toxic monomers' release before complete mineralization is set.

Assisted bioremediation techniques that involve synergy between physical, chemical, and biological methods have been tested for AP waste treatment. Some of them include photodegradation by UV radiation (El-Mamouni et al. 2002), oxidation with the Fenton reagent (Zhang et al. 2019), or with zerovalent iron/EDTA/air (Lu and Wei 2011), as a pretreatment for aerobic or anaerobic biological process. In most cases, pretreatment improves AP solubilization by reducing Mw; thus, hybrid technologies increase AP removal rates and enhance mineralization.

## Conclusions and perspectives

The diversity of AP materials is equivalent to their extensive and increasing applications in multiple areas. Because AP materials had been considered not harmful for the environment and human health, no regulations for their use and waste disposal have been implemented in many countries. Nevertheless, the current information about the effect AP releases generate and the damages that can be foreseen by their accumulation in the environment, plus the toxicity of some of their components, indicates that regulations for controlling AP use and waste management should be established. Extensive and detailed analyses about the environmental fates AP could reach after their lifecycles would help develop better waste management strategies.

AP microbial biodegradation can be carried out on some types of polymers and to some extent. An AP biodegradability assessment, which defines the biodegradation rate a polymer

is degraded, will depend on the polymer's structure, the microorganisms and the environment where the process is carried out, and the techniques used to quantitate AP degradation. The C-C backbone, the presence of side groups, quaternary carbons, and impurities of AP products significantly affect the biodegradability assessment, which is crucial in defining the magnitude of AP environmental impact. Therefore, unifying the use of techniques for measuring biodegradation would be beneficial for providing comparable data to define accurate biodegradation rates. Using isotopic C-labeled AP materials for quantifying transformation to CO<sub>2</sub>, biomass, or intermediate biodegradation products is the more objective approach. Moreover, performing long-time experiments is essential since the more quickly eliminated groups, measured in short-time experiments, generate overestimation of the degradation rates because the C-C backbone cleavage, the most recalcitrant segment, is not quantified, providing with false expectations about how long an AP would last to be degraded.

Significant advances in the elucidation of AP biodegradative pathways have been reached, mainly supported by analytical techniques. Nevertheless, many aspects remain to be discovered. The characterization of enzymes accounting for the proposed reactions and the transport of the degradation products into the cells is still missing. Besides, nothing is known about the genes encoding these proteins and the genome organization, expression, and regulation of AP attacking microorganisms. The knowledge of genes encoding AP biodegradative enzymes will be a starting point for cloning genes for producing recombinant proteins, developing metabolic engineering strategies, and doing directed evolution research that will open a vast panorama for biotechnological advances. Furthermore, exploring the catalytic potential of environmental communities with AP degrading capacities by “omics” technologies is a promising strategy for designing tailor-made microbial consortia highly specialized for AP mineralization. Perhaps, future biotechnological-based products might include microorganisms or enzymes with a broad spectrum of activities that might efficiently degrade diverse AP types to prevent their accumulation in the environment.

Finally, we would like to stress that even though science and technology are working for searching solutions for plastic pollution by re-thinking the design of products and by developing holistic strategies to contribute to reducing the impact of polymers to the environment, the regulation for polymer use and waste management is in the governments and industries' hands.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11073-1>.

**Acknowledgments** IG and MB acknowledge Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for their PhD scholarships. The authors

sincerely thank Dr. Alexander Steinbüchel for the invitation to write this mini-review and the reviewer for the excellent suggestions for improving our manuscript.

**Authors' contributions** IGE and HLT conceived and designed this review's content, wrote most of the manuscript, analyzed all the subjects, contributed critical insights on acrylic polymers biodegradation, and designed the figures. MB wrote the "Acrylic polymers' chemistry, properties, and applications" section, advised on chemical nomenclature, compiled data in Table 1, and drew the chemical structures shown in the figures. All authors read and approved the manuscript.

**Funding** This work was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México grant IN227620; Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, grant 5000-9117; and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Ciencia de Frontera 2019 grant 101737.

## Compliance with ethical standards

**Competing interests** The authors declare that they have no competing interests.

**Ethical approval** Not required.

## References

- Abo-Salem OM, Abd-Ellah MF, Ghonaim MM (2011) Hepatoprotective activity of quercetin against acrylonitrile-induced hepatotoxicity in rats. *J Biochem Mol Toxicol* 25:386–392. <https://doi.org/10.1002/jbt.20406>
- Adegbola TA, Agboola O, Fayomi OSI (2020) Review of polyacrylonitrile blends and application in manufacturing technology: recycling and environmental impact. *Res Eng Des* 7:100144. <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2020.100144>
- Aggour YA, Aziz MS (2000) Degradation of polyacrylonitrile by low energy ion beam and UV radiation. *Polym Test* 19:261–267. [https://doi.org/10.1016/S0142-9418\(98\)00087-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9418(98)00087-7)
- Akkaya A, Ozseker EE (2019) Modification of polyacrylonitrile fabric for antibacterial application by tetracycline immobilization. *Polym Test* 78:105959. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2019.105959>
- Bai M, Wilske B, Buegger F, Esperschütz J, Bach M, Frede HG, Breuer L (2015) Relevance of nonfunctional linear polyacrylic acid for the biodegradation of superabsorbent polymer in soils. *Environ Sci Pollut Res* 22:5444–5452. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3772-0>
- Bao M, Chen Q, Li Y, Jiang G (2010) Biodegradation of partially hydrolyzed polyacrylamide by bacteria isolated from production water after polymer flooding in an oil field. *J Hazard Mater* 184:105–110. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.08.011>
- Bedade DK, Singhal RS (2018) Biodegradation of acrylamide by a novel isolate, *Cupriavidus oxalaticus* ICTDB921: identification and characterization of the acrylamidase produced. *Bioresour Technol* 261:122–132. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.012>
- Borak J, Fields C, Andrews LS, Pemberton MA (2011) Methyl methacrylate and respiratory sensitization: a critical review. *Crit Rev Toxicol* 41:230–268. <https://doi.org/10.3109/10408444.2010.532768>
- Cameron MD, Post ZD, Stahl JD, Haselbach J, Aust SD (2000) Cellobiose dehydrogenase-dependent biodegradation of polyacrylate polymers by *Phanerochaete chrysosporium*. *Environ Sci Pollut Res* 7:130–134. <https://doi.org/10.1065/espr2000.04.022>
- Caulfield MJ, Qiao GG, Solomon DH (2002) Some aspects of the properties and degradation of polyacrylamides. *Chem Rev* 102:3067–3083. <https://doi.org/10.1021/cr010439p>
- Chand D, Kumar H, Sankhian UD, Kumar D, Vitzthum F, Chand T (2004) Treatment of simulated wastewater containing toxic amides by immobilized *Rhodococcus rhodochrous* NHB-2 using a highly compact 5-stage plug flow reactor. *World J Microbiol Biotechnol* 20:679–686. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-2158-8>
- Chang JS, Abu-Orf M, Dentel SK (2005) Alkylamine odors from degradation of flocculant polymers in sludges. *Water Res* 39:3369–3375. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.05.047>
- Chiellini E, Corti A, D'Antone S, Solaro R (2003) Biodegradation of poly(vinyl alcohol) based materials. *Prog Polym Sci* 28:963–1014. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(02\)00149-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(02)00149-1)
- Cook BD, Bloom PR, Halbach TR (1997) Fate of a polyacrylate polymer during composting of simulated municipal solid waste. *J Environ Qual* 26:618–625. <https://doi.org/10.2134/jeq1997.00472425002600030005x>
- Dai X, Luo F, Yi J, He Q, Dong B (2014) Biodegradation of polyacrylamide by anaerobic digestion under mesophilic condition and its performance in actual dewatered sludge system. *Bioresour Technol* 153:55–61. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.007>
- Dai X, Luo F, Zhang D, Dai L, Chen Y, Dong B (2015) Waste-activated sludge fermentation for polyacrylamide biodegradation improved by anaerobic hydrolysis and key microorganisms involved in biological polyacrylamide removal. *Sci Rep* 5:1–13. <https://doi.org/10.1038/srep11675>
- De Matos O (2019) The ECETOC conceptual framework for polymer risk assessment (CF4Polymers). Technical Report No. ECETOC AISBL, European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Brussels, pp 133–131
- Del Real A, Wallander D, Maciel A, Cedillo G, Loza H (2015) Graft copolymerization of ethyl acrylate onto tamarind kernel powder, and evaluation of its biodegradability. *Carbohydr Polym* 117:11–18. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.044>
- DeLeo PC, Summers H, Stanton K, Lam MW (2020) Environmental risk assessment of polycarboxylate polymers used in cleaning products in the United States. *Chemosphere* 258:127242. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127242>
- Dell'Ambrogio G, Wong JWY, Ferrari BJD (2019) Ecotoxicological effects of polyacrylate, acrylic acid, polyacrylamide and acrylamide on soil and water organisms. Swiss Centre for Applied Ecotoxicology, Lausanne
- El-Mamouni R, Frigon J, Hawari J, Marroni D, Guiot SR (2002) Combining photolysis and bioprocesses for mineralization of high molecular weight polyacrylamides. *Biodegradation* 13:221–227. <https://doi.org/10.1023/A:1021272519714>
- Esmizadeh E, Khalili S, Vahidifar A, Naderi G, Dubois C (2019) Waste polymethyl methacrylate (PMMA): recycling and high-yield monomer recovery. In: *Handbook of ecomaterials*. Springer Nature, Switzerland. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-68255-6\\_164](https://doi.org/10.1007/978-3-319-68255-6_164)
- EURAR (2004) European Union Risk Assessment Report AN. <https://echa.europa.eu/documents/10162/22bf49d3-e951-44b8-a45a-6973d3dc62f6>. Accessed 23 October 2020.
- Fater (2020) Our challenge is to turn the use of baby diapers, hygienic pads and incontinence products into an advantage also for the environment. <https://fatergroup.com/en/news/recycling-project>. Accessed 23 October 2020
- Fischer-Colbrie G, Herrmann M, Heumann S, Puolakka A, Wirth A, Cavaco-Paulo A, Guebitz GM (2006) Surface modification of polyacrylonitrile with nitrile hydratase and amidase from *Agrobacterium*

- tumefaciens*. Biocatal Biotransform 24:419–425. <https://doi.org/10.1080/10242420601033977>
- Freeman MB, Bender TM (1993) An environmental fate and safety assessment for a low molecular weight polyacrylate detergent additive. Environ Technol 14:101–112. <https://doi.org/10.1080/09593339309385269>
- Freeman MB, Paik YH, Swift G, Wilczynski R, Wolk SK, Yocom KM (1996) Biodegradability of polycarboxylates: structure-activity studies. ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington, DC, pp 118–136
- Gaytán I, Sánchez-Reyes A, Burelo M, Vargas-Suárez M, Liachko I, Press M, Sullivan S, Cruz-Gómez MJ, Loza-Tavera H (2020) Degradation of recalcitrant polyurethane and xenobiotic additives by a selected landfill microbial community and its biodegradative potential revealed by proximity ligation-based metagenomic analysis. Front Microbiol 10:2986. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02986>
- Gitalis R, Zhou L, Marshdeh MQ, Sun C, Glogauer M, Finer Y (2019) Human neutrophils degrade methacrylate resin composites and tooth dentin. Acta Biomater 88:325–331. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.02.033>
- Gong JS, Lu ZM, Li H, Shi JS, Zhou ZM, Xu ZH (2012) Nitrilases in nitrile biocatalysis: recent progress and forthcoming research. Microb Cell Factories 11:1–18. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-142>
- Hayashi T, Mukoyama M, Sakano K, Tani Y (1993) Degradation of a sodium acrylate oligomer by an *Arthrobacter* sp. Appl Environ Microbiol 59:1555–1559. <https://doi.org/10.1128/aem.59.5.1555-1559.1993>
- Hayashi T, Nishimura H, Sakano K, Tani Y (1994) Microbial degradation of poly(sodium acrylate). Biosci Biotechnol Biochem 58:444–446. <https://doi.org/10.1271/bbb.58.444>
- Hennecke D, Bauer A, Herrchen M, Wischerhoff E, Gores F (2018) Cationic polyacrylamide copolymers (PAMs): environmental half life determination in sludge-treated soil. Environ Sci Eur 30(16):1–13. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0143-3>
- Huang B, Sadeghinejad L, Adebayo OIA, Ma D, Xiao Y, Siqueira WL, Cvitkovitch DG, Finer Y (2018) Gene expression and protein synthesis of esterase from *Streptococcus mutans* are affected by biodegradation by-product from methacrylate resin composites and adhesives. Acta Biomater 81:158–168. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.050>
- Ito S, Okada Y, Hirai H, Nishida T (2005) Degradation of poly(acrylic acid)s with phenolic side-chains by manganese peroxidase from white rot fungi. J Polym Environ 13:357–363. <https://doi.org/10.1007/s10924-005-5530-3>
- Iwahashi M, Katsuragi T, Tani Y, Tsutsumi K, Kakiuchi K (2003) Mechanism for degradation of poly(sodium acrylate) by bacterial consortium no. L7-98. J Biosci Bioeng 95:483–487. <https://doi.org/10.1263/jbb.95.483>
- Jebasingh SEJ, Lakshmikandan M, Rajesh RP, Raja P (2013) Biodegradation of acrylamide and purification of acrylamidase from newly isolated bacterium *Moraxella osloensis* MSU11. Int Biodeterior Biodegrad 85:120–125. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.06.012>
- Joshi SJ, Abed RMM (2017) Biodegradation of polyacrylamide and its derivatives. Environ Process 4:463–476. <https://doi.org/10.1007/s40710-017-0224-0>
- Kawabata N, Fuse T (2006) Coagulation and sedimentation of bacteria using a highly biodegradable polymeric coagulant. J Appl Polym Sci 100:1618–1623. <https://doi.org/10.1002/app.23669>
- Kawabata N, Ohashi K, Nishiyama T (2006) Releasing polyacrylonitrile from poor biodegradability by insertion of a highly biodegradable chemical structure into the main chain. J Appl Polym Sci 99:852–857. <https://doi.org/10.1002/app.22591>
- Kawai F (1993) Bacterial degradation of acrylic oligomers and polymers. Appl Microbiol Biotechnol 39:382–385. <https://doi.org/10.1007/BF00192097>
- Kawai F, Igarashi K, Kasuya F, Fukui M (1994) Proposed mechanism for bacterial metabolism of polyacrylate. J Environ Polym Degrad 2: 59–65. <https://doi.org/10.1007/BF02074774>
- Kay-Shoemaker JL, Watwood ME, Lentz RD, Sojka RE (1998a) Polyacrylamide as an organic nitrogen source for soil microorganisms with potential effects on inorganic soil nitrogen in agricultural soil. Soil Biol Biochem 30:1045–1052. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00250-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00250-2)
- Kay-Shoemaker JL, Watwood ME, Sojka RE, Lentz RD (1998b) Polyacrylamide as a substrate for microbial amidase in culture and soil. Soil Biol Biochem 30:1647–1654. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00251-4](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00251-4)
- Kikuchi Y, Hirao M, Ookubo T, Sasaki A (2014) Design of recycling system for poly(methyl methacrylate) (PMMA). Part 1: recycling scenario analysis. Int J Life Cycle Assess 19:120–129. <https://doi.org/10.1007/s11367-013-0624-y>
- Kolvenbach BA, Helbling DE, Kohler HE, Corvini PF (2014) Emerging chemicals and the evolution of biodegradation capacities and pathways in bacteria. Curr Opin Biotechnol 27:8–14. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.017>
- Larson RJ, Bookland EA, Williams RT, Yocom KM, Saucy DA, Freeman MB, Swift G (1997) Biodegradation of acrylic acid polymers and oligomers by mixed microbial communities in activated sludge. J Environ Polym Degrad 5:41–48. <https://doi.org/10.1007/BF02763567>
- Lu M, Wei X (2011) Treatment of oilfield wastewater containing polymer by the batch activated sludge reactor combined with a zerovalent iron/EDTA/air system. Bioresour Technol 102:2555–2562. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.103>
- Mahalik JP, Madras G (2005) Effect of the alkyl group substituents on the thermal and enzymatic degradation of poly(*n*-alkyl acrylates). Ind Eng Chem Res 44:4171–4177. <https://doi.org/10.1021/ie0500164>
- Mai C, Schormann W, Majcherczyk A, Hüttermann A (2004) Degradation of acrylic copolymers by white-rot fungi. Appl Microbiol Biotechnol 65:479–487. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1668-5>
- Maksimova YG, Vasil'ev DM, Zorina AS, Ovechkina GV, Maksimov AY (2018) Acrylamide and acrylic acid biodegradation by *Alcaligenes faecalis* 2 planktonic cells and biofilms. Appl Biochem Microbiol 54:173–178. <https://doi.org/10.1134/s0003683818020084>
- Matamá T, Carneiro F, Caparrós C, Gübitz GM, Cavaco-Paulo A (2007) Using a nitrilase for the surface modification of acrylic fibres. Biotechnol J 2:353–360. <https://doi.org/10.1002/biot.200600068>
- McKeen LW (2012) Styrenic plastics. In: Permeability properties of plastics and elastomers, Plastics Design Library (Third Edition). William Andrew Publishing, pp 77–88. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-3469-0.10005-0>
- Mittal H, Fosso-Kankeu E, Mishra SB, Mishra AK (2013) Biosorption potential of Gum ghatti-g-poly(acrylic acid) and susceptibility to biodegradation by *B. subtilis*. Int J Biol Macromol 62:370–378. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.09.023>
- Morro A, Catalina F, Corrales T, Pablos JL, Marin I, Abrusci C (2016) New blends of ethylene-butyl acrylate copolymers with thermoplastic starch. Characterization and bacterial biodegradation. Carbohydr Polym 149:68–76. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.075>
- Mosley AP (2017) Acrylic plastics. Brydson's plastics materials, eighth edition. Elsevier Ltd, pp 441–456. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35824-8.00016-5>
- Müller D, Gabriel J (1999) Bacterial degradation of the herbicide bromoxynil by *Agrobacterium radiobacter* in biofilm. Folia Microbiol 44:377–379. <https://doi.org/10.1007/BF02903708>



- Narihiro T, Nobu MK, Tamaki H, Kamagata Y, Sekiguchi Y, Liu WT (2016) Comparative genomics of syntrophic branched-chain fatty acid degrading bacteria. *Microbes Environ* 31:288–292. <https://doi.org/10.1264/jsm2.ME16057>
- Navarchian AH, Sharafi A, Kermanshahi RK (2013) Biodegradation study of starch-graft-acrylonitrile copolymer. *J Polym Environ* 21: 233–244. <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0518-2>
- Nuss P, Gardner KH (2013) Attributional life cycle assessment (ALCA) of polyitaconic acid production from northeast US softwood biomass. *Int J Life Cycle Assess* 18:603–612. <https://doi.org/10.1007/s11367-012-0511-y>
- Nyssonölä A, Ahlgren J (2019) Microbial degradation of polyacrylamide and the deamination product polyacrylate. *Int Biodeterior Biodegrad* 139:24–33. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.02.005>
- O'Leary KA, Paul DR (2006) Physical properties of poly(*n*-alkyl acrylate) copolymers. Part 1. Crystalline/crystalline combinations. *Polymer* 47:1226–1244. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.12.005>
- Oksińska MP, Magnucka EG, Lejcuś K, Jakubiak-Marcinkowska A, Ronka S, Trochimczuk AW, Pietr SJ (2019) Colonization and biodegradation of the cross-linked potassium polyacrylate component of water absorbing geocomposite by soil microorganisms. *Appl Soil Ecol* 133:114–123. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.09.014>
- P2L (2019) Innovative and environmentally friendly acrylic (PMMA-polymethyl methacrylate) recycling technology. <http://www.plant2life.com>. Accessed 23 October 2020
- Pemberton MA, Lohmann BS (2014) Risk assessment of residual monomer migrating from acrylic polymers and causing allergic contact dermatitis during normal handling and use. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:467–475. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.05.013>
- PMMA (2018) PMMA/acrylic sustainable solutions. <https://www.pmma-online.eu/sustainability/>. Accessed 23 October 2020
- Probian C, Wulfin A, Harder J (2003) Anaerobic mineralization of quaternary carbon atoms: isolation of denitrifying bacteria on pivalic acid (2,2-dimethylpropionic acid). *Appl Environ Microbiol* 69: 1866–1870. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1866-1870.2003>
- Rustamov IR, Dyatlov VA, Grebeneva TA, Dyatlov AV, Zaitsev VV, Maleev VI (2014) Polycyanoacrylate porous material for bone tissue substitution. *J Mater Chem B* 2:4310–4317. <https://doi.org/10.1039/c4tb00554f>
- Sabatini V, Cattò C, Cappelletti G, Cappitelli F, Antenucci S, Farina H, Ortenzi MA, Camazzola S, Di Silvestro G (2018) Protective features, durability and biodegradation study of acrylic and methacrylic fluorinated polymer coatings for marble protection. *Prog Org Coat* 114:47–57. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2017.10.003>
- Šajn N (2019) Environmental impact of the textile and clothing industry. EPRS|European Parliamentary Research Service, European Union
- Sang G, Pi Y, Bao M, Li Y, Lu J (2015) Biodegradation for hydrolyzed polyacrylamide in the anaerobic baffled reactor combined aeration tank. *Ecol Eng* 84:121–127. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.07.028>
- Saroja N, Shamala TR, Tharanathan RN (2000) Biodegradation of starch-g-polyacrylonitrile, a packaging material, by *Bacillus cereus*. *Process Biochem* 36:119–125. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00190-4](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00190-4)
- Saruchi, Kaith BS, Jindal R, Kumar V (2015) Biodegradation of Gum tragacanth acrylic acid based hydrogel and its impact on soil fertility. *Polym Degrad Stab* 115:24–31. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2015.02.009>
- Sein TT, Spurio R, Cecchini C, Cresci A (2009) Screening for microbial strains degrading glass fiber acrylic composite filters. *Int Biodeterior Biodegrad* 63:901–905. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.06.002>
- Serrano-Aroca Á (2017) Latest improvements of acrylic-based polymer properties for biomedical applications. *Acrylic polym healthcare*. IntechOpen, Rijeka, pp 75–98. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68996>
- Seybold CD (1994) Polyacrylamide review: Soil conditioning and environmental fate. *Commun Soil Sci Plant Anal* 25:2171–2185. <https://doi.org/10.1080/00103629409369180>
- Sharma M, Nand N (2009) Amidases: versatile enzymes in nature. *Rev Environ Sci Biotechnol* 8:343–366. <https://doi.org/10.1007/s11517-009-9175-x>
- Shimi (2020) Acrylic Plastic Waste Cracking Unit, Shimi Research Center. <http://shimiresearch.in/Acrylic-Recycling.php>. Accessed 23 October 2020
- Shukla NB, Daraboina N, Madras G (2009) Oxidative and photooxidative degradation of poly(acrylic acid). *Polym Degrad Stab* 94:1238–1244. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.04.020>
- Silman NJ, Carver MA, Jones CW (1991) Directed evolution of amidase in *Methylophilus methylotrophus*: purification and properties of amidases from wild-type and mutant strains. *J Gen Microbiol* 137:169–178. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-1-169>
- Solano-Serena F, Marchal R, Heiss S, Vandecasteele JP (2004) Degradation of isooctane by *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173: growth and catabolic pathway. *J Appl Microbiol* 97:629–639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02344.x>
- Song T, Li S, Lu Y, Yan D, Sun P, Bao M, Li Y (2019) Biodegradation of hydrolyzed polyacrylamide by a *Bacillus megaterium* strain SZK-5: functional enzymes and antioxidant defense mechanism. *Chemosphere* 231:184–193. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.143>
- Stahl JD, Cameron MD, Haselbach J, Aust SD (2000) Biodegradation of superabsorbent polymers in soil. *Environ Sci Pollut Res* 7:83–88. <https://doi.org/10.1065/espr199912.014>
- Sutherland GRJ, Haselbach J, Aust SD (1997) Biodegradation of crosslinked acrylic polymers by a white-rot fungus. *Environ Sci Pollut Res* 4:16–20. <https://doi.org/10.1007/BF02986258>
- Swick RW (1962) Propionic acid metabolism: mechanism of the methylmalonyl isomerase reaction and the reduction of acrylyl coenzyme a to propionyl coenzyme a in propionibacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48(2):288–293. <https://doi.org/10.1073/pnas.48.2.288>
- Tauber MM, Cavaco-Paulo A, Robra KH, Gübitz GM (2000) Nitrile hydratase and amidase from *Rhodococcus rhodochrous* hydrolyze acrylic fibers and granular polyacrylonitriles. *Appl Environ Microbiol* 66:1634–1638. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1634-1638.2000>
- Vargas-Suárez M, Fernández-Cruz V, Loza-Tavera H (2019) Biodegradation of polyacrylic and polyester polyurethane coatings by enriched microbial communities. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:3225–3236. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09660-y>
- Wang Y, Yang JF (2010) Physical properties and biodegradation of acrylic acid grafted poly( $\epsilon$ -caprolactone)/chitosan blends. *J Polym Res* 17:221–232. <https://doi.org/10.1007/s10965-009-9308-5>
- Wen Q, Chen Z, Zhao Y, Zhang H, Feng Y (2010) Biodegradation of polyacrylamide by bacteria isolated from activated sludge and oil-contaminated soil. *J Hazard Mater* 175:955–959. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.102>
- Wilske B, Bai M, Lindenstruth B, Bach M, Rezaei Z, Frede HG, Breuer L (2014) Biodegradability of a polyacrylate superabsorbent in agricultural soil. *Environ Sci Pollut Res* 21:9453–9460. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2103-1>
- Wiśniewska M (2018) Polyacrylamide (PAM). In: PM V, AO S (eds) High performance polymers and their nanocomposites. Wiley, New Jersey, pp 105–131. <https://doi.org/10.1002/9781119363910.ch4>
- Xiong B, Loss RD, Shields D, Pawlik T, Hochreiter R, Zydner AL, Kumar M (2018) Polyacrylamide degradation and its implications in environmental systems. *npj Clean Water* 1(17):1–9. <https://doi.org/10.1038/s41545-018-0016-8>

- Yamada H, Kobayashi M (1996) Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide. *Biosci Biotechnol Biochem* 60: 1391–1400. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.1391>
- Yongrui P, Zheng Z, Bao M, Li Y, Zhou Y, Sang G (2015) Treatment of partially hydrolyzed polyacrylamide wastewater by combined fenton oxidation and anaerobic biological processes. *Chem Eng J* 273:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.01.034>
- Yu F, Fu R, Xie Y, Chen W (2015) Isolation and characterization of polyacrylamide-degrading bacteria from dewatered sludge. *Int J Environ Res Public Health* 12:4214–4230. <https://doi.org/10.3390/ijerph120404214>
- Zhang L, Su F, Wang N, Liu S, Yang M, Wang Y, Huo D, Zhao T (2019) Biodegradability enhancement of hydrolyzed polyacrylamide wastewater by a combined Fenton-SBR treatment process. *Bioresour Technol* 278:99–107. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.074>
- Zhao L, Song T, Han D, Bao M, Lu J (2019) Hydrolyzed polyacrylamide biotransformation in an up-flow anaerobic sludge blanket reactor system: key enzymes, functional microorganisms, and biodegradation mechanisms. *Bioprocess Biosyst Eng* 42:941–951. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02094-w>
- Zohuriaan-Mehr MJ, Kabiri K (2008) Superabsorbent polymer materials: a review. *Iran Polym J* 17(6):451–477

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



# Synthesis, characterization and biodegradation studies of polyurethanes: Effect of unsaturation on biodegradability

Manuel Burelo<sup>a,\*\*</sup>, Itzel Gaytán<sup>b</sup>, Herminia Loza-Tavera<sup>b</sup>, Jorge A. Cruz-Morales<sup>a</sup>, Daniel Zárata-Saldaña<sup>a</sup>, M. Javier Cruz-Gómez<sup>c</sup>, Selena Gutiérrez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Química Sostenible, Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-360, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, Ciudad de México, Mexico

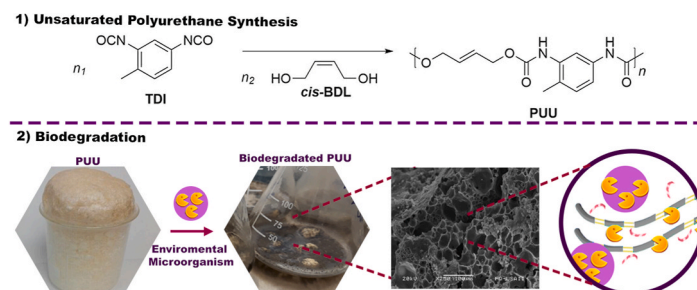
<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Ave. Universidad 3000. Col. UNAM. Coyoacán, 04510, Ciudad de México, Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Ave. Universidad 3000. Col. UNAM. Coyoacán, 04510, Ciudad de México, Mexico

## HIGHLIGHTS

- Saturated and unsaturated polyurethanes were synthesized with yields higher than 97%.
- BP8 community and *C. tenuissimum* A3.I.1 fungus were used in biodegradation studies.
- The biodegradation process was more efficient with the fungus than the BP8 community.
- The greatest changes and weight loss (51%) were observed in the PUU.
- PUU is a green alternative because C=C double bonds enhance biodegradation.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

Handling Editor: Michael Bank

### Keywords:

Polyurethane synthesis  
Unsaturation effect  
Environmental microorganisms  
Biodegradation  
Environmentally friendly polyurethane  
Biorecycling

## ABSTRACT

The presence of unsaturation in the main chain of the polymer promotes the biodegradation process. To elucidate this hypothesis, one unsaturated polyurethane (PUU) and another saturated polyurethane (PUS) were synthesized and then biodegraded, and evidence was found to support this hypothesis. The polyurethanes were synthesized by a polycondensation reaction with yields up to 97%. It is important to note that both polyurethanes were constituted only by the recalcitrant hard segment and showed low crystallinity and molecular weight. Spectroscopic, thermal, and chromatographic techniques were used for physical and structural characterization. Both polyurethanes were biodegraded by the BP8 microbial community and the *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 fungus during a two-month period. A postbiodegradation characterization revealed the detriment of properties in both materials, indicating successful biodegradation. As a general trend, more efficient biodegradation was observed by the *Cladosporium tenuissimum* fungus A3.I.1 than by the BP8 microbial community. Specifically, with the fungus, the infrared analysis showed a decrease in the characteristic bands as well as the appearance of new carboxylic acid signals (approximately  $1701\text{ cm}^{-1}$ ), suggesting the enzymatic cleavage of the urethane group. By comparison to polyurethanes, PUU showed superior biodegradation; using the fungus, a 51% decrease in

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [jmburelo@comunidad.unam.mx](mailto:jmburelo@comunidad.unam.mx) (M. Burelo), [sgutierrezf@unam.mx](mailto:sgutierrezf@unam.mx) (S. Gutiérrez).

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136136>

Received 29 September 2021; Received in revised form 2 August 2022; Accepted 17 August 2022

Available online 23 August 2022

0045-6535/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

molecular weight ( $M_w$ ) for PUU was achieved, in contrast with 36% achieved for PUS. Despite the low crystallinity and molecular weight, the determining factor in biodegradation was the presence of unsaturations along the main chain. Thus, a more efficient oxidative attack is carried out by microorganisms on double bonds. The novel PUU showed similar biodegradation to the known polyester-type PU with highly hydrolysable groups. Consequently, PUU represents a green alternative to conventional polyurethanes and is a key material to achieve biorecycling.

## 1. Introduction

Since the early 1980s, the growing accumulation of plastic wastes has become a severe environmental problem (Ru et al., 2020). Plastic production accounts for approximately 6% of global fossil feedstocks, reaching a global production volume of 360 million tons, while the global generation of postconsumer plastic waste is estimated to be approximately 150 million tons per year (Hatti-Kaul et al., 2020), with between 10 and 20 million tons per year leaking into the oceans (Amobonye et al., 2021; Urbanek et al., 2018).

Polyurethanes (PUs) represent 7.9% of the world's total plastic consumption, and they can be used as elastomers, foams, adhesives, fibers, packaging, and automotive components, among others (Akindoyo et al., 2016). These types of materials have been designed to show high tensile strength and melting points as well as resistance to degradation by water, oils, and organic solvents. As a consequence of their excellent properties, they undergo very slow biodegradation in the environment, causing serious pollution problems, and efforts to achieve their recycling have been insufficient. Indeed, only a small percentage receive some type of thermal or mechanical treatment, and surprisingly, during such processes, nitrogen compounds, aromatics, acids, and aminoisocyanates (Garrido et al., 2017) are emitted.

Typically, PUs are synthesized by a polycondensation reaction between diisocyanates and polyols (or macrodiols) using a short-chain diol as a chain extender. The three constituents derived from petroleum resources react to form a segmented polymer, alternating soft and hard segments (Scheme 1). The contents of soft and hard segments in PUs depend on the molar ratio used in the reaction (diisocyanate/polyol), which will determine its properties, crystallinity, type of PU, final application, and biodegradation process (Akindoyo et al., 2016; Asensio et al., 2019; Masykuri and Widyasari, 2021). It is worth mentioning that the hard segment, constituted by the diisocyanate and short-chain extender, is known as the recalcitrant part of the polymer due to its low biodegradation rate caused by the presence of aromatic and urethane moieties in the structure. In fact, there are few reports in this regard. For instance, it has been established that using a degradable short-chain extender based on lactic acid and ethylene glycol can accelerate hard segment degradation (Tatai et al., 2007). In contrast, the soft segment, constituted by the polyol or the macrodiol, is more prone to attack by microorganisms, and it can be completely biodegraded if the

polyol contains ester or ether functional groups in its structure, as in polyester-type PUs and polyether-type PUs, respectively.

In this regard, it has been established in several reports (Howard, 2002; Tokiwa et al., 2009) that PUs, like other synthetic plastics, are practically not biodegradable. However, polyester-type PUs are highly susceptible to microbial attack, and polyether-type PUs exhibit moderate to high resistance (Liu et al., 2021; Magnin et al., 2020). For instance, it has been observed that the microbial communities BP1h, BP3h, BP7h, and BP8 affect not only the aliphatic and aromatic groups but also ester, ether, and urethane functional groups present in polyester-polyurethane varnish as well as polyether-polyurethane-acrylate copolymer (Gaytán et al., 2020; Vargas-Suárez et al., 2019). In addition to microbial communities, fungi have demonstrated high activity against PUs. For example, *Alternaria* sp. and *Alternaria tenuissima* can degrade polyether-type PUs, reaching a weight loss of 25% after 60–70 days (Matsumiya et al., 2010; Oprea et al., 2018).

On the other hand, due to the low biodegradability of synthetic polymers, monomers exhibiting unsaturation in their main chain are very attractive (Adamu et al., 2022; Burelo et al., 2019; Fonseca et al., 2016; Lin et al., 2021; Martínez et al., 2019; Pasaoglu and Koyuncu, 2021) since their polymers are more susceptible to oxidation, which is consistent with the oxidative degradation shown by natural rubber ( $-\text{[CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{]}_n-$ ) compared to polyethylene (PE) ( $-\text{[CH}_2\text{]}_n-$ ) (Singh and Sharma, 2008). Therefore, unsaturation in polymers improves their degradability (Sundarrajan et al., 2005; Zhu et al., 2018), as was observed in unsaturated aliphatic polyesters and polysulfides that were more easily deteriorated by thermal degradation than their saturated analogs (Jiang et al., 2015). Currently, the main challenge is to design a stable polymer that minimizes its potential long-term environmental impact.

Considering that PUs with higher hard-segment content show more biostability as well as the hypothesis that unsaturation promotes more efficient degradation, this work focuses on the synthesis and characterization of a novel unsaturated (PUU) polyurethane, fundamentally constituted by unsaturated hard segments, to evaluate its biodegradability and to explore how unsaturation affects such a process. To test this idea, a saturated polyurethane (PUS) with the same characteristics was also synthesized, and both PUs underwent the attack of environmental polyurethanolytic microorganisms, the BP8 microbial community, and the fungus *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1. The results will provide important data to study how slight changes in structure affect the biodegradation process.

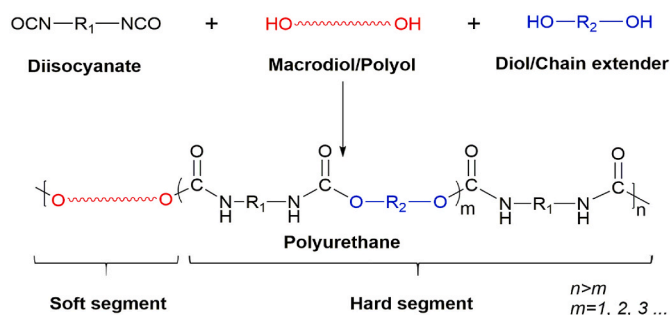
## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

All chemicals, including 2,4-toluene diisocyanate (TDI), 1,4-butanediol (BDL), *cis*-2-butene-1,4-diol (*cis*-BDL), dibutyltin dilaurate (DBTDL), anhydrous tetrahydrofuran (THF), and methanol, were obtained from the Aldrich Co., and they were used as received.

### 2.2. Synthesis of saturated (PUS) and unsaturated (PUU) polyurethane

Both types of polyurethane were synthesized by the direct polycondensation reaction of tolylene-2,4-diisocyanate (TDI) and a specific diol molecule (BDL or *cis*-BDL), as shown in Scheme 2. For PUS, a 100



**Scheme 1.** Synthesis of polyurethanes (PUs) by a polycondensation reaction. The urethane bond and the aromatic groups from diisocyanate (constituents of the hard segment) undergo slow biodegradation, being the recalcitrant part of the PU molecule.

mL Schlenk tube under a nitrogen atmosphere was charged with 10 g of TDI (50.0 mmol), 5.4 g of BDL (60.0 mmol), and 50 mL of THF anhydrous as a solvent in a molar ratio of  $[\text{NCO}]/[\text{OH}] = 1:1.2$ . Then, 0.38 g (0.6 mmol) of DBTDL (catalyst) was added in one shot, and the reaction mixture was stirred and heated at 60 °C for 3 h. Afterward, the product was washed three times with methanol. The obtained yellowish solid was dried in a vacuum oven at 60 °C for 24 h. The reaction yield = 97%, and the yield was calculated by gravimetry.

The PUU synthesis was carried out under the same synthetic route as for PUS, but instead of the diol molecule, 5.3 g (60.0 mmol) of *cis*-BDL was used (shown in Scheme 2), and the reaction yield = 98%.

For good reliability in controlling the molecular weight and the structure of the obtained polymers, laboratory methods were used for their synthesis, but large-scale industrial methods can also be used.

## 2.3. Biodegradation analysis with polyurethanalytic microorganisms

### 2.3.1. Microbial systems

Biodegradation analyses were performed with two microbial systems, both selected by their capability to grow in PUs as the only carbon source, as previously reported (Álvarez-Barragán et al., 2016; Gaytán et al., 2020).

The BP8 microbial community used in this work, mainly composed of five bacterial taxa, *Paracoccus* sp., *Chryseobacterium* sp., *Parapedobacter* sp., *Microbacteriaceae* bacterium, and *Ochrobactrum intermedium* (metagenomic analysis), was previously isolated from a deteriorated PU foam sample collected from a municipal landfill and was characterized by Gaytán et al. This microbial community was enriched with a mineral medium and polyether-polyurethane-acrylate coating (PolyLack® (PL)) (Gaytán et al., 2020). *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1. was collected from a cold room polyurethane insulated wall and cultivated in a polyester-polyurethane coating (Impranil) (Álvarez-Barragán et al., 2016).

### 2.3.2. Culture conditions

For the BP8 community preinoculum culture, preserved glycerol (500 µL) at -70 °C was inoculated with 50 mL of minimal medium (MM) ((mM)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 14.7;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 40.2;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 12.5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.4;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0035;  $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0004;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.036; and  $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.007, at a pH of 7) plus 0.3% weight/volume of the polyether-polyurethane-acrylate coating PolyLack (PL) (MM-PL) (Gaytán et al., 2020) and cultivated at 37 °C and 220 rpm for 48 h. After that, cultures were centrifuged at 25,703×g and 4 °C for 10 min (Eppendorf 5417C Centrifuge). The cell pellet was suspended in MM-PL to obtain an inoculum of 3 mg/mL. After that, 25 mL of this suspension was poured into a 125 mL flask containing one 0.5 g cube-shaped foam (2.5 × 1.5 × 1 cm) of PUS or PUU. The PUS and PUU were previously UV sterilized for 6 min at 20 mJ/cm<sup>2</sup> with an Ultraviolet Crosslinker Mod CL-1000 (UVP). Cultures were incubated at 37 °C, a pH of 7, and 220 rpm for 2 months. Control noninoculated cultures were incubated under similar conditions and analyzed at zero time and after two months. At

least three replicates were analyzed for each condition. BP8 viability was evaluated by spreading 25 µL culture aliquots in Luria Bertani (LB) plates at 37 °C overnight.

For the experiments with *C. tenuissimum* A3.I.1. fungus, a volume of 75 µL of preserved glycerol at -70 °C was inoculated on potato dextrose agar (PDA, 250 g of potato infusion; 20 g of dextrose per L, final pH of 5.6 ± 0.2) plates and cultivated at 30 °C for one week. Conidia were collected on phosphate buffer (50 mM, pH of 7), washed three times with the same buffer by centrifugation at 2800×g for 15 min at 4 °C (GS-6R-Beckman Centrifuge), and counted in a Neubauer chamber under a microscope. For the biodegradation analyses, 0.5 g cube-shaped foams (2.5 × 1.5 × 1 cm) of previously UV-sterilized PUS or PUU samples were introduced into 125 mL flasks. Each polyurethane sample was inoculated with 1 million conidia suspended in potato broth (PB) medium (250 g of potato infusion per L, final pH of 5.6 ± 0.2). Once the polyurethane materials absorbed the inoculum, 5 mL of PB plus PolyLack (0.3% weight/volume) (PB-PL) was added to the flask. All flasks were incubated at 30 °C, and a pH of 5.6 in the dark without agitation for two months. Noninoculated controls were run at the same time. At least three replicates were analyzed for each condition.

### 2.3.3. PUS and PUU treatment after incubation with the microbial systems

PUS and PUU materials were collected after incubation and washed with abundant sterilized deionized water with gentle agitation overnight to eliminate BP8 cells or A3.I.1 mycelium. PUs materials were dried overnight at 30 °C in a vacuum stove. Changes in physical and structural properties after the biodegradation process were evaluated using the set of characterization techniques described in Section 2.4. The structural changes were analyzed by infrared spectroscopy (FT-IR), where the cleavage and formation of functional groups of the PUs were related to changes in the intensity of the signals as well as the appearance and disappearance of signals in the corresponding spectra. The change and decrease in the molecular weight ( $M_n$  and  $M_w$ ) were determined by gel permeation chromatography (GPC). The changes in thermal properties, on the decomposition temperature ( $T_d$ ) and the glass transition temperature ( $T_g$ ), were analyzed by differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA and DTG). Scanning electron microscopy (SEM) was used to analyze changes in PU surfaces.

After the biodegradation process, all samples were analyzed and compared. Control samples were incubated under similar conditions to the PU samples with the microbial systems. At least three replicates were analyzed for each condition.

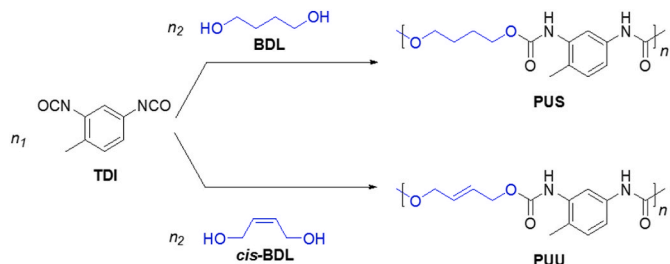
## 2.4. Analytical determination

Nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) spectra were recorded using a Bruker spectrometer at 400 MHz (Bruker Avance, USA). Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in parts per million (ppm) relative to tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. A total of 20–30 mg of PU sample was dissolved in a deuterated solvent (acetone-D<sub>6</sub>) for analysis.

Infrared spectroscopy (FT-IR) was performed using a PerkinElmer Frontier MIR spectrometer (USA) fitted with a Frontier Universal Diamond/ZnSe ATR with a single reflection top plate and pressure arm. Data are presented as the frequency of absorption (cm<sup>-1</sup>). The spectra were recorded in the region from 4000 to 500 cm<sup>-1</sup>. The mass of PU analyzed was approximately 100 mg in the solid state previously dried.

The number- and weight-average molecular weights ( $M_n$  and  $M_w$ ) were obtained by gel permeation chromatography (GPC) using a Waters 2695 ALLIANCE instrument (Waters Co., USA) using monodisperse polystyrene as a standard and THF (HPLC grade) as a solvent, a universal column, and a flow rate of 1 mL/min. The PU was dissolved in THF (1 mg/mL), filtered (Whatman filters, 0.45 µm pore size of polyvinylidene difluoride PVDF), and placed in a vial for chromatography.

Differential scanning calorimetry (DSC) thermograms were recorded on a TA Instrument Q2000 (TA Instruments, USA) in a temperature



**Scheme 2.** Synthesis of saturated (PUS) and unsaturated (PUU) polyurethanes by polycondensation reactions. PUS and PUU constitute the hard segment in the polyurethane molecule.

range from  $-60$  to  $250$  °C with a heating rate of  $10$  °C/min under a nitrogen atmosphere. Thermogravimetric analysis (TGA and DTG) was carried out on a TA Instrument Q5000 under a nitrogen atmosphere from room temperature to  $600$  °C with a heating rate of  $10$  °C/min. The mass of PU analyzed was approximately  $5$  mg for both TGA and DSC analysis using a sealed aluminum pan from TA Instruments.

Scanning electron microscopy (SEM) images were obtained using a JEOL JSM-5900-LV microscope (JEOL, USA) using secondary electrons in high vacuum mode. All PU samples were coated with gold for analysis.

Wide-angle X-ray diffraction (WAXD) measurements were carried out using a Siemens D-5000 diffractometer between  $2\theta = 2^\circ$  and  $70^\circ$  at  $35$  kV and  $25$  mA using Cu-K $\alpha$  radiation ( $\lambda = 1.54$  Å). The powdered PU was placed in a sample holder for analysis.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Synthesis and characterization of saturated and unsaturated polyurethanes

The PU biodegradation process can be analyzed by focusing on

polyol degradation (soft segment) and urethane degradation (hard segment), with the latter being the most difficult or recalcitrant biodegradation feature. Hence, to study the degradation of hard segments, two low molecular weight polymers, solely consisting of the hard segment, were designed and synthesized according to Scheme 2. The first represents a classical saturated polyurethane (PUS), whereas the second represents a novel unsaturated polyurethane (PUU).

The synthesis of the PUS and PUU was confirmed by FT-IR analysis. The vibrational frequencies corresponding to the isocyanate ( $\text{-NCO}$ ,  $2275\text{-}2250$   $\text{cm}^{-1}$ ) and hydroxyl ( $\text{OH}$ ,  $3290$   $\text{cm}^{-1}$ ) groups of the precursors (TDI, BDL, and *cis*-BDL) disappeared completely in the spectra of both of the synthesized PUs (Fig. 1(a)). The consumption of the precursor's reactive groups led to the appearance of a new absorption band corresponding to the urethane bond ( $\text{-OCONH-}$ ). The signals observed at  $3300$  and  $3250$   $\text{cm}^{-1}$  correspond to the imino group ( $\text{-NH}$ ), while the signal observed at  $1693$   $\text{cm}^{-1}$  was assigned to carbonyl ( $\text{-C=O}$ ), both for the urethane group. The absorption peaks at  $2954\text{-}2853$   $\text{cm}^{-1}$  were attributed to the stretching of the aliphatic symmetric and asymmetric methylene groups ( $\text{-CH}_2\text{-}$ ). The characteristic stretching of the PUU double bond was observed at  $3022$   $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{-CH=CH-}$ ), although the other characteristic signal corresponding to ( $\text{C=C}$ ) groups was not observed

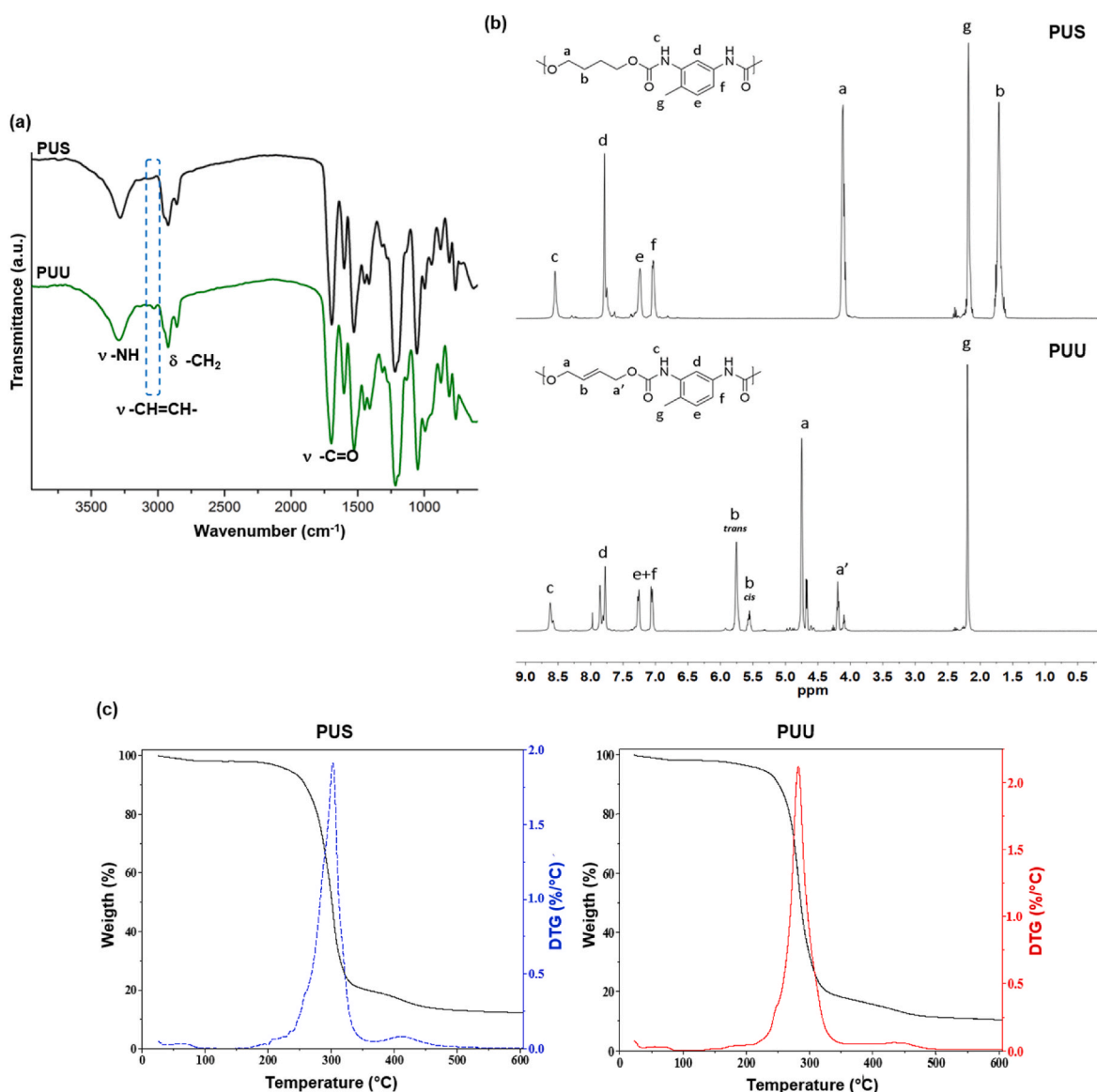


Fig. 1. (a) FT-IR spectra of the PUS and PUU. (b)  $^1\text{H}$  NMR spectra (400 MHz, acetone- $\text{D}_6$ ) of the PUS and PUU. (c) TGA and DTG thermograms of the PUS and PUU.

due to signal overlapping of the aromatic ring at  $1625\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 1(a)).

Additionally, NMR analysis confirmed the formation of polyurethanes. Fig. 1(b) shows the comparative  $^1\text{H}$  NMR spectra of the PUS and PUU. In spectrum (a), the signal at 8.54 ppm corresponds to the protons of the imino (-NH) group of urethane, whereas the set of signals that appear in the range of 7.77–7.04 ppm was attributed to aromatic protons. The signals at 4.11 ppm and the 1.78–1.63 ppm region correspond to the methylene protons in the  $\alpha$ -position (-CH<sub>2</sub>-O-) and  $\beta$ -position (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-) to the oxygen atom in the main chain. Finally, the protons of the methyl substituent on the aromatic ring were observed at 2.18 ppm (CH<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>). Spectrum (b) is quite similar to spectrum (a), with only one difference that arises in the region of 5.62–5.49 ppm, where *trans* and *cis* double bond signals were observed. Since  $^1\text{H}$  NMR was used to determine the *cis/trans* content in the PUU backbone, it can be observed that *trans* isomer formation (81.2%) becomes favored compared to the *cis* isomer (18.8%), which is in accordance with several reports (Albanese et al., 2016; Boyle et al., 1995).

The yield of the PUs obtained was close to quantitative (97–98%). Moreover, the obtained results by GPC analysis showed that the weight average molecular weight ( $M_w$ ) was 7411 g/mol for the conventional PUS and 7647 g/mol for PUU (Table 1). The magnitude of the  $M_w$  in all materials was carefully maintained on the same scale to validate the biodegradation process. The relatively low molecular weight of these “prepolymers” facilitates their characterization since they have good solubility in organic solvents compared to their high molecular weight analogs. Previously, high molecular weight polyurethanes were successfully synthesized (data not shown); however, these materials were not suitable for the present study due to their low processability.

The thermal behaviors of PUS and PUU were evaluated by differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA and DTG). According to DSC, the glass transition temperature  $T_g$  in both materials was quite similar and above room temperature (60 °C for PUS and 58 °C for PUU) due to the structure of such polymers where the hard segment prevails. TGA analysis showed that both polymers exhibit similar thermal stability; the first mass loss of 5% started at approximately 232 and 225 °C for PUS and PUU, respectively. Thermal degradation of the urethane group ( $T_{d\text{ max}}$ ) was determined by DTG. For PUS, such a temperature was observed at 301 °C, whereas for PUU, degradation occurred at 287 °C, and both processes corresponded to a mass loss of 50% (Fig. 1(c)).

Wide-angle X-ray diffraction (WAXD) measurements showed a typical amorphous pattern with one broad diffraction peak with maximum values of approximately  $2\theta = 20.7^\circ$  and  $19.38^\circ$  for PUS and PUU, respectively (supplementary information: Fig. S1). In other words, both polyurethanes were completely amorphous since crystallinity was not detected by WAXD or by the thermal measurements previously described.

**Table 1**  
Molecular weights and thermal properties of the PUS and PUU.

PU	Molecular weight (g/mol) <sup>a</sup>			Yield (%) <sup>b</sup>	Thermal properties (°C)		
	$M_n$	$M_w$	$M_w/M_n$		DSC	TGA	
					$T_g$	$T_d$	$T_d$
PUS	3533 ± 160	7411 ± 236	2.1 ± 0.10	97 ± 1.00	60	232 (5%)	301 (50%)
PUU	3361 ± 133	7614 ± 126	2.3 ± 0.11	98 ± 0.58	58	225	287

<sup>a</sup> The number average molecular weight ( $M_n$ ), the weight average molecular weight ( $M_w$ ), and the polydispersity index ( $M_w/M_n$ ) were obtained by gel permeation chromatography (GPC) using monodisperse polystyrene as the standard.

<sup>b</sup> Isolated yield of PU. n = 3, mean ± standard deviation.

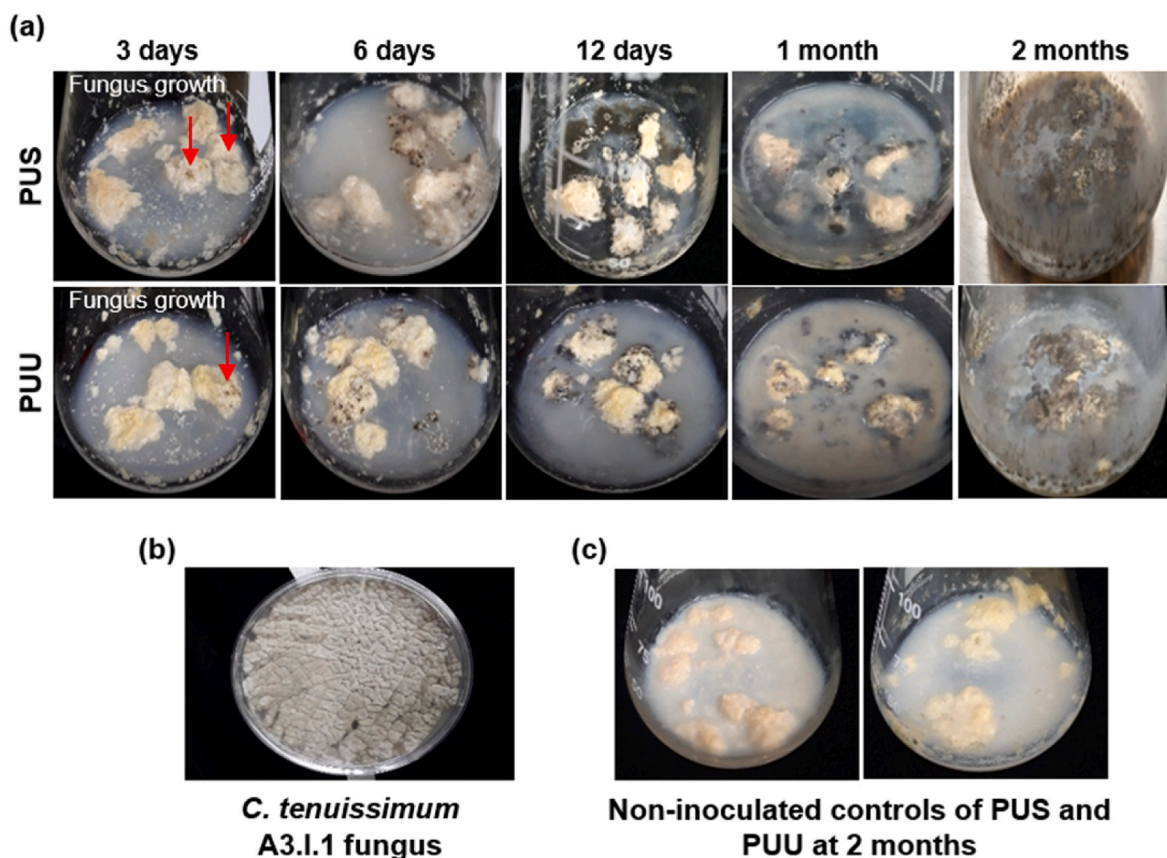
### 3.2. Biodegradation of saturated and unsaturated polyurethanes by polyurethanolytic microorganisms

Biodegradation studies of PUS and PUU to analyze the effect of double bonds were carried out with polyurethanolytic microorganisms: the BP8 microbial community and the *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 fungus. Therefore, it was examined whether using unsaturated diols in the synthesis of PUU promoted a more significant degradation, which would help reduce the accumulation and pollution derived from synthetic polymers to establish a biorecycling process (Acik et al., 2021; Burelo et al., 2019; Fonseca et al., 2016). As described in the previous section, both polyurethanes were synthesized under the same reaction conditions and exhibited similar thermal properties and molecular weights (Table 1). Basically, the difference between them was the unsaturation present in the main chain. Synthesized polyurethanes are “iso-structural” and contain a “hard segment” formed by one of the most industrially used diisocyanates, TDI.

According to the results, the BP8 community was able to grow in the culture media with the polyurethane samples and maintained its viability until the end of the analysis (2 months) (supplementary information: Fig. S2). However, in the noninoculated controls, there was no evidence of physical changes in either polyurethane sample. This was confirmed by FT-IR analysis, as shown below. Regarding the experiments with the other environmental microorganism, the *C. tenuissimum* A3.I.1 fungus, Fig. 2(a) shows the growth of this fungus on both polyurethanes at different culture times; Fig. 2(b) shows the appearance of the A3.I.1 fungus growing in PB, and Fig. 2(c) shows the control experiments after two months of incubation. No physical changes in PUs were observed in noninoculated control experiments. In contrast, fungal growth was observed from the third day with mycelium patches (red arrows) proliferating over the polyurethane samples until they were completely covered up by the end of the analysis. The fungal proliferation over the PUS and PUU samples showed that no toxic effects were generated by the polymers that could inhibit fungus growth, which suggests that it may produce changes in the physical properties and chemical structure of the polymers.

To elucidate how biodegradation occurs in PUS and PUU and what structural changes are generated by the BP8 microbial community or A3.I.1 fungal activities, FT-IR spectroscopy analyses were performed. Fig. 3 depicts FT-IR curves for controls and samples for one-month (1 m) and two-month (2 m) cultures for PUS and PUU. The spectra of non-inoculated controls of both polyurethanes (PUS and PUU) shown in Fig. 3(a) (black line) are practically the same as the initial polyurethane spectra in Fig. 1(a), which suggests that the materials do not suffer any alteration in this short period as a result of their high dimensional stability. In PUS and PUU exposed to BP8 cultures, decreases in the bands for the N–H stretching ( $3400\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ ) and the urethane N–H bending and C–N stretching ( $1540\text{ cm}^{-1}$ ) were observed during the cultivation time (Fig. 3(a)), suggesting the enzymatic cleavage of the urethane group. Aliphatic chains were also affected by a substantial decrease in the antisymmetric  $\alpha$ - or  $\beta$ -CH<sub>2</sub> stretching signals ( $2940$  and  $2855\text{ cm}^{-1}$ ) and CH<sub>2</sub> wagging ( $1400\text{--}1340\text{ cm}^{-1}$ ) in both polyurethanes, suggesting C–C bond cleavage by oxidative enzymes. Additionally, the carbonyl group ( $1693\text{ cm}^{-1}$ ) gradually decreased with incubation time, suggesting the participation of esterases (Fig. 3(a)). Finally, aromatic rings were also cleaved in PUS and PUU, as shown by the decrease in signal intensity at  $1610\text{ cm}^{-1}$ , which can be correlated with oxidative enzymatic activities. Previously, the functional metagenomic analysis of the BP8 community revealed the existence of genes encoding proteins with hydrolytic (esterases, urethanases) and oxidative activities (mono-, dioxygenases, dehydrogenases) (Gaytán et al., 2020), which may explain the degradative activity over the PUS and PUU.

On the other hand, the biodegradative activity of *C. tenuissimum* A3.I.1 on PUS and PUU was also studied by FT-IR analysis after two months of cultivation (Fig. 3(b)). It should be noted that in noninoculated controls, the same behavior as the BP8 community was observed,



**Fig. 2.** (a) Growth of the *C. tenuissimum* A3.I.1 fungus on polyurethanes at different culture times. (b) *C. tenuissimum* A3.I.1 fungus. (c) Noninoculated controls of PUS and PUU at 2 months.

obtaining practically the same FT-IR signals (Fig. 3(b)) as the initial polyurethanes (Fig. 1(a) spectra).

In the case of the samples, substantial decreases in the N–H stretching ( $3400\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ ) and the urethane N–H bending and C–N stretching ( $1540\text{ cm}^{-1}$ ) signals were observed in the first month of culture, suggesting the activity of carbamate hydrolyzing enzymes acting on the C–N bond or esterases acting on the C=O bond. Notably, a decrease in the C=C signal intensity ( $3022\text{ cm}^{-1}$ ) was observed when PUU was exposed to A3.I.1. This decrease could result from the biological oxidation of PUU unsaturations that would lead to polymer cleavage. In addition, in both materials, significant decreases in aliphatic ( $2940$  and  $2855\text{ cm}^{-1}$ ) and aromatic signals ( $1610\text{ cm}^{-1}$ ) were observed, suggesting the participation of oxidative activities from *C. tenuissimum* A3.I.1. Moreover, changes in the signals associated with carbonyl groups were observed (Fig. 3(b)). After two months, the PUS signal for the urethane carbonyl at  $1693\text{ cm}^{-1}$  became wider due to the appearance of new overlapping signals at  $1703\text{ cm}^{-1}$ , which are associated with carbonyl groups of carboxylic acids in their dimeric form. Similar behavior was observed in PUU; the urethane carbonyl signal at  $1694\text{ cm}^{-1}$  was replaced with a new signal at  $1701\text{ cm}^{-1}$ . These changes could be associated with the action of esterases on the urethane group. The changes observed by FT-IR in both polyurethanes confirm the attack by microorganisms, with an increased effect in PUU inoculated with *C. tenuissimum* A3.I.1. These observations support our proposal that the presence of double bonds [C=C] in the PUU main chain favored the biodegradation process.

Table 2 shows the molecular weights determined by GPC for non-inoculated controls (Entries 1 and 6) and PUS and PUU samples at different culture times (Entries 2–5 and 7–10) exposed to the BP8 microbial community and the *C. tenuissimum* A3.I.1 fungus. The results showed that BP8 decreased the weight average molecular weight ( $M_w$ )

by 10% for PUS and 14% for PUU, whereas the A3.I.1 fungus showed a more significant decrease after two months of incubation; the  $M_w$  of PUS decreased by 36%, and that of PUU decreased by 51%. Fungal growth on polyurethane samples affects the chemical structure as well as the molecular weight. Additionally, Fig. S3 (supplementary information) shows the changes in  $M_w$  of the polyurethanes before and after biodegradation at different culture times. Notably, both biological systems, with better performance of the fungus at the second month, generated more significant  $M_w$  loss in PUU than in PUS, which can be attributed to the more effective biodegradation due to unsaturations present in the main chain.

The decreases in  $M_w$  and  $M_n$  are attributed to the production of smaller chains, such as oligomers, due to the attack of microorganisms (Chandure et al., 2014; Umare and Chandure, 2008; Yang et al., 2018, 2021). These results are supported by increases in the polydispersity index ( $M_w/M_n$ ).

Table 3 summarizes the changes in the number average molecular weight ( $M_n$ ) values of PUS and PUU after the biodegradation process and compares similar processes for polyesters and polyurethanes reported by different authors. Entries 1 to 4 (Table 3) show the polyurethanes synthesized in this work composed only of the hard segment. For these polyurethanes, remarkable changes in  $M_n$  values, in the ranges of 19–21% and 37–54% compared to the control, were observed after exposure to the BP8 community and *C. tenuissimum* A3.I.1, respectively. Entries 5 and 6 (Table 3) refer to the biodegradation of two polyesters. It is known that aliphatic polyesters can be fully biodegraded, in contrast with aromatic polyesters, as they possess highly hydrolysable ester groups along their main chain (Umare and Chandure, 2008). However, in this case, using soil microbes, 58% of the change in the molecular weight was achieved (Entry 5, Table 3), whereas by enzymatic treatment with *Rhizopus delemar* lipase, only 19% loss was observed (Entry 6, Table 3), even though both polyesters have a low initial molecular



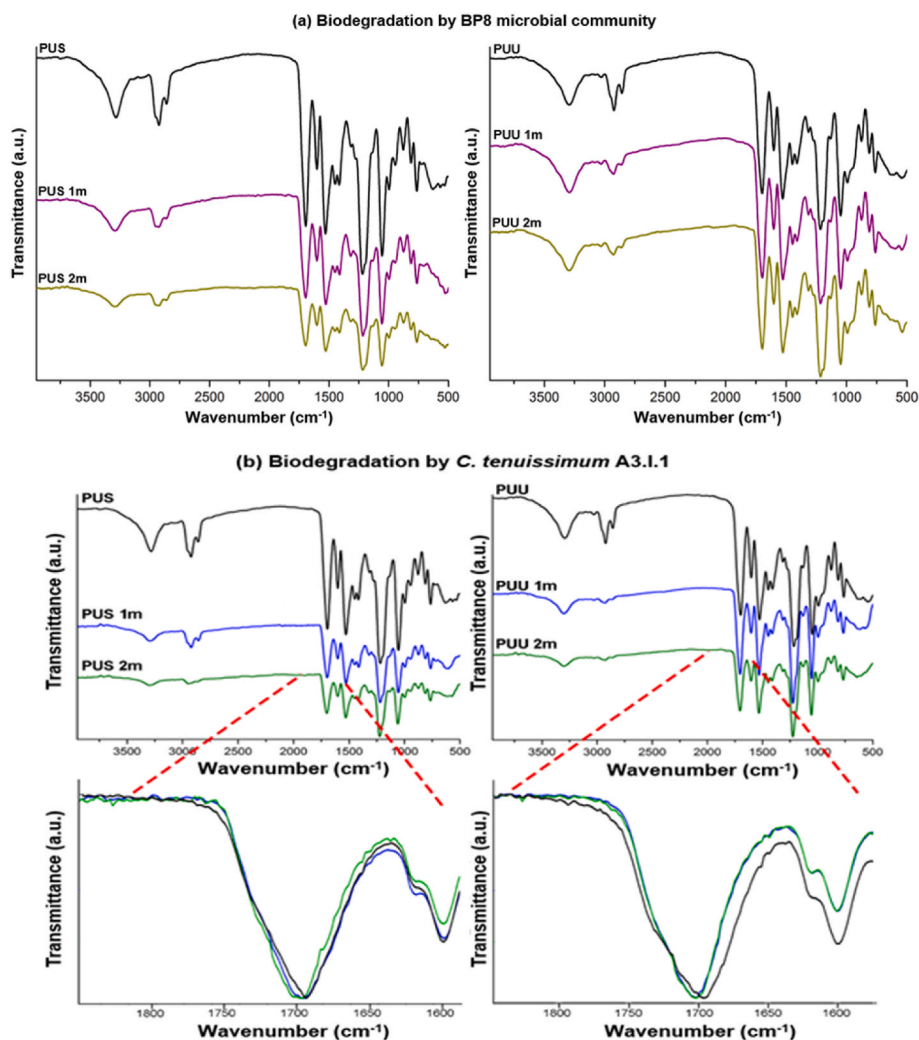


Fig. 3. FT-IR spectra of noninoculated controls (dark line) as well as samples at one month (1 m) and two months (2 m) of culture for the PUS and PUU with (a) the BP8 microbial community and (b) *C. tenuissimum* A3.I.1 fungus.

Table 2

Molecular weights and thermal properties of polyurethanes after biodegradation by the BP8 microbial community and *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 fungus.

Entry	Microorganism <sup>a</sup>	Culture time (months)	Molecular weight <sup>b</sup> (g/mol)			Thermal properties (°C)		
			$M_n$	$M_w$	$M_w/M_n$	DSC $T_g$	TGA $T_d$ (5%)	$T_d$ (50%)
<b>PUS</b>								
1	–	0	3533 ± 160	7411 ± 236	2.1 ± 0.1	60	232	301
2	BP8	1	3061 ± 203	7008 ± 335	2.3 ± 0.2	60	227	296
3	BP8	2	2857 ± 140	6646 ± 253	2.4 ± 0.2	59	210	282
4	A3.I.1	1	2682 ± 183	6900 ± 315	2.7 ± 0.2	59	230	303
5	A3.I.1	2	2224 ± 195	4725 ± 286	2.3 ± 0.3	59	227	297
<b>PUU</b>								
6	–	0	3361 ± 133	7614 ± 126	2.3 ± 0.1	58	225	287
7	BP8	1	2882 ± 154	6812 ± 233	2.3 ± 0.2	58	215	274
8	BP8	2	2667 ± 160	6575 ± 250	2.4 ± 0.1	58	206	266
9	A3.I.1	1	2296 ± 196	6971 ± 320	2.8 ± 0.2	57	225	286
10	A3.I.1	2	1559 ± 136	3711 ± 187	2.4 ± 0.2	57	217	278

<sup>a</sup> BP8 = BP8 microbial community; A3.I.1 = *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 fungus.

<sup>b</sup> The number average molecular weight ( $M_n$ ), the weight average molecular weight ( $M_w$ ) and the polydispersity index ( $M_w/M_n$ ) were obtained by gel permeation chromatography (GPC) using monodisperse polystyrene as the standard. N = 3, mean ± standard deviation.

weight (Bikiaris et al., 2006; Chandure et al., 2014). The low biodegradation observed in these polyesters (Entries 5 and 6, Table 3) was attributed to their high crystallinity (>50%) since biodegradability depends not only on the origin of the polymer but also on its chemical

structure, crystallinity, and degrading environmental conditions (Gaytán et al., 2021; Umare et al., 2007; Umare and Chandure, 2008). Entries 7 and 8 (Table 3) correspond to the biodegradation of two polyurethanes. Entry 7 (Table 3) shows the biodegradation of a

**Table 3**Comparison of the number average molecular weight ( $M_n$ ) of PUs and polyesters-polyurethanes after biodegradation by different microorganisms.

Entry	Polymer	Soft segment		Hard segment		Culture time (days)	$M_n$ Initial (g/mol)	$M_n$ after biodegradation (g/mol)	$M_n$ change (%)	Microorganism	Ref.
		Macrodiol/Polyol		Chain Extender (diol)	Diisocyanate						
1	PUS	–		1,4-butanediol	2,4'-TDI	60	3533	2857	19%	BP8 microbial community	[This work]
2	PUU	–		cis-2-buten-1,4-diol	2,4'-TDI	60	3361	2667	21%	BP8 microbial community	[This work]
3	PUS	–		1,4-butanediol	2,4'-TDI	60	3533	2224	37%	C. tenuissimum A3.I.1	[This work]
4	PUU	–		cis-2-buten-1,4-diol	2,4'-TDI	60	3361	1559	54%	C. tenuissimum A3.I.1	[This Work]
5	PCAC-60	Adipic acid	1,4-cyclohexane dimethanediol	–	–	70	3840	1600	58%	soil microbes	Chandure et al. (2014)
6	Polyester (PPSu)	Succinic acid and 1,3-Propanediol	–	–	–	60	6880	5520	19%	Rhizopus delemar lipase	Bikiaris et al. (2006)
7	PolyLack® (PL)	Polypropylene glycol and acrylates	–	Propylene glycol	4,4'-MDI, 2,6'-TDI	25	101,896	65,609	35%	BP8 microbial community	Gaytán et al. (2020)
8	Poly (ester urethane)s (PEU-1)	PPSe	–	1,3-propanediol	4,4'-MDI	140	63,390	23,700	62%	soil microbes	Umare and Chandure (2008)

PCAC-60 = Poly(1,4-cyclohexanedimethylene-adipate-carbonate).

PolyLack® = Polyether-polyurethane-acrylate copolymer.

PPSe = Polyester prepolymer (from 1,3-propanediol and sebacic acid).

4,4'-MDI = 4,4'-Methylene diphenyl diisocyanate.

2,4'-TDI = 2,4'-Toluene diisocyanate.

2,6'-TDI = 2,6'-Toluene diisocyanate.

copolymer (PL) based on polyether, polyacrylate, and polyurethane, which achieved a 35% molecular weight loss when exposed to the BP8 microbial community (Gaytán et al., 2020). This change is more significant than that found in this work for the biodegradation of PUS and PUU with the same community and similar culture conditions (Entries 1 and 2, Table 3). However, it should be considered that the PUs in Entries 1 and 2 (Table 3) are formed only by the rigid segment; thus, the larger biodegradation of PL could be mainly attributed to the soft segments and the fact that such a copolymer is in suspension. Finally, Entry 8 (Table 3) shows a significant molecular weight decrease (62%) in a poly (ester urethane) when soil microorganisms carried out its biodegradation. This poly (ester urethane) was synthesized with a polyester prepolymer (PPSe) as a soft segment, 4,4'-MDI, and 1,3-propanediol as the chain extender. In this case, the hydrophilicity and the low crystallinity of PPSe seem to improve its biodegradation (Umare and Chandure, 2008). It is worth mentioning that the change in molecular weight percentage achieved in PUU, formed by hard segments, with the C. tenuissimum A3.I.1 fungus was 54% (Entry 4, Table 3). This result was similar to the changes shown by the PCAC-60 polyester, 58% (Entry 5, Table 3), and the PEU-1 poly (ester urethane), 62% (Entry 8, Table 3), even though the PUU is made only of the hard segment. It has been reported that soft segment contents in PCAC-60 and PEU-1 resulted in higher degradability (Chandure et al., 2014; Umare and Chandure, 2008). According to the degradation studies of semicrystalline polymer materials, the accepted assumption is that degradation first occurs in the amorphous phase rather than in the crystalline phase (Kim and Kim, 1998). Additionally, our results also indicate that low crystallinity in PUU (above 98% amorphous) and low molecular weight promote its biodegradation, but they are not the determining factors. This fact is clearly shown by comparing PUU with PUS biodegradation by C. tenuissimum A3.I.1 (Entries 3–4, Table 3). In this case, both polyurethanes are isostructural, exhibiting the same degree of crystallinity and molecular weight. However, with PUS, only a 37% change in molecular weight was achieved. In this regard, the determining factor in the high biodegradability of PUU is the presence of double bonds in the main chain, which allow a more favorable metabolic activity of the microorganisms over this type

of polymer.

Polyurethane thermal properties were also affected by the process of biodegradation. The decomposition temperature ( $T_d$ ) and glass transition temperature ( $T_g$ ) values for the noninoculated control and PU samples after biodegradation by the BP8 microbial community and C. tenuissimum A3.I.1 fungus at different culture times are summarized in Table 2. Due to biodegradation, the  $T_g$  values showed a slight variation from 60 °C to 59 °C and from 58 °C to 57 °C for PUS and PUU, respectively (supplementary information: Fig. S4).

These small changes are attributed to the fact that both polyurethanes were mainly constituted by the hard segment.  $T_d$  was studied by TGA from room temperature to 600 °C, showing different percentages of mass loss. Both PUS and PUU showed good thermal stability, having a mass loss of 5% ( $T_d$  (5%)) at 232 °C and 225 °C, respectively. However, the decomposition temperatures ( $T_d$  (5%)) after two months of cultivation changed to 210 °C and 206 °C and 227 °C and 217 °C when PUS and PUU were exposed to the BP8 community and C. tenuissimum A3.I.1, respectively (Table 2). TGA showed changes in  $T_d$  (50%) for both polymers when the BP8 microbial community was used as a biodegradation agent, and the registered values were 282 °C and 266 °C for PUS and PUU, respectively (Table 2). Consequently, the value of  $T_d$  (50%) dropped 20 °C after biodegradation. However, when C. tenuissimum A3.I.1 was used as the biodegradation agent,  $T_d$  (50%) values dropped almost 10 °C (Table 2), suggesting different biodegradative mechanisms for the BP8 community and C. tenuissimum A3.I.1. These results indicate that both polyurethanes lost dimensional stability due to the cleavage of chemical bonds and the formation of oligomers, as was demonstrated in previous results in the biodegradation of polyurethane powder coatings (Pilch-Pitera, 2013). Fig. 4 depicts the TGA and DTG thermograms of PUS and PUU exposed to C. tenuissimum A3.I.1 as well as for non-inoculated controls. According to DTG thermograms, at two months of biodegradation (blue line), a decrease in area and a shift at lower temperature values than the control and one-month curves (black and red curves, respectively) were observed. These phenomena are directly related to the decomposition of urethane and ester bonds (Adamu et al., 2022; Gaytán et al., 2020; Pilch-Pitera, 2013). Since PUS or PUU (blue

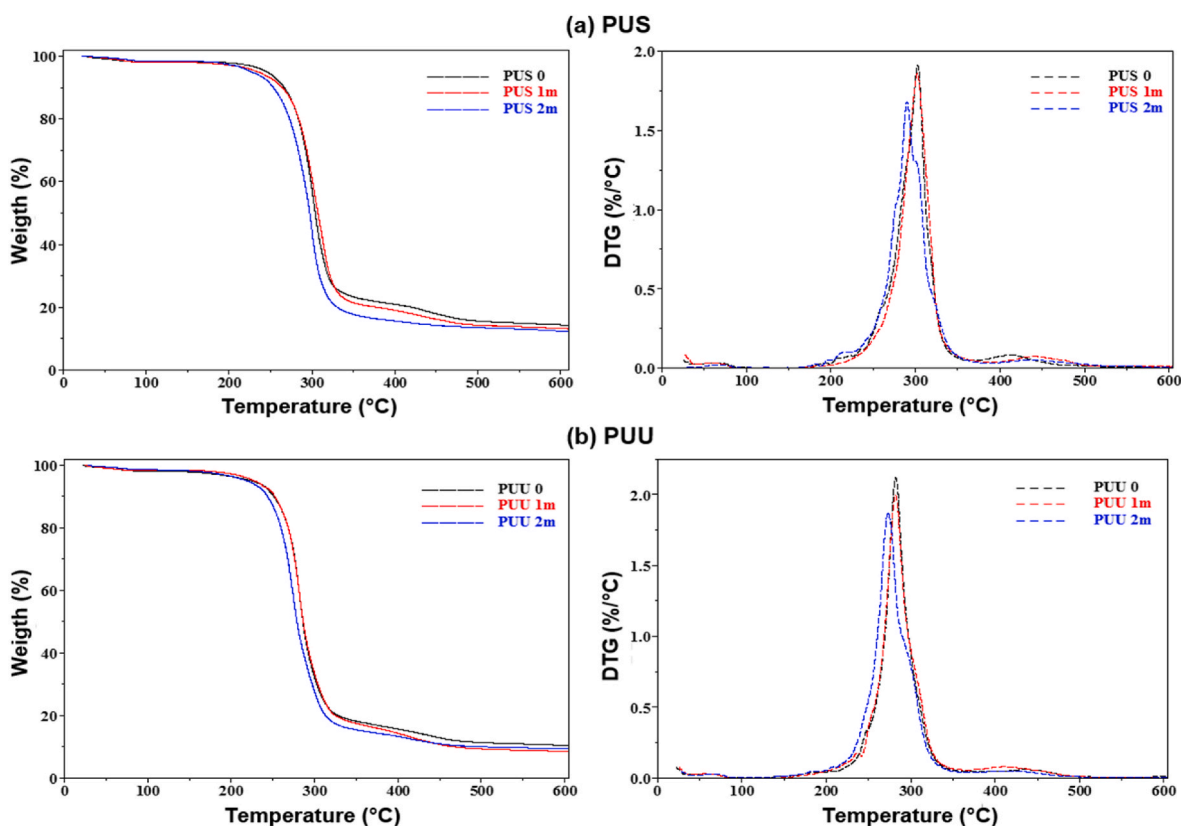


Fig. 4. TGA and DTG analysis of noninoculated controls (dark line) as well as samples at one month (red line) and two months (blue line) of culture with the *C. tenuissimum* A3.I.1 fungus for the (a) PUS and (b) PUU.

line) samples suffered a greater attack by the fungus, a lower temperature was required to achieve the cleavage of such groups.

SEM is a helpful tool for monitoring changes in polyurethane surfaces during the biodegradation process. Fig. 5 shows SEM micrographs of the control, PUS and PUU biodegradation experiments with the BP8 community and *C. tenuissimum* A3.I.1 at two months of cultivation and different magnifications of 50 $\times$ , 250 $\times$ , and 1000 $\times$ . In the control samples, a rough surface with some imperfections can be noted. For both polyurethanes inoculated with microorganisms, changes in the surface were observed. Fig. 5(a) depicts fungal growth inside PUS samples, where hyphal networks are observed after 2 months at 250 $\times$ , confirming the presence and attack of the fungus. Additional evidence indicating biodegradation on the PUS and PUU surfaces was the appearance of cracks, cavities, pits of different sizes, and surface irregularities; those by the fungus were greater than those generated by the BP8 community, as seen in Fig. 5(b) at 1000 $\times$ . Similar changes by SEM have been reported, indicating polyurethane biodegradation (Álvarez-Barragán et al., 2016; Ghosh and Karak, 2018; Pilch-Pitera, 2013).

Even though BP8 showed a lower degradative capacity than *C. tenuissimum* A3.I.1, changes in the materials were also observed. Consistent with the previous results, more significant attacks by the fungus were observed in PUU than in PUS. These results can be attributed to the PUU unsaturations that modify the polymer surface characteristics, favoring microorganism-polymer interactions and improving biodegradation.

The different responses of the BP8 community and the *C. tenuissimum* A3.I.1 fungus for attacking double bonds might reflect different biochemical reactions but a common strategy. PU biodegradation should be initiated by the hydrolytic action of esterases and C–N cleaving enzymes at the carbamate groups. The products of esterase reactions would be saturated or unsaturated aliphatic alcohols, depending on the PU structure and carboxylic acids with the reacted

TDI. The products of C–N cleavage reactions would be saturated or unsaturated aliphatic alcohols and toluene diamines. These biodegradation products would enter the cells through specialized transporters to be further oxidized by cytoplasmic enzymes. Both saturated and unsaturated aliphatic chains would first be oxidized at the alcohol group to produce aldehydes and, later, carboxylates. However, the unsaturated alcohols would also be oxidized at the double bonds because of their nucleophilic nature, rendering an epoxide that will be consecutively oxidized to alcohol, aldehyde, and carboxylate. Carboxylates are processed through  $\beta$ -oxidation and toluene diamines through the benzoate pathway (Cárdenas Espinosa et al., 2020). The common bacterial mechanism for biodegrading unsaturated short aliphatic hydrocarbons (C2–C6) is the insertion of oxygen into the C=C bond via monooxygenases (O<sub>2</sub>-/NADH-dependent alkene monooxygenases and flavin active-center monooxygenases) or the cytochrome P450 system, yielding an epoxide. After that, oxide hydrolases, glutathione-S transferases, carboxylases, or isomerases convert epoxides to alcohols,  $\beta$ -keto acids, ketones, or aldehydes (Abbasian et al., 2015). Carbon double bond oxidation by fungal enzymes, such as the *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase (CfuCPO) (Geigert et al., 1986) and the *Agroclybe aegerita* heme-thiolate peroxidase unspecific peroxygenase (AaeAPO) (Peter et al., 2013), has been reported as a first step in cleaving double bonds and producing epoxide intermediates. In the metagenome of the BP8 community, several genes encoding monooxygenases were identified (Gaytán et al., 2020), supporting the possibility that one of them could be involved in alkene cleavage. However, for *C. tenuissimum* A3.I.1, this information is not yet available since the sequencing of its genome is currently being carried out.

The nucleophilic nature of the double bond and the possibility that there can be another oxidation site in PUU would make it more biodegradable than PUS. In addition, the high reactivity of double bonds from unsaturated hydrocarbons (alkenes) has been associated with significant

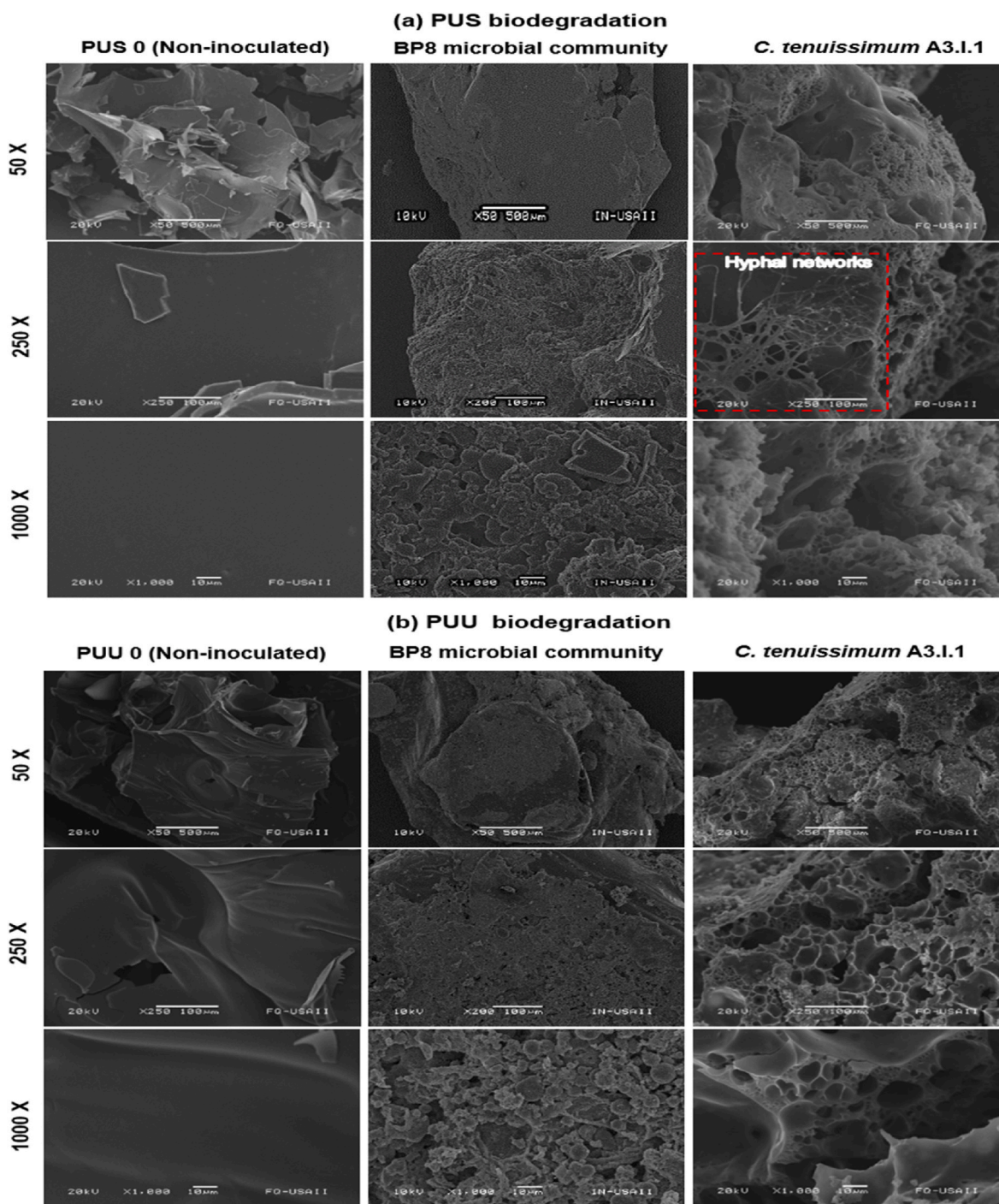


Fig. 5. SEM micrographs of noninoculated controls as well as (a) PUS and (b) PUU samples at two months of culture with the BP8 microbial community and the *C. tenuissimum* A3.I.1 fungus.

degradation levels compared to alkanes and aromatic hydrocarbons (Grossi et al., 2011).

Thus, the study opens up the possibility of using any of the polyurethanes (PUS or PUU) in the same application field, since both exhibit similar properties, but with the advantage that the unsaturation in the main PUU chain enhances the biodegradation process. This will reduce the accumulation and contamination derived from synthetic polymers to establish a true biorecycling process.

In this regard, it is interesting to develop studies on the biodegradation of high molecular-weight polyurethanes, constituted by both rigid and flexible segments, with possible crystalline domains or in

cross-linked polyurethanes, to discover how both types of structures could be degraded by environmental microorganisms.

#### 4. Conclusions

A classical PUS and a novel PUU were designed and successfully obtained by a polycondensation reaction with high yields (97–98%). Both polyurethanes constituted wholly of the hard segment showed a weight average molecular weight ( $M_w$ ) of approximately 7500 g/mol as well as high thermal and mechanical stability and no evidence of crystallinity. The glass transition temperature  $T_g$  in both materials is above

room temperature and quite similar: 60 °C for PUS and 58 °C for PUU. Meanwhile, the thermal degradation ( $T_d$ ) of the urethane group was observed between 287 and 301 °C.

According to the biodegradation study, both polyurethanes suffered an important decrease to their physical and structural properties after two months of culture by the action of the environmental microorganisms BP8 microbial community and the *Cladosporium tenuissimum* A3. I.1 fungus. Significant decreases in the FT-IR characteristic bands for the N-H stretching (3400–3200  $\text{cm}^{-1}$ ) and C-N stretching (1540  $\text{cm}^{-1}$ ) suggested the enzymatic cleavage of the urethane group. Aliphatic chains and aromatic rings were also affected due to substantial decreases in the  $-\text{CH}_2$  stretching signals (2940 and 2855  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\text{CH}_2$  wagging (1400–1340  $\text{cm}^{-1}$ ), and the signal intensity at 1610  $\text{cm}^{-1}$ , suggesting C-C bond cleavage by oxidative enzymes. In addition, in both materials, the signal associated with the carbonyl group ( $\sim 1693 \text{ cm}^{-1}$ ) becomes wider due to the appearance of a new signal (1703  $\text{cm}^{-1}$ ), providing evidence of the formation of carboxylic acids due to cleavage of the urethane group. The biodegradation process was more efficient with the fungus than with the BP8 community. PUU always underwent the greatest structural changes and weight loss ( $M_w$ ), achieving 51% loss (in contrast to 36% loss for PUS). Thus, it was established that the unsaturation in the main chain was the driving force in the biodegradation process, despite the low crystallinity and molecular weight of the polyurethanes. The biological oxidation of the unsaturations by the action of esterases led to more efficient cleavage of the polymer chain, which was confirmed by FT-IR, observing a notable decrease in the C=C signal intensity (3022  $\text{cm}^{-1}$ ) as well as SEM microscopy, where the unsaturations modified polymer surface characteristics, favoring microorganism-polymer interactions. It is important to remark that before biodegradation, PUS and PUU showed similar properties ( $M_w$ ,  $T_g$ , and  $T_d$ ), making them candidates for the same application field. However, the behavior of the double bonds in PUU differs greatly from that in PUS, making PUU more suitable for biodegradation. In fact, its biodegradation rate is comparable with that of polyester-type PU, which contains soft segments with highly hydrolysable groups. In summary, the developed material points in the correct direction toward true biorecycling.

#### Author contribution statement

All authors contributed in equal manner to the revised version of the manuscript.

#### Funding

Financial support is greatly appreciated from the project PAPIIT-UNAM IA207418. Biodegradation studies were funded by PAPIIT-UNAM IN227620, PAIP-UNAM 5000-9117 and Programa Presupuestario F003 "Programas Nacionales Estratégicos de Ciencia, Tecnología y Vinculación con los sectores Social, Público y Privado", Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, grant 101737.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Data availability

Data will be made available on request.

#### Acknowledgments

We thank to the National Council for Science and Technology of Mexico CONACYT (M.B., CVU:419281. I.G., CVU:270518. D. Z-S.,

CVU:417716). I.G., acknowledges to Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM for the support granted during her Ph.D. studies. We are grateful to Gerardo Cedillo V., Salvador López M., Karla Eriseth Reyes M., Miguel Ángel Canseco M., Adriana Tejada C. (IIM-UNAM) and Rafael Iván Puente L. (USAI, FQ-UNAM) for their assistance in NMR, GPC, Thermal analysis, FT-IR, XRD, and SEM techniques; respectively. Also, we are grateful to Adileily Olivares-Jiménez, Angélica Contreras-Coronel, and María de las Mercedes Villaseñor-Jiménez for their support in the synthesis of PU, microbial cultures, material treatment, and technical assistance.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136136>.

#### References

- Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., Naidu, R., 2015. A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 176, 670–699. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1603-5>.
- Acik, B., Acik, G., Erdemi, H., 2021. Synthesis and characterization of bile acid, poly(*ε*-caprolactone) and  $\epsilon$ -lysine diisocyanate ethyl ester based polyurethanes and investigation of their biodegradability properties. *Eur. Polym. J.* 146, 110247. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110247>.
- Adamu, A.A., Muhamad Sarih, N., Gan, S.N., 2022. Polyurethane resin derived from polyol of palm olein and recycled poly(ethylene terephthalate). *Pigment Resin Technol.* 51 (1), 6–12. <https://doi.org/10.1108/PRT-06-2020-0056>.
- Akindoyo, J.O., Beg, M.D.H., Ghazali, S., Islam, M.R., Jeyaratnam, N., Yuvaraj, A.R., 2016. Polyurethane types, synthesis and applications-a review. *RSC Adv.* 6, 114453–114482. <https://doi.org/10.1039/c6ra14525f>.
- Albanese, M., Boyenval, J., Marchese, P., Sullalti, S., Celli, A., 2016. The aliphatic counterpart of PET, PPT and PBT aromatic polyesters: effect of the molecular structure on thermo-mechanical properties. *AIMS Mol. Sci.* 3, 32–51. <https://doi.org/10.3934/molsci.2016.1.32>.
- Álvarez-Barragán, J., Domínguez-Malfavón, L., Vargas-Suárez, M., González-Hernández, R., Aguilar-Osorio, G., Loza-Tavera, H., 2016. Biodegradative activities of selected environmental fungi on a polyester polyurethane varnish and polyether polyurethane foams. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 5225–5235. <https://doi.org/10.1128/AEM.01344-16>.
- Amobonye, A., Bhagwat, P., Singh, S., Pillai, S., 2021. Plastic biodegradation: frontline microbes and their enzymes. *Sci. Total Environ.* 759, 143536. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143536>.
- Asensio, M., Costa, V., Nohales, A., Bianchi, O., Gómez, C.M., 2019. Tunable structure and properties of segmented thermoplastic polyurethanes as a function of flexible segment. *Polymers* 11. <https://doi.org/10.3390/polym11121910>.
- Bikiaris, D.N., Papageorgiou, G.Z., Achilias, D.S., 2006. Synthesis and comparative biodegradability studies of three poly(alkylene succinate)s. *Polym. Degrad. Stabil.* 91, 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.polydegradstab.2005.04.030>.
- Boyle, L.L., Hudson, R.F., Wallis, J.D., 1995. The relative stability of cis and trans isomers. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* 341, 141–147. [https://doi.org/10.1016/0166-1280\(95\)04201-G](https://doi.org/10.1016/0166-1280(95)04201-G).
- Burelo, M., Martínez, A., Cruz-Morales, J.A., Tlenkopatchev, M.A., Gutiérrez, S., 2019. Metathesis reaction from bio-based resources: synthesis of diols and macrodiols using fatty alcohols,  $\beta$ -citronellol and natural rubber. *Polym. Degrad. Stabil.* 166, 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.polydegradstab.2019.05.021>.
- Cárdenas Espinosa, M., Colina Blanco A, S.T., AK, A.-K., Kappelmeyer U, T.D., Pieper DH, H.H., C E, 2020. Toward biorecycling: isolation of a soil bacterium that grows on a polyurethane oligomer and monomer. *Front. Microbiol.* 11, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00404>.
- Chandure, A.S., Bhusari, G.S., Umare, S.S., 2014. Synthesis, characterization, and biodegradation studies of poly(1, 4-cyclohexanedimethylene-adipate-carbonate) s. *J. Polym.* 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/547325>, 2014.
- Fonseca, L.R., Bergman, J.A., Kessler, M.R., Madbouly, S.A., Lima-Neto, B.S., 2016. Self-metathesis of 10-undecen-1-ol with Ru-Amine-Based complex for preparing the soft segment and chain extender of novel Castor oil-based polyurethanes. *Macromol. Symp.* 368, 30–39. <https://doi.org/10.1002/masy.201500173>.
- Garrido, M.A., Gerecke, A.C., Heeb, N., Font, R., Conesa, J.A., 2017. Isocyanate emissions from pyrolysis of mattresses containing polyurethane foam. *Chemosphere* 168, 667–675. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.009>.
- Gaytán, I., Burelo, M., Loza-Tavera, H., 2021. Current status on the biodegradability of acrylic polymers: microorganisms, enzymes and metabolic pathways involved. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105, 991–1006. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11073-1>.
- Gaytán, I., Sánchez-Reyes, A., Burelo, M., Vargas-Suárez, M., Liachko, I., Press, M., Sullivan, S., Cruz-Gómez, M.J., Loza-Tavera, H., 2020. Degradation of recalcitrant polyurethane and xenobiotic additives by a selected landfill microbial community and its biodegradative potential revealed by proximity ligation-based metagenomic analysis. *Front. Microbiol.* 10, 2986. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02986>.

- Geigert, J., Lee, T.D., Dalietos, D.J., Hirano, D.S., Neidleman, S.L., 1986. Epoxidation of alkenes by chloroperoxidase catalysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136, 778–782. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(86\)90507-3](https://doi.org/10.1016/0006-291X(86)90507-3).
- Ghosh, T., Karak, N., 2018. Biobased multifunctional macroglycol containing smart thermoplastic hyperbranched polyurethane elastomer with intrinsic self-healing attribute. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 6, 4370–4381. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b00001>.
- Grossi, V., Cravo-Laureau, C., Rontani, J.F., Cros, M., Hirschler-Réa, A., 2011. Anaerobic oxidation of n-alkenes by sulphate-reducing bacteria from the genus *Desulfatiferula*: N-Ketones as potential metabolites. *Res. Microbiol.* 162, 915–922. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.07.004>.
- Hatti-Kaul, R., Nilsson, L.J., Zhang, B., Rehnberg, N., Lundmark, S., 2020. Designing biobased recyclable polymers for plastics. *Trends Biotechnol.* 38, 50–67. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.04.011>.
- Howard, G.T., 2002. Biodegradation of polyurethane: a review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 49, 245–252. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00051-3](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00051-3).
- Jiang, Y., Woortman, A.J.J., Alberda Van Ekenstein, G.O.R., Loos, K., 2015. Environmentally benign synthesis of saturated and unsaturated aliphatic polyesters via enzymatic polymerization of biobased monomers derived from renewable resources. *Polym. Chem.* 6, 5451–5463. <https://doi.org/10.1039/c5py00660k>.
- Kim, Y.D., Kim, S.C., 1998. Effect of chemical structure on the biodegradation of polyurethanes under composting conditions. *Polym. Degrad. Stabil.* 62, 343–352. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(98\)00017-2](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(98)00017-2).
- Lin, C.S.K., Kirpluks, M., Priya, A., Kaur, G., 2021. Conversion of food waste-derived lipid to bio-based polyurethane foam. *Case Stud. Chem. Environ. Eng.* 4, 100131 <https://doi.org/10.1016/j.csee.2021.100131>.
- Liu, J., He, J., Xue, R., Xu, B., Qian, X., Xin, F., Blank, L.M., Zhou, J., Wei, R., Dong, W., Jiang, M., 2021. Biodegradation and up-cycling of polyurethanes: progress, challenges, and prospects. *Biotechnol. Adv.* 48, 107730 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107730>.
- Magnin, A., Pollet, E., Phalip, V., Avérous, L., 2020. Evaluation of biological degradation of polyurethanes. *Biotechnol. Adv.* 39, 107457 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107457>.
- Martínez, A., Tlenkopatchev, M.A., Gutiérrez, S., Burelo, M., Vargas, J., Jiménez-Regalado, E., 2019. Synthesis of unsaturated esters by cross-metathesis of terpenes and natural rubber using Ru-alkylidene catalysts. *Curr. Org. Chem.* 23, 1356–1364. <https://doi.org/10.2174/1385272823666190723125427>.
- Masykuri, M., Widyasari, F., 2021. Surface morphology and biodegradation tests of polyurethane/clay rigid foam composites. *J. Chem. Technol. Metall.* 56, 744–753.
- Matsumiya, Y., Murata, N., Tanabe, E., Kubota, K., Kubo, M., 2010. Isolation and characterization of an ether-type polyurethane-degrading micro-organism and analysis of degradation mechanism by *Alternaria* sp. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1946–1953. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04600.x>.
- Oprea, S., Potolinca, V.O., Gradinariu, P., Oprea, V., 2018. Biodegradation of pyridine-based polyether polyurethanes by the *Alternaria tenuissima* fungus. *J. Appl. Polym. Sci.* 135, 1–10. <https://doi.org/10.1002/app.46096>.
- Pasaoglu, M.E., Koyuncu, I., 2021. Substitution of petroleum-based polymeric materials used in the electrospinning process with nanocellulose: a review and future outlook. *Chemosphere* 269, 128710. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128710>.
- Peter, S., Kinne, M., Ullrich, R., Kayser, G., Hofrichter, M., 2013. Epoxidation of linear, branched and cyclic alkenes catalyzed by unspecific peroxygenase. *Enzym. Microb. Technol.* 52, 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.02.013>.
- Pilch-Pitera, B., 2013. Examination of the enzyme resistance of polyurethane powder coatings. *J. Polym. Environ.* 21, 215–223. <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0519-1>.
- Ru, J., Huo, Y., Yang, Y., 2020. Microbial degradation and valorization of plastic wastes. *Front. Microbiol.* 11, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00442>.
- Singh, B., Sharma, N., 2008. Mechanistic implications of plastic degradation. *Polym. Degrad. Stabil.* 93, 561–584. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008>.
- Sundarrajan, S., Surianarayanan, M., Srinivasan, K.S.V., 2005. Synthesis and characterization of saturated and unsaturated polysulfide polymers and their thermal degradation processes investigated by flash pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 43, 638–649. <https://doi.org/10.1002/pola.20535>.
- Tatai, L., Moore, T.G., Adhikari, R., Malherbe, F., Jayasekara, R., Griffiths, I., Gunatillake, P.A., 2007. Thermoplastic biodegradable polyurethanes: the effect of chain extender structure on properties and in-vitro degradation. *Biomaterials* 28, 5407–5417. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.08.035>.
- Tokiwa, Y., Calabia, B.P., Ugwu, C.U., Aiba, S., 2009. Biodegradability of plastics. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3722–3742. <https://doi.org/10.3390/ijms10093722>.
- Umare, S.S., Chandure, A.S., 2008. Synthesis, characterization and biodegradation studies of poly(ester urethane)s. *Chem. Eng. J.* 142, 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.11.017>.
- Umare, S.S., Chandure, A.S., Pandey, R.A., 2007. Synthesis, characterization and biodegradable studies of 1,3-propanediol based polyesters. *Polym. Degrad. Stabil.* 92, 464–479. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2006.10.007>.
- Urbanek, A.K., Rymowicz, W., Mironczuk, A.M., 2018. Degradation of plastics and plastic-degrading bacteria in cold marine habitats. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 7669–7678. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9195-y>.
- Vargas-Suárez, M., Fernández-Cruz, V., Loza-Tavera, H., 2019. Biodegradation of polyacrylic and polyester polyurethane coatings by enriched microbial communities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 3225–3236. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09660-y>.
- Yang, L., Gao, J., Liu, Y., Zhuang, G., Peng, X., Wu, W.M., Zhuang, X., 2021. Biodegradation of expanded polystyrene and low-density polyethylene foams in larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: tenebrionidae): broad versus limited extent depolymerization and microbe-dependence versus independence. *Chemosphere* 262, 127818. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127818>.
- Yang, S.S., Brandon, A.M., Andrew Flanagan, J.C., Yang, J., Ning, D., Cai, S.Y., Fan, H.Q., Wang, Z.Y., Ren, J., Benbow, E., Ren, N.Q., Waymouth, R.M., Zhou, J., Criddle, C.S., Wu, W.M., 2018. Biodegradation of polystyrene wastes in yellow mealworms (larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus): factors affecting biodegradation rates and the ability of polystyrene-fed larvae to complete their life cycle. *Chemosphere* 191, 979–989. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.117>.
- Zhu, Y., Zhang, D., Zhang, Z., Wang, Z., 2018. The effect of polymer structures on complete degradation: a first-principles study. *ChemistryOpen* 7, 463–466. <https://doi.org/10.1002/open.201800078>.