



POTENCIAL DE LA HALOARQUEA *Halorubrum sp.* COMO FUENTE DE OBTENCIÓN DE BIOPLÁSTICOS

Daniel Antonio Órdenes Orellana

Trabajo entregado para la obtención del grado de Máster en

Tecnología Ambiental

Modalidad: Investigación

Septiembre, 2024

Directores:

María del Carmen Ruiz Domínguez

María Cuaresma Franco

Dña. María del Carmen Ruiz Domínguez DNI: 28.612.018H y cargo Contratada Ramón y Cajal (Ministerio), y **Dña. María Cuaresma Franco**, DNI: 48.917.772S y cargo Profesora Contratada Doctora, ambas del Departamento de Química “Profesor José Carlos Vílchez Martín” de la Universidad de Huelva

INFORMAN:

Que el trabajo titulado “**Potencial de la Haloarquea *Halorubrum* sp. como fuente de obtención de bioplásticos**” presentado por **D. Daniel Antonio Órdenes Orellana**, con N.I.E.: **Z0066903R**, ha sido realizado en la Unidad de Investigación Biotecnología de Microalgas, adscrita a RENSMA y ubicada en el Centro de Investigación y Desarrollo de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias (CIDERTA), Universidad de Huelva, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación y defensa como **Trabajo Fin de Máster** (Modalidad: Investigación), para el Máster Universitario en Tecnología Ambiental de la Universidad de Huelva.

En Huelva, a 16 de Septiembre de 2024

Fdo.: María del Carmen Ruiz Domínguez

Fdo.: María Cuaresma Franco

RESUMEN

El plástico es mundialmente uno de materiales más utilizados y persistentes en los ecosistemas. La gran mayoría son derivados de la industria petroquímica, alcanzando una demanda mundial del 12% como producto procedente del petróleo. Gracias al bajo costo y plasticidad, el plástico se ha globalizado durante décadas para muchas aplicaciones industriales provocando un importante problema ambiental en la gestión como residuo. Es por ello que la comunidad científica e industrial están promocionando la búsqueda de alternativas renovables y ecológicas, como los bioplásticos, para paliar los efectos provocados por la contaminación de dichos polímeros de origen petroquímico. La producción microbiana de bioplásticos, derivados del poli- β -hidroxibutírico, PHB, ha proporcionado una alternativa prometedora frente a la contaminación plástica. Son pocos los microorganismos conocidos para la síntesis de dichos compuestos, particularmente de origen bacteriano. En las Marismas de Odiel (Huelva) existe una gran diversidad de especies debido a sus condiciones ambientales donde confluyen masas de agua dulce y saladas que permiten la existencia incluso de microorganismos extremófilos, como los halófitos. Estas son especies que crecen con alta salinidad, entre 1-4 M NaCl. *Halorubrum* sp. es una arquea halófila que ha sido aislada de este entorno por la Unidad de Biotecnología de Microalgas (UBM) de la Universidad de Huelva. El objetivo principal de este trabajo de fin de Máster fue evaluar el efecto de las condiciones nutricionales, particularmente la limitación de nitrógeno, en la capacidad de síntesis de PHB. Para ello, la haloarquea fue cultivada por duplicado en una cámara de cultivo con temperatura, gaseo e irradiancia constante. El medio nutricional fue el mismo para todos los ensayos, a excepción de la concentración de nitrógeno. *Halorubrum* sp. mostró no solo la presencia de PHB mediante técnicas analíticas de cromatografía de gases (GC-FID) y espectrometría de masas (GC-MS), sino que, además, bajo condiciones limitantes de nitrógeno los cultivos mostraron un aumento en la productividad de PHB. Se pudieron observar diferencias significativas de concentración de PHB durante todo el periodo de cultivo de los tratamientos, destacando el día 3 de cultivo. Los valores de productividad indican que *Halorubrum* sp. se encuentra dentro de valores similares de otras especies del mismo género con valores que varían desde 13 a 28 mg/L·d. Finalmente, la especie aislada por el grupo UBM, es capaz de producir PHB de cadena corta (poli- β -hidroxibutírico) así como otros ácidos grasos de interés, por lo que se proporciona con este trabajo información novedosa para proponer a esta especie de *Halorubrum* sp. para otras aplicaciones, además de la síntesis de PHB.

ABSTRACT

Plastic is one of the most widely used and persistent materials in ecosystems worldwide. The majority are derived from the petrochemical industry, reaching a global demand of 12% as a product derived from petroleum. Thanks to its low cost and plasticity, plastic has been globalized for decades for many industrial applications, causing a major environmental problem in waste management. For these reasons, the scientific and industrial community promotes the search for renewable and ecological changes, such as bioplastics, to ease the effects caused by the contamination of these polymers of petrochemical origin. The production of bioplastics from microorganisms, derived from poly- β -hydroxybutyric acid, PHB, has provided a promising alternative to plastic pollution. Few microorganisms are known for the synthesis of these compounds, particularly those of bacterial origin. At "Marismas del Odiel" (Huelva) a great diversity of species can be found due to its environmental conditions where fresh and saltwater masses converge, allowing the existence of extremophiles, such as halophytes. They are species that grow in high salinity, between 1-4 M NaCl. *Halorubrum* sp. is a halophyte archaeon that has been isolated from this environment by the Microalgal Biotechnology Unit (UBM) of the University of Huelva. The main objective of this Master's thesis was to evaluate the effect of nutritional conditions, particularly nitrogen limitation, on the capacity to synthesize PHB. To do so, the haloarchaea was cultured in duplicate in a culture chamber with constant temperature, gasification and irradiance. The nutritional medium was the same for all assays, except for the nitrogen concentration. *Halorubrum* sp. showed not only the presence of PHB using analytical techniques such as gas chromatography (GC-FID) and mass spectrometry (GC-MS), but also the cultures showed an increase in the PHB productivity under nitrogen-limiting conditions. Significant differences in PHB concentration were also observed during the cultivation period, especially on day 3 of cultivation. Productivity values indicate that *Halorubrum* sp. is within similar values of other species of the same genus with values ranging from 0.013 to 0.028 g/L d. Finally, the species isolated by the UBM group is capable of producing short-chain PHB (poly- β -hydroxybutyric acid) and other fatty acid compounds, so this work provides novel information to propose this species of *Halorubrum* sp. for other applications, in addition to PHB synthesis.

Índice

RESUMEN.....	5
ABSTRACT	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
INDICE DE TABLAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. El problema del plástico.....	15
1.2. Bioplásticos.....	18
1.2.1. Tipos de bioplásticos.....	18
1.2.2. Poli- β -hidroxibutirato (PHB).....	20
1.2.3. Microorganismos que producen bioplásticos.....	21
1.2.4. Ruta metabólica del PHB	22
1.3. <i>Halorubrum</i> sp.	24
1.4. ¿Por qué elegir Haloarqueas como productoras de bioplásticos?	25
1.5. Objetivos.....	26
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
2.1 Microorganismo de estudio, <i>Halorubrum</i> sp.	27
2.2. Cultivo de <i>Halorubrum</i> sp.....	27
2.3. Diseño experimental. Adaptación de <i>Halorubrum</i> sp.....	29
2.4. Variables de crecimiento.....	29
2.5. Extracción de Poli- β -hidroxibutirato (PHB) desde <i>Halorubrum</i> sp.	31
2.6. PHB mediante Cromatografía de Gases (GC-FID).....	31
2.7. PHB y otras moléculas de interés mediante Espectrometría de Masas (GC-MS)..	32
2.8. Estadística	33
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
3.1 Evolución del crecimiento de <i>Halorubrum</i> sp. bajo limitación de nitrógeno.....	35
3.2 Efectos en el contenido de PHB de <i>Halorubrum</i> sp. bajo limitación de nitrógeno..	37
3.3 PHB y otras moléculas de interés presentes en <i>Halorubrum</i> sp.....	41
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFÍA	47
ANEXOS.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

1.- INTRODUCCIÓN

Figura 1.1	La Isla de Basura del océano Pacífico	15
Figura 1.2	Cambios en las propiedades de los microplásticos después de la degradación	17
Figura 1.3	Categorías de plásticos biodegradables y no biodegradables	19
Figura 1.4	Estructura de poli- β -hidroxibutirato (PHB)	20
Figura 1.5	Micrografía electrónica de los gránulos de PHB en el interior de la célula de la haloarquea <i>Haloferox mediterranei</i>	22
Figura 1.6	Ruta metabólica de la biosíntesis de poliéster (PHB)	23
Figura 1.7	(A) Imagen de cultivos de <i>Halorubrum</i> sp. estudiados en este trabajo; (B) micrografías de células de <i>Halorubrum litoreum</i>	24
Figura 1.8	(A) Salar Chott El Djerid, (Túnez) (B) Marismas del Odiel (Huelva, España)	25

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 2.1	Vista aérea de las Marismas del Odiel (Huelva)	27
Figura 2.2	Cultivos de <i>Halorubrum</i> sp. llevados a cabo en este TFM	28
Figura 2.3	Condiciones de cultivo experimental de <i>Halorubrum</i> sp	29
Figura 2.4	Ejemplo de la optimización de la centrifugación de <i>Halorubrum</i> sp.	30
Figura 2.5	Cromatógrafo de gases Agilent 6890N con detector FID ubicado en CIDERTA, Universidad de Huelva	32
Figura 2.6	(A) Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS), (B) QExactive-GC, Espectrómetro de Masas Híbrido Cuadrupolo-Orbitrap usado en este TFM	33

3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 3.1	Efecto de la limitación de extracto de levadura como fuente de nitrógeno en el crecimiento, medido como densidad óptica (DO_{600}), de la haloarquea <i>Halorubrum</i> sp. Los cultivos y toma de muestra fueron realizados por duplicado.	35
Figura 3.2.	Efecto de la limitación de extracto de levadura como fuente de nitrógeno en el crecimiento, medido como peso seco, de la haloarquea <i>Halorubrum</i> sp. Los cultivos y toma de muestra fueron realizados por duplicado.	36
Figura 3.3	Concentración de PHB en los cultivos control, E1 y E3.	37
Figura 3.4	Evolución del contenido de PHB (% p/p) respecto a la densidad óptica (OD 600nm) durante los tres primeros días de cultivos en los experimentos (A) control (B) E1 y (C) E3.	39

- Figura 3.5** Cromatograma de las moléculas presentes en el extracto metilado de *Halorubrum* sp. del cultivo control mediante espectrometría de masas. Se observa la presencia del monómero representativo de PHB (1) y otros compuestos de interés (2-5). 41
- Figura 3.6** Espectro de masas del patrón PHB (arriba) y muestra control (abajo) donde se ratifica la presencia de PHB en la haloarquea mediante GC-MS. 42

INDICE DE TABLAS

1.- INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1	Composición y propiedades fisicoquímicas de los microplásticos presentes en los océanos.	16
------------------	--	----

3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 3.1	Comparativa del contenido y productividad de PHB y peso seco entre cepas de haloarqueas.	40
Tabla 3.2	PHB y otras moléculas de interés identificadas en la fracción metilada desde la haloarqueea <i>Halorubrum</i> sp.	44

LISTA DE ABREVIATURAS

3HB-CoA: 3-hidroxibutiril-CoA

ANOVA: análisis de varianza

CIDERTA: Centro de Investigación y Desarrollo de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias

CITIUS: Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla

CoA: coenzima A

DO₆₀₀: densidad óptica a 600nm

E1: cultivo estresado con 1 g/L de extracto de levadura

E2: cultivo estresado con 3 g/L de extracto de levadura

Ec.: ecuación

ECODES: Fundación de Ecología y Desarrollo

FID: Detector iónico de llamas

GC-FID: cromatografía de gases con detector FID

GC-MS: espectrometría de masas

OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico

PA: poliamidas

PA6: poliamida 6

PA66: poliamida 66

PBAT: tereftalato de adipato de polibutileno (PBAT)

PBS: succinato de polibutileno

PE: polietileno

PEF: furanoato de polietileno

PET: tereftalato de polietileno

PHA(s): polihidroxialcanoato(s)

PhaA: acetiltransferasa

PhaB1: acetoacetil-CoA reductasa

PhaC1: PHA sintasa

PHB: Poli- β -hidroxibutirato

PHBv: poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)

PHPV: -poli(3-hidroxi-5-fenilvalerato)UB

PLA: ácido poliláctico

PP: polipropileno

p/p: porcentaje en peso seco

PTT: tereftalato de politrimetileno

Tr: tiempo de retención (min)

UBM: Unidad de Biotecnología de Microalgas

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. El problema del plástico

El plástico es uno de materiales más utilizados y persistentes en los ecosistemas a nivel mundial. Estos provienen de origen fósil, los llamados en inglés *conventional plastic* (Bioplastics, 2022). Se definen como la combinación de polímero(s) y aditivos, lo que se aplica tanto a los plásticos fósiles como a los de origen biológico descritos más adelante (Lackner et al., 2023).

En la actualidad, la gran mayoría de los plásticos que percibimos son derivados de la industria petroquímica, alcanzando una demanda mundial del 12% como producto procedente del petróleo (McAdam et al., 2020). Su uso se ha globalizado durante décadas para muchas aplicaciones industriales, desde productos básicos hasta manufacturados, debido a su bajo costo y plasticidad (Jâms et al., 2020). Es por ello, que, el elevado consumo de este material ha provocado que la gestión del plástico como residuo sea un problema de alto impacto medioambiental. Tal como se muestra en la Figura 1.1, cada año son vertidas una media de 8 millones de toneladas de plástico en los océanos según lo describe la Fundación de Ecología y Desarrollo, ECODES (ECODES, 2023), una organización española sin ánimo de lucro cuyos objetivos se alinean con la Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible y MacArthur (2017).



Figura 1.1. La *Isla de Basura* del océano Pacífico (Aquaefundación, 2023)

La composición química del plástico tiene un comportamiento no biodegradable debido a su alto peso y conformación molecular, lo que hace este material persistente y resistente a la acción degradadora de los microorganismos. Es por ello que termina acumulándose en grandes cantidades, además de provocar toxicidad en el medio y

desestabilizar, por consiguiente, el flujo natural de los ecosistemas (Khanna & Srivastava, 2005; Wendlandt et al., 2005).

En los diferentes hábitats y ecosistemas de nuestro planeta, los plásticos pueden ser clasificados según su tamaño como mega-plásticos (>1 m), macrolásticos (< 1m), mesoplásticos (<2.5 cm).

Los microplásticos son, dentro de la clasificación de plásticos, los más abundantes en estuarios y otros sistemas marinos, y su distribución en ambientes pelágicos y bentónicos depende de su densidad (Browne et al., 2010; Thushari & Senevirathna, 2020). La siguiente Tabla 1.1 describe la composición química principal de los microplásticos presentes en los ambientes marinos. Polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), policloruro de vinilo (PVC), poliamida (PA) y tereftalato de polietileno (PET) son los polímeros más abundantes (Andrady, 2017; Hidalgo-Ruz et al., 2012). Los cambios en densidad implican que, por ejemplo, el polipropileno y el polietileno floten en agua (baja densidad), mientras que el poliestireno, el PVC, la poliamida y el PET, son mayoritariamente más densos y decantan a través de la columna de agua, llegando a estar presentes en los ambientes bentónicos (Guo & Wang, 2019).

Tabla 1.1. Composición y propiedades fisicoquímicas de los microplásticos presentes en los océanos. Fuente (Crawford & Quinn, 2016)

Microplásticos	Formula molecular	Grado de cristalinidad	Densidad (g/cm ³)
PE	(C ₂ H ₄) _n	semicristalino	0.92-0.97
PP	(C ₃ H ₆) _n	semicristalino (isotático, sindiotático), amorfo (atático)	0.88-1.23
PS	(C ₈ H ₈) _n	amorfo	1.04-1.50
PA6*	(C ₆ H ₁₁ NO) _n	semicristalino	1.12-1.14
PA66*	(C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₂) _n	---	1.13-1.38
PVC	(C ₂ H ₃ Cl) _n	amorfo	1.15-1.70
PET	(C ₁₀ H ₈ O ₄) _n	semicristalino	1.30-1.50

* Poliamida 6 o Poliamida 66 (plásticos con diferentes resistencias a la temperatura y ductilidad)

La presencia de estos microplásticos en ambientes acuáticos es un problema de relevancia mundial. Un ejemplo de esta problemática lo encontramos en la especie *Mitylus edulis*, comúnmente conocida como mejillón. Esta especie convive en su ciclo de vida larval o bentónica con diferentes tipos de microplásticos como el polietileno, polipropileno y el PVC. Al ser un organismo que se alimenta por filtración esto hace que durante su ciclo de vida se acumulen pequeños microplásticos en su organismo (Browne et al., 2008).

Otro tipo de clasificación de los plásticos se realiza en base a cómo ingresan en el medio natural, en los océanos, siendo denominados como plásticos primarios y secundarios (Eerkes-Medrano et al., 2015; Thushari & Senevirathna, 2020). Los

plásticos primarios son principalmente la materia prima usada en la fabricación industrial de productos de cuidado personal, de aditivos y productos de limpieza, pudiendo encontrarse como gránulos, perlas, fibras, pellets y polvos plásticos (Eerkes-Medrano et al., 2015). Los plásticos secundarios son desechos procedentes de la rotura y/o descomposición de macroplásticos en los ambientes terrestres y marinos, siendo ejemplos de ellos los procedentes de bolsas o botellas (Thompson et al., 2004).

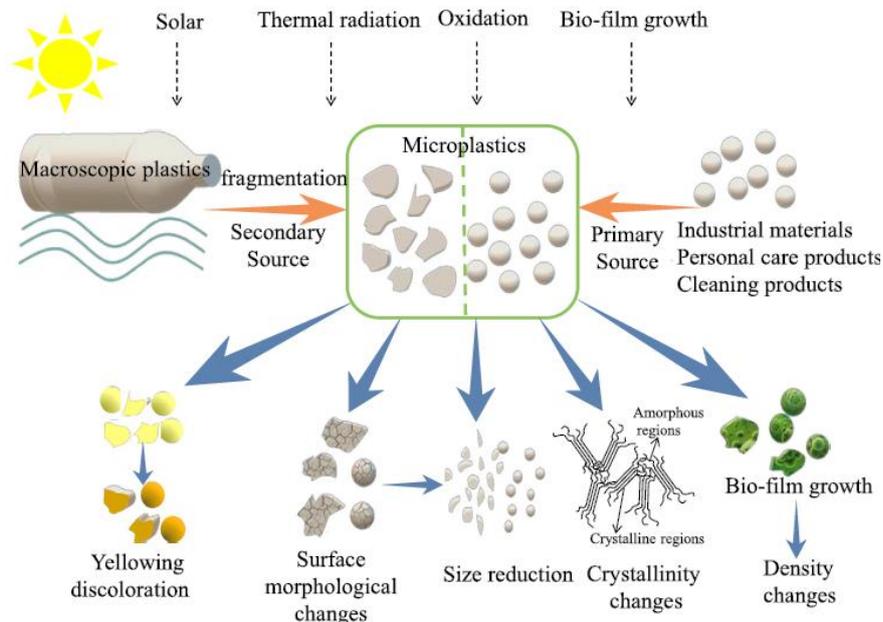


Figura 1.2. Cambios en las propiedades de los microplásticos después de la degradación ambiental. Fuente (Guo & Wang, 2019)

La degradación ambiental del plástico se define, tal y como muestra la Figura 1.2, como una serie de reacciones químicas que afectan a la composición estructural de los polímeros, ya sea por diferentes factores de exposición y envejecimiento, y/o factores mecánicos, físicos, químicos y biológicos propios de la zona litoral-oceánica de vertido (Guo & Wang, 2019). Y el cambios de estado físico de los macroplásticos a microplásticos pueden ser debido a efectos como la fotodegradación, donde la radiación ultravioleta emitida por la luz solar incidente rompe la estructura de los plásticos debido a la abrasión física de las ondas y a su efecto oxidativo sobre los polímeros (Thushari & Senevirathna, 2020). La exposición a altas temperaturas y/o los cambios meteorológicos igualmente contribuyen a la fotooxidación y/o termoxidación de los plásticos, provocando cambios en su cristalinidad, densidad y color, lo que da lugar a la rotura de la estructura por la entrada de oxígeno en los polímeros, reduciendo así su tamaño y generando el problema ambiental de los microplásticos (De La Orden et al., 2015; Guo & Wang, 2019; Rouillon et al., 2016).

Los microplásticos, además de estar presentes en océanos y en el ecosistema terrestre, pueden terminar introduciéndose en la cadena alimentaria, generalmente mediante la ingesta de microplásticos contaminados por organismos marinos. Esto

supone riesgos directos para la salud humana, por lo que urge tomar medidas para la descontaminación de los ecosistemas y para su sustitución por recursos biodegradables. Por consiguiente, no sólo la comunidad científica, sino también sectores políticos, están enfatizando la necesidad de buscar alternativas que permitan el uso y la producción de plásticos biodegradables siguiendo procedimientos amigables con el medio ambiente.

1.2. Bioplásticos

Una alternativa a la problemática del plástico no biodegradable son los llamados bioplásticos (Lackner et al., 2023; Onen Cinar et al., 2020). En la naturaleza encontramos varios tipos de polímeros como, por ejemplo, almidón, celulosa, lignocelulosa o proteínas (los llamados biopolímeros o polímeros naturales) (Onen Cinar et al., 2020). Un bioplástico se puede definir de manera similar al plástico, pero en su formulación química encontramos un biopolímero. Como ejemplo encontramos el almidón de origen vegetal, o producido por microorganismos (polihidroxialcanoato, PHA), junto a otros aditivos y/o rellenos (Lackner et al., 2023). Así, los bioplásticos pueden considerarse plásticos derivados de fuentes de biomasa renovables (Simó-Cabrera et al., 2021).

Según la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico), los “plásticos sostenibles” pueden definirse como “plásticos utilizados en productos que brindan beneficios sociales al tiempo que mejoran la salud y la seguridad humana y ambiental a lo largo de todo el ciclo de vida del producto” (DIN, 2018). Aunque existen datos de incremento en la producción de bioplásticos (principalmente desde materia prima vegetal – almidón y ácido láctico-), que van desde 0,7 millones de toneladas en el 2010, hasta 1,7 millones de toneladas en el 2015 (Soroudi & Jakubowicz, 2013), esto solo representa alrededor del 1% de la producción anual de plástico (Bioplastics, 2024). Se estima que en el que en el 2025 la producción anual de bioplásticos sea de 3 millones de toneladas (Guzmán-Lagunes et al., 2023)

1.2.1. Tipos de bioplásticos

La familia de los bioplásticos se puede dividir en tres grupos principales según Lackner et al. (2023) y Bioplastics (2022):

- a. **Plásticos de origen biológico**, o al menos parcialmente (*bio-based*), y **no biodegradables**, como el polietileno (PE) de origen biológico, el polipropileno (PP) de origen biológico o el tereftalato de polietileno (PET) de origen biológico (los llamados drop-ins). También polímeros de rendimiento técnico, como numerosas poliamidas (PA) de origen biológico, tereftalato de politrimetileno (PTT), o polímeros totalmente nuevos como el furanoato de polietileno (PEF)

- b. **Plásticos que son a la vez de origen biológico y biodegradables**, como el ácido poliláctico (PLA), los polihidroxicanoatos (PHA y PHAs), el succinato de polibutileno (PBS), o diferentes mezclas de almidón.
- c. **Plásticos que se basan en recursos fósiles pero que son biodegradables**, como el tereftalato de adipato de polibutileno (PBAT), que bien podría producirse, al menos en parte, a partir de materia prima de origen biológico en el futuro, aunque en algunos casos ya se están produciendo.

El concepto “de origen biológico -bio-based-” significa que el material o producto deriva (al menos en parte) de biomasa (origen vegetal –plantas– o microorganismos). La biomasa utilizada para los bioplásticos proviene, por ejemplo, del maíz, la caña de azúcar, la madera, o de microorganismos eucariotas, bacterias y arqueas (Lackner et al., 2023; Simó-Cabrera et al., 2021).

El término “biodegradable” hace referencia a la respuesta de un proceso bioquímico en el que los microorganismos que se encuentran en un entorno determinado convierten los materiales en agua, dióxido de carbono y biomasa. El proceso de biodegradación depende de las condiciones ambientales circundantes (por ejemplo: temperatura, inóculo, humedad) y del material. Por lo tanto, el concepto *bio-based* no tiene por qué ser biodegradable, tal y como se explica en la clasificación anterior **(a)**. En la Figura 1.3, pueden diferenciarse las categorías de los plásticos, desde el punto de vista de su degradabilidad o materia prima.

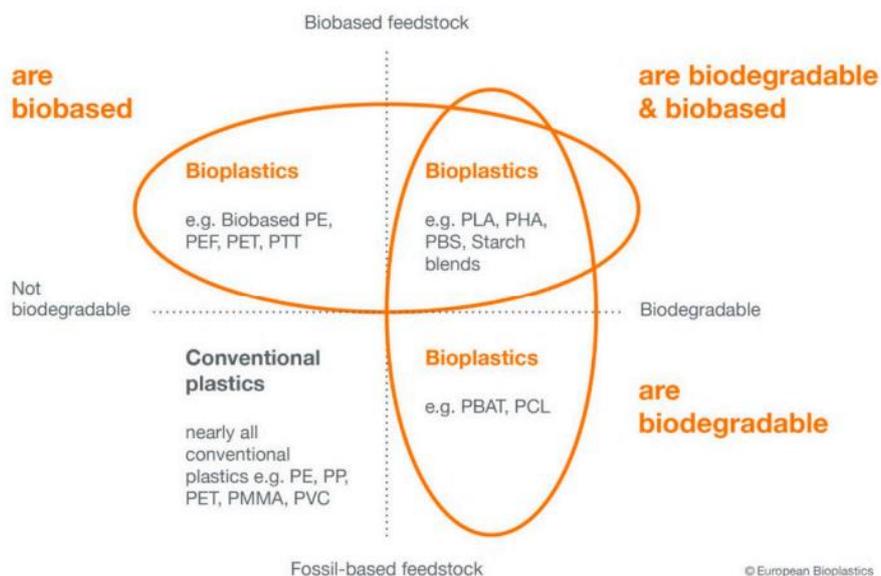


Figura 1.3. Categorías de plásticos biodegradables y no biodegradables. Fuentes (Bioplastics, 2022; Lackner et al., 2023)

1.2.2. Poli-β-hidroxibutirato (PHB)

Hoy en día, los bioplásticos más empleados derivan principalmente de cultivos terrestres como el maíz y la patata y, por lo tanto, compiten con el suministro de alimentos (Rahman & Miller, 2017). Además, la producción de bioplásticos a partir de cultivos agrícolas utiliza grandes áreas de tierra, agua y nutrientes, lo que desde el punto de vista ambiental y económico no es lo más favorable a largo plazo (Bioplastics, 2023; Onen Cinar et al., 2020). Es por esto que existe la necesidad de buscar nuevos recursos sostenibles de producción de bioplásticos a partir de otras materias primas, como los microorganismos.

Particularmente, el poli-β-hidroxibutirato (PHB, ver Figura 1.4) es un poliéster de origen biológico (biopoliéster) y biodegradable (Simó-Cabrera et al., 2021). Está incluido en el grupo de los polihidroxicanoatos (PHAs) y fue el primero en ser identificado y estudiado por la comunidad científica (Getachew & Woldesenbet, 2016). Es producido por microorganismos bajo condiciones de cultivos específicas o inestables para el crecimiento. Por ejemplo, cuando hay disponibilidad de sustratos en exceso (fuente de carbono), o en condiciones de limitación de oxígeno, nitrógeno, fósforo o pH, entre otras (Kumar et al., 2020). En general, estos biopoliésteres (PHAs) están compuestos por ácidos grasos alifáticos, como los PHBs u otros que contienen ácidos grasos aromáticos -poli(3-hidroxi-5-fenilvalerato), PHPV- o ambos grupos funcionales, como en los “heterobiopolímeros”. El grupo R de los PHB es CH₃ y se forma por la condensación del grupo carboxilo de un monómero (ácido hidroxialcanoico) con el grupo hidroxilo del siguiente, dando lugar así a un enlace éster y recibiendo por ello el nombre de “poliésteres” (Khanna & Srivastava, 2005).

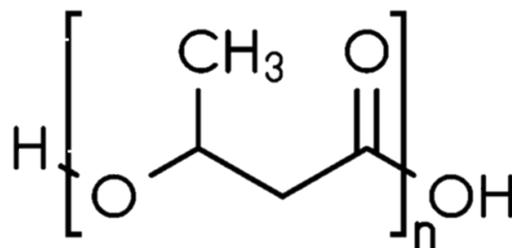


Figura 1.4. Estructura de poli-β-hidroxibutirato (PHB).

Las propiedades físicas y químicas de los biopolímeros de PHA difieren entre sí en la composición química y estructural de su unidad monomérica (Kumar et al., 2020). En el caso del PHB, este se comporta de manera similar al polipropileno (PP), siendo útil para el atrapamiento de gases y con elevada resistencia a la humedad (Getachew & Woldesenbet, 2016). Su monómero (ácido 3-hidroxibutírico) tiene un alto grado de cristalinidad, lo que le da una naturaleza rígida y quebradiza. Puede tener ciertas ventajas ambientales y sostenibles a pesar de su mezcla con matrices poliméricas de base petroquímica, mostrando bajos valores de degradación debido a sus características mecánicas. La cantidad de PHB en las mezclas puede dar lugar a

variaciones de sus características, como hidrofobicidad, cristalinidad o flexibilidad (Luzi et al., 2019; Simó-Cabrera et al., 2021).

En general, las características de los PHAs como la biodegradabilidad, las propiedades termoplásticas y la biocompatibilidad hacen que estos materiales sean adecuados para diversas aplicaciones en la industria del embalaje, la medicina, la farmacia, la agricultura y la industria alimentaria. Pero también como materias primas para la síntesis de productos químicos enantioméricamente puros y la producción de pinturas (Anderson et al., 1990). De ahí el interés de encontrar nuevas especies de microorganismos que puedan maximizar su productividad para un uso industrial y así paliar la problemática global de los plásticos tradicionales.

1.2.3. Microorganismos que producen bioplásticos

Es relativamente reciente encontrar numerosas revisiones bibliográficas sobre el potencial de ciertos microorganismos “como factorías de bioplásticos”. Estos pueden clasificarse, a grandes rasgos, como bacterias, eucariotas y arqueas (Onen Cinar et al., 2020; Rahman & Miller, 2017).

- a. **Bacterias.** En la literatura destacan géneros como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Escherichia* (Arshad et al., 2007) como sintetizadoras de PHA y PHB. Especies Gram positivas y Gram negativas también han sido descritas por estar asociadas con la acumulación de PHB (Arshad et al., 2007; Hassan et al., 1997). También es conocida la producción de PHB en especies bacterianas fijadoras de nitrógeno, como el género *Rhizobium* o *Azotobacter* (Stockdale et al., 1968; Tombolini & Nuti, 1989). Y en el caso de especies halófitas, la familia Halomonadaceae, es conocida por acumular PHA. Estas especies crecen en condiciones moderadas de sal (3-15% NaCl). Otras especies requieren de fuentes de carbono como el glicerol para maximizar la síntesis de PHB como *Halomonas* sp. KM-1, la cual produce PHB utilizando glicerol como única fuente de carbono (Kawata & Aiba, 2010).

- b. **Eucariotas.** Son muy recientes los trabajos de prospección de PHA/PHB en microalgas (Rahman & Miller, 2017) y no hay demasiado descrito respecto a la síntesis de estos compuestos. Las especies más conocidas hasta el momento son *Chlorella* y *Spirulina* (Wang, 2014). Otras especies como *Chlorella fritschii* y *Phaeodactylum tricornutum* han sido descritas por obtener niveles de PHB que van del 10,6% al 17% en base de la biomasa seca (Hempel et al., 2011; Johnsson & Steuer, 2018; Wang, 2014). Particularmente condiciones de cultivos con heterotrofia (fuente de carbono orgánica como acetato), y variaciones nutricionales y de irradiancia han sido efectivas en la síntesis de estos compuestos (Monshupanee et al., 2016). *Scenedesmus almeriensis* y *Neochloris oleobundans* también han sido estudiadas como productoras de

biopolímeros, ya que son especies ricas en almidón o PHA (Hempel et al., 2011; Johnsson & Steuer, 2018).

- c. **Arqueas.** Este dominio está constituido por microorganismos procariotas y se caracterizan por ser extremófilos -capaces de crecer óptimamente en condiciones medioambientales muy hostiles gracias a sus adaptaciones metabólicas (Espinosa, 2022; Pikuta et al., 2007). Dentro de ellas destacan los microorganismos pertenecientes al grupo de los halófilos, los cuales crecen a alta salinidad (1 - 4 M de NaCl) (Espinosa, 2022) y se definen como haloarqueas (Haloarchaea). Este grupo son los más descritos por producir PHA tales como el poli- β -hidroxibutirato (PHB) y el poli-hidroxivalerato (PHV). La Figura 1.5, muestra una de las especies pertenecientes al género *Haloferax*, *H. mediterranei*, una de las más estudiadas como productora de bioplásticos (Longo et al., 2024). Como se observa en la Figura 1.5. estos biopoliésteres se depositan como inclusiones citoplasmáticas de tamaño nanométrico insolubles en agua en los microorganismos y su principal empleo es funcionar como reservas intracelulares de carbono y energía, representando en algunos casos, hasta el 80% de la biomasa seca (Keshavarz & Roy, 2010; Simó-Cabrera et al., 2021).

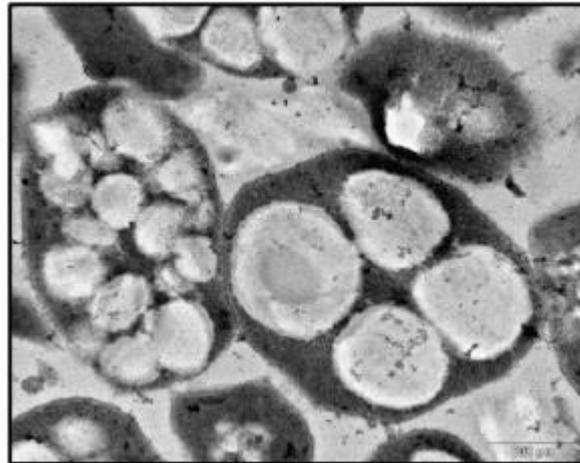


Figura 1.5. Micrografía electrónica de los gránulos de PHB en el interior de la célula de la haloarquea *Haloferax mediterranei*. Imagen obtenida de la Universidad de Alicante (Espinosa, 2022)

1.2.4. Ruta metabólica del PHB

Como ya se ha mencionado anteriormente, los PHB están dentro de la familia de los PHA, y se componen de ácidos grasos alifáticos de cadena corta (de 3 a 5 átomos de carbono). La biosíntesis de estos ha sido estudiada con detalle en la bacteria *Ralstonia eutropha* y en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*. Como se muestra en la Figura 1.6 descrita por Sandström et al. (2015) y más detallada por Rehm (2007), el proceso de biosíntesis se inicia por la condensación de dos moléculas

de acetil-CoA (CoA, coenzima A) a acetoacetil-CoA por acción de la acetiltransferasa (PhaA). A continuación, la acetoacetil-CoA se convierte en 3-hidroxibutiril-CoA (3HB-CoA) por acción de la acetoacetil-CoA reductasa (PhaB1) dependiente de NADPH. Finalmente, los monómeros de 3HB-CoA se combinan en largas cadenas de PHB por acción de la PHA sintasa (PhaC1).

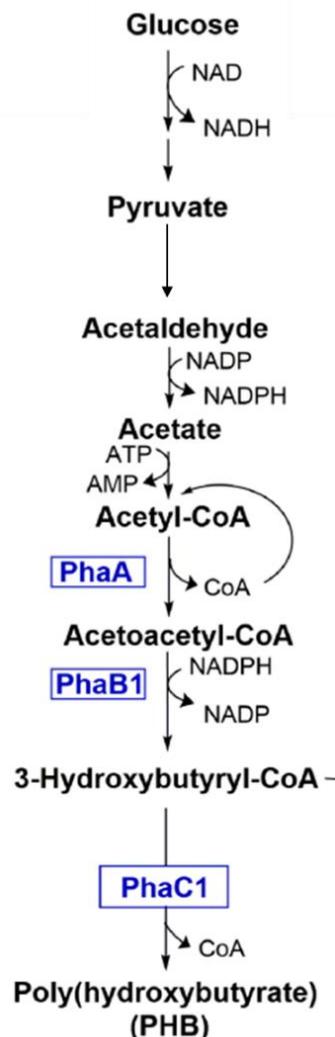


Figura 1.6. Ruta metabólica de la biosíntesis de poliéster (PHB). Fuente modificada desde Rehm (2007) y Sandström et al. (2015)

Como se observa en la Figura 1.6, el ciclo de biosíntesis de PHB comienza con la asimilación de la glucosa hasta piruvato, lo cual conlleva que sea una de las fuentes de carbono orgánico más utilizadas en la síntesis de este biopolímero, y es una de las condiciones de cultivo más utilizadas para estimular la síntesis de PHB. Otras fuentes orgánicas de carbono como glicerol, sacarosa, fructosa, ribosa, xilosa, maltosa, arabinosa, manitol, etc. han sido también empleadas en otros trabajos con haloarqueas y/o bacterias para conocer el efecto en el contenido final de PHB (Romano et al., 2007; Yüksesdağ et al., 2004). En el presente estudio se decide trabajar con glucosa como fuente principal de carbono.

1.3. *Halorubrum* sp.

Las haloarqueas son una rama evolutiva del dominio *archaea* y por lo general constituyen la mayoría de la población procariota en ambientes hipersalinos (Oren, 2002). Además, pertenecen al phylum Euryarchaeota y según Gupta et al. (2015) y se agrupan en dos grandes familias: *Halobacteriaceae* y *Haloferacaceae*. En su mayoría, estas arqueas son extremadamente halófilas y aeróbicas, y generalmente pigmentadas de rojo por la presencia de carotenoides (Naziri et al., 2014). Como se ha mencionado en apartados anteriores, *Haloferax* sp. es uno de los géneros más estudiados para la producción de compuestos de interés, especialmente bacterioruberina (carotenoide mayoritario presente en haloarqueas) y PHAs, pero existen otros géneros menos estudiados como *Halorubrum* (ver Figura 1.7). Particularmente, el presente estudio se ha centrado en evaluar el potencial para la producción de PHB de una especie de *Halorubrum*.

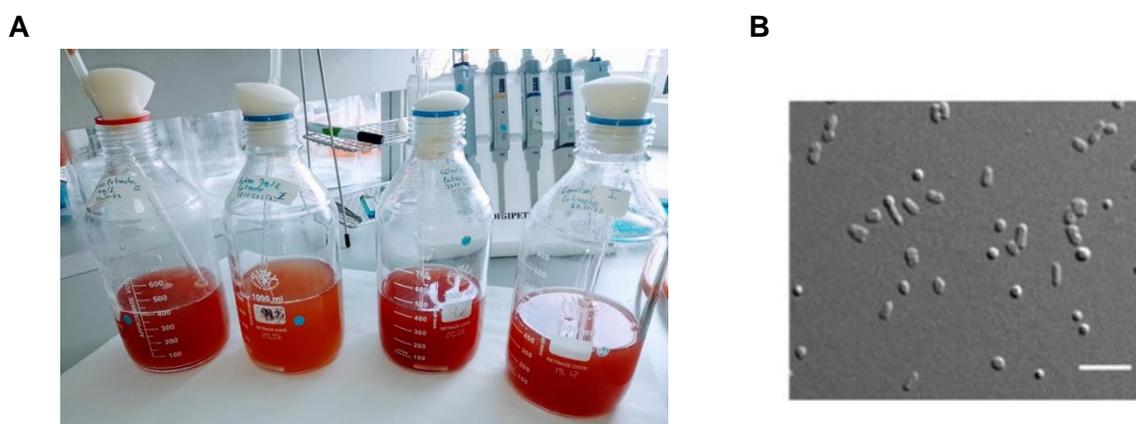


Figura 1.7. (A) Imagen de cultivos de *Halorubrum* sp. estudiados en este trabajo; (B) micrografías de células de *Halorubrum litoreum* publicadas en Sakina et al. (2018). Escala de la barra 10 μ m.

El género *Halorubrum*, perteneciente a la familia Halobacteriaceae, son microorganismos predominantes en ambientes extremos (hipersalinos) y juegan un importante rol en la dinámica y ecología de los mismos, así como en los ciclos biogeoquímicos o en el balance de nutrientes y de gases atmosféricos emitidos y fijados (Adam et al., 2017). Como muestra la Figura 1.7A, su coloración típica, que va del rosa al rojo, pasando por el naranja, se debe a la presencia de carotenoides como la bacterioruberina. En este sentido, muchos autores han estudiado su potencial en la producción de bacterioruberina ya que son un recurso alternativo de carotenoides (Ma et al., 2023; Naziri et al., 2014). Pero en este trabajo se pretende validar la posibilidad de que la haloarquea *Halorubrum* sp., aislada de las Marismas del Odiel (Huelva) por la Unidad de Biotecnología de Microalgas (UBM) de la Universidad de Huelva, sea una prometedora candidata para la producción de PHB, considerándose como otra alternativa biológica que podría contribuir a paliar la problemática ambiental del plástico.

1.4. ¿Por qué elegir Haloarqueas como productoras de bioplásticos?

La principal ventaja que presenta cultivar haloarqueas desde escala de laboratorio a escala industrial es que no necesitan condiciones estériles estrictas, como otros microorganismos, ya que crecen a altas concentraciones de sal (aproximadamente en el rango de 1-4 M de NaCl, ver Figura 1.8). Esto impone una gran limitación a la contaminación y/o población por parte de otros huéspedes que puedan terminar desplazándolas biológicamente. Gracias a esta peculiaridad, los cultivos son más fáciles y convenientes de crecer en comparación con otros eucariotas. Además, este privilegio de crecer a alta salinidad puede dar lugar al uso de materias primas como salmueras para preparar medios de cultivos, minimizando los costos de producción y contribuyendo a los procesos de economía circular (Manikandan et al., 2009; Wendlandt et al., 2005).

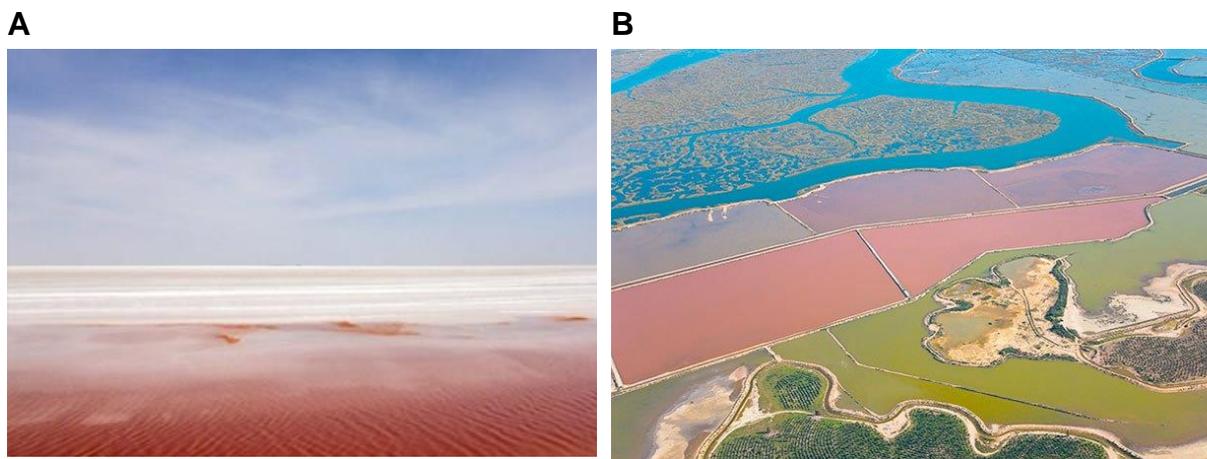


Figura 1.8. (A) Salar Chott El Djerid, (Túnez) **(B)** Marismas del Odiel (Huelva, España). Ejemplos de ambientes extremos hipersalinos ricos en haloarqueas como *Halorubrum* sp. Fuentes: (Andalucía, 2024; Karray et al., 2021)

Por otro lado, la pared celular de las haloarqueas es frágil y, por tanto, fácil de romper. Así, la ausencia de sal en el medio (choque osmótico) facilita dicha rotura y contribuye a minimizar gastos en el proceso de *downstream*. Obteniéndose, en este caso, los compuestos de interés sintetizados en gránulos de PHA, PHB y PHBV (Lillo & Rodríguez-Valera, 1990a; Simó-Cabrera et al., 2021).

Otra ventaja de estos microorganismos halófitos es que crecen con fuentes de carbono orgánica como almidón, glucosa y glicerol, que pueden obtenerse como subproductos industriales. Esto nuevamente minimiza los costos de producción y favorece la economía circular (Zhao et al., 2015). Además, hay que recordar que los bioplásticos obtenidos a partir de microorganismos versus materia prima vegetal tienen como ventaja el no necesitar de grandes extensiones de tierras y recursos hídricos, lo cual no genera competencia con la producción de alimentos y tiene un

menor impacto en la disponibilidad de agua, entre otros problemas (Bioplastics, 2023; Onen Cinar et al., 2020).

Finalmente, los contenidos de PHA son prometedores en haloarqueas, habiéndose descrito valores que van del 19.9 al 70% de PHA respecto a biomasa seca, en especies como *Haloferax mediterranei* DSM 1411 (Bhattacharyya et al., 2012; Ferre-Guell & Winterburn, 2018; Karray et al., 2021).

1.5. Objetivos

Los objetivos del presente trabajo se dividen en tres:

- 1. Evaluar el efecto de la limitación de la fuente de nitrógeno en el crecimiento de la haloarquea *Halorubrum* sp.**
- 2. Evaluar el efecto de la limitación de la fuente de nitrógeno en el contenido de poli- β -hidroxibutirato (PHB) de la haloarquea *Halorubrum* sp.**
- 3. Análisis de la presencia de otros compuestos de interés en el extracto metilado de la haloarquea *Halorubrum* sp.**

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Microorganismo de estudio, *Halorubrum* sp.

La haloarquea utilizada en este trabajo de fin de Máster (TFM), fue *Halorubrum* sp. Este microorganismo fue cedido por la Unidad de Biotecnología de Microalgas (UBM) de la Facultad de Ciencias Experimentales (Universidad de Huelva) adscrita a RENSMA y ubicada en CIDERTA. Previamente, la especie fue aislada de las Marismas del Odiel, Huelva por parte de integrantes de la unidad de investigación. Como muestra la Figura 2.1, las Marismas del Odiel, son parte del Paraje Natural, declarado el 25 de Octubre de 1984, que está situado al sur de la provincia de Huelva, en la confluencia de las desembocaduras de los ríos Tinto y Odiel. Por su ubicación es una zona de encuentro entre las aguas dulces y saladas, dando lugar a un complejo de marismas influenciadas por las mareas y ricas en microorganismos y plantas resistentes a alta salinidad (halófitos). Un ejemplo de ellas es la salicornia o la espartina, auténtica estructuradora de la ecología y el paisaje de amplias áreas de marismas (Andalucía, 2024).



Figura 2.1. Vista aérea de las Marismas del Odiel (Huelva). Fuente (Andalucía, 2024)

2.2. Cultivo de *Halorubrum* sp.

El medio de cultivo control utilizado para crecer *Halorubrum* sp. fue modificado a partir del empleado previamente por la UBM. Especialmente la concentración de sal utilizada por el grupo fue 2,7 M y en el presente TFM se adaptó a 4,2 M de NaCl tal y como lo describe Karray et al. (2021) para la mejora de producción de PHB. Por otro lado, los demás nutrientes del medio se basaron en el mismo trabajo realizado por

Karray et al. (2021) con modificaciones. La composición final es: 250 g/L de NaCl, 10g/ L de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 15g/L de $SO_4Mg \cdot 7H_2O$, 4g/L de KCl, 0,5g/L de $NaHCO_3$, 1g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. La fuente de carbono es glucosa (10g/L) y la fuente de nitrógeno (5g/L) es extracto de levadura.

Como muestra la Figura 2.2, los cultivos de *Halorubrum* sp. fueron cultivados en botellas cilíndricas transparentes de borosilicato con un volumen máximo de inóculo de 60% respecto al volumen total (1L), lo cual otorga una adecuada columna de aire, mejora su crecimiento y evita la evaporación de los mismos. El pH de los cultivos fue estable a 7. La temperatura se controló en todos los ensayos experimentales a $37 \pm 0,1^\circ C$ en un baño maría, controlado por una sonda NTC de temperatura (sensor DC RINGDER) y recirculando el agua del baño gracias a un circuito cerrado con bomba sumergible y termostato (JP Selecta – Termotronic III). Los cultivos fueron homogeneizados mediante aireación constante sin adición de CO_2 , y en cada línea se añadió un sistema de filtros de membrana PTFE de $0,2 \mu m$ para evitar contaminación del medio. Los cultivos fueron iluminados gracias a luces LEDs acalóricas con una irradiancia aproximada de $150 \mu mol \text{ fotones}/m \cdot s^2$. Todos los cultivos fueron además agitados de manera constante mediante 4 agitadores magnéticos – uno por botella - (Plug&Play Thermo Scientific™ RT Basic) a velocidad media, para evitar precipitación de sales y mejorar el acceso a los nutrientes.

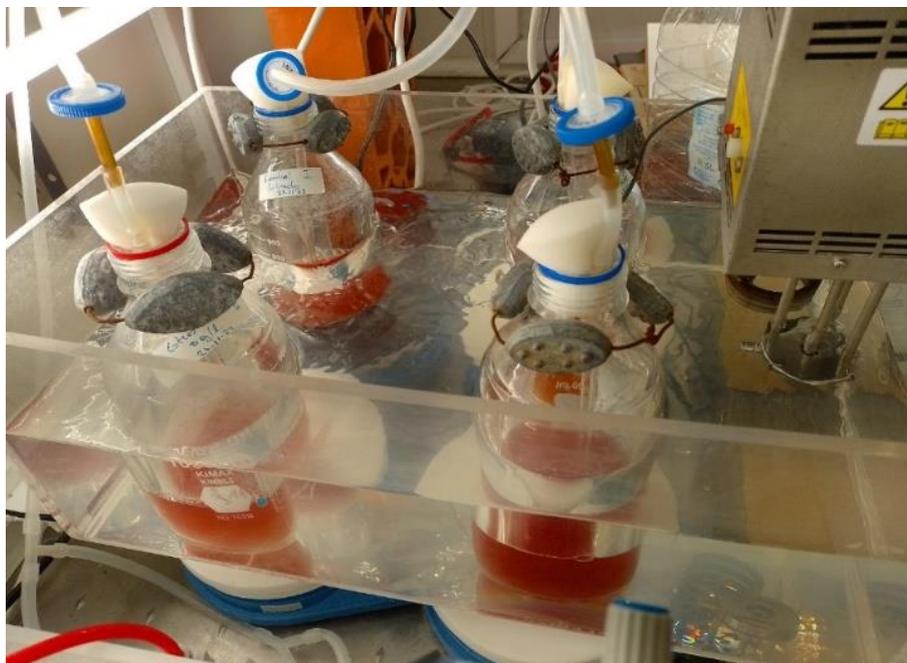


Figura 2.2. Fotografía de parte del diseño experimental utilizado para el cultivo de *Halorubrum* sp en este TFM.

Además, se añadió un sistema de pesas para evitar que las botellas flotaran y mantener su estabilidad. Todas las condiciones de cultivo ensayadas se incubaron por duplicado (replicados biológicos).

2.3. Diseño experimental. Adaptación de *Halorubrum* sp.

El diseño experimental se basó en cultivar la especie de *Halorubrum* sp. bajo tres condiciones (por duplicado). Como muestra la Figura 2.3, el cultivo control creció con el medio nutricional descrito en el apartado anterior (5 g/L de extracto de levadura, C). Se probaron además dos condiciones de estrés, variándose la cantidad de nitrógeno en el medio: 3g/L (E3) y 1 g/L (E1) de extracto de levadura. La fuente de glucosa se mantuvo igual en todas las condiciones (10 g/L).

Para favorecer la aclimatación a los diferentes medios de cultivo se realizaron baños repetidos, incorporando el nuevo medio cada 48hrs hasta obtener un cultivo con un 90% de su volumen “refrescado” y, por tanto, adaptado a las nuevas condiciones.

La toma de muestra se realizó por duplicado (a y b, ver Figura 3.3) cada 24h desde el día cero (tiempo inicial de inóculo) y hasta 5 días (96 h) para estudiar variables de crecimiento, y durante los tres primeros días (72 h) para las variables dependientes de PHB.

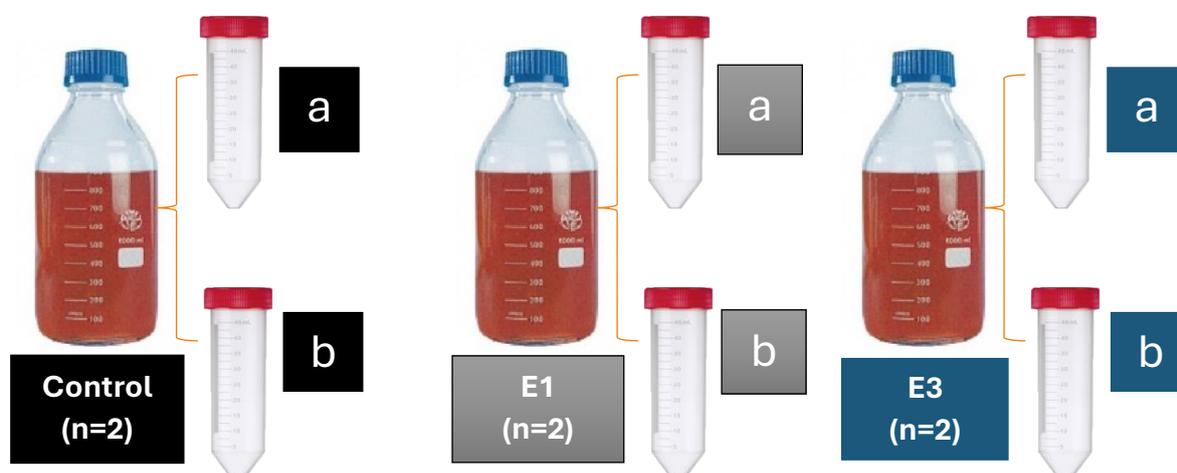


Figura 2.3. Condiciones de cultivo experimental de *Halorubrum* sp. control (5g/L de extracto de levadura), E1 (estrés 1, 1g/L extracto de levadura) y E3 (estrés 3 g/L de extracto de levadura) y toma de muestra (a y b). Cada botella (condición de cultivo) y toma de muestra se realizaron por duplicado ($n_{\text{final}}=4$).

2.4. Variables de crecimiento

La **densidad óptica** fue una de las variables utilizadas para conocer la evolución de crecimiento de *Halorubrum* sp. Fue analizado diariamente mediante el

control por turbidez de los cultivos por espectrofotometría de UV-Vis a una longitud de onda de 600 nm, y utilizando un equipo de espectrofotometría de UV-Vis modelo Evolution 201 (Thermo Fisher Scientific, USA). Con este valor, se pudo determinar la cinética de crecimiento tanto en los cultivos control, como de estrés y de mantenimiento y/o adaptación.

Además de ello, en este TFM se optimizó un protocolo de determinación de **peso seco**. La alta cantidad de sal en el medio en organismos halófilos (NaCl = 250 g/L) es un problema para determinar esta variable de forma tradicional, dando valores sobredimensionados. Además, como muestra la Figura 2.4, la centrifugación de la biomasa fue también un desafío. Al ser células muy pequeñas hubo problemas de rotura por la velocidad de giro seleccionada y/o la no decantación de las células (pellet).



Figura 2.4. Ejemplo de la optimización de la centrifugación de *Halorubrum* sp. **Vial izquierdo**, muestra correctamente centrifugada. **Vial derecho**, otras pruebas de centrifugación, donde el sobrenadante continúa con color rojizo tras la rotura celular.

Así, se optimizó, tras numerosas pruebas, que el volumen a centrifugar fuera de 8 mL (V muestra) por duplicado a una velocidad de 3480 g por 30 min a 4°C (OHAUS, Frontier 5816R, Parsippany, NJ, USA). Posteriormente, desechando el sobrenadante para calcular el peso seco de cada muestra, los pellets fueron trasladados a crisoles previamente pesados (C) y colocado en un desecador de alimentos (CECOTEQ, VitaDry Pro, España) durante 48h a 37°C para determinar el peso seco inicial (biomasa + sales = BS). Luego, las mismas muestras, tras estar

secas (peso constante), fueron incineradas en un horno mufla (Hobersal, HD 430 PAD, España) a 550°C durante 24 h para determinar el peso seco de cenizas (sales = S). Finalmente se determinó el peso seco de la biomasa mediante la siguiente fórmula (Ec.1)

$$\text{Peso seco (g/L)} = \frac{(B-S-C)}{V_{\text{muestra}}} \quad (\text{Ec. 1})$$

2.5. Extracción de Poli-β-hidroxibutirato (PHB) desde *Halorubrum* sp.

Las muestras fueron derivatizadas y/o metiladas según lo descrito por Brandl et al. (1988) con modificaciones. Para la metilación se utilizaron 8 mL de cultivo de *Halorubrum* sp. centrifugadas a 3480 g por 30 min a 4°C. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y el pellet fue suspendido en 2 mL de cloroformo y 2 mL de solución ácida de metanol con ácido sulfúrico (15% v/v de H₂SO₄) como agente transesterificante. Luego, las muestras fueron homogeneizadas mediante vórtex durante 1 min, para ser incubadas durante 1 hora y media a 100°C en un baño seco. Finalmente, las muestras se dejaron enfriar a T° ambiente y se añadió 1 mL de agua Milli-Q. Nuevamente se homogeneizaron las muestras y fueron centrifugadas a 690 g durante 5 minutos para recoger la fase orgánica (inferior) y reservar en viales ámbar de vidrio para su posterior análisis por cromatografía de gases (GC-FID) y masas (GC-MS).

2.6. PHB mediante Cromatografía de Gases (GC-FID)

Los extractos metilados, así como un patrón de ácido butírico (Figura 2.5 A) en representación del monómero que compone el PHB, fueron analizados mediante cromatografía de gases (Agilent 6890N, Alemania) con detector iónico de llama (FID) como muestra la Figura 2.5 B.

La inyección de la muestra fue de 1 µL en modo split de 1:100 y fue separado a través de una columna capilar RESTEK 5MS de 30m x 0,25 mm DI x 0,25 µm de espesor. El programa de temperatura comenzó a 80 °C (mantenido durante 5 min) y aumentó a 350 °C a una velocidad de 5 °C/min (mantenido durante 10 min). La temperatura del inyector fue de 270 °C, el gas portador fue helio y la velocidad de flujo fue de 5 mL/min en modo Split 1:100.

La identificación del monómero identificado como PHB, fue a través del tiempo de retención y su cuantificación mediante la comparativa entre áreas obtenidas en los experimentos y patrón junto con la cantidad (mg) de patrón metilado (~5 mg) Esto se definió como **concentración de PHB** (mg PHB/ml). Además, el **contenido de PHB** (mg pHB/ g biomasa seca) fue calculado como la siguiente Ecuación 2 y expresado como % p/p.

$$\text{Contenido PHB} \left(\% \frac{P}{P} \right) = \left(\frac{\text{mg de PHB}}{\text{ml}} \right) * \left(\frac{\text{ml}(\text{CLCH}_3)}{\text{ml de cultivo}} \right) * \left(\frac{\text{ml}}{\text{g de biomasa seca}} \right) * 100 \quad (\text{Ec.2})$$

La **productividad de PHB** se calculó como se define como la siguiente

Ecuación 3 (Ec. 3).

$$\text{Productividad de PHB} \left(\frac{\text{g}}{\text{l} * \text{d}} \right) = \frac{\text{g de bioma seca}}{\text{tiempo de cultivo}} * \text{Contenido de PHB} \quad (\text{Ec. 3})$$

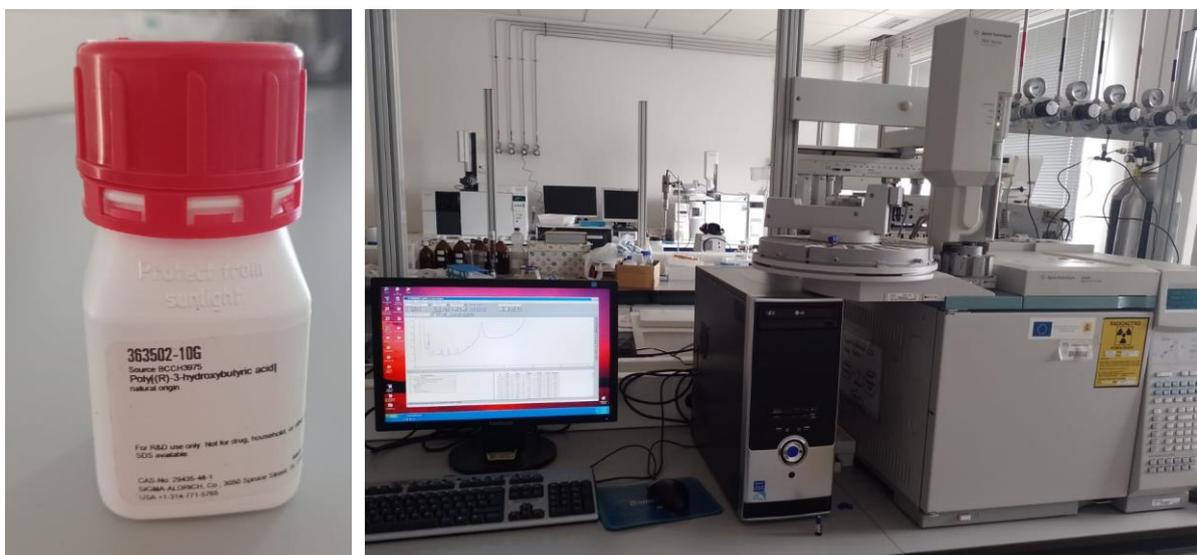


Figura 2.5. (A) Patrón usado en este TFM, Poli-β-hidroxibutirato (PHB) – Sigma-Aldrich, **(B)** Cromatógrafo de gases Agilent 6890N con detector FID ubicado en CIDERTA, Universidad de Huelva

2.7. PHB y otras moléculas de interés mediante Espectrometría de Masas (GC-MS)

Las mismas muestras metiladas y analizadas por GC_FID fueron analizadas mediante un servicio externo de análisis (CITIUS, Universidad de Sevilla Figura 2.6 A) para corroborar la presencia de PHB, así como para obtener información de otras biomoléculas de interés que pudieran estar presentes en los extractos.

Todas las muestras fueron analizadas mediante espectrómetro de masas Thermo Scientific Q Exactive™ GC Orbitrap™ (Figura 2.6 B) equipado con una columna DB 5MS (30 m × 0,25 mm de diámetro interior × 0,25 μm de espesor de película) (Agilent, Alemania). El programa de temperatura comenzó a 80 °C (mantenido durante 5 min) y aumentó a 350 °C a una velocidad de 5 °C/min (mantenido durante 10 min). La temperatura del inyector fue de 270 °C, el gas portador

fue helio y la velocidad de flujo fue de 5 mL/min en modo Split 1:100. La identificación de los compuestos, incluido PHB y otros ácidos grasos se logró comparando los espectros de masas con la NIST Mass Spectrometry Data Center (versión de software MS 2.3).

A



B



Figura 2.6. (A) Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS), **(B)** QExactive-GC, Espectrómetro de Masas Híbrido Cuadrupolo-Orbitrap usado en este TFM

2.8. Estadística

El software Statgraphics Centurion XVIII Statistics (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, EE. UU.) fue empleado para el análisis estadístico y la elaboración de datos usando un nivel de significancia establecido en 95%. El análisis de varianza unidireccional (ANOVA), junto con la prueba estadística de Tuckey, se empleó para conocer diferencias estadísticamente significativas entre los cultivos y condiciones estudiadas para la variable concentración de PHB.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Evolución del crecimiento de *Halorubrum* sp. bajo limitación de nitrógeno

El efecto de la limitación de nitrógeno fue evaluado en el crecimiento de la haloarquea *Halorubrum* sp. La Figura 3.1. muestra la evolución de turbidez de los cultivos de la haloarquea, definida como densidad óptica a 600nm (DO_{600}) respecto a los 5 días de ensayo de las tres condiciones propuestas para *Halorubrum* sp. Las condiciones fueron: control (5g/L de extracto de levadura) y cultivos estresados E1 y E3 (1 y 3 g/L de extracto de levadura en el medio respectivamente). Como se observa en la figura, el cultivo control llega a presentar en el día 4 de cultivo el doble de DO_{600} (2,1), respecto a los cultivos estresados E3 (1,3) y E1 (1,2). En el inicio del cultivo, no obstante, no se encontraron grandes diferencias entre las tres condiciones. La limitación de nutrientes, en particular el nitrógeno, tiene de manera general en los microorganismos un efecto de ralentización del crecimiento (Breuer et al., 2012), lo cual explicaría la menor densidad de cultivo alcanzada en los cultivos estresados. Al final de la experimentación, el cultivo control muestra una reseñable caída en la densidad celular, posiblemente relacionada con el agotamiento de nutrientes esenciales como consecuencia del sobrecrecimiento experimentado hasta el día 4. Dicha condición no parece alcanzarse en los cultivos estresados debido al menor crecimiento experimentado.

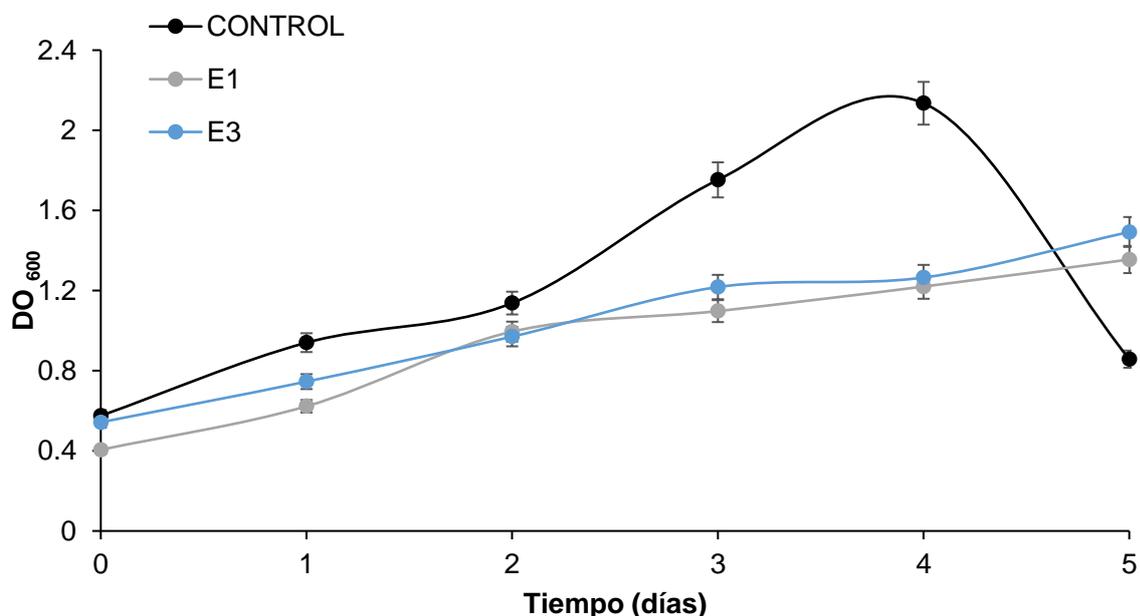


Figura 3.1. Efecto de la limitación de extracto de levadura como fuente de nitrógeno en el crecimiento, medido como densidad óptica (DO_{600}), de la haloarquea *Halorubrum* sp. Los cultivos y toma de muestra fueron realizados por duplicado.

La siguiente Figura 3.2 muestra la evolución del peso seco de *Halorubrum* sp. bajo las mismas condiciones estudiadas como control, E1 y E3, respectivamente. Como es esperable, la tendencia obtenida es similar a la observada anteriormente. Durante los tres primeros días de crecimiento no hay diferencias entre las condiciones ensayadas, sin embargo, el día 4 el cultivo control duplica el peso seco en comparación con los cultivos con limitación de nitrógeno (N). Pero nuevamente se observa la importante caída en el peso seco experimentada en el día 5 como consecuencia del sobrecrecimiento, agotamiento de nutrientes esenciales y posible acumulación de sustancias de desecho tóxicas para la propia biomasa. El crecimiento celular de los cultivos estresados muestra, por el contrario, un crecimiento más moderado, alcanzando los máximos de peso seco en los días 2 y 4 para las condiciones E1 y E3. Los valores de biomasa máximos alcanzados se sitúan en el entorno de 1,9 y 2,4 g/L, según la concentración de extracto de levadura utilizada (E1 y E3, respectivamente). Hasta el momento, hay poco estudiado sobre la carencia de N en haloarqueas y sus efectos fisiológicos. Sin embargo, en bacterias la limitación o carencia nutricional (N, fósforo, carbono, etc.) son condiciones muy usadas para favorecer rutas metabólicas de síntesis de moléculas de interés como los PHAs (Anderson & Dawes, 1990; Lee, 1996).

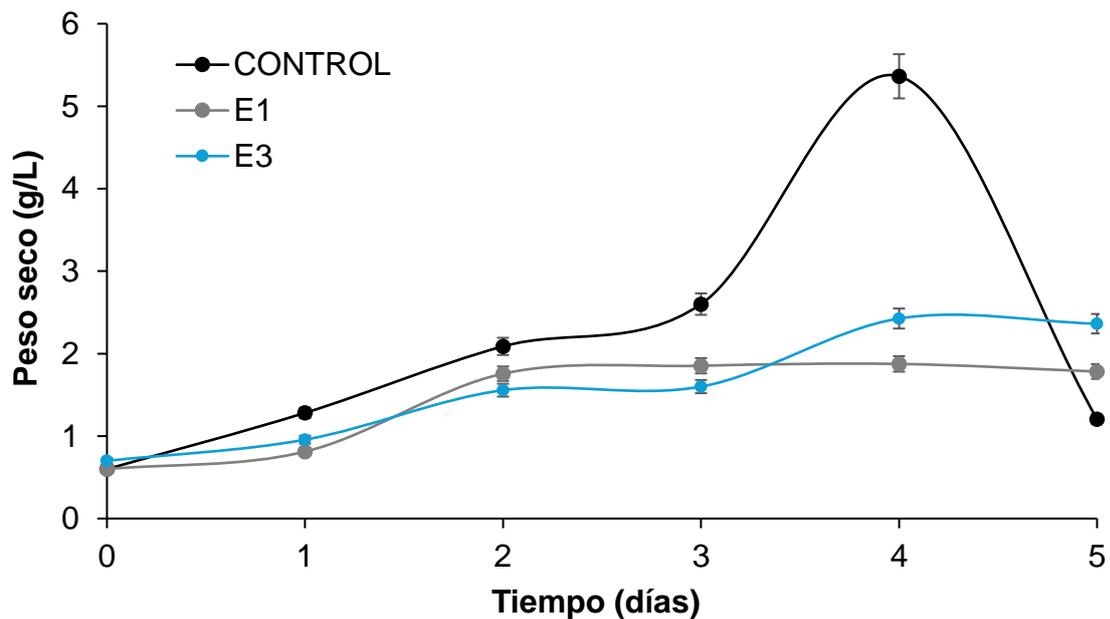


Figura 3.2. Efecto de la limitación de extracto de levadura como fuente de nitrógeno en el crecimiento, medido como peso seco, de la haloarquea *Halorubrum* sp. Los cultivos y toma de muestra fueron realizados por duplicado.

3.2 Efectos en el contenido de PHB de *Halorubrum* sp. bajo limitación de nitrógeno

En este apartado se presenta el efecto de la limitación de nitrógeno en la concentración (mg PHB/mL, Ec. 2.) y en el contenido de PHB (% p/p, Ec. 3) de la especie *Halorubrum* sp. Para realizar los cálculos de ambas variables fue necesario identificar y cuantificar el compuesto (monómero) que conforma el PHB mediante el patrón poli- β -hidroxibutirato (PHB) de Sigma-Aldrich. La separación se realizó gracias a las técnicas de cromatografía de gases (GC-FID) y espectrometría de masas (GC-MS), descritas en Materiales y Métodos.

De este modo, la Figura 3.3 muestra la concentración volumétrica de PHB en los tres primeros días de cultivo en las condiciones definidas como control, E1 y E3. Se observa que la limitación de extracto de levadura como fuente de nitrógeno estimula la síntesis de PHB en *Halorubrum* sp. Particularmente, el tratamiento E3 fue hasta 3,3 veces mayor que la concentración de PHB en el control. Y el tratamiento E1 también supero en hasta 1,5 veces la concentración de PHB control en el día tres de cultivo.

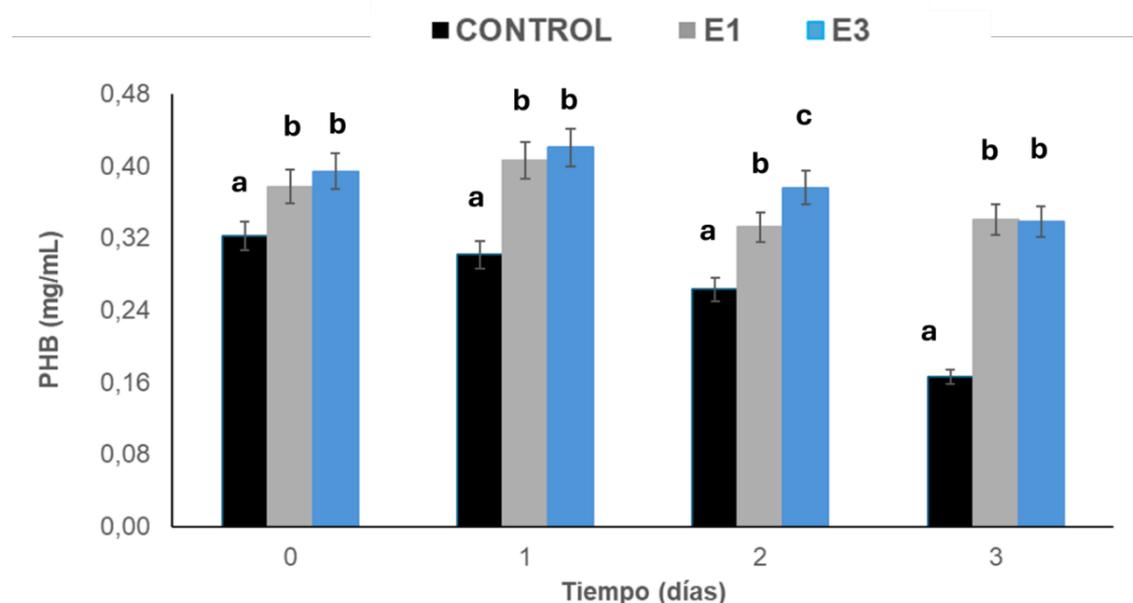


Figura 3.3. Concentración de PHB en los cultivos control, E1 y E3. Las letras a-c muestran la existencia de diferencias significativas utilizando la prueba ANOVA y la prueba HSD de Tuckey. Unidad = mg PHB/ mL extracto metilado

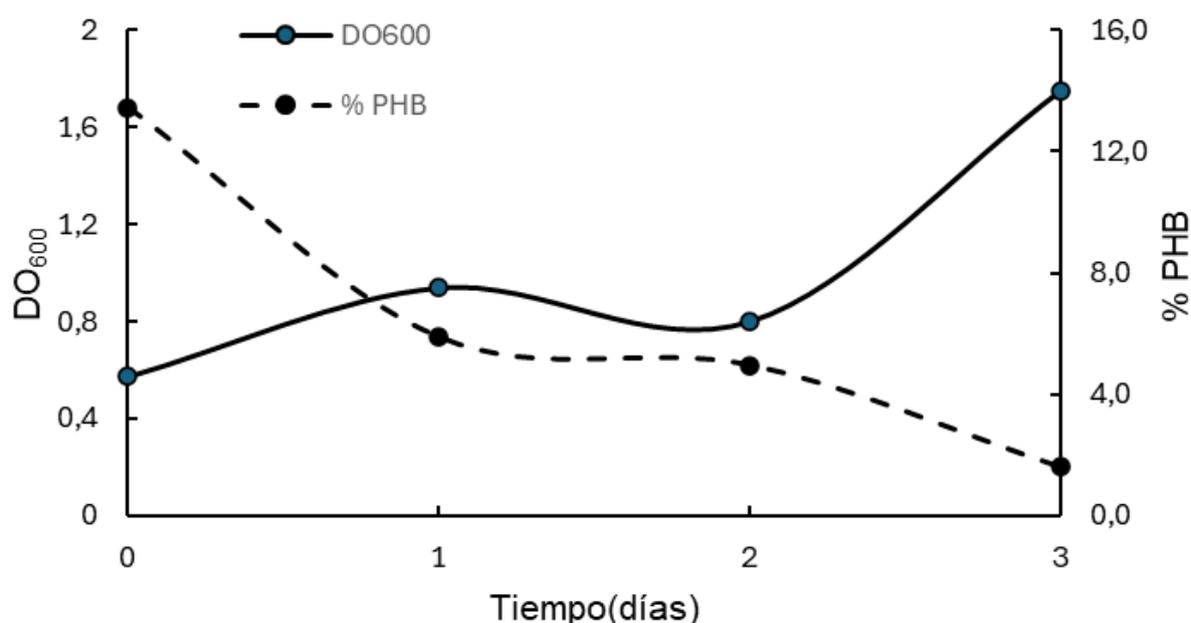
Estos resultados muestran cierta controversia con lo descrito para *Haloferax mediterranei*, donde la utilización de extracto de levadura como fuente de nitrógeno no parece generar una estimulación significativa en la producción de PHB de cadena corta (Lillo & Rodríguez-Valera, 1990b). Sin embargo, las diferencias existentes entre los metabolismos de diferentes géneros y especies de haloarqueas podrían justificar dichas diferencias. Además, el resto de las condiciones de cultivo empleadas también

afectan a la síntesis de PHB, pudiendo la fuente de carbono jugar un papel importante, además de la fuente de nitrógeno. Han et al. (2007)) identificaron dos genes adyacentes, phaEHm y phaCHm, que codifican dos subunidades de la PHA sintasa (clase III), y los cuales son necesarios para la síntesis de PHB en *Haloarcula marismortui*. Esta es un tipo de haloarquea extremadamente halófila y bajo condiciones anaerobias, con glucosa al 2% y 2 g/L de extracto de levadura, llega a alcanzar hasta un 21% p/p de PHB con respecto a su peso seco (Han et al. (2007)).

Para conocer la evolución del contenido de PHB en *Halorubrum* sp. versus el crecimiento celular (DO_{600}) y bajo las diferentes condiciones de cultivo, se presenta la Figura 3.4. Dicha figura describe tanto en el cultivo control (Figura 3.4 A), E1 (Figura 3.4 B) y E3 (Figura 3.4 C) la variación en el tiempo de la variable de crecimiento y síntesis de PHB.

En las tres formas de cultivar, se observa la misma tendencia. Mientras hay un crecimiento celular (turbidez) en aumento, el contenido en PHB respecto biomasa seca disminuye. Este modelo de cinética es contraria a la descrita por Han et al. (2007) en la especie *Haloarcula hispánica*, también perteneciente a la familia de las Halobacteriidae. Sin embargo, podríamos justificar nuestros resultados en base a que *Halorubrum* sp. podría estar utilizando el contenido de PHB como reserva de energía y fuente de carbono, tal y como otros autores sí han descrito (Shrivastava et al., 2021; Simó-Cabrera et al., 2021).

A



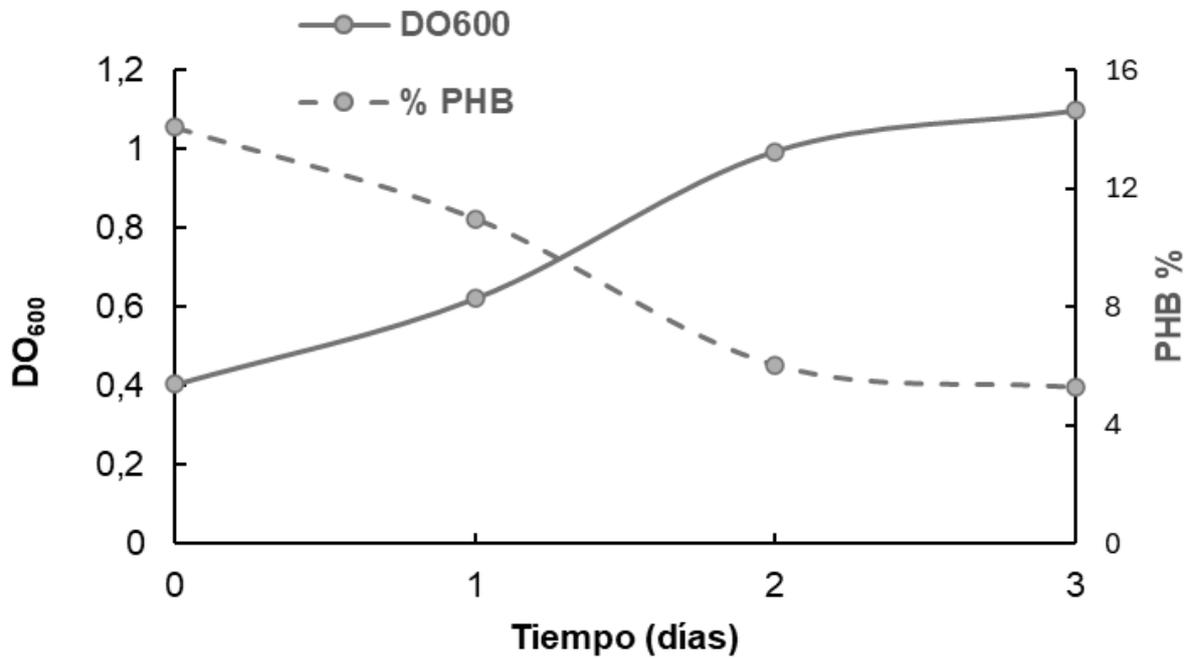
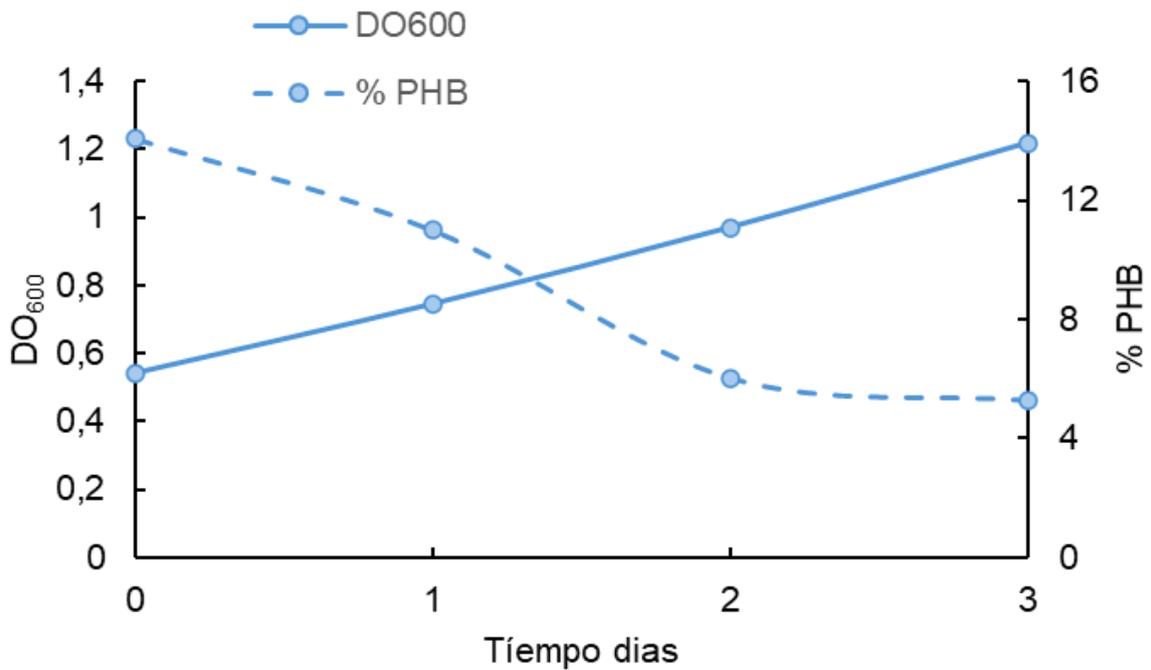
B**C**

Figura 3.4. Evolución del contenido de PHB (% p/p) respecto a la densidad óptica (OD 600nm) durante los tres primeros días de cultivos en los experimentos **(A)** control **(B)** E1 y **(C)** E3.

Por otro lado, como se ha descrito en Introducción, muchos tipos de microorganismos son capaces de sintetizar PHA de forma natural en forma de gránulos intracelulares con similares características a los polímeros petroquímicos

(Shrivastava et al., 2021). Este almacenamiento es considerado una de las principales estrategias como respuesta ante el estrés que puede proporcionar dichos ambientes extremos y, por consiguiente, un método de adaptación a las condiciones medioambientales. De modo que, por ejemplo, una relación de exceso de sustrato de carbono y/o limitación de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo, se convierten en condiciones de estrés que inducen la síntesis de PHA (Don et al., 2006).

En la siguiente Tabla 3.1. se realiza una comparativa del contenido de PHB, calculado como % p/p y productividad de PHB, como principal poliéster sintetizado por *Halorubrum* sp. versus otras especies descritas en literatura y crecidas bajo diferentes fuentes de carbono. Además, se muestra el dato de peso seco (g/L) obtenido en cada especie.

Tabla 3.1. Comparativa del contenido y productividad de PHB y peso seco entre cepas de haloarqueas.

<i>Especie</i>	Fuente de C	Tiempo (días)	Peso seco (g/L)	PHB (%p/p)	P (mg/L·d)	Tipo de PHAs
CEJ-34-14	Almidón	6	0,22	9,25	0,39	PHB
CEJ-5-14		7	0,56	7,11	5,6	
CEJ-48-10		5	0,55	1,42	1,5	
<i>H. argentinensis</i> CGMCC1.7094	Glucosa	4	3,3	6,5	53	PHBV
<i>H. literium</i>			2,5	2,1	13	PHB
<i>H. trapanicum</i> CGMCC1.2201			1,9	12,7	60	PHBV
Este estudio - <i>Halorubrum</i> sp.						
Control	Glucosa	3	2,6	1,6	13	PHB
E1			3,6	2,4	28	
E3			1,6	5,3	28	

Abreviaturas: H. (*Halorubrum*); P (productividad de PHB). Datos obtenidos a partir de los trabajos de Karray et al. (2021), Han et al. (2010) y el presente estudio.

Como se observa en la tabla, las especies estudiadas en el Salar Chott El Jerid, descritas como CEJ34-14, CEJ5-14 y CEJ48-10 presentaron un contenido de PHB de 9,25; 7,11; y 1,42% p/p con respecto a su biomasa seca entre los días 5 y 7 de cultivo, respectivamente. La fuente de carbono que usaron fue almidón soluble (Karray et al., 2021). La mayoría de las haloarqueas pueden utilizar glucosa como fuente de carbono, siendo una de las mayores fuentes de material de reserva en eubacterias (Fernandez-Castillo et al., 1986). Es importante destacar que el medio de cultivo utilizado en este TFM para *Halorubrum* sp. se basó en lo descrito por Karray et al. (2021) pero con la modificación de la fuente carbono, pasando de almidón a glucosa gracias a la optimización previa realizada en el grupo de investigación UBM. Según los resultados obtenidos al tercer día de cultivo, el contenido de PHB en *Halorubrum* sp. fue de 1,6; 2,4 y 5,3% p/p para el cultivo control, E1 y E3, respectivamente. Estos valores están dentro del rango publicado por otros autores como Han et al. (2010) que trabajaron con especies pertenecientes al género *Halorubrum*. Por tanto, la especie

estudiada en este TFM, aislada de las Marismas del Odiel, podría ser una potencial candidata para la producción de PHB de cadena corta.

En la Tabla 3.1, también se muestra otra variable relevante, la productividad de PHB. Esta se describe en Materiales y Métodos, y da información relevante pues tiene en cuenta el peso seco y el tiempo de cultivo, además del contenido de PHB alcanzado. Teniendo en cuenta la productividad, los valores logrados en este estudio son más elevados que los descritos para otras especies de interés (Karray et al., 2021) aunque también existen otras cepas de *Halorubrum* sp. (Han et al., 2010) que han mostrado valores dentro del rango de los obtenidos en este trabajo. Por otro lado, en los cultivos estresados, E1 y E2, no se encontraron diferencias en el valor de productividad, pero sí fueron el doble de lo alcanzado en el cultivo control. Por lo que la condición de cultivo bajo limitación de nitrógeno sí favoreció significativamente la productividad de PHB.

3.3 PHB y otras moléculas de interés presentes en *Halorubrum* sp.

El análisis por espectrometría de masas de los extractos obtenidos en este TFM permite evaluar el potencial de *Halorubrum* sp. para la producción de dicho poliéster, así como la identificación de otros posibles compuestos de interés que también pudieran ser producidos por la haloarquea. La Figura 3.5 muestra el perfil de compuestos presentes en las muestras control metiladas a partir de la biomasa de *Halorubrum* sp.

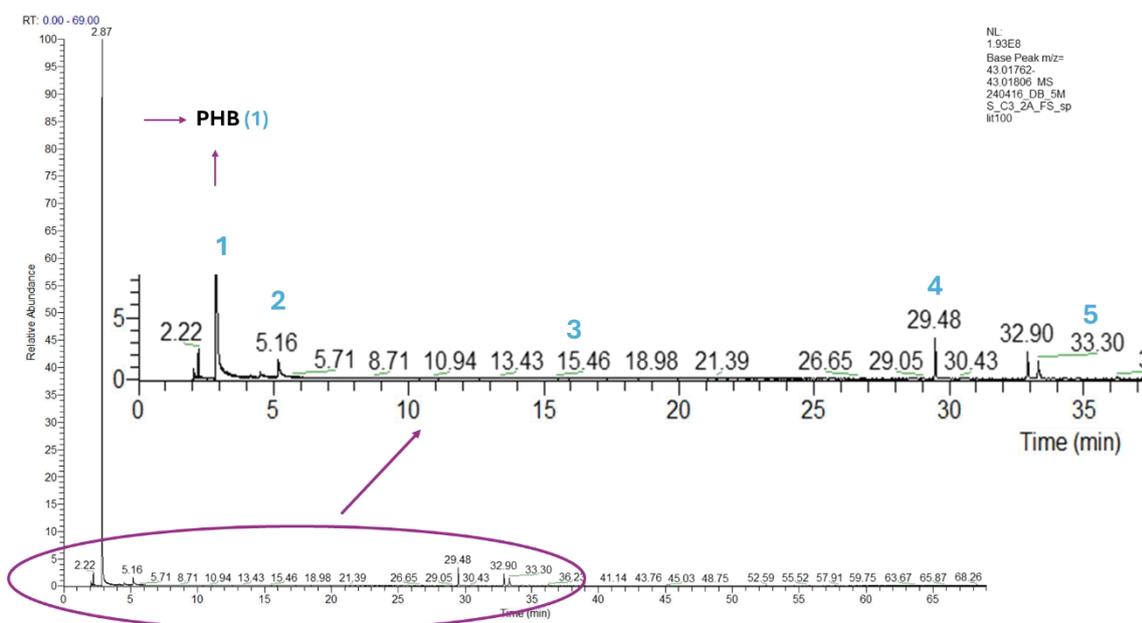


Figura 3.5. Cromatograma de las moléculas presentes en el extracto metilado de *Halorubrum* sp. del cultivo control mediante espectrometría de masas. Se observa la presencia del monómero representativo de PHB (1) y otros compuestos de interés (2-5).

La presencia del monómero de PHB (ácido 3-hidroxi-metilbutírico, etiquetado como 1 en la Figura), no solo fue ratificada mediante cromatografía de gases con detector FID, sino también mediante el servicio externo de espectrometría de masas, proporcionado por la Universidad de Sevilla (CITIUS). En este servicio se pudo separar e identificar los extractos mediante el uso de un Espectrómetro de Masas Híbrido Cuadrupolo-Orbitrap, QExactive-GC. Además, la cuantificación de PHB se llevó a cabo mediante el patrón poli(R)-3-hidroxibutírico de Sigma-Aldrich descrito en Materiales y Métodos junto con el software “NIST Mass Spectrometry Data Center” (versión de software MS 2.3). El análisis de datos fue realizado de manera remota en CIDERTA, tras formación del software por parte de los técnicos especialistas en CITIUIS.

Como muestra la Figura 3.5, en el minuto 2,87 se separa el monómero característico de PHB, siendo con diferencia el pico más elevado del cromatograma, posiblemente debido a que el proceso de derivatización de las muestras fue afín a la metilación de PHB y no tanto a otros ácidos grasos (Brandl et al., 1988). Las muestras metiladas de *Halorubrum* sp. (particularmente del día 3, donde hubo mayor contenido de PHB) fueron analizadas por esta técnica tanto en cultivo control, E1 y E3. A modo de ejemplo se muestra el cromatograma control, por ser representativo de las otras dos condiciones.

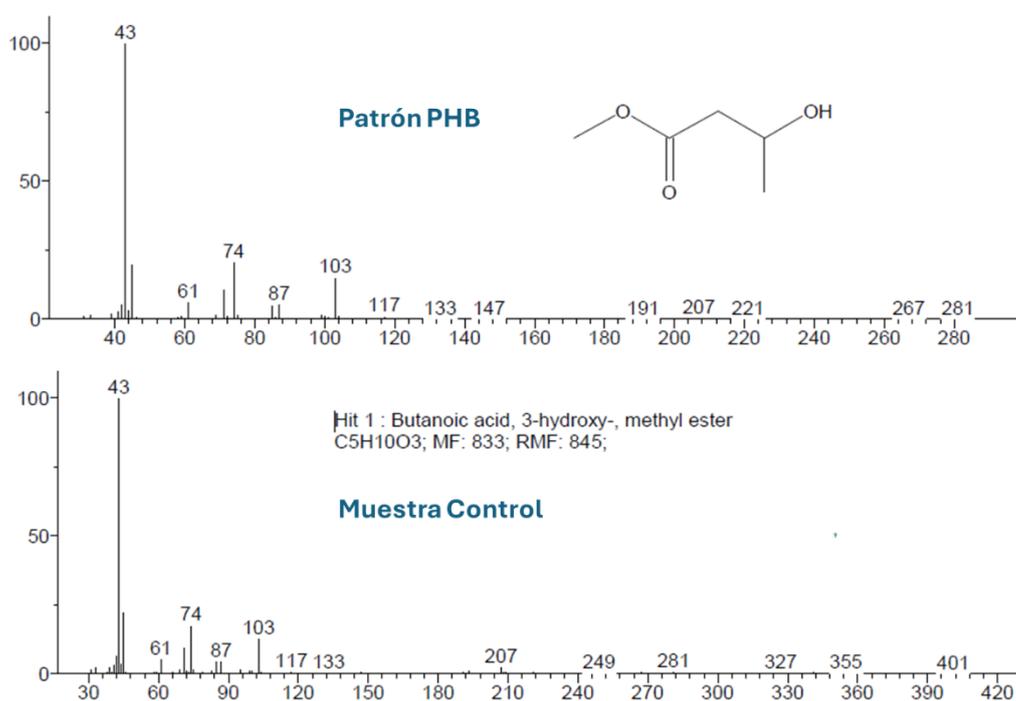


Figura 3.6. Espectro de masas del patrón PHB (arriba) y muestra control (abajo) donde se ratifica la presencia de PHB en la haloarquea mediante GC-MS.

La Figura 3.6 muestra los espectros de masas del monómero de PHB obtenidos por el software NIST. Arriba, el espectro del patrón y abajo, la molécula metilada 3-

hidroxibutirato, del cultivo control de *Halorubrum* sp. Este compuesto también fue encontrado en las muestras de estrés E1 y E3 (aportadas en anexos) con mayor intensidad, corroborando los resultados del apartado 4.2.

La espectrometría de masas (GC-MS), tiene una mayor resolución y precisión de masas. Es una técnica más exhaustiva que el detector FID y confirma, nuevamente, la presencia de PHB en *Halorubrum* sp. El método de separación fue el usado en el GC-FID, pero su alta precisión de masa -por debajo de ppm- con una alta velocidad de adquisición, da lugar a una calidad espectral sin igual.

Por otro lado, como se observa en la Figura 3.5, además de la presencia de PHB se pudo separar otros compuestos de interés desde la especie *Halorubrum* sp. La siguiente Tabla 3.2 resume los compuestos más relevantes identificados mediante GC-MS y con mayor porcentaje de acierto según la NIST. Estos compuestos estuvieron presentes tanto en los cultivos control como E1 y E3, no habiendo presencia de otras moléculas según las condiciones de cultivos seleccionadas.

El compuesto identificado como ácido levulínico (2) tiene muchas aplicaciones industriales, tales como la cosmética, farmacéutica y como aditivos para combustibles. También ha sido descrita su actividad como fungicida y pesticida (Alonso et al., 2010; Garcia-Ortiz et al., 2020). El compuesto (3) de la Tabla 3.2, trimetil citrato, es derivado del ácido cítrico, y ofrece la novedosa ventaja de tener la propiedad ser “demulsionante”, es decir, permite la separación de fracciones agua-aceite. En la industria por ejemplo del combustible, según reporta Shen et al. (2024), tiene alta rentabilidad y amplia aplicabilidad en etapas descritas en dicha área. También, la presencia del ácido palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) definidos como 4 y 5 en la Figura 4.6 y Tabla 4.1, están presentes en la fracción metilada de *Halorubrum* sp. Estos son dos ácidos grasos saturados muy abundantes en semillas y plantas oleaginosas (Kenar et al., 2017).

En las últimas décadas, el palmítico tiene muchas aplicaciones, particularmente en la industria alimentaria debido a la textura y estabilidad que ofrece en el procesado de productos (Mancini et al., 2015). También ha sido descrito su papel en la fabricación de detergentes, emulsionantes, agentes humectantes, estabilizadores, resinas, lubricantes, plastificantes, además de ser parte de alimentos para animales (Verhe et al., 2004). Según Chen et al. (2020), el éster metílico del ácido esteárico proporciona neuroprotección y mejora los resultados funcionales después de un paro cardíaco, lo que proporciona un papel único y desconocido de estos ácidos grasos saturados en la salud cerebral de los humanos.

En haloarqueas, en general, no hay mucho descrito sobre la presencia de ácidos grasos, ya que esta familia de moléculas no es muy abundante, por ejemplo, en la membrana de las arqueas. Pero sí se han detectado pequeñas cantidades de ácidos grasos (C14, C16, C18) en las proteínas de la membrana de *Halobacterium salinarum* (Pugh & Kates, 1994), por lo que es probable que otras especies de

haloarqueas posean constituyentes de membrana similares porque tienen el mismo conjunto de genes para la síntesis *de novo* de isoprenoides. Sin embargo, es poco lo que hay descrito.

Tabla 3.2. PHB y otras moléculas de interés identificadas en la fracción metilada desde la haloarquea *Halorubrum* sp.

Pico	Compuesto tentativo	Sinónimo	Fórmula	Tr (min)	(M/Z) M ⁺	Aplicaciones y/o Propiedades Bioactivas
1	Ácido butanóico, 3 hidroximetil éster	β-hidroxibutírico	C ₅ H ₁₀ O ₃	2,87	118	PHB - bioplásticos
2	Ácido pentanoico, 4-oxo-, metil éster	Ácido Levulínico	C ₆ H ₁₀ O ₃	5,16	130	Fármacos, combustible y aditivos alimentarios
3	Ácido cítrico, trimetil éster	Trimetil citrato	C ₉ H ₁₄ O ₇	18,98	234	Tratamientos de desorden metabólico
4	Ácido hexadecanoico, metil éster	Ácido Palmítico	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	29,48	270	Detergentes, emulsificantes, estabilizantes y/o pienso en animales
5	Metil estearato	Ácido Esteárico	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	33,30	298	Neuroprotector

Tr = tiempo de retención

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

1. La condición de cultivo bajo la limitación de nitrógeno y la utilización de glucosa como fuente de carbono **favorece la síntesis PHB** de cadena corta, obteniéndose los mejores resultados en el tratamiento con mayor concentración de extracto de levadura (E3).
2. El **PHB** parece ser utilizado por *Halorubrum* sp. **como fuente de carbono y energía**. Es necesario, por tanto, optimizar las condiciones y medio de cultivo con el objeto de maximizar los valores de productividad de PHB.
3. Gracias a la espectrometría de masas (GC-MS) **Halorubrum sp.** presentó en su fracción metilada la presencia de otros compuestos de interés como los **ácidos grasos palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0)**.

Por consiguiente, como conclusión general, los resultados aportados en este TFM proporcionan información novedosa para proponer a la especie **Halorubrum sp., aislada de las Marismas del Odiel, como productora natural de PHB** y otros compuestos de interés.

PROYECCIONES FUTURAS

1. Estudiar otras variables físico-químicas para la acumulación de PHB y ácidos grasos tales como limitación de oxígeno, variabilidad en la irradiancia, y otras fuentes de carbono determinantes para la síntesis de estos compuestos en *Halorubrum* sp.
2. Optimización y análisis de variables que induzcan la síntesis de otros compuestos antioxidantes como la bacterioruberina (carotenoides C50) presente en haloarqueas.
3. Conocimiento de la proteómica involucrada en la síntesis de PHB de *Halorubrum* sp.
4. Potencial escalado de *Halorubrum* sp. enriquecida en PHB u otros compuestos para una visión piloto y/o industrial

BIBLIOGRAFÍA

- Adam, P.S., Borrel, G., Brochier-Armanet, C., Gribaldo, S. 2017. The growing tree of Archaea: new perspectives on their diversity, evolution and ecology. *The ISME journal*, **11**(11), 2407-2425.
- Alonso, D.M., Bond, J.Q., Dumesic, J.A. 2010. Catalytic conversion of biomass to biofuels. *Green Chemistry*, **12**(9), 1493-1513.
- Andalucía, J.d. 2024. Paraje Natural Marismas del Odiel. https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/portal/web/ventanadelvisitante/detalle-buscador-mapa/-/asset_publisher/Jlboxh2qB3NwR/content/marismas-del-odiel/255035.
- Anderson, A.J., Dawes, E. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological reviews*, **54**(4), 450-472.
- Anderson, A.J., Haywood, G.W., Dawes, E.A. 1990. Biosynthesis and composition of bacterial poly (hydroxyalkanoates). *International journal of biological macromolecules*, **12**(2), 102-105.
- Andrady, A.L. 2017. The plastic in microplastics: A review. *Marine pollution bulletin*, **119**(1), 12-22.
- AquaeFundación. 2023. La Isla de Basura del océano Pacífico. <https://www.fundacionaquae.org/wiki/alarmanete-aumento-de-la-isla-de-basura/>.
- Arshad, M.U., Jamil, N., Naheed, N., Hasnain, S. 2007. Analysis of bacterial strains from contaminated and non-contaminated sites for the production of biopolymers. *African Journal of Biotechnology*, **6**(9).
- Bhattacharyya, A., Pramanik, A., Maji, S.K., Haldar, S., Mukhopadhyay, U.K., Mukherjee, J. 2012. Utilization of vinasse for production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *AMB express*, **2**, 1-10.
- Bioplastics, E. 2023. Bioplastics Market Data. <https://www.european-bioplastics.org/market/>.
- Bioplastics, E. 2022. What are bioplastics? <https://www.european-bioplastics.org/bioplastics/>.
- Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W., Fuller, R.C. 1988. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly (β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Applied and environmental microbiology*, **54**(8), 1977-1982.
- Breuer, G., Lamers, P.P., Martens, D.E., Draaisma, R.B., Wijffels, R.H. 2012. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource technology*, **124**, 217-226.
- Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T.S., Lowe, D.M., Thompson, R.C. 2008. Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental science & technology*, **42**(13), 5026-5031.
- Browne, M.A., Galloway, T.S., Thompson, R.C. 2010. Spatial patterns of plastic debris along estuarine shorelines. *Environmental science & technology*, **44**(9), 3404-3409.

- Chen, P.-Y., Wu, C.Y.-C., Clemons, G.A., Citadin, C.T., Couto e Silva, A., Possoit, H.E., Azizbayeva, R., Forren, N.E., Liu, C.-H., Rao, K.N.S., Krzywanski, D.M., Lee, R.H.-C., Neumann, J.T., Lin, H.W. 2020. Stearic acid methyl ester affords neuroprotection and improves functional outcomes after cardiac arrest. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **159**, 102138.
- Crawford, C.B., Quinn, B. 2016. *Microplastic pollutants*. Elsevier Limited.
- De La Orden, M., Montes, J., Urreaga, J.M., Bento, A., Ribeiro, M., Pérez, E., Cerrada, M.L. 2015. Thermo and photo-oxidation of functionalized metallocene high density polyethylene: Effect of hydrophilic groups. *Polymer degradation and stability*, **111**, 78-88.
- DIN, E. 2018. 17033: 2018–03 (E) Plastics—Biodegradable mulch films for use in agriculture and horticulture—Requirements and test methods. *ISO: Geneva, Switzerland*.
- Don, T.-M., Chen, C.W., Chan, T.-H. 2006. Preparation and characterization of poly (hydroxyalkanoate) from the fermentation of *Haloferax mediterranei*. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, **17**(12), 1425-1438.
- ECODES. 2023. Contaminación por plásticos uno de los mayores desafíos ambientales del siglo XXI, Vol. 2023. <https://ecodes.org/hacemos/cultura-para-la-sostenibilidad/salud-y-medioambiente/observatorio-de-salud-y-medio-ambiente/contaminacion-por-plasticos-uno-de-los-mayores-desafios-ambientales-del-siglo-xxi>.
- Eerkes-Medrano, D., Thompson, R.C., Aldridge, D.C. 2015. Microplastics in freshwater systems: a review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water research*, **75**, 63-82.
- Espinosa, R.M.M. 2022. Haloarqueas (microorganismos extremófilos) como factorías celulares para la producción de bioplásticos y pigmentos naturales. *Revista de treball, economia i societat*(109), 2.
- Fernandez-Castillo, R., Rodriguez-Valera, F., Gonzalez-Ramos, J., Ruiz-Berraquero, F. 1986. Accumulation of Poly (β -Hydroxybutyrate) by Halobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **51**(1), 214-216.
- Ferre-Guell, A., Winterburn, J. 2018. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates with controlled composition and microstructure. *Biomacromolecules*, **19**(3), 996-1005.
- Garcia-Ortiz, A., Arias, K.S., Climent, M.J., Corma, A., Iborra, S. 2020. Transforming Methyl Levulinate into Biosurfactants and Biolubricants by Chemoselective Reductive Etherification with Fatty Alcohols. *ChemSusChem*, **13**(4), 707-714.
- Getachew, A., Woldesenbet, F. 2016. Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material. *BMC research notes*, **9**, 1-9.
- Guo, X., Wang, J. 2019. The chemical behaviors of microplastics in marine environment: A review. *Marine pollution bulletin*, **142**, 1-14.
- Gupta, R.S., Naushad, S., Baker, S. 2015. Phylogenomic analyses and molecular signatures for the class Halobacteria and its two major clades: a proposal for division of the class Halobacteria into an emended order Halobacteriales and two new orders, Haloferacales ord. nov. and Natrialbales ord. nov., containing the novel families Haloferacaceae fam. nov. and Natrialbaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **65**(Pt_3), 1050-1069.

- Guzmán-Lagunes, F., Wongsirichot, P., Winterburn, J., Guerrero Sanchez, C., Montiel, C. 2023. Polyhydroxyalkanoates Production: A Challenge for the Plastic Industry. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **62**(44), 18133-18158.
- Han, J., Hou, J., Liu, H., Cai, S., Feng, B., Zhou, J., Xiang, H. 2010. Wide Distribution among Halophilic Archaea of a Novel Polyhydroxyalkanoate Synthase Subtype with Homology to Bacterial Type III Synthases. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**(23), 7811-7819.
- Han, J., Lu, Q., Zhou, L., Zhou, J., Xiang, H. 2007. Molecular characterization of the phaECHm genes, required for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) in the extremely halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**(19), 6058-6065.
- Hassan, M.A., Shirai, Y., Kusubayashi, N., Karim, M.I.A., Nakanishi, K., Hasimoto, K. 1997. The production of polyhydroxyalkanoate from anaerobically treated palm oil mill effluent by *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **83**(5), 485-488.
- Hempel, F., Bozarth, A.S., Lindenkamp, N., Klingl, A., Zauner, S., Linne, U., Steinbüchel, A., Maier, U.G. 2011. Microalgae as bioreactors for bioplastic production. *Microbial cell factories*, **10**, 1-6.
- Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R.C., Thiel, M. 2012. Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environmental science & technology*, **46**(6), 3060-3075.
- Jâms, I.B., Windsor, F.M., Poudevigne-Durance, T., Ormerod, S.J., Durance, I. 2020. Estimating the size distribution of plastics ingested by animals. *Nature Communications*, **11**(1), 1594.
- Johnsson, N., Steuer, F. 2018. Bioplastic material from microalgae: Extraction of starch and PHA from microalgae to create a bioplastic material.
- Karray, F., Ben Abdallah, M., Baccar, N., Zaghden, H., Sayadi, S. 2021. Production of Poly (3-Hydroxybutyrate) by *Haloarcula*, *Halorubrum*, and *Natrinema Haloarchaeal* Genera Using Starch as a Carbon Source. *Archaea*, **2021**(1), 8888712.
- Kawata, Y., Aiba, S.-i. 2010. Poly (3-hydroxybutyrate) production by isolated *Halomonas* sp. KM-1 using waste glycerol. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **74**(1), 175-177.
- Kenar, J.A., Moser, B.R., List, G.R. 2017. Chapter 2 - Naturally Occurring Fatty Acids: Source, Chemistry, and Uses. in: *Fatty Acids*, (Ed.) M.U. Ahmad, AOCS Press, pp. 23-82.
- Keshavarz, T., Roy, I. 2010. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*, **13**(3), 321-326.
- Khanna, S., Srivastava, A.K. 2005. Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*, **40**(6), 2173-2182.
- Kumar, M., Rathour, R., Singh, R., Sun, Y., Pandey, A., Gnansounou, E., Lin, K.-Y.A., Tsang, D.C., Thakur, I.S. 2020. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Opportunities, challenges, and prospects. *Journal of Cleaner Production*, **263**, 121500.
- Lackner, M., Mukherjee, A., Koller, M. 2023. What Are “Bioplastics”? Defining Renewability, Biosynthesis, Biodegradability, and Biocompatibility. *Polymers*, **15**(24), 4695.
- Lee, S.Y. 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and bioengineering*, **49**(1), 1-14.

- Lillo, J.G., Rodriguez-Valera, F. 1990a. Effects of culture conditions on poly (β -hydroxybutyric acid) production by *Haloferax mediterranei*. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**(8), 2517-2521.
- Lillo, J.G., Rodriguez-Valera, F. 1990b. Effects of Culture Conditions on Poly(β -Hydroxybutyric Acid) Production by *Haloferax mediterranei*. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**(8), 2517-2521.
- Longo, A., Fanelli, F., Villano, M., Montemurro, M., Rizzello, C.G. 2024. Bioplastic Production from Agri-Food Waste through the Use of *Haloferax mediterranei*: A Comprehensive Initial Overview. *Microorganisms*, **12**(6), 1038.
- Luzi, F., Torre, L., Kenny, J.M., Puglia, D. 2019. Bio-and fossil-based polymeric blends and nanocomposites for packaging: structure–property relationship. *Materials*, **12**(3), 471.
- Ma, Y.-C., Su, W.-P., Sun, Z.-S., Zhang, Z.-X., Li, P.-Y., Zhang, B., Sui, L.-Y. 2023. Optimization of extraction procedure and antioxidant activity of C50 carotenoids from *Halorubrum* sp. HRM-150. *Process Biochemistry*, **130**, 577-583.
- MacArthur, E. 2017. Beyond plastic waste, Vol. 358, American Association for the Advancement of Science, pp. 843-843.
- Mancini, A., Imperlini, E., Nigro, E., Montagnese, C., Daniele, A., Orrù, S., Buono, P. 2015. Biological and Nutritional Properties of Palm Oil and Palmitic Acid: Effects on Health. *Molecules*, **20**(9), 17339-17361.
- Manikandan, M., Pašić, L., Kannan, V. 2009. Optimization of growth media for obtaining high-cell density cultures of halophilic archaea (family Halobacteriaceae) by response surface methodology. *Bioresource technology*, **100**(12), 3107-3112.
- McAdam, B., Brennan Fournet, M., McDonald, P., Mojicevic, M. 2020. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and factors impacting its chemical and mechanical characteristics. *Polymers*, **12**(12), 2908.
- Monshupanee, T., Nimdach, P., Incharoensakdi, A. 2016. Two-stage (photoautotrophy and heterotrophy) cultivation enables efficient production of bioplastic poly-3-hydroxybutyrate in auto-sedimenting cyanobacterium. *Scientific reports*, **6**(1), 37121.
- Naziri, D., Hamidi, M., Hassanzadeh, S., Tarhriz, V., Maleki Zanjani, B., Nazemyieh, H., Hejazi, M.A., Hejazi, M.S. 2014. Analysis of Carotenoid Production by *Halorubrum* sp. TBZ126; an Extremely Halophilic Archeon from Urmia Lake. *Adv Pharm Bull*, **4**(1), 61-7.
- Onen Cinar, S., Chong, Z.K., Kucuker, M.A., Wiczorek, N., Cengiz, U., Kuchta, K. 2020. Bioplastic Production from Microalgae: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **17**(11), 3842.
- Oren, A. 2002. Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, **39**(1), 1-7.
- Pikuta, E.V., Hoover, R.B., Tang, J. 2007. Microbial extremophiles at the limits of life. *Critical reviews in microbiology*, **33**(3), 183-209.
- Pugh, E.L., Kates, M. 1994. Acylation of proteins of the archaeobacteria *Halobacterium cutirubrum* and *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biochim Biophys Acta*, **1196**(1), 38-44.
- Rahman, A., Miller, C.D. 2017. Chapter 6 - Microalgae as a Source of Bioplastics. in: *Algal Green Chemistry*, (Eds.) R.P. Rastogi, D. Madamwar, A. Pandey, Elsevier. Amsterdam, pp. 121-138.

- Rehm, B.H. 2007. Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoate granules: a platform technology for the production of tailor-made bioparticles. *Current issues in molecular biology*, **9**(1), 41-62.
- Romano, I., Poli, A., Finore, I., Huertas, F.J., Gambacorta, A., Pelliccione, S., Nicolaus, G., Lama, L., Nicolaus, B. 2007. *Haloterrigena hispanica* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from Fuente de Piedra, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**(7), 1499-1503.
- Rouillon, C., Bussiere, P.O., Desnoux, E., Collin, S., Vial, C., Therias, S., Gardette, J.L. 2016. Is carbonyl index a quantitative probe to monitor polypropylene photodegradation? *Polymer Degradation and Stability*, **128**, 200-208.
- Sakina, K., Lestini, R., Myllykallio, H., Houali, K. 2018. Isolation and identification of two extremely halophilic archaea from sebkhas in the Algerian Sahara. *Cellular and molecular biology*, **64**, 83-91.
- Sandström, A.G., Muñoz de las Heras, A., Portugal-Nunes, D., Gorwa-Grauslund, M.F. 2015. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of poly-3-d-hydroxybutyrate from xylose. *AMB Express*, **5**, 1-9.
- Shen, L., Ai, G., Liu, H., Zhu, L., Lai, L., Yan, X., Yu, W., Mi, Y. 2024. Synthesis and demulsification performance of a novel low-temperature demulsifier based on trimethyl citrate. *Journal of Hazardous Materials*, **472**, 134543.
- Shrivastava, S., Kailashiya, C., Singh, D.M., Tiwari, D.A. 2021. An initiative to reduce polymer pollution by introducing biopolymers synthesized by microorganisms with the use of various organic waste with economically effective and biodegradability *International Journal of Engineering Applied Sciences and Technology*, **6** (4), 250-265.
- Simó-Cabrera, L., García-Chumillas, S., Hagagy, N., Saddiq, A., Tag, H., Selim, S., AbdElgawad, H., Arribas Agüero, A., Monzó Sánchez, F., Cánovas, V. 2021. Haloarchaea as cell factories to produce bioplastics. *Marine drugs*, **19**(3), 159.
- Soroudi, A., Jakubowicz, I. 2013. Recycling of bioplastics, their blends and biocomposites: A review. *European Polymer Journal*, **49**(10), 2839-2858.
- Stockdale, H., Ribbons, D., Dawes, E. 1968. Occurrence of poly- β -hydroxybutyrate in the Azotobacteriaceae. *Journal of Bacteriology*, **95**(5), 1798-1803.
- Thompson, R.C., Olsen, Y., Mitchell, R.P., Davis, A., Rowland, S.J., John, A.W., McGonigle, D., Russell, A.E. 2004. Lost at sea: where is all the plastic? *Science*, **304**(5672), 838-838.
- Thushari, G.G.N., Senevirathna, J.D.M. 2020. Plastic pollution in the marine environment. *Heliyon*, **6**(8).
- Tombolini, R., Nuti, M. 1989. Poly (β -hydroxyalkanoate) biosynthesis and accumulation by different Rhizobium species. *FEMS microbiology letters*, **60**(3), 299-304.
- Verhe, R., De Caro, P., Mouloungui, Z., Stevens, C.V. 2004. Industrial products from lipids and proteins. *Renewable bioresources: scope and modification for non-food applications*, 208-250.
- Wang, K. 2014. Bio-plastic potential of spirulina microalgae, University of Georgia.
- Wendlandt, K.-D., Geyer, W., Mirschel, G., Hemidi, F.A.-H. 2005. Possibilities for controlling a PHB accumulation process using various analytical methods. *Journal of biotechnology*, **117**(1), 119-129.
- Yüksekdağ, Z.N., Aslim, B., Beyatli, Y., Mercan, N. 2004. Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12. *African Journal of Biotechnology*, **3**(1), 63-66.

Zhao, Y., Rao, Z., Xue, Y., Gong, P., Ji, Y., Ma, Y. 2015. Biosynthesis, property comparison, and hemocompatibility of bacterial and haloarchaeal poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Science Bulletin*, **60**(22), 1901-1910.

ANEXOS

PRUEBA ANOVA Y PRUEBA HSD DE TUCKEYZ

Dia 0

ANOVA Table for DIA 0 by CULTIVOS

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.007818	2	0.003909	25.89	0.0011
Within groups	0.000906	6	0.000151		
Total (Corr.)	0.008724	8			

Method: 95.0 percent Tukey HSD

CULTIVOS	Count	Mean	Homogeneous Groups
C	3	0.322	X
E1	3	0.377	X
E3	3	0.39	X

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
C - E1	*	-0.055	0.0307851
C - E3	*	-0.068	0.0307851
E1 - E3		-0.013	0.0307851

* denotes a statistically significant difference.

Dia 1

ANOVA Table for DIA 1 by CULTIVOS

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.025382	2	0.012691	94.01	0.0000
Within groups	0.00081	6	0.000135		
Total (Corr.)	0.026192	8			

Method: 95.0 percent Tukey HSD

CULTIVOS	Count	Mean	Homogeneous Groups
C	3	0.301	X
E1	3	0.406	X
E3	3	0.42	X

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
C - E1	*	-0.105	0.0291084
C - E3	*	-0.119	0.0291084
E1 - E3		-0.014	0.0291084

* denotes a statistically significant difference.

Dia 2

ANOVA Table for DIA2 by CULTIVOS

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
--------	----------------	----	-------------	---------	---------

Between groups	0.022454	2	0.011227	886.34	0.0000
Within groups	0.000076	6	0.0000126667		
Total (Corr.)	0.02253	8			

Method: 95.0 percent Tukey HSD

CULTIVOS	Count	Mean	Homogeneous Groups
C	3	0.263	X
E1	3	0.332	X
E3	3	0.385	X

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
C - E1	*	-0.069	0.00891627
C - E3	*	-0.122	0.00891627
E1 - E3	*	-0.053	0.00891627

* denotes a statistically significant difference.

Dia 3

ANOVA Table for DIA3 by CULTIVOS

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.059864	2	0.029932	29932.00	0.0000
Within groups	0.000006	6	0.000001		
Total (Corr.)	0.05987	8			

Method: 95.0 percent Tukey HSD

CULTIVOS	Count	Mean	Homogeneous Groups
C	3	0.166	X
E3	3	0.338	X
E1	3	0.34	X

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
C - E1	*	-0.174	0.00250525
C - E3	*	-0.172	0.00250525
E1 - E3		0.002	0.00250525

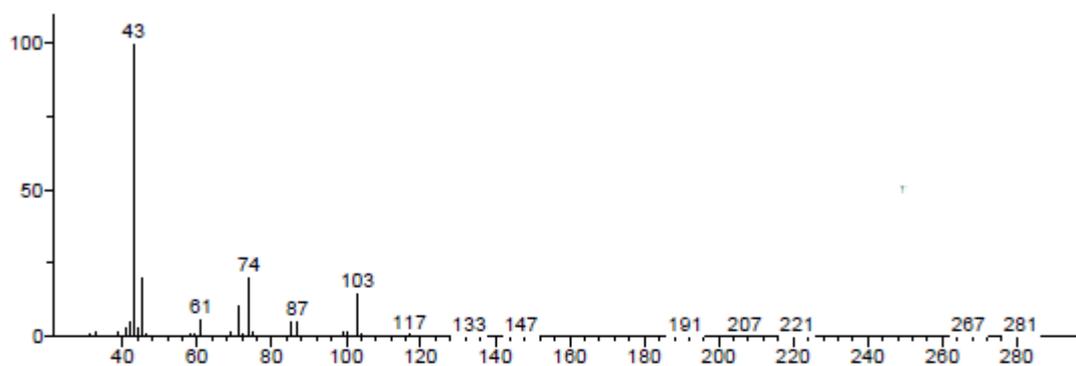
* denotes a statistically significant difference.

ESPECTROS DE MASAS

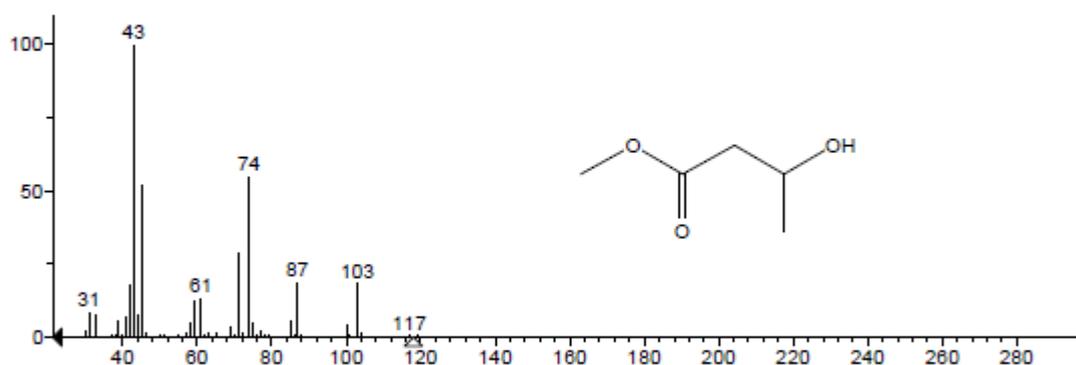
PATRÓN PHB

** Search Report Page 1 of 1 **

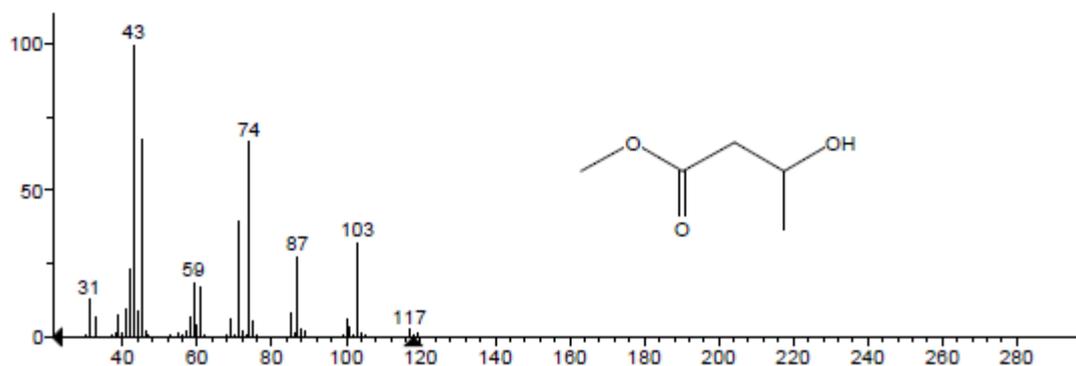
Unknown: 240416_DB_5MS_PHB_J_FS_split100_1#189-194 RT: 2.86-2.88 AV: 6
Compound in Library Factor = -101



Hit 1 : Butanoic acid, 3-hydroxy-, methyl ester
C₅H₁₀O₃; MF: 833; RMF: 845; Prob 43.7%; CAS: 1487-49-6; Lib: mainlib; ID: 10006.



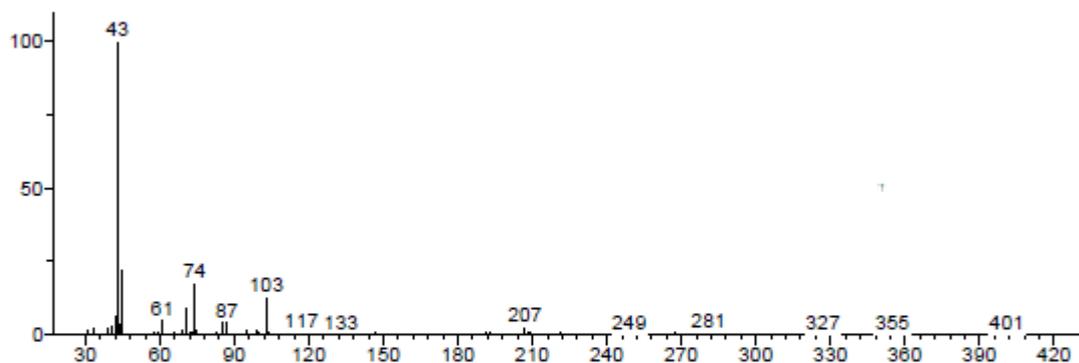
Hit 2 : Butanoic acid, 3-hydroxy-, methyl ester
C₅H₁₀O₃; MF: 832; RMF: 836; Prob 43.7%; CAS: 1487-49-6; Lib: replib; ID: 2345.



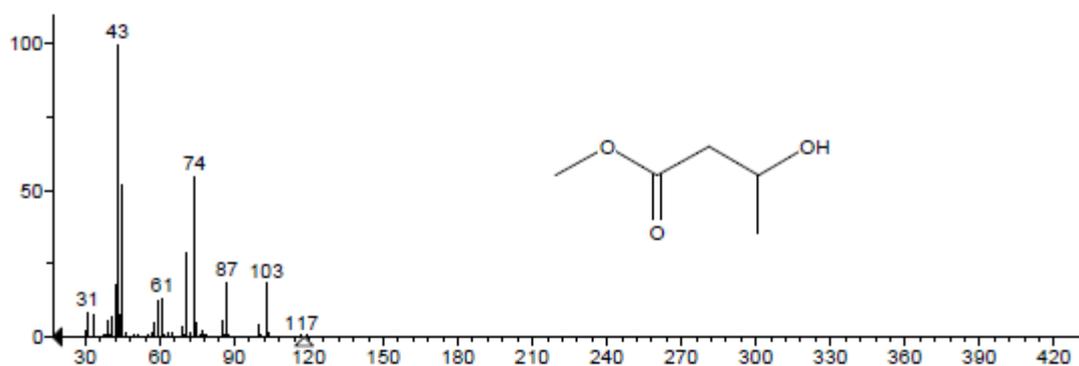
CONTROL – DIA 3

** Search Report Page 1 of 1 **

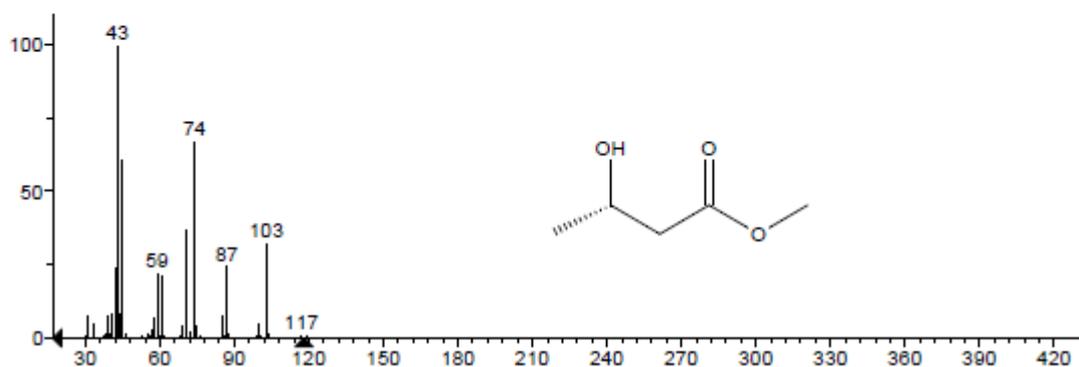
Unknown: 240416_DB_5MS_C3_2A_FS_split100#189-197 RT: 2.86-2.90 AV: 9 SB: 2 4.86 , 5.05
Compound in Library Factor = -361



Hit 1 : Butanoic acid, 3-hydroxy-, methyl ester
C5H10O3; MF: 742; RMF: 841; Prob 34.8%; CAS: 1487-49-6; Lib: mainlib; ID: 10006.

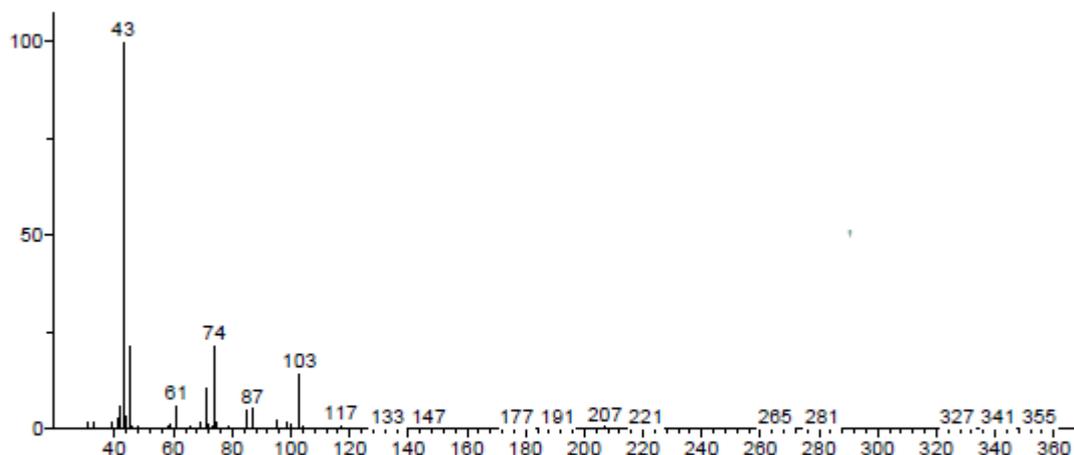


Hit 2 : Butanoic acid, 3-hydroxy-, methyl ester, (S)-
C5H10O3; MF: 742; RMF: 837; Prob 34.8%; CAS: 53562-86-0; Lib: replib; ID: 3219.



E1 y E3 – DIA 3

Unknown; InLib=-186



(Text File) 240416_DB_5MS_C3_2A_FS#192-199 RT: 2.87-2.90 AV: 8 SB: 1 33.19 [in-source]

Name: 240416_DB_5MS_C3_2A_FS#192-199 RT: 2.87-2.90 AV: 8 SB: 1 33.19

MW: N/A ID#: 234 DB: Text File

Comment: T: FTMS + p EI Full ms [30.0000-650.0000]

Spectrum type: in-source

10 largest peaks:

43	999.00	74	216.00	45	212.00	103	146.00	71	104.00
61	62.00	87	55.00	42	54.00	85	45.00	44	31.00

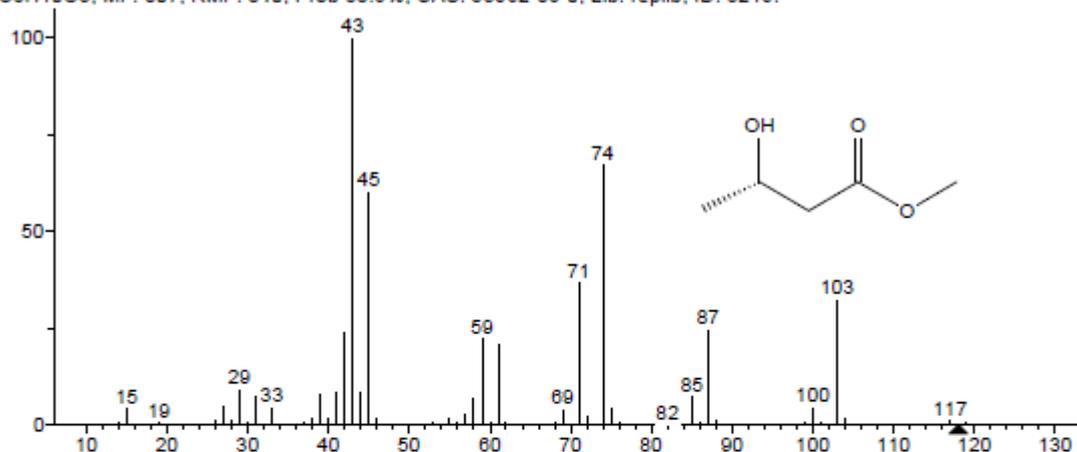
80 m/z Values and Intensities:

31	13.00	32	1.00	33	16.00	34	2.00	37	1.00
38	2.00	39	16.00	40	2.00	41	26.00	42	54.00
43	999.00	44	31.00	45	212.00	46	6.00	48	4.00
49	1.00	50	2.00	55	1.00	56	1.00	57	2.00
58	5.00	59	8.00	61	62.00	62	1.00	64	1.00
65	1.00	66	6.00	68	2.00	69	15.00	70	1.00
71	104.00	72	9.00	73	4.00	74	216.00	75	15.00
76	1.00	77	1.00	78	2.00	79	3.00	82	2.00
83	2.00	85	45.00	86	2.00	87	55.00	88	2.00
89	1.00	95	19.00	96	2.00	97	1.00	99	14.00
100	11.00	101	2.00	103	146.00	104	6.00	105	1.00
117	11.00	118	1.00	119	1.00	133	2.00	135	1.00
147	3.00	149	2.00	151	1.00	177	1.00	191	2.00
193	2.00	204	1.00	207	8.00	208	1.00	209	2.00
217	1.00	221	2.00	225	1.00	265	1.00	267	1.00
281	2.00	283	1.00	327	1.00	341	1.00	355	1.00

Synonyms:

no synonyms.

Hit 1 : Butanoic acid, 3-hydroxy-, methyl ester, (S)-
C5H10O3; MF: 807; RMF: 840; Prob 38.6%; CAS: 53562-86-0; Lib: replib; ID: 3219.



(replib) Butanoic acid, 3-hydroxy-, methyl ester, (S)-

