

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

**Posgrado en Biotecnología**

**“Producción y caracterización de polihidroxicanoatos por *Vreelandella venusta*”**

**TESIS**

Para obtener el grado de:

**MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**ANDREA TREJO HERNÁNDEZ**

**MATRICULA: 2233803900**

**CORREO: andrea03trejoh@gmail.com**

Director: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Co director: Dr. Marcos López Pérez

Asesor: Dr. José Félix Aguirre Garrido

**JURADO:**

Presidente: Dr. Omar Oltehua López

Secretario: Dr. Francisco Javier Figueroa Martínez

Vocal: Dr. Humberto García Arellano

Vocal: Dr. José Félix Aguirre Garrido

Iztapalapa, Ciudad de México, a 14 de noviembre de 2025

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Sistema Nacional de Posgrados de la SECIHTI y además cuenta con apoyo de dicha secretaría, con número de referencia 001465.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Ambiental, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Lerma, con la dirección del Dr. Francisco José Fernández Perrino, co dirección del Dr. Marcos López Pérez y el asesoramiento del Dr. José Félix Aguirre Garrido.

El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento de CONAHCyT (proyectos CB-2012 176960 y CF-2022 320409) y con la beca para estudios de posgrado, nivel Maestría, de Andrea Trejo Hernández (1332097).

A **Andrés, Edith y Alejandro**, pilares inquebrantables de mi vida. Gracias por su amor inmenso, por ser mi refugio y mi impulso en cada paso de este camino. Su apoyo constante, sus palabras de aliento y su fe en mí han sido la fuerza que me sostuvo en los momentos más difíciles y la alegría que acompañó cada logro. Todo lo que soy y lo que he alcanzado lleva impreso un pedacito de ustedes. Esta meta, que hoy se concreta, también es suya.

A **Omar**, mi raíz, mi fuerza y mi refugio. Gracias por ser mi compañero incansable en los días de entrega, duda y cansancio. Por creer en mis sueños incluso cuando yo dudaba, por las horas de escucha, los ánimos en los días largos y la serenidad que me regalaste cuando el cansancio parecía vencer. Tu amor ha sido mi equilibrio y mi inspiración para seguir adelante con el corazón lleno de esperanza.

A **Dios**, por guiar cada uno de mis pasos con propósito. Por darme la claridad para seguir, la perseverancia para no rendirme y la paz para aceptar cada proceso. Sin tu presencia y tu propósito en mi vida, nada de esto habría sido posible. A Ti encomiendo cada logro y cada nuevo comienzo.

*“Confía en el Señor con todo tu corazón y no te apoyes en tu propia inteligencia; reconócelo en todos tus caminos, y él allanará tus sendas.”*

*Proverbios 3:5-6*

## **Agradecimientos**

Expreso mi más sincero agradecimiento a la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Lerma, por el respaldo académico, técnico y logístico brindado para la realización del presente proyecto experimental. Su apoyo fue fundamental para el desarrollo del trabajo de investigación en sus distintas etapas. Abrazo y agradezco de manera especial al QFB José Abraham Canales Meza y al M. en C. Luis Mario Hernández Soto, por su paciencia y enseñanza dentro y fuera del laboratorio.

Agradezco de manera especial al Centro Nacional de Metrología (CENAM) por su valiosa colaboración en la caracterización térmica y morfológica del biopolímero, mediante análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y microscopía electrónica de barrido (SEM), los cuales aportaron información clave para la comprensión de las propiedades del material obtenido.

Asimismo, agradezco a M. en C. Atilano Gutiérrez Carrillo y M. en C. Marco Antonio Vera Ramírez, encargados del Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la UAM Iztapalapa, por la caracterización estructural del biopolímero mediante RMN-<sup>1</sup>H, herramienta esencial para confirmar su composición y pureza.

Finalmente, extiendo un profundo agradecimiento a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el otorgamiento de la beca económica, la cual fue un apoyo determinante para la continuidad y conclusión de este trabajo de investigación.

## Índice

Índice de figuras .....	1
Índice de tablas .....	3
Lista de abreviaturas .....	4
Resumen.....	6
Abstract .....	7
Introducción .....	8
Justificación .....	11
Hipótesis.....	12
Objetivos .....	13
Objetivo general .....	13
Objetivos específicos .....	13
<b>Capítulo 1: Generalidades de los polihidroxicarboxilatos .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Historia de los polihidroxicarboxilatos .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2 Biosíntesis de los polihidroxicarboxilatos .....</b>	<b>14</b>
1.2.1 Vías de biosíntesis de PHA en bacterias .....	14
1.2.2 Enzimas clave: $\beta$ -cetotiolasa, acetoacetyl-CoA reductasa y PHA sintasa.....	16
1.2.3 Regulación de la síntesis: condiciones nutricionales y ambientales.....	18
1.2.4 Rol fisiológico de los PHA en la célula bacteriana .....	20
<b>1.3 Tipos de polihidroxicarboxilatos.....</b>	<b>22</b>
1.3.1 Homopolímeros y copolímeros .....	23
1.3.2 PHA de cadena corta, media y larga .....	23
1.3.3 Propiedades fisicoquímicas y aplicaciones según el tipo de PHA.....	24
<b>1.4 Degradación de los polihidroxicarboxilatos.....</b>	<b>26</b>
<b>Capítulo 2: <i>Vreelandella venusta</i> como productora de PHA.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Características generales del género <i>Vreelandella</i> .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2 Fisiología halófila y su relación con la biosíntesis de PHA .....</b>	<b>30</b>
<b>2.3 Estudios previos sobre <i>Vreelandella venusta</i> y su potencial biotecnológico .....</b>	<b>31</b>
<b>Capítulo 3: Métodos de extracción, cuantificación y caracterización de PHA .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Visualización intracelular de gránulos de PHA mediante tinción con negro Sudán.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2 Métodos de ruptura celular y recuperación del polímero .....</b>	<b>33</b>
3.2.1 Extracción con hipoclorito de sodio .....	33
3.2.2 Extracción con cloroformo .....	33
3.2.3 Precipitación con metanol .....	34
<b>3.3 Cuantificación de la producción de los PHA .....</b>	<b>34</b>
3.3.1 Método gravimétrico.....	35
3.3.2 Método del ácido crotonico.....	36
<b>3.4 Caracterización fisicoquímica del PHA .....</b>	<b>37</b>
3.4.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	37
3.4.2 Resonancia magnética nuclear (RMN) .....	37

3.4.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	38
<b>Capítulo 4: Materiales y métodos .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Cepa empleada y área de estudio .....</b>	<b>39</b>
4.1.1 Lago cráter hipersalino de Isla Isabel, México .....	39
<b>4.2 Reactivación y mantenimiento de la cepa.....</b>	<b>40</b>
<b>4.3 Preparación del inóculo.....</b>	<b>41</b>
<b>4.4 Visualización intracelular de gránulos de PHA mediante tinción con negro Sudán.....</b>	<b>42</b>
<b>4.5 Cuantificación de rendimiento (% PHA/MSC) .....</b>	<b>44</b>
<b>4.6 Análisis estadístico.....</b>	<b>45</b>
<b>Capítulo 5: Resultados y discusión .....</b>	<b>46</b>
<b>5.1 Visualización intracelular de gránulos de PHA mediante tinción con negro Sudán.....</b>	<b>46</b>
<b>5.2 Cinética de crecimiento de Vreelandella venusta Hven10 bajo diferentes concentraciones de NaCl .....</b>	<b>48</b>
<b>5.3 Cuantificación de rendimiento (% PHA/MSC) .....</b>	<b>50</b>
<b>5.4 Seguimiento del pH durante la cinética de cultivo .....</b>	<b>57</b>
<b>5.5 Cuantificación de PHA mediante el método del ácido crotónico .....</b>	<b>59</b>
<b>5.6 Caracterización de PHA mediante FTIR .....</b>	<b>60</b>
<b>5.7 Caracterización de PHA mediante RMN-<sup>1</sup>H .....</b>	<b>63</b>
<b>5.8 Caracterización de PHA mediante SEM.....</b>	<b>66</b>
<b>Capítulo 6: Conclusiones .....</b>	<b>70</b>
<b>Capítulo 7: Perspectivas .....</b>	<b>71</b>
<b>Capítulo 8: Bibliografía.....</b>	<b>72</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>89</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Mapa de ubicación de la Isla Isabel y del lago cráter (Alcocer et al. 1998). .....	39
<b>Figura 2.</b> Visualización de gránulos intracelulares de PHA en <i>V. venusta</i> Hven10 cultivada con 80 g/L de NaCl, mediante tinción con negro Sudán. Se observan inclusiones de color morado oscuro correspondientes a PHA, y células teñidas de rosado. Observación a 100 X con aceite de inmersión. ....	46
<b>Figura 3.</b> Visualización de gránulos intracelulares de PHA en <i>V. venusta</i> Hven10 cultivada con 100 g/L de NaCl, mediante tinción con negro Sudán. Se observan inclusiones de color morado oscuro correspondientes a PHA, y células teñidas de rosado. Observación a 100 X con aceite de inmersión. ....	46
<b>Figura 4.</b> Visualización de gránulos intracelulares de PHA en <i>V. venusta</i> Hven10 cultivada con 120 g/L de NaCl, mediante tinción con negro Sudán. Se observan inclusiones de color morado oscuro correspondientes a PHA, y células teñidas de rosado. Observación a 100 X con aceite de inmersión. ....	47
<b>Figura 5.</b> Cinética de crecimiento de <i>V. venusta</i> Hven10 cultivada bajo diferentes concentraciones de NaCl (80, 100 y 120 g/L). Los valores representan el promedio $\pm$ desviación estándar de tres réplicas independientes. ....	48
<b>Figura 6.</b> Cinética de crecimiento y producción de PHA por <i>V. venusta</i> Hven10 con 80 g/L de NaCl. Los datos experimentales se encuentran en el apartado Anexos (Tabla 1A). ....	50
<b>Figura 7.</b> Cinética de crecimiento y producción de PHA por <i>V. venusta</i> Hven10 con 100 g/L de NaCl. Los datos experimentales se encuentran en el apartado Anexos (Tabla 2A).....	51
<b>Figura 8.</b> Cinética de crecimiento y producción de PHA por <i>V. venusta</i> Hven10 con 120 g/L de NaCl. Los datos experimentales se encuentran en el apartado Anexos (Tabla 3A).....	52
<b>Figura 9.</b> Comparación de la acumulación de PHA en <i>V. venusta</i> Hven10 cultivada a diferentes concentraciones de NaCl (80, 100 y 120 g/L) durante una cinética de 216 h. Se representa el porcentaje de PHA respecto a la masa seca celular (% PHA/MSC) a lo largo del tiempo. ....	53
<b>Figura 10.</b> Evolución del pH durante la cinética de crecimiento de <i>V. venusta</i> Hven10 cultivada con diferentes concentraciones de NaCl (80, 100 y 120 g/L). Los datos del seguimiento de pH se encuentran en el apartado Anexos (Tabla 6A). ....	56
<b>Figura 11.</b> Espectro FTIR de PHA extraídos de <i>V. venusta</i> Hven10 cultivada con 80 g/L de NaCl.....	61

<b>Figura 12.</b> Espectro FTIR de PHA extraídos de <i>V. venusta</i> Hven10 cultivada con 100 g/L de NaCl.....	61
<b>Figura 13.</b> Espectro FTIR de PHA extraídos de <i>V. venusta</i> Hven10 cultivada con 120 g/L de NaCl.....	62
<b>Figura 14.</b> Espectro RMN- <sup>1</sup> H de PHA extraído de <i>V. venusta</i> Hven10 cultivada con 80 g/L de NaCl.....	63
<b>Figura 15.</b> Espectro RMN- <sup>1</sup> H de PHA extraído de <i>V. venusta</i> Hven10 cultivada con 100 g/L de NaCl.....	63
<b>Figura 16.</b> Espectro RMN- <sup>1</sup> H de PHA extraído de <i>V. venusta</i> Hven10 cultivada con 120 g/L de NaCl.....	64
<b>Figura 17.</b> Micrografías electrónicas de barrido a diferentes magnificaciones (100, 500, 2000, 5000, 10000, 20000 X) de PHA extraído de <i>V. venusta</i> Hven10 cultivada con 80 g/L de NaCl. ....	65
<b>Figura 18.</b> Micrografías electrónicas de barrido a diferentes magnificaciones (100, 500, 2000, 5000, 10000, 20000 X) de PHA extraído de <i>V. venusta</i> Hven10 cultivada con 100 g/L de NaCl. ....	66
<b>Figura 19.</b> Micrografías electrónicas de barrido a diferentes magnificaciones (100, 500, 2000, 5000, 10000, 20000 X) de PHA extraído de <i>V. venusta</i> Hven10 cultivada con 120 g/L de NaCl. ....	67

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Comparación entre PHB, polímeros sintéticos y naturales.....	25
<b>Tabla 2.</b> Relación de microorganismos descritos como degradadores de PHA y las condiciones ambientales en las cuales se ha observado su actividad degradativa. ....	27
<b>Tabla 3.</b> Composición de medio de cultivo halófilo (HB) .....	41
<b>Tabla 4.</b> Composición de medios de cultivo HM1 y HM2 .....	42
<b>Tabla 5.</b> Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>V. venusta</i> Hven10 a diferentes concentraciones de NaCl. ....	49
<b>Tabla 6.</b> Rendimiento de polihidroxialcanoatos (PHA) por <i>V. venusta</i> Hven10 en función de la concentración de NaCl. Los valores de PHA (% MSC) representan el contenido máximo de polímero acumulado respecto a la masa seca celular. La concentración de PHA ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) se calculó a partir de la cantidad total de PHA obtenida en 10 mL de cultivo.....	55
<b>Tabla 7.</b> Comparación de la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) por bacterias halófilas en diferentes concentraciones de NaCl reportadas en la literatura y por <i>V. venusta</i> Hven10 en este estudio. ....	56
<b>Tabla 8.</b> Cuantificación de PHA mediante el método del ácido crotónico. La curva de calibración se encuentra en el apartado Anexos (Tabla 7A, 8A, Gráfico 1A).....	60

## Lista de abreviaturas

- **3HB** – 3-hidroxibutirato
- **3HO** – 3-hidroxi octanoato
- **3HV** – 3-hidroxivalerato
- **4HB** – 4-hidroxibutirato
- **ATP/ADP** – Adenosín trifosfato/Adenosín difosfato
- **CDM** - Cell dry mass
- **CENAM** - Centro Nacional de Metrología
- **CH<sub>3</sub> OH** – Metanol
- **CHCl<sub>3</sub>** – Cloroformo
- **DE** – Desviación estándar
- **DHB** – Ácido 2,5-dihidroxibenzoico
- **DSC** – Calorimetría diferencial de barrido
- **Fe** – Hierro
- **FTIR** – Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
- **H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>** – Ácido sulfúrico
- **HB** – Medio halófilo
- **ICI** – Imperial Chemical Industries
- **K<sub>m</sub>** – Constante de Michaelis
- **lcl-PHA** – PHA de cadena larga
- **MALDI-TOF MS** – Espectrometría de masas acoplada a tiempo de vuelo
- **mcl-PHA** – PHA de cadena media
- **MPa** – Módulo de elasticidad
- **MSC** – Masa seca celular
- **N** – Nitrógeno
- **NaCl** – Cloruro de sodio
- **NaClO** – Hipoclorito de sodio
- **NADP<sup>+</sup>** – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
- **NADPH** – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
- **NGIB** – Biotecnología industrial de próxima generación
- **O** – Oxígeno
- **OD 600** – Densidad óptica a 600 nm
- **P** – Fósforo
- **PA** – Poliamida
- **PE** – Polietileno

- **PET** – Polietilentereftalato
- **PHA** – Polihidroxialcanoatos
- **PHB** – Poli(3-hidroxi-butirato)
- **PHB4HB** – Poli(3-hidroxi-butirato-co-4-hidroxi-butirato)
- **PHBV** – Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato)
- **PHD** – Poli(3-hidroxi-decanoato)
- **PHO** – Poli(3-hidroxi-octanoato)
- **PGAP** – Proteínas asociadas a gránulos de PHA
- **PET** – Polietilentereftalato
- **PHBV** – Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato)
- **PP** – Polipropileno
- **PS** – Poliestireno
- **PVC** – Cloruro de polivinilo
- **PhaA** –  $\beta$ -cetotiolasa
- **PhaB** – Acetoacetyl-CoA reductasa
- **PhaC** – PHA sintasa
- **PhaZ** – PHA despolimerasas
- **RMN** – Resonancia magnética nuclear
- **ROS** – Especies reactivas de oxígeno
- **S** – Azufre
- **scl-PHA** – PHA de cadena corta
- **SEM** – Microscopía electrónica de barrido
- **Tg** – Temperatura de transición vítrea
- **Tm** – Temperatura de fusión
- **TPS** – Almidón termoplástico
- **Vmax** – Velocidad máxima de reacción enzimática

## Resumen

Los polihidroxicanoatos (PHA) son biopolímeros de origen microbiano con potencial para sustituir a los plásticos convencionales, debido a su biodegradabilidad y sostenibilidad. En este estudio se evalúa la producción de PHA por *Vreelandella venusta Hven10* en distintas condiciones de salinidad (80, 100 y 120 g/L de NaCl), con glucosa como fuente de carbono. La biomasa se determina como masa seca celular (MSC) y el contenido de PHA se cuantifica gravimétricamente. Posteriormente, los polímeros extraídos se caracterizan mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), resonancia magnética nuclear de protón (RMN-<sup>1</sup>H) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Los resultados muestran una mayor acumulación de PHA a 120 g/L de NaCl. Los espectros obtenidos en FTIR y RMN-<sup>1</sup>H confirman la presencia de poli(3-hidroxi-butirato) (PHB) como principal componente, sin evidencia de copolímeros. Adicionalmente, las micrografías obtenidas por SEM revelan una morfología superficial rugosa y heterogénea, característica de polímeros parcialmente cristalinos, lo que respalda la pureza y estructura del PHB obtenido tras la extracción y purificación.

Estos resultados destacan la capacidad de *V. venusta Hven10* para sintetizar PHB en condiciones salinas, posicionándose como una candidata prometedora para la producción de bioplásticos en ambientes halófilos.

Palabras clave: bioplásticos, FTIR, *Vreelandella venusta*, PHB, polihidroxicanoatos, RMN-<sup>1</sup>H, SEM, salinidad.

## Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are microbial biopolymers with potential to replace conventional plastics due to their biodegradability and sustainability. In this study, the production of PHA by *Vreelandella venusta Hven10* was evaluated under different salinity conditions (80, 100, and 120 g/L NaCl) using glucose as the carbon source. Biomass was determined as cell dry mass (CDM), and PHA content was quantified gravimetrically. The extracted polymers were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), proton nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  NMR), and scanning electron microscopy (SEM). Results showed the highest PHA accumulation at 120 g/L NaCl. FTIR and  $^1\text{H}$  NMR spectra confirmed the presence of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) as the main component, with no evidence of copolymer formation. Additionally, SEM micrographs revealed a rough and heterogeneous surface morphology, typical of semi-crystalline PHB, supporting the purity and structural integrity of the extracted polymer. These findings highlight the ability of *V. venusta Hven10* to synthesize PHB under saline conditions, positioning this strain as a promising candidate for sustainable bioplastic production in halophilic environments.

Keywords: bioplastics, FTIR, *Vreelandella venusta*, PHB, polyhydroxyalkanoates,  $^1\text{H}$ -NMR, SEM, salinity.

## Introducción

Los plásticos producidos con base en el petróleo, como el tereftalato de polietileno (PET), el cloruro de polivinilo (PVC), el polietileno (PE), el polipropileno (PP), el poliestireno (PS) y la poliamida (PA) son los más utilizados para empaques y envases de un solo uso, debido a que presentan muchas ventajas: son versátiles, duraderos y relativamente económicos de producir, lo que ha llevado a su uso generalizado en diversas industrias y productos cotidianos (Możejko-Ciesielska et al., 2023). Sin embargo, su producción (basada en recursos fósiles no renovables) conlleva al agotamiento de estos recursos, la liberación de microplásticos y la emisión de gases de efecto invernadero. La mayoría de estos materiales persisten durante cientos de años, contribuyendo a la contaminación ambiental. Además, las prácticas inadecuadas de eliminación y reciclaje han traído como consecuencia la acumulación de desechos plásticos en vertederos, océanos, suelos y otros ecosistemas, causando daños a la vida silvestre y al ambiente (Chen et al., 2021).

Plastics Europe (2022) informó que la fabricación mundial de plásticos alcanzó los 390.7 millones de toneladas en 2021, un 4.04% más que en 2020. De esta cantidad, el 90.2% (352.3 millones de toneladas) correspondió a plásticos de origen fósil. Asimismo, 32.5 millones de toneladas (el 8.3%) fueron plásticos reciclados post consumo y los 5.9 millones de toneladas restantes (el 1.5%) bioplásticos. Por este motivo, es indispensable desarrollar alternativas sostenibles a los plásticos convencionales, por ejemplo, biopolímeros ecológicos elaborados a partir de recursos renovables como residuos agrícolas, biomasa de origen vegetal y aceites animales, los cuales predominan dentro de un ciclo sostenible de producción y eliminación (Wang et al., 2021).

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son biopolímeros de origen microbiano, compostables, biodegradables y biocompatibles con el ambiente. Poseen propiedades fisicoquímicas similares a los plásticos sintéticos, como el PET, PE, PP, PA (Pernicova et al., 2019), por lo que han atraído la atención de la comunidad científica como alternativas ecológicamente aceptables a los polímeros de origen petroquímico.

Los PHA son una familia de poliésteres termoplásticos producidos intracelularmente, en forma de gránulos, por numerosas bacterias Gram positivas y Gram negativas. Su función es la reserva de energía y carbono intracelular en condiciones de desequilibrio nutricional, es decir, en una limitación de nutrientes y un exceso de carbono. Además, los PHA son una fuente de poder reductor y ayudan a mantener el balance redox celular y la presión osmótica, en ciertas condiciones (Rekhi et al., 2021).

La producción comercial de PHA de base biológica aún es limitada; empresas como Biomer en Alemania y Bio-on en Italia producen PHA utilizando materias primas caras (azúcares), cuyo uso y sostenibilidad siguen en discusión (Khatami et al., 2021). La fuente de carbono suele contribuir entre el 30% y el 50% del coste total de producción de PHA, mientras que las etapas de extracción y purificación del biopolímero representan una fracción significativa del coste operativo y del precio mínimo de venta (p. ej. solventes, energía y eficiencia de ruptura celular) (Jiang et al., 2016; Khan et al., 2021; Gautam et al., 2024). Para reducir el precio del PHA existen alternativas, como la producción de estos biopolímeros a partir de sustratos de desecho económicos, especialmente desechos del procesamiento de alimentos. En particular, se consideran sustratos prometedores a los materiales a base de lípidos, como el aceite de freír/cocinar (Obruca et al., 2013), el aceite de palmiste (Loo et al., 2005) o los lípidos de la industria procesadora de alimentos (Riedel et al., 2015). Otra estrategia para reducir los costos de producción de PHA ha sido recientemente definida bajo el concepto de “biotecnología industrial de próxima generación” (NGIB, por sus siglas en inglés). Este enfoque, propuesto por Chen y Jiang (2018), se basa en el uso de organismos extremófilos, los cuales ofrecen múltiples ventajas para los procesos de producción, como su capacidad de crecer en condiciones no estériles, su alta tolerancia a concentraciones elevadas de sal u otros compuestos inhibitorios, la simplificación de los procesos de cultivo y extracción, y la reducción de los riesgos de contaminación microbiana (Możejko-Ciesielska et al., 2023; Obulisamy y Mehariya, 2021).

En la actualidad, los microorganismos halófilos se reconocen como organismos con un alto potencial para su aplicación en la biotecnología industrial (Yin et al., 2015). De hecho, la producción de PHA ya ha sido descrita en numerosos halófilos, siendo

de gran relevancia el vínculo entre la halofilicidad y la acumulación de PHA, ya que podría atribuirse al hecho de que los gránulos de PHA protegen a las células bacterianas de los efectos adversos de las fluctuaciones de la osmolaridad (Qu et al., 2022; Ben Abdallah et al., 2025). Por esta razón, podría esperarse que la biosíntesis de PHA sea una característica positiva durante la adaptación a condiciones hipertónicas y fluctuaciones osmóticas (Sedlacek et al., 2019). Además de su resistencia a la contaminación microbiana y su capacidad para utilizar fuentes de carbono no convencionales, las bacterias halófilas ofrecen mayor tolerancia a condiciones ambientales extremas y la posibilidad de obtener productos de alto valor agregado bajo condiciones hipertónicas (Kumar y Kim, 2018; Lim et al., 2023; Mitra et al., 2020).

La notable capacidad adaptativa de los microorganismos halófilos para prosperar en ambientes con alta osmolaridad, junto con su aptitud para sintetizar biopolímeros como los PHA en condiciones extremas, ha impulsado el interés en ciertos géneros con aplicaciones biotecnológicas ya consolidadas en procesos industriales. Estas aplicaciones incluyen la producción a gran escala de biopolímeros, enzimas halotolerantes y compuestos osmoprotectores utilizados en sectores como la biomedicina, la industria alimentaria y la biorremediación salina (Quillaguamán et al., 2010; Oren, 2024).

Entre ellos, el género *Vreelandella* (anteriormente incluido dentro de *Halomonas*) destaca no solo por su tolerancia a concentraciones elevadas de sal, sino también por su versatilidad metabólica, su rápido crecimiento y su capacidad para utilizar diversas fuentes de carbono, incluyendo residuos agroindustriales y aceites residuales. Estas características lo posicionan como un microorganismo de interés emergente para el desarrollo de bioprocesos sostenibles y de bajo costo enfocados en la producción de bioplásticos bajo condiciones no estériles y de alta salinidad (Oren, 2024).

Diversas especies de *Halomonas* han sido ampliamente estudiadas por su eficiencia en la acumulación de PHA, particularmente en condiciones no estériles y con un diseño simplificado de procesos (Mothes et al., 2008; Mitra et al., 2020; Quillaguamán et al., 2008; Tamang y Nogueira, 2021). En este contexto, *Vreelandella venusta* (sin.: *Halomonas venusta*), es una especie que, al presentar

un genoma menos explorado en comparación con otras cepas modelo del género, ofrece la posibilidad de contribuir al conocimiento fundamental sobre los mecanismos moleculares y fisiológicos implicados en la biosíntesis de PHA en bacterias halófilas. Esto representa una oportunidad para identificar nuevas rutas metabólicas, optimizar condiciones de cultivo a través de enfoques empíricos y establecer parámetros fisicoquímicos específicos para la caracterización de los polímeros obtenidos.

De esta manera, el presente trabajo aporta un enfoque novedoso al explorar una cepa no convencional y poco caracterizada de *Vreelandella venusta*, en contraste con los modelos halófilos más estudiados. Este análisis permite no sólo generar información básica sobre su fisiología y rutas metabólicas, sino también evaluar su potencial bajo condiciones de cultivo simplificadas y con fuentes de carbono de bajo costo, lo que aporta elementos prácticos y transferibles para el diseño de bioprocesos sostenibles de producción de PHA.

## **Justificación**

El incremento de la contaminación por residuos plásticos derivados del petróleo ha impulsado la búsqueda de alternativas sostenibles y biodegradables. Dentro de estas, los polihidroxicanoatos representan una opción prometedora por su origen microbiano, su biodegradabilidad y sus propiedades fisicoquímicas comparables a las de los plásticos convencionales (Chen et al., 2021; Rekhi et al., 2021). Sin embargo, su producción a escala industrial aún enfrenta retos técnicos y económicos, principalmente relacionados con los costos del sustrato y la eficiencia en la acumulación del polímero (Chen y Jiang, 2017).

Las bacterias halófilas, como *Vreelandella venusta* (sin.: *Halomonas venusta*), ofrecen ventajas significativas para la producción de PHA, ya que pueden crecer en condiciones salinas que reducen los riesgos de contaminación microbiana, permiten el uso de medios no estériles y presentan la capacidad de acumular altos porcentajes de PHA en condiciones de estrés (Qu et al., 2022). Además, el uso de

fuentes de carbono simples, como la glucosa, facilita el estudio controlado de los mecanismos de biosíntesis de los biopolímeros.

El presente trabajo se centró en evaluar el efecto de diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) sobre el rendimiento de producción de PHA por *Vreelandella venusta*. A diferencia de estudios previos centrados en halófilos ampliamente caracterizados, este estudio aborda una cepa recientemente reclasificada y poco explorada, lo que representa una oportunidad para descubrir nuevos rasgos fisiológicos y metabólicos con potencial biotecnológico.

La cepa *V. venusta Hven10* fue aislada del lago cráter hipersalino de la Isla Isabel (México), un ecosistema insular declarado Parque Nacional y Área Natural Protegida, caracterizado por su alta salinidad, temperatura variable y limitada disponibilidad de nutrientes. Estas condiciones extremas ejercen una presión selectiva que favorece el desarrollo de microorganismos con mecanismos únicos de adaptación y síntesis de compuestos de interés, entre ellos los polihidroxicanoatos.

Aunque el estudio de cepas poco exploradas puede implicar limitaciones técnicas, como la ausencia de información genómica o condiciones de cultivo optimizadas, también ofrece la ventaja de ampliar el repertorio biotecnológico más allá de los modelos convencionales, como *Halomonas* o *Cupriavidus*, e identificar nuevos candidatos con tolerancia a salinidades extremas, rutas metabólicas alternativas y mayor versatilidad en el uso de sustratos.

Por ello, la exploración de *V. venusta* no sólo aporta información novedosa sobre su fisiología y respuesta a la salinidad, sino que también contribuye a la valoración científica de los ecosistemas hipersalinos mexicanos como reservorios de biodiversidad microbiana con potencial para aplicaciones industriales sostenibles.

## **Hipótesis**

La cepa halófila *Vreelandella venusta Hven10* es capaz de acumular polihidroxicanoatos (PHA) en condiciones de alta salinidad, utilizando glucosa

como fuente de carbono, y su rendimiento de acumulación (%PHA/MSC) se ve influido significativamente por la concentración de NaCl en el medio de cultivo.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar el potencial biotecnológico de *Vreelandella venusta* Hven10 para la producción de polihidroxialcanoatos en condiciones controladas de cultivo, y caracterizar las propiedades estructurales y morfológicas de los biopolímeros obtenidos mediante técnicas fisicoquímicas y espectroscópicas.

### **Objetivos específicos**

- Optimizar las condiciones de cultivo de *Vreelandella venusta* Hven10 mediante la variación de las concentraciones de NaCl en el medio, con el fin de identificar las condiciones que favorecen la acumulación intracelular de PHA.
- Cuantificar el rendimiento y la eficiencia de producción de PHA en función de la biomasa seca celular, a partir de la extracción y purificación del polímero mediante métodos fisicoquímicos.
- Analizar la dinámica de acumulación de PHA durante la cinética de crecimiento de *V. venusta* Hven10, evaluando la relación entre el crecimiento celular y la producción del biopolímero.
- Caracterizar estructural y morfológicamente los PHA obtenidos, utilizando técnicas de microscopía electrónica y espectroscopía para determinar sus propiedades físicas, químicas y morfológicas.

# Capítulo 1: Generalidades de los polihidroxialcanoatos

## 1.1 Historia de los polihidroxialcanoatos

La identificación de los gránulos de PHA en bacterias se remonta a 1888, cuando Martinus Beijerinck los observó por primera vez como inclusiones intracelulares (Beijerinck, 1888). Posteriormente, en 1926, Maurice Lemoigne aisló y caracterizó el poli(3-hidroxibutirato) (PHB) de *Bacillus megaterium*, describiendo su masa molecular, punto de fusión y actividad óptica, lo cual marcó el inicio formal del estudio de estos biopolímeros (Lemoigne, 1926). Durante las décadas siguientes, investigadores como Macrae y Wilkinson (1958) evidenciaron que *B. megaterium* acumulaba polihidroxialcanoatos en condiciones de alto cociente carbono/nitrógeno, y se identificaron nuevas bacterias productoras, como *Pseudomonas*, *Azotobacter* y *Chromatium*.

El interés industrial por los PHA surgió en la década de 1970, cuando la crisis petrolera incentivó el desarrollo de bioplásticos. Imperial Chemical Industries (ICI) produjo PHB con altos rendimientos (~70 %) utilizando *Alcaligenes latus* (Anderson y Dawes, 1990). A pesar del avance técnico, los altos costos limitaron la competitividad de los PHA frente al polipropileno. Sin embargo, en los años 80 - 90 del siglo XX se comercializó el copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) por la marca Biopol (Monsanto/Metabolix), consolidando el potencial del PHA, aunque con desafíos económicos persistentes (Madison y Huisman, 1999; Sudesh et al., 2000).

## 1.2 Biosíntesis de los polihidroxialcanoatos

### 1.2.1 Vías de biosíntesis de PHA en bacterias

La ruta biosintética hacia la formación de PHA depende en gran medida del tipo de monómeros disponibles, los cuales a su vez están determinados por la fuente de carbono utilizada por la bacteria y el flujo metabólico resultante. En términos generales, las rutas de biosíntesis de PHA se pueden agrupar en tres vías principales: la vía a partir de azúcares (principalmente glucosa), la vía desde ácidos

grasos o lípidos, y la vía desde intermediarios, como el 3-hidroxiacetil-CoA (Vicente et al., 2023).

La primera y más ampliamente distribuida vía biosintética de PHA parte de fuentes de carbono como la glucosa y otros carbohidratos simples, que son canalizados a través de la glucólisis hacia la generación de acetil-CoA. Este compuesto actúa como precursor para la síntesis de PHB, el tipo de PHA más común. En esta vía, dos moléculas de acetil-CoA se condensan mediante la enzima  $\beta$ -cetotilasa (PhaA), formando acetoacetil-CoA. Posteriormente, la acetoacetil-CoA reductasa (PhaB) reduce este intermediario a (R)-3-hidroxiacetil-CoA, utilizando NADPH como cofactor. Finalmente, la PHA sintasa (PhaC) polimeriza estos monómeros en cadenas de PHB. Esta vía es común en bacterias como *Cupriavidus necator*, *Azotobacter vinelandii* y diversas especies del género *Halomonas*, incluida *Vreelandella venusta* (sin.: *Halomonas venusta*) (Stanley et al., 2020).

Una segunda vía relevante en la biosíntesis de PHA implica el metabolismo de ácidos grasos o lípidos, a través del proceso de  $\beta$ -oxidación. En esta ruta, los ácidos grasos son degradados enzimáticamente a unidades de acil-CoA, que a su vez generan intermediarios como (R)-3-hidroxiacil-CoA, los cuales pueden ser directamente canalizados hacia la síntesis de PHA mediante la acción de PHA sintasas. Esta vía es particularmente eficiente para la producción de PHA de cadena media (mcl-PHA), caracterizados por presentar propiedades mecánicas flexibles y mayor elasticidad en comparación con los PHA de cadena corta (scl-PHA) como el PHB (Chen y Jiang, 2017).

En el caso de bacterias halófilas, como *Halomonas sp.*, *Halomonas bluephagenesis* y *Vreelandella venusta*, se ha demostrado que poseen la capacidad de metabolizar eficientemente aceites vegetales o lípidos residuales, tales como aceite de cocina usado, como fuente principal de carbono para la síntesis de PHA, principalmente en condiciones de salinidad elevada (Pernicova et al., 2019a; Yin et al., 2015). Esta característica confiere a las bacterias halófilas una ventaja biotecnológica, ya que no sólo toleran ambientes osmóticamente extremos, sino que también convierten sustratos económicos y renovables en bioplásticos de interés industrial.

Existe una tercera vía metabólica menos común, denominada la vía del 3-hidroxiopropionato, en la cual se forma un intermediario que puede ser transformado en precursores de monómeros PHA de cadena corta o media. Aunque es una vía menos utilizada en bacterias no modificadas, se ha explorado mediante estrategias de ingeniería metabólica para la producción de copolímeros novedosos (Akiyama et al., 2003). Algunas arqueas halófilas también pueden presentar variantes de esta ruta para acumular PHA en condiciones de estrés ambiental.

La elección de una vía biosintética específica no sólo depende de la especie bacteriana, sino también de las condiciones de cultivo y la disponibilidad de nutrientes. Por ejemplo, cuando se utilizan azúcares como fuente de carbono, se favorece la vía de la acetil-CoA, mientras que la presencia de ácidos grasos promueve el uso de la vía  $\beta$ -oxidación. Existen bacterias que presentan flexibilidad metabólica, pudiendo cambiar entre rutas dependiendo del medio de cultivo, lo cual es relevante en contextos industriales donde se busca maximizar la productividad de PHA a partir de materias primas económicas y sostenibles (Chen y Jiang, 2018). La comprensión de estas vías metabólicas ha permitido el diseño de estrategias de ingeniería genética y optimización de medios de cultivo para aumentar tanto el rendimiento como la calidad de los PHA producidos. Asimismo, la combinación de rutas en cepas modificadas ha posibilitado la producción de copolímeros con propiedades mecánicas y térmicas superiores, ampliando el abanico de posibles aplicaciones industriales de estos biopolímeros (Mai et al., 2024).

### **1.2.2 Enzimas clave: $\beta$ -cetotiolasa, acetoacetil-CoA reductasa y PHA sintasa**

El metabolismo de PHA es un ciclo continuo bidireccional de síntesis y degradación (Prieto et al., 2016). Es un proceso intrincado controlado por circuitos reguladores complejos donde el flujo de carbono está adecuadamente equilibrado entre la síntesis de PHA y el crecimiento de los microorganismos. En particular, tres enzimas juegan un papel central en la ruta biosintética de los PHA de cadena corta, como el PHB:  $\beta$ -cetotiolasa (PhaA), acetoacetil-CoA reductasa (PhaB) y PHA sintasa (PhaC) (Madhusoodhanan et al., 2023). Estas enzimas actúan secuencialmente,

canalizando el flujo de carbono desde intermediarios centrales del metabolismo (como el acetil-CoA) hacia la formación y polimerización del monómero 3-hidroxi-butiril-CoA.

La primera enzima,  $\beta$ -cetotiolasa, cataliza la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA. Esta reacción, que ocurre en el citoplasma bacteriano, es termodinámicamente desfavorable en condiciones normales, por lo que su flujo se ve favorecido cuando la concentración intracelular de acetil-CoA es alta, como ocurre en condiciones de exceso de carbono y limitación de otros nutrientes (Mai et al., 2024). Esta enzima no sólo participa en la biosíntesis de PHA, sino también en rutas relacionadas, como la cetogénesis y la degradación de aminoácidos, lo que resalta su papel versátil dentro del metabolismo bacteriano.

A continuación, la acetoacetil-CoA es reducida a (R)-3-hidroxi-butiril-CoA por la acción de la enzima acetoacetil-CoA reductasa. Esta reacción requiere la participación de NADPH como cofactor reductor, lo cual vincula la biosíntesis de PHA con el estado redox de la célula. La disponibilidad de NADPH, generalmente elevada en condiciones anabólicas, puede ser un factor limitante para la actividad de esta enzima (Madhusoodhanan et al., 2023). Además, se ha reportado que la actividad de esta reductasa se ve regulada por la proporción NADPH/NADP<sup>+</sup>, y su eficiencia determina el enantiómero del monómero resultante, lo cual es crucial para la posterior polimerización (Koller et al., 2010a).

Finalmente, el paso clave en la biosíntesis es catalizado por la PHA sintasa, que polimeriza unidades de (R)-3-hidroxi-butiril-CoA para formar los diferentes tipos de PHA. Esta enzima presenta una alta especificidad, y su actividad depende tanto de la naturaleza del monómero como de su propia estructura. Las PHA sintasas se clasifican en cuatro clases (I–IV) según su organización estructural y especificidad de sustrato. Las clases I y III son las más comunes en bacterias productoras de PHA de cadena corta, mientras que las clases II y IV se asocian con la incorporación de monómeros de cadena media (Rehm, 2003; Sudesh et al., 2000).

La PHA sintasa (PhaC) es considerada la enzima clave y limitante de la ruta biosintética de los polihidroxicanoatos, por lo que su eficiencia catalítica, estabilidad estructural, afinidad por el monómero y mecanismos de regulación determinan

directamente la cantidad y el tipo de polímero producido (Chen, 2009). La expresión de *phaC* se encuentra regulada por múltiples factores, incluyendo el estado nutricional de la célula, la disponibilidad de carbono y la limitación de nutrientes esenciales (como nitrógeno, fósforo y oxígeno), que inducen una red de señales globales de estrés. En muchas bacterias, la transcripción de *phaC* está controlada por reguladores como PhaR, que reprime o activa la expresión dependiendo de la acumulación intracelular de PHA, y por proteínas asociadas a la envoltura del gránulo como PhaP (phasinas), que modulan la estabilidad y el tamaño de los gránulos (Jendrosseck y Pfeiffer, 2014).

A nivel metabólico, la actividad de la PHA sintasa se ajusta por la disponibilidad de sustratos (intermedios como 3-hidroxiacil-CoA o 3-hidroxiacil-CoA) y por el balance redox intracelular (NADPH/NADP<sup>+</sup>), lo que integra su regulación dentro del metabolismo central. Adicionalmente, estudios de ingeniería genética han demostrado que la sobreexpresión de *phaC* o la introducción de mutaciones puntuales en residuos catalíticos pueden incrementar el rendimiento de PHA y alterar la especificidad del sustrato, posibilitando la producción de copolímeros con propiedades mecánicas mejoradas (Chen, 2009; Lu et al., 2009).

En conjunto, la acción coordinada de estas tres enzimas convierte intermediarios metabólicos derivados del carbono en polímeros de almacenamiento que pueden representar hasta el 90% del peso seco celular en condiciones óptimas.

### **1.2.3 Regulación de la síntesis: condiciones nutricionales y ambientales**

La producción de PHA en bacterias no es un proceso constitutivo, sino que se encuentra fuertemente regulado por las condiciones nutricionales y ambientales del entorno. Esta regulación responde a estrategias adaptativas que las bacterias han desarrollado para enfrentar situaciones de desequilibrio metabólico, particularmente en escenarios donde existe un exceso de carbono y una limitación de otros nutrientes esenciales, como nitrógeno (N), fósforo (P), azufre (S), oxígeno (O) o hierro (Fe) (Anderson y Dawes, 1990; Sudesh e Iwata, 2008). La acumulación de PHA se desencadena principalmente en condiciones de crecimiento desbalanceado, es decir, cuando el suministro de una fuente de carbono es abundante, pero otros nutrientes

limitan la síntesis de biomasa. Este desbalance favorece la canalización de intermediarios metabólicos hacia rutas anabólicas secundarias, como la síntesis de PHA, actuando como una válvula de escape del exceso de carbono intracelular (Madison y Huisman, 1999). En este contexto, los PHA funcionan como polímeros de almacenamiento, acumulándose en forma de gránulos intracelulares cuando las condiciones de crecimiento son desfavorables para la replicación celular, pero el carbono permanece disponible.

Desde el punto de vista bioquímico, la síntesis de PHA está regulada directamente a nivel enzimático. Los valores cinéticos de  $K_m$  y  $V_{max}$  de las enzimas participantes en la ruta metabólica:  $\beta$ -cetotiolasa, la acetoacetyl-CoA reductasa y la PHA sintasa, proporcionan información sobre su especificidad de sustrato, así como pistas para mejorar aún más sus actividades para promover la formación de PHA. Estas enzimas pueden activarse o inhibirse en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, a la carga energética de la célula (ATP/ADP) y a señales regulatorias de tipo transcripcional o post transcripcional (Koller et al., 2017). Por ejemplo, en bacterias como *Cupriavidus necator*, se ha demostrado que la transcripción del gen *phaC* está directamente inducida por la limitación de nitrógeno, en presencia de carbono excedente (Verlinden et al., 2007). Asimismo, la modificación covalente de la PHA sintasa por fosforilación también afecta a su actividad enzimática, lo que podría influir aún más en la acumulación de PHA (Juengert et al., 2018). Por ello, controlar la actividad enzimática de proteínas clave involucradas en la vía biosintética de PHA es un posible método para regular su metabolismo.

Además de las condiciones nutricionales, factores ambientales como la temperatura, el pH, la salinidad y la concentración de oxígeno disuelto también influyen significativamente en la acumulación de PHA. En bacterias halófilas como *Halomonas spp.*, la síntesis de PHA ha sido asociada con la tolerancia a ambientes hipertónicos. La salinidad elevada no sólo modula la expresión de genes asociados con el metabolismo del PHA, sino que también favorece indirectamente su acumulación al generar un estrés osmótico que altera el balance energético y redox de la célula (Obruca et al., 2020).

Este proceso de modulación ocurre principalmente mediante la activación de rutas de señalización y regulación transcripcional que ajustan el flujo metabólico hacia la

síntesis y almacenamiento de PHA. Ante condiciones hiperosmóticas, las bacterias halófilas redirigen el exceso de poder reductor (NADPH) y de intermediarios del ciclo de Krebs hacia la formación de (R)-3-hidroxiacil-CoA, precursor inmediato del PHA. Al mismo tiempo, se suprime parcialmente la biosíntesis de macromoléculas asociadas al crecimiento, priorizando la acumulación de reservas de carbono y energía (Kumar y Kim, 2018b; Sedlacek et al., 2019b).

Particularmente, en bacterias halófilas moderadas y extremas, como *Halomonas elongata* o *Vreelandella venusta*, se ha observado que los gránulos de PHA pueden desempeñar un papel protector frente al estrés osmótico, al contribuir a la estabilización de estructuras intracelulares y al mantenimiento de la homeostasis celular. Por lo tanto, el entorno de alta salinidad puede ser no solo permisivo, sino favorable para la síntesis y acumulación de estos biopolímeros (Lim et al., 2023a).

Otro mecanismo para controlar el metabolismo de PHA involucra a las proteínas reguladoras. Los gránulos de PHA están cubiertos con proteínas conocidas como proteínas asociadas a gránulos de PHA (PGAP) (Maestro y Sanz, 2017). Algunas de estas PGAP, como PhaR, PhaM, PhaF y PhaQ, a menudo sirven como proteínas reguladoras que se unen a sus propios promotores o a los promotores de otros genes biosintéticos de PHA, para regular su transcripción y asegurar la formación bien organizada de gránulos de PHA (Pötter et al., 2005; Galán et al., 2011). Por lo tanto, la modificación de estos elementos reguladores puede alterar el nivel de producción de PHA. Además, algunos sistemas reguladores globales, como el sistema Gac/Rsm, el sistema PTS y Ntr, el sistema regulador de dos componentes NtrB/NtrC y el quórum *sensing* también participan en la regulación de la síntesis de PHA en algunas especies (Pfeiffer et al., 2011).

#### **1.2.4 Rol fisiológico de los PHA en la célula bacteriana**

La función fisiológica de los polihidroxicanoatos va más allá del almacenamiento energético: estos biopolímeros desempeñan roles esenciales en la adaptación a condiciones ambientales adversas, la respuesta al estrés osmótico y oxidativo, la estabilización celular e incluso la regulación de la homeostasis metabólica (Jendrossek y Pfeiffer, 2014; Kadouri et al., 2005). Desde una perspectiva energética,

los PHA se acumulan típicamente cuando existe un exceso de carbono disponible en el medio, pero hay limitaciones en otros nutrientes esenciales como N, P o S. En estas condiciones, el flujo metabólico se desvía hacia la síntesis de polímeros, permitiendo a la célula almacenar carbono en forma de gránulos intracelulares de PHA. Posteriormente, en condiciones de escasez de carbono, estos polímeros pueden ser degradados por enzimas intracelulares como las PHA despolimerasas (PhaZ), liberando monómeros que son reconvertidos a acetyl-CoA, permitiendo la supervivencia celular durante periodos prolongados de inanición (Rehm, 2010; Wang et al., 2012). Adicionalmente, se ha demostrado que los gránulos de PHA desempeñan funciones estructurales y protectoras dentro de la célula bacteriana. Lejos de ser simples reservorios de carbono, estos gránulos se consideran orgánulos funcionales debido a su compleja organización molecular y a la presencia de una capa superficial de proteínas especializadas, denominada envoltura del gránulo o capa de proteínas PhaP/PhaR.

Diversos estudios han demostrado que las proteínas asociadas a los gránulos incluyen enzimas biosintéticas (como la PHA sintasa, PhaC), proteínas estructurales (*phasinas*, PhaP), reguladoras (PhaR) y proteínas vinculadas con el metabolismo y el ciclo celular, como FtsZ, MreB y PopZ, que participan en la división y morfología celular (Sznajder et al., 2015; Obruca et al., 2020).

La interacción de los gránulos de PHA con estas proteínas permite su posicionamiento dinámico dentro de la célula, su segregación durante la división bacteriana y su integración en las redes metabólicas, lo que sustenta su consideración como orgánulos bacterianos funcionales, análogos en cierto modo a los compartimentos especializados observados en células eucariotas (Jendrossek y Pfeiffer, 2014)

En bacterias halófilas, el rol fisiológico de los PHA cobra especial relevancia ya que estos microorganismos enfrentan constantes fluctuaciones osmóticas en ambientes salinos extremos. En este contexto, la acumulación de gránulos de PHA se ha vinculado con la resistencia osmótica, actuando posiblemente como un sistema tampón frente a la pérdida de agua o facilitando la reorganización intracelular del volumen y contenido iónico (Sedlacek et al., 2019). Asimismo, los PHA parecen tener un papel en la protección frente a estrés oxidativo, al reducir la generación de

especies reactivas de oxígeno (ROS), tal como ha sido observado en *Cupriavidus necator* y otras bacterias ambientales (Obruca et al., 2016a).

Otro aspecto notable del rol fisiológico de los PHA es su implicación en la formación de biofilms y motilidad celular. Algunos reportes han indicado que la acumulación de PHA puede modular la expresión de genes relacionados con la motilidad flagelar y la síntesis de exopolisacáridos, influyendo en la capacidad de colonización y adhesión a superficies (Kadouri et al., 2005). Esta función es particularmente útil en entornos cambiantes, donde las bacterias deben adaptar rápidamente su fenotipo para asegurar su persistencia. Finalmente, los PHA han sido implicados en la regulación del equilibrio redox intracelular, al actuar como sumideros de poder reductor (principalmente NADPH). Durante condiciones de desbalance metabólico o estrés oxidativo, la síntesis de PHA permite el consumo del exceso de equivalentes reducidos, contribuyendo al mantenimiento del balance entre las formas oxidada y reducida de los cofactores (NADP<sup>+</sup> /NADPH), y favoreciendo así la estabilidad metabólica de la célula. Esta capacidad de "almacenar" electrones de forma transitoria representa una ventaja adaptativa importante, especialmente en bacterias sometidas a cambios bruscos en la disponibilidad de nutrientes o en la presión oxidativa (Obruca et al., 2016b).

En conjunto, estas observaciones destacan que los PHA son mucho más que simples reservorios de energía; se trata de biopolímeros funcionales que intervienen activamente en la fisiología, homeostasis y supervivencia de las bacterias, especialmente en condiciones de estrés ambiental, lo cual es altamente relevante para aplicaciones biotecnológicas que buscan explotar cepas robustas, como *Vreelandella venusta*, para la producción industrial de bioplásticos.

### **1.3 Tipos de polihidroxialcanoatos**

Los polihidroxialcanoatos constituyen una familia diversa de poliésteres microbianos cuya composición monomérica, longitud de cadena y propiedades fisicoquímicas puede variar ampliamente dependiendo de la cepa bacteriana productora, la vía metabólica activa, el tipo de sustrato utilizado y las condiciones de cultivo. Esta versatilidad ha sido ampliamente estudiada, no solo en bacterias modelo como

*Cupriavidus necator*, sino también en bacterias halófilas como *Halomonas bluephagenesis* y *Vreelandella venusta*, que han demostrado ser capaces de producir tanto homopolímeros como copolímeros con potencial de aplicación industrial (Qu et al., 2022; Yin et al., 2015).

### **1.3.1 Homopolímeros y copolímeros**

Desde el punto de vista estructural, los PHA pueden clasificarse en homopolímeros, cuando están compuestos por un solo tipo de monómero, y copolímeros, cuando incluyen al menos dos tipos distintos de monómeros en la cadena polimérica. El homopolímero más estudiado y producido es el poli(3-hidroxi-butirato) (PHB), que se genera a partir de (R)-3-hidroxi-butiril-CoA y es característico de muchas bacterias en condiciones de acumulación de carbono. Este polímero es altamente cristalino, biodegradable y presenta propiedades mecánicas similares al polipropileno, aunque de mayor fragilidad (Chen y Wu, 2005).

Los copolímeros, como el poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV) o el poli(3-hidroxi-butirato-co-4-hidroxi-butirato) (PHB4HB), presentan mejor flexibilidad, menor temperatura de fusión y resistencia al impacto en comparación con el PHB puro, lo que los hace más atractivos para aplicaciones biomédicas o de envases flexibles (Sudesh et al., 2000). *Halomonas elongata* y *Halomonas bluephagenesis* han sido ampliamente estudiadas por su capacidad de producir copolímeros mediante la adición de precursores como ácido propiónico, ácido valérico o aceites vegetales, incluso en condiciones no estériles, lo que reduce considerablemente los costos de producción (Pernicova et al., 2019; He et al., 2025).

### **1.3.2 PHA de cadena corta, media y larga**

Los PHA también pueden clasificarse, con base en la longitud de su unidad monomérica, en:

- PHA de cadena corta (scl-PHA): contienen entre 3 a 5 átomos de carbono por monómero. Ejemplos típicos son el PHB y el PHBV. Son los más comunes en bacterias halófilas y se caracterizan por su alta cristalinidad y rigidez.
- PHA de cadena media (mcl-PHA): compuestos por monómeros de 6 a 14 átomos de carbono, como el poli(3-hidroxiocetanoato) (PHO) o poli(3-hidroxidecanoato) (PHD). Son más elastoméricos, con menor punto de fusión y mayor elongación hasta la rotura. Aunque son más comunes en *Pseudomonas*, ciertos halófilos como *Halomonas desertis* pueden producirlos a partir de aceites (Tamang y Nogueira, 2021).
- PHA de cadena larga (lcl-PHA): con más de 14 átomos de carbono, menos frecuentes y con propiedades aún más elastoméricas. Su producción es limitada y generalmente requieren condiciones específicas o ingeniería genética.

La longitud de la cadena monomérica está estrechamente relacionada con la ruta metabólica activa. En bacterias halófilas predominan los scl-PHA, debido a la vía clásica a partir de acetil-CoA, aunque se ha demostrado que mediante ingeniería metabólica o selección de sustratos lipídicos específicos también pueden producirse mcl-PHA (Chen y Jiang, 2017).

### **1.3.3 Propiedades fisicoquímicas y aplicaciones según el tipo de PHA**

Las propiedades fisicoquímicas de los PHA, como su punto de fusión ( $T_m$ ), temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), cristalinidad, módulo de elasticidad, elongación hasta la rotura y biodegradabilidad, dependen significativamente del tipo de PHA sintetizado. En términos generales:

Los homopolímeros scl-PHA, como el PHB, han sido ampliamente aplicados gracias a su biodegradabilidad, biocompatibilidad, alta cristalinidad (~60 - 80%) y resistencia térmica ( $T_m \sim 170^\circ\text{C}$ ). Estas propiedades han permitido su uso en sectores como el biomédico, en suturas absorbibles, andamios para ingeniería de tejidos y sistemas de

liberación controlada de fármacos, la industria de envases, en películas, bolsas y contenedores biodegradables, así como en agricultura, donde se emplea como matriz para liberación lenta de nutrientes o pesticidas. También se ha explorado su uso en biocompuestos, mezclado con nanomateriales o polímeros naturales, para fabricar partes automotrices o componentes electrónicos biodegradables. Su biocompatibilidad y degradación en metabolitos no tóxicos han sido fundamentales para extender sus aplicaciones en tecnologías sustentables y biomédicas (Chen y Wu, 2005; Koller et al., 2010a; Sharma et al., 2019; Kalia et al., 2023; Zinn et al., 2001). Los copolímeros, como PHBV, al reducir la cristalinidad, mejoran la flexibilidad y elongación, permitiendo su uso en envases biodegradables, suturas médicas, matrices para liberación controlada de fármacos.

Los mcl-PHA tienen propiedades similares a las de los elastómeros termoplásticos, con baja  $T_m$  (~40 - 60°C) y alta elongación (>300%), haciéndolos útiles en prótesis, parches dérmicos o adhesivos médicos (Koller et al., 2010b).

En la **Tabla 1** se muestra una comparación entre las propiedades físico-químicas y biológicas del PHB y otros polímeros convencionales o naturales basada en valores reportados por Chen y Patel (2012); Sudesh et al., (2000); Habibi et al., (2010); y Reddy et al., (2013).

**Tabla 1.** Comparación entre PHB, polímeros sintéticos y naturales.

Propiedad	PHB	Polipropileno (PP)	PLA (ácido poliláctico)	Almidón Termoplástico (TPS)	Celulosa regenerada
<b>Origen</b>	Bacteriano (microbiano)	Petroquímico	Fermentación de azúcares (láctico)	Vegetal (almidón modificado)	Vegetal (pulpa de madera, algodón)
<b>Biodegradabilidad</b>	Alta	Nula	Alta	Alta	Alta
<b>Biocompatibilidad</b>	Alta	Baja	Alta	Moderada	Alta
<b>Cristalinidad (%)</b>	60-80	50-70	35-45	Baja	Alta
<b>Temperatura de fusión (°C)</b>	170-180	160-170	150-160	100-120	No definida, depende del tipo

<b>Módulo de elasticidad (MPa)</b>	3500-4000	1300-1800	2000-3000	200-300	2000-5000
<b>Elongación a la rotura (%)</b>	5-8	200-600	4-10	100-300	10-30
<b>Procesabilidad</b>	Buena (inyección, extrusión)	Excelente	Buena	Regular (hidrofílico)	Limitada (requiere tratamientos)
<b>Impacto ambiental</b>	Bajo	Alto	Bajo	Bajo	Bajo
<b>Aplicaciones comunes</b>	Biomédica, envases, agricultura	Envases, autopartes, textiles	Envases, medicina, impresión 3D	Films agrícolas, biodegradables	Textiles, films, papel, filtros

#### 1.4 Degradación de los polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos son biopolímeros intracelulares que, además de su origen microbiano, presentan una ventaja sustancial frente a los plásticos convencionales: su capacidad de degradarse en ambientes naturales y controlados. Esta degradación ocurre por la acción de microorganismos capaces de secretar enzimas extracelulares denominadas despolimerasas, que catalizan la hidrólisis del polímero en monómeros solubles como el 3-hidroxi-butarato (3HB), los cuales pueden ser posteriormente asimilados por diversas especies bacterianas o fúngicas (Jendrossek y Handrick, 2002).

El proceso de degradación se ve influido por múltiples factores fisicoquímicos, como la composición química del PHA, su cristalinidad, la temperatura, el pH, la humedad y la disponibilidad de oxígeno. Los homopolímeros, como el PHB, suelen tener mayor cristalinidad y, por ende, una degradación más lenta en comparación con copolímeros como el PHBV, cuya menor cristalinidad facilita una hidrólisis más eficiente (Volova et al., 2011; Mohanan et al., 2020).

En condiciones aeróbicas, la degradación conduce a la formación de dióxido de carbono, agua y biomasa microbiana. En condiciones anaeróbicas, como en digestores o sedimentos, los productos finales incluyen metano, lo que hace de los PHA materiales compatibles incluso con procesos de biodigestión (Meereboer et al.,

2020). Específicamente, se ha reportado que bacterias de géneros como *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus* y actinomicetos son eficientes degradadores de PHA en diversos entornos, incluyendo suelos, compostas, aguas residuales y ambientes marinos (Paloyan et al., 2025; Tokiwa y Calabia, 2006) (**Tabla 2**).

El potencial de degradación de los PHA también ha sido validado en condiciones industriales de compostaje, en las que se ha observado que PHB y PHBV pueden alcanzar una mineralización superior al 90% en menos de seis semanas, lo que cumple con los criterios de biodegradabilidad establecidos por normativas como la EN 13432 (European Committee for Standardization, 2000). No obstante, la degradación en ambientes marinos puede ser más lenta debido a las bajas temperaturas, menor actividad enzimática y baja concentración de microorganismos específicos, lo cual representa un área de investigación activa.

La importancia de la degradabilidad de los PHA radica en su papel como alternativas sostenibles a los polímeros derivados del petróleo. La posibilidad de cerrar el ciclo de vida del material mediante su reincorporación al ciclo del carbono es un atributo clave en el diseño de materiales poliméricos biodegradables (Narancic et al., 2018).

**Tabla 2.** Relación de microorganismos descritos como degradadores de PHA y las condiciones ambientales en las cuales se ha observado su actividad degradativa.

Microorganismo	Tipo de PHA degradado	Ambiente de degradación	Condiciones óptimas	Referencia
<i>Pseudomonas lemoignei</i>	PHB, PHBV	Suelo, composta	Aeróbico, 30-37 °C, pH neutro	Volova et al., (2011)
<i>Streptomyces sp.</i>	PHB, PHBV	Composta, aguas residuales	Aeróbico, 35-45 °C, humedad alta	Tokiwa y Calabia (2006)
<i>Bacillus sp.</i>	PHB	Composta, suelos agrícolas	Aeróbico, 37 °C, actividad máxima en 2-4 semanas	Cho et al., (2021)

<i>Actinomyces israelii</i>	PHB	Suelo	Aeróbico, temperaturas moderadas	Paloyan et al., (2025)
<i>Aspergillus fumigatus</i> (hongo)	PHBV	Composta, suelos tropicales	Alta humedad, 30 °C, pH 6-7	Jendrossek y Handrick (2002)
<i>Halomonas elongata</i>	PHB	Ambientes salinos	Aeróbico, NaCl 5- 10%, 30-37 °C	Paloyan et al., (2025); Meereboer et al., (2020)
Consortios microbianos de compostaje	PHB, PHBV	Composta industrial	Aeróbico, 55-60 °C, alta humedad	Narancic et al., (2018); European Committee (2000)
Microbiota de lodos activados	PHB	Aguas residuales	Aeróbico/anaeróbico, 20-35 °C	Meereboer et al., (2020)

## Capítulo 2: *Vreelandella venusta* como productora de PHA

### 2.1 Características generales del género *Vreelandella*

Entre las bacterias halófilas prometedoras para la síntesis de PHA, el género originalmente conocido como *Halomonas* — representando más de 160 especies descritas hasta la fecha — ha sido recientemente objeto de una profunda reestructuración filogenómica (de la Haba et al., 2025). Una de las revisiones más destacadas es la reclasificación de *Halomonas venusta*, que ahora pertenece al nuevo género *Vreelandella*, bajo la combinación *Vreelandella venusta* comb. nov. (de la Haba et al., 2025; Parte et al., 2020-2024). Este cambio responde a análisis genómicos y filogenéticos que justifican la división del antiguo género *Halomonas* en varios nuevos géneros más coherentes en términos de genómica comparada.

En este nuevo contexto, *Vreelandella* conserva las propiedades distintivas de los halófilos moderados previamente atribuidas a *Halomonas*, incluyendo su notable capacidad de crecimiento en un amplio rango de concentraciones salinas, que puede extenderse hasta 2.5 M de NaCl (Kushner, 1978). Esta flexibilidad osmótica y nutricional le permite adaptarse a distintos ambientes y fuentes de carbono, ya que sus requerimientos varían con factores como la temperatura de cultivo y la naturaleza del sustrato (Kushner, 1992).

A nivel fisiológico, las especies de este género son bacilos Gram negativos, halófilos aeróbicos móviles, capaces de sintetizar metabolitos adaptativos como la ectoína y los polihidroxicanoatos (Yin et al., 2015). Su distribución global en ambientes marinos, salinas, lagos hipersalinos y suelos salinos, junto con su tolerancia ambiental y capacidad de crecer en condiciones no estériles, ha despertado un creciente interés biotecnológico, especialmente por su aptitud para acumular biopolímeros de alto valor (de la Haba et al., 2025).

## 2.2 Fisiología halófila y su relación con la biosíntesis de PHA

El género *Vreelandella* ha desarrollado estrategias fisiológicas específicas para prosperar en condiciones de alta salinidad, principalmente a través de la acumulación intracelular de solutos compatibles, como betaína, prolina, trehalosa y ectoína (Roberts, 2005). Estos compuestos cumplen una doble función crítica en la homeostasis osmótica: por un lado, reducen el potencial osmótico citosólico, permitiendo a las células mantener su turgencia sin acumular excesivamente sales inorgánicas (Rojas y Huang, 2017) y, por otro lado, estabilizan proteínas y estructuras celulares frente a la desnaturalización causada por fuerzas iónicas elevadas (Roychoudhury, 2013; Biswas et al., 2023).

La relación entre el metabolismo de solutos compatibles y la biosíntesis de PHA ha sido objeto de varios estudios. En ellos se ha demostrado que múltiples cepas de bacterias halófilas, incluyendo *Halomonas campaniensis* y *Halomonas alkaliphila*, pueden coacumular ectoínas y PHB en condiciones salinas específicas (Romano et al., 2005; 2006). En particular, *H. campaniensis* logra acumular hasta un 12.4% de PHB en función de la masa seca celular (MSC) y 1.4 moles de ectoína/mg de células húmedas a 5.8 % (p/v) de NaCl (Strazzullo et al., 2008). Este fenómeno sugiere una relación sinérgica entre ambos sistemas de adaptación: los gránulos de PHA actuarían como estructuras hidrofóbicas de reserva y protección, mientras que los solutos compatibles controlarían la presión osmótica celular.

En condiciones hipertónicas, *Halomonas halophila* ha demostrado que la acumulación de PHA mejora la integridad celular, mientras que en condiciones hipoosmóticas, las células pobres en PHA son más susceptibles a la lisis (Sedláček et al., 2019c). La acumulación de PHA, al desplazar parcialmente el volumen citoplasmático disponible para solutos compatibles, permite una transición más rápida de medios hipertónicos a hipotónicos, reduciendo el riesgo de choque osmótico descendente (Obruca, 2020).

### **2.3 Estudios previos sobre *Vreelandella venusta* y su potencial biotecnológico**

Dentro del género *Vreelandella*, la especie *V. venusta* ha emergido como un organismo de interés biotecnológico por su capacidad de crecer en ambientes salinos moderados y sintetizar compuestos de alto valor agregado, como polihidroxicanoatos y biosurfactantes. Se ha reportado que *V. venusta* produce PHB en condiciones de cultivo con 3 % de NaCl, glucosa a 80 g/L y una relación N/P controlada, alcanzando una acumulación del 69 % de PHB respecto a la masa celular, lo que representa una producción de aproximadamente 1.5 g/L (Stanley et al., 2017).

Además, cuando se aplican estrategias de cultivo tipo feed-batch, *V. venusta* ha demostrado un alto rendimiento, alcanzando hasta 33.4 g/L de PHB, correspondiente al 88 % de la masa celular, lo cual representa uno de los valores más altos reportados para esta especie (Stanley et al., 2017). Estos resultados confirman la eficiencia metabólica de esta cepa en condiciones controladas, destacando su potencial como plataforma biotecnológica para la producción de biopolímeros.

Por otro lado, *V. venusta* ha mostrado también una notable capacidad para producir biosurfactantes del tipo lipopeptídico, con propiedades multifuncionales. Se ha demostrado que estos compuestos presentan una alta estabilidad frente a variaciones de salinidad (0-120 g/L de NaCl), pH y temperatura. Además, los biosurfactantes derivados de *V. venusta* inhiben la formación de biofilms y promueven la cicatrización celular, lo que sugiere aplicaciones prometedoras en el campo biomédico y cosmético (Cheffi et al., 2021).

En conjunto, la evidencia experimental indica que *Vreelandella venusta* no sólo es una productora eficiente de PHA en condiciones moderadamente halófilas, sino que también posee capacidades metabólicas adicionales de interés industrial, como la biosíntesis de compuestos tensioactivos bioactivos. Estas propiedades refuerzan su valor como cepa modelo para el desarrollo de procesos biotecnológicos sostenibles, especialmente en plataformas que aprovechan residuos como fuente de carbono y operan en condiciones no estériles.

## **Capítulo 3: Métodos de extracción, cuantificación y caracterización de PHA**

### **3.1 Visualización intracelular de gránulos de PHA mediante tinción con negro Sudán**

La detección y confirmación morfológica de los gránulos intracelulares de PHA en *Vreelandella venusta* se llevó a cabo mediante tinción con negro Sudán, una técnica histoquímica basada en la afinidad lipofílica del colorante por los polímeros de naturaleza hidrofóbica, como los PHA. Esta metodología permite la observación directa de los gránulos almacenados en el citoplasma celular, diferenciándolos visualmente del resto de la estructura celular en el microscopio óptico.

Para la preparación del colorante, se disolvieron 0.3 g de negro Sudán en 100 mL de alcohol etílico al 70%, obteniéndose una solución estable para tinción. Se realizaron frotis bacterianos de aproximadamente 10 × 30 mm sobre portaobjetos limpios, los cuales se fijaron mediante exposición directa a la flama durante unos segundos, para asegurar la adherencia celular y preservar la estructura.

Una vez fijado el frotis, se aplicaron 3 mL de la solución de negro Sudán, dejando actuar el colorante durante 15 minutos para permitir la penetración y unión al material polimérico. Posteriormente, se retiró el exceso de colorante por escurrimiento y se enjuagó con agua destilada. Para mejorar el contraste lipídico, se añadió 1 mL de una mezcla de xilenos con etilbenceno durante 20 segundos, seguido de un nuevo enjuague con agua destilada. Finalmente, se aplicó safranina como colorante de contraste durante 1 minuto, lo que permitió teñir el citoplasma bacteriano de color rosado.

Las preparaciones fueron observadas en microscopía óptica con el objetivo de inmersión 100 x, empleando una gota de aceite de inmersión para optimizar la resolución. En las muestras analizadas, los gránulos intracelulares de PHA se visualizaron como inclusiones de color morado oscuro, mientras que el resto de la célula bacteriana adoptó una tonalidad rosada clara. Esta diferencia de color permitió corroborar la presencia y localización subcelular de los polímeros acumulados (Ortiz, 2009 citado por Blanco, 2010; Salinas et al., 2014).

## **3.2 Métodos de ruptura celular y recuperación del polímero**

La extracción eficiente de los PHA acumulados intracelularmente en bacterias es un paso crítico para su posterior cuantificación y caracterización. Dado que estos biopolímeros se depositan en forma de gránulos citoplasmáticos insolubles, su recuperación requiere la disrupción de la envoltura celular sin alterar la estructura química del polímero.

Existen diversos enfoques para llevar a cabo esta extracción, que incluyen métodos físicos, enzimáticos y químicos. En esta investigación se utilizaron técnicas basadas en tratamiento con hipoclorito de sodio, seguido de extracción con cloroformo y precipitación con metanol, un protocolo ampliamente documentado por su balance entre rendimiento, pureza y accesibilidad (Kunasundari y Sudesh, 2011).

### **3.2.1 Extracción con hipoclorito de sodio**

El uso de hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) como agente de digestión celular es una estrategia ampliamente empleada para la recuperación de PHA. Este compuesto actúa como un oxidante fuerte que lisa selectivamente el material celular, sin dañar a los gránulos de PHA, permitiendo que estos se sedimenten intactos. En el procedimiento clásico, la biomasa seca se resuspende en una solución de  $\text{NaClO}$  al 5% (v/v) y se incuba a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora con agitación leve. Durante este periodo, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos se degradan, mientras que los gránulos de PHA, altamente resistentes a la oxidación, permanecen íntegros. Posteriormente, el polímero es recolectado por centrifugación y lavado con solución salina al 10% (v/v) para remover impurezas residuales (Reddy et al., 2003; Verlinden et al., 2007).

### **3.2.2 Extracción con cloroformo**

La extracción con cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) constituye un método estándar para recuperar PHA con alta pureza, especialmente cuando se desea conservar su integridad estructural y masa molecular. Este método se fundamenta en la solubilidad selectiva del polímero en cloroformo, en contraste con otros componentes celulares. Tras la

lisis celular (con NaClO), el pellet de PHA es incubado con cloroformo en agitación suave durante 1 hora a 37°C. El polímero se disuelve en el solvente, mientras que el material insoluble (como residuos celulares o sales) permanece como fase sólida. La disolución puede filtrarse o centrifugarse para eliminar estos residuos (Sudesh et al., 2000; Khanna y Srivastava, 2005).

### **3.2.3 Precipitación con metanol**

La precipitación con metanol (CH<sub>3</sub> OH) es una etapa posterior a la disolución del PHA en cloroformo, y tiene como finalidad purificar y recuperar el polímero mediante la reducción de su solubilidad. Al añadir metanol en exceso al extracto clorofórmico (en proporciones típicas de 3:1 o 4:1, metanol:cloroformo), se induce la formación de una fase sólida blanca correspondiente al polímero precipitado. Esta técnica permite eliminar contaminantes solubles en cloroformo y recuperar el polímero con mayor pureza. Tras la adición de metanol, la mezcla se mantiene en reposo (a 4 °C o temperatura ambiente), y el polímero es separado por filtración o centrifugación, seguido de secado a temperatura controlada. Este material puede emplearse directamente para análisis térmicos y estructurales (Koller et al., 2017; Kourmentza et al., 2017).

La combinación de extracción con cloroformo y precipitación con metanol es considerada una de las más efectivas para la obtención de PHA de grado analítico o de alta pureza, aunque su escalamiento a nivel industrial requiere estrategias de recuperación de solventes, para mejorar la sostenibilidad del proceso.

## **3.3 Cuantificación de la producción de los PHA**

La cuantificación del PHA acumulado por bacterias es esencial para evaluar el rendimiento del proceso biosintético en distintas condiciones experimentales. Existen diversos métodos para este fin, desde aproximaciones gravimétricas hasta técnicas espectrofotométricas y cromatográficas. En esta investigación se emplearon dos estrategias complementarias: la cuantificación indirecta mediante el método del ácido

crotónico (**apartado 3.3.2**), y el método gravimétrico, basado en la determinación de la masa seca celular (**apartado 3.3.1**).

La masa seca celular representa un parámetro clave para expresar el rendimiento de PHA en términos relativos (% PHA/MSC) y absolutos (mg PHA/mL). Esta metodología permite estandarizar comparaciones entre condiciones de cultivo y cepas productoras, y es particularmente útil en etapas de optimización.

### **3.3.1 Método gravimétrico**

La determinación gravimétrica de PHA se basó en la cuantificación de la biomasa celular total producida durante la fermentación bacteriana. Esta técnica proporciona una medida confiable de la producción bruta del cultivo, especialmente cuando se desea correlacionar la síntesis de biopolímero con parámetros de crecimiento.

El protocolo consistió en recolectar el volumen total de cultivo tras la incubación, seguido de una centrifugación a 10 000 rpm durante 5 minutos para separar la biomasa. El sobrenadante fue descartado y el pellet bacteriano fue lavado cuidadosamente con solución salina al 10% para eliminar residuos de medio de cultivo y compuestos solubles que pudieran interferir en el pesaje. Posteriormente, los pellets lavados fueron transferidos a papel de filtro previamente pesados y secados a 60 °C durante 24 horas, o hasta alcanzar peso constante. Una vez seco, se determinó el peso neto de la biomasa mediante balanza analítica. La masa seca celular obtenida se utilizó para expresar los rendimientos de PHA tanto en términos absolutos (mg) como relativos al peso celular (% PHA/MSC), al combinar esta información con los datos obtenidos mediante el método del ácido crotónico.

Este enfoque permite comparar la eficiencia de síntesis de PHA en diferentes condiciones experimentales, y es ampliamente reportado en estudios previos con bacterias halófilas (Quillaguamán et al., 2010b).

### 3.3.2 Método del ácido crotonico

El método del ácido crotonico es una técnica espectrofotométrica ampliamente utilizada para la cuantificación indirecta de polihidroxicanoatos, basada en la conversión térmica del biopolimero a ácido crotonico en condiciones altamente ácidas. Esta reacción permite transformar el PHB en un derivado detectable mediante espectrofotometría UV, ya que el ácido crotonico presenta una absorbancia característica a una longitud de onda de 235 nm (Thu et al., 2023).

Para cuantificar PHB en las muestras experimentales, se desarrolló previamente una curva de calibración de ácido crotonico, utilizando concentraciones conocidas del compuesto patrón. Las soluciones se prepararon mediante la mezcla de volúmenes determinados de ácido crotonico con ácido sulfúrico concentrado, siguiendo un protocolo estandarizado. La mezcla fue sometida a condiciones controladas de temperatura para asegurar la estabilidad del ácido crotonico durante la medición. La absorbancia de cada mezcla fue medida en un espectrofotómetro UV-Vis a 235 nm, obteniendo valores proporcionales a la cantidad de ácido crotonico presente. Las concentraciones ensayadas abarcaron un rango de 0 a 8 µg/mL, permitiendo establecer una relación lineal entre la absorbancia y la concentración del compuesto. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de regresión lineal, generando la ecuación de la recta correspondiente y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), el cual confirmó la linealidad del sistema y su idoneidad para fines cuantitativos. Esta curva de calibración se empleará como referencia para determinar la concentración de PHB en las muestras obtenidas de este trabajo. Para ello, los extractos poliméricos son sometidos a digestión ácida con ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) a temperaturas elevadas (~100°C), promoviendo la conversión del PHB en ácido crotonico. Tras el enfriamiento, la absorbancia de la solución resultante se mide a 235 nm, y el valor obtenido se interpolará en la curva de calibración para determinar el contenido de PHB en términos de µg o mg por muestra.

Este método ha demostrado ser altamente sensible, económico y reproducible, especialmente adecuado para estudios comparativos y evaluación de rendimiento en sistemas bacterianos productores de PHB, como las especies del género *Halomonas* (Braunegg et al., 1978; Yue et al., 2014).

### 3.4 Caracterización fisicoquímica del PHA

La caracterización fisicoquímica de los polihidroxicanoatos es un paso fundamental para confirmar su naturaleza química, analizar su microestructura, determinar su pureza, evaluar sus propiedades térmicas y morfológicas, así como estimar su utilidad potencial en aplicaciones industriales o biomédicas. Diversas técnicas instrumentales permiten obtener un perfil completo de los biopolímeros producidos por bacterias halófilas como *Vreelandella venusta*. A continuación, se describen los métodos empleados en este trabajo para el análisis de PHA.

#### 3.4.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) es una herramienta rápida, no destructiva y ampliamente utilizada para identificar los grupos funcionales presentes en los PHA. La técnica se basa en la absorción de radiación infrarroja por los enlaces químicos de las moléculas, generando un espectro característico de vibraciones moleculares. En el caso de PHB, se observan bandas típicas de estiramiento del grupo carbonilo (C=O) alrededor de  $1720\text{ cm}^{-1}$ , del enlace C–O entre  $1050\text{-}1280\text{ cm}^{-1}$  y del grupo metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) entre  $2850\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$  (Kalia et al., 2023).

La FTIR también permite distinguir entre homopolímeros y copolímeros de PHA, así como detectar posibles contaminaciones o impurezas procedentes del proceso de extracción (Wang et al., 2014). Esta técnica ha sido validada para el análisis de PHA extraído de diversas bacterias halófilas, como *Halomonas campaniensis* y *Halomonas hydrothermalis* (Kourmentza et al., 2017).

#### 3.4.2 Resonancia magnética nuclear (RMN)

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica poderosa para la elucidación estructural de PHA a nivel atómico. En particular, el uso de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN permite identificar con precisión la composición monomérica, la secuencia de copolímeros y la pureza del polímero. En el caso del PHB, el espectro RMN- $^1\text{H}$

presenta señales características: un triplete a 1.2 ppm ( $-\text{CH}_3$ ), un multiplete a 2.5 ppm ( $\text{CH}_2$ ) y un doblete a 5.2 ppm ( $-\text{CH}-$ ), mientras que en  $^{13}\text{C}$  RMN se identifican señales en 169.0 ppm ( $\text{C}=\text{O}$ ), 67.4 ppm ( $-\text{CH}-$ ), 40.8 ppm ( $-\text{CH}_2$ ) y 19.7 ppm ( $-\text{CH}_3$ ) (Dai et al., 2008).

Esta técnica resulta especialmente útil para confirmar la presencia de unidades monoméricas, como 3-hidroxivalerato (3HV), 3-hidroxiocetanoato (3HO) o 4-hidroxibutirato (4HB), en copolímeros, la cual tiene implicaciones directas sobre las propiedades mecánicas y térmicas del PHA (Seitz et al., 2024).

### **3.4.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

El análisis morfológico del polímero extraído y purificado se realiza mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) en colaboración con el Centro Nacional de Metrología (CENAM). Las observaciones se efectúan utilizando un equipo Thermo Fisher Phenom, con el propósito de examinar la morfología y textura superficial del material polimérico obtenido bajo condiciones halófilas.

Las muestras se colocan sobre un portamuestras metálico y se adhieren con cinta de carbono conductora, sin aplicar recubrimiento metálico adicional, ya que este método permite una adecuada conducción eléctrica y evita la deformación del polímero. Las micrografías se obtienen a un voltaje de aceleración de 15 y 20 kV, empleando diferentes magnificaciones (100, 500, 2000, 5000, 10000, 20000 X) con el fin de visualizar tanto la estructura general como los detalles superficiales del material.

El análisis es de tipo cualitativo, enfocado exclusivamente en la descripción morfológica del polímero, sin incluir análisis elemental por dispersión de energía de rayos X (EDX). Las imágenes obtenidas permiten observar la microestructura característica del PHA extraído y purificado, la cual se interpreta en el capítulo de resultados y discusión.

## Capítulo 4: Materiales y métodos

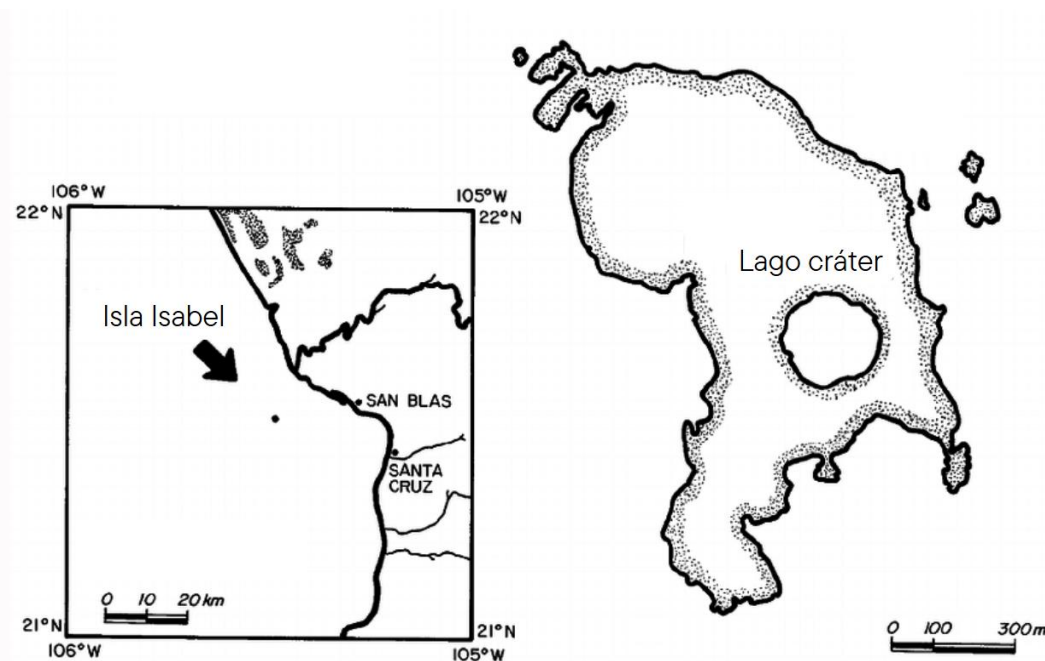
### 4.1 Cepa empleada y área de estudio

La cepa utilizada en este estudio corresponde a *Vreelandella venusta Hven10*, un bacilo halófilo moderado perteneciente a la familia *Halomonadaceae*. Esta cepa fue aislada originalmente del lago cráter hipersalino de Isla Isabel, México, un ecosistema costero con condiciones particulares de salinidad, temperatura y nutrientes, características que favorecen la proliferación de bacterias adaptadas al estrés osmótico.

La cepa fue recolectada en marzo de 2020 por Hernández-Soto y colaboradores (2023) como parte de un estudio doctoral sobre microbiota halófila ambiental. Posteriormente, fue conservada a -80 °C en crioviales, con una mezcla de 50% de glicerol estéril como crioprotector en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Ambiental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Lerma, institución que proporcionó el material biológico para esta investigación.

#### 4.1.1 Lago cráter hipersalino de Isla Isabel, México

La Isla Isabel es una isla de origen volcánico, data de aproximadamente 3.5 millones de años, ubicada en el municipio Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. Al interior de la Isla se ubica un lago casi circular (**Figura 1**), con un pH superficial de 10, el centro del lago presenta una profundidad aproximada de 25 metros y una altitud de 7 metros sobre el nivel del mar (Macías, 1979 citado por CONANP, 2005). El agua de este lago no tiene comunicación con el océano, por lo que es considerado un ambiente talasohalino meromíctico. Además de esto, el agua en gran medida se ve afectada por el gran aporte de nutrientes derivados de las excreciones de las comunidades de aves que habitan en la isla y por evaporación (Aguirre-Garrido et al., 2016).



**Figura 1.** Mapa de ubicación de la Isla Isabel y del lago cráter (Alcocer et al. 1998).

## 4.2 Reactivación y mantenimiento de la cepa

Para iniciar el trabajo experimental, la cepa criopreservada fue reactivada en condiciones controladas. Se descongeló un vial de *V. venusta* Hven10 y se inoculó directamente en 10 mL de medio halófilo (HB) con 10% (p/v) de NaCl, formulado para favorecer el crecimiento inicial de bacterias halófilas (**Tabla 3**). Las condiciones de incubación fueron de 37 °C durante 48 horas en agitación constante a 180 rpm, con el fin de asegurar una aireación adecuada y permitir la recuperación metabólica de la cepa.

La turbidez del cultivo fue monitoreada visualmente y, en caso necesario, por medida de la densidad óptica a 600 nm (OD 600). Una vez confirmado el crecimiento, el cultivo fue transferido al medio HM1 para la obtención de biomasa suficiente que serviría como inóculo inicial para los ensayos posteriores.

**Tabla 3.** Composición de medio de cultivo halófilo (HB)

Compuesto	g/L
-----------	-----

MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	25
Casaminoácidos	10
Extracto de levadura	10
Proteasa peptona	5
Citrato trisódico	3
KCl	2

### 4.3 Preparación del inóculo

El cultivo reactivado de *Vreelandella venusta Hven10* fue sembrado en medio HM1, un medio complejo diseñado para favorecer la acumulación de biomasa celular en bacterias halófilas (**Tabla 4**). Para este paso, se utilizaron matraces Erlenmeyer de 500 mL con un volumen de trabajo de 150 mL de medio, incubados a 37 °C con agitación constante de 180 rpm durante 24 horas, asegurando condiciones aerobias y homogéneas. Cabe destacar que, en esta etapa, se evaluaron tres concentraciones distintas de NaCl (80, 100 y 120 g/L) con el fin de estudiar el efecto de la salinidad sobre el crecimiento celular. Estas condiciones sirvieron no sólo para estandarizar el inóculo sino también para determinar su impacto sobre la producción de PHA.

La densidad celular alcanzada se midió por espectrofotometría a 600 nm (OD 600), y los cultivos que alcanzaron una densidad óptica entre 1.0 y 1.5 fueron seleccionados como inóculo activo. El inóculo fue transferido posteriormente al medio HM2 para la producción de PHA (**Tabla 4**).

Tras la etapa de crecimiento en HM1, los cultivos se transfirieron al medio HM2 con una proporción de inoculación del 5% (v/v). Esta estrategia permitió garantizar que las células en fase logarítmica activa ingresaran a un entorno carente de nitrógeno para estimular la acumulación de PHA como respuesta al estrés nutricional.

Las condiciones de incubación fueron idénticas a las empleadas en HM1: temperatura de 37 °C y agitación constante a 180 rpm en incubadora orbital, durante un periodo de 48 a 72 horas, dependiendo de la condición experimental. Estas condiciones favorecieron la aireación, homogeneidad del medio y permitieron a *V. venusta Hven10*

responder al entorno limitante mediante la acumulación intracelular de polímeros de reserva.

**Tabla 4.** Composición de medios de cultivo HM1 y HM2

Reactivo	% p/v	
	HM1	HM2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1	0.025
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.036	0.009
KCl	0.2	0.05
NaHCO <sub>3</sub>	0.006	-
NaBr	0.023	0.006
Peptona (Difco)	0.5	0.5
Extracto de levadura	1	1
Glucosa	1.1	1.1
<b>Para medio sólido</b>		
Agar	2	2
pH (se ajusta con NaOH 3 M)	8.75 ± 0.75	8.75 ± 0.75

#### 4.4 Visualización intracelular de gránulos de PHA mediante tinción con negro Sudán

Después de la preparación del inóculo (**sección 4.3**) y la producción de biomasa en el medio HM1, las células de *Vreelandella venusta* Hven10 fueron transferidas al medio HM2 para inducir la síntesis de polihidroxicanoatos bajo condiciones de exceso de carbono y limitación de nutrientes.

Una vez completado el periodo de incubación correspondiente a la fase de acumulación, se realizó la visualización intracelular de los gránulos de PHA mediante tinción histoquímica con negro Sudán, técnica que permite evidenciar directamente los polímeros lipofílicos acumulados en el citoplasma bacteriano.

Preparación del colorante

Se preparó una solución de negro Sudán disolviendo 0.3 g del colorante en 100 mL de etanol al 70% (v/v). La mezcla se agitó hasta su completa disolución y se conservó en frasco ámbar a temperatura ambiente hasta su utilización.

#### Preparación del frotis bacteriano

Se elaboraron frotis bacterianos de aproximadamente 10 × 30 mm sobre portaobjetos limpios y secos, los cuales se fijaron por paso rápido a la flama para preservar la morfología celular y asegurar la adherencia al portaobjetos.

#### Procedimiento de tinción

Sobre cada frotis fijado se aplicaron 3 mL de la solución de negro Sudán, dejando actuar el colorante durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró el exceso de colorante por escurrimiento y se enjuagó con agua destilada. Para mejorar el contraste lipídico, se añadió 1 mL de una mezcla de xilenos y etilbenceno durante 20 segundos, seguido de un nuevo enjuague con agua destilada. Finalmente, se aplicó safranina como colorante de contraste durante 1 minuto, permitiendo teñir el citoplasma bacteriano de tonalidad rosada.

#### Observación microscópica

Las preparaciones teñidas se observaron en microscopio óptico con objetivo de inmersión (100x), utilizando una gota de aceite de inmersión para mejorar la resolución de la imagen. Los gránulos intracelulares de PHA se visualizaron como inclusiones de color morado oscuro distribuidas en el citoplasma, mientras que el resto de la célula presentó una coloración rosada clara. Este contraste permitió confirmar la presencia y localización intracelular de los PHA en *V. venusta Hven10*, evidenciando su capacidad para acumular polímeros bajo las condiciones halófilas de producción.

### **4.5 Cuantificación de rendimiento (% PHA/MSC)**

Para la cuantificación del rendimiento de producción de polihidroxialcanoatos en función de la biomasa bacteriana generada, se diseñó un experimento que permitió evaluar la acumulación de polímero a lo largo del tiempo en condiciones específicas

de cultivo. La producción de biomasa bacteriana en diferentes concentraciones de NaCl (80, 100 y 120 g/L) se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 150 mL de medio HM1, en los cuales se inoculó *Vreelandella venusta Hven10* previamente reactivada. Estos cultivos fueron incubados a 37 °C y 180 rpm hasta alcanzar una fase activa de crecimiento, evidenciada por una densidad óptica (OD 600) de aproximadamente 1.5.

Posteriormente, se inocularon las mismas concentraciones de NaCl en matraces Erlenmeyer de 1 L con 600 mL de medio HM2, utilizando un 5% (v/v) del inóculo activo proveniente del cultivo en HM1. Durante el proceso de incubación en HM2, se llevó a cabo un monitoreo temporal a lo largo de varios días con el fin de evaluar la cinética de acumulación de PHA y el crecimiento bacteriano. Para ello, cada 24 horas se tomaron 20 mL de muestra del cultivo para su análisis. Esta muestra fue dividida en dos partes: 10 mL fueron destinados a la cuantificación de masa seca celular, y los 10 mL restantes se utilizaron para la extracción y posterior cuantificación del PHA. Simultáneamente, se midió la densidad óptica a 600 nm como estimador indirecto del crecimiento celular, y el pH del medio de cultivo, con el objetivo de evaluar posibles cambios en la acidez del sistema como consecuencia del metabolismo bacteriano. Todos los experimentos fueron realizados en paralelo y por triplicado independiente, lo cual permitió generar datos confiables y reproducibles para el análisis estadístico.

Al concluir el periodo experimental de la cinética de crecimiento y producción, el PHA extraído de las muestras finales fue recuperado, purificado y secado, quedando así disponible para su posterior caracterización mediante las técnicas fisicoquímicas y espectroscópicas previamente descritas. Estos análisis permitieron determinar la composición química, estructura molecular, propiedades térmicas y morfología del biopolímero producido por *Vreelandella venusta Hven10* en condiciones controladas de estrés salino y limitación nutricional.

#### **4.6 Análisis estadístico**

Para evaluar las diferencias en la producción de PHA (% MSC) entre las distintas concentraciones de NaCl (80, 100 y 120 g/L), se aplicaron análisis estadísticos de un solo factor, siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

1. Diseño experimental:  
Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con tres concentraciones de NaCl. Cada tratamiento se realizó en triplicado biológico, y se midió el contenido de PHA en cada réplica a diferentes tiempos del cultivo.
2. Cálculo de medidas centrales y dispersión:  
Los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar (DE) de los tres replicados biológicos para cada tratamiento, calculados a partir de los valores de PHA en mg y expresados como porcentaje respecto a la MSC.
3. Análisis de varianza (ANOVA):  
Se aplicó un ANOVA de un factor para determinar si existían diferencias significativas en el rendimiento de PHA entre los tres tratamientos de NaCl.
4. Prueba de Tukey:  
Cuando el ANOVA indicó diferencias significativas, se realizó la prueba de Tukey para identificar qué tratamientos difieren entre sí.
  - Se consideraron todas las comparaciones posibles entre los tres tratamientos ( $k = 3$ )
  - Grados de libertad:  $gl = 6$  (dentro de grupos)
  - Se reportó la diferencia de medias, el valor  $q$  calculado, el  $q$  crítico, el  $p$  ajustado y si la diferencia fue significativa.
  - Esta prueba permitió determinar de manera precisa qué concentraciones de NaCl promovieron un aumento significativo en la producción de PHA.

Los datos de ANOVA y de la prueba de Tukey se incluyen en los anexos (**Tabla 4A y 5A**), con tablas completas que permiten al lector verificar las diferencias estadísticas y la significancia de los resultados.

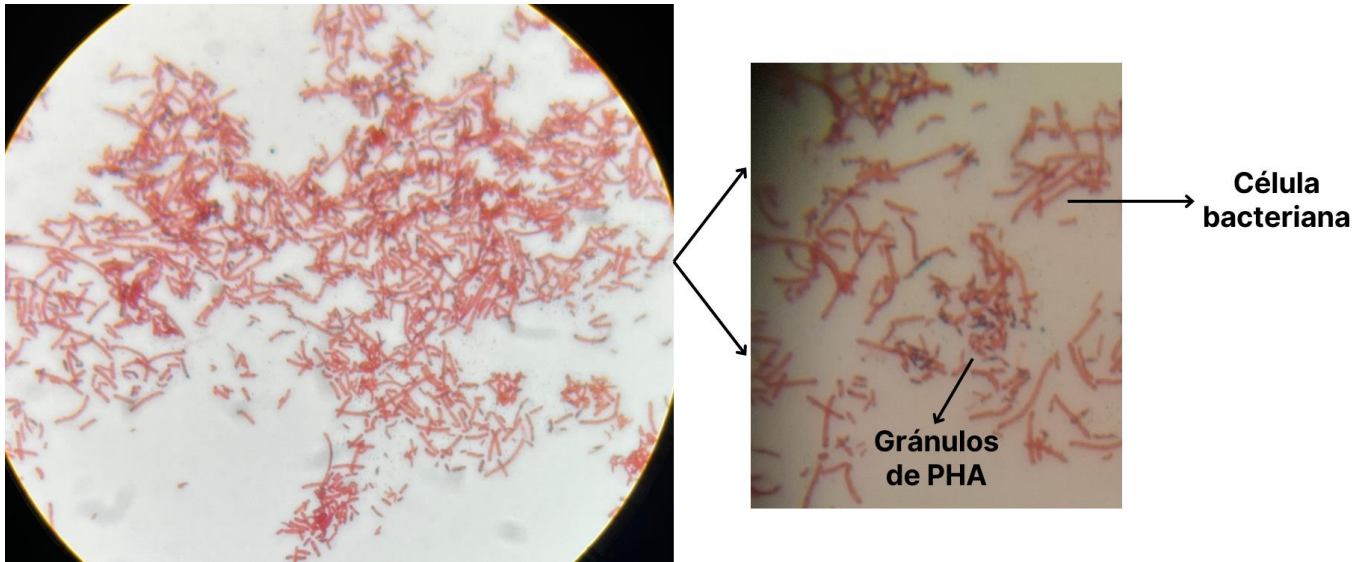
## Capítulo 5: Resultados y discusión

### 5.1 Visualización intracelular de gránulos de PHA mediante tinción con negro Sudán

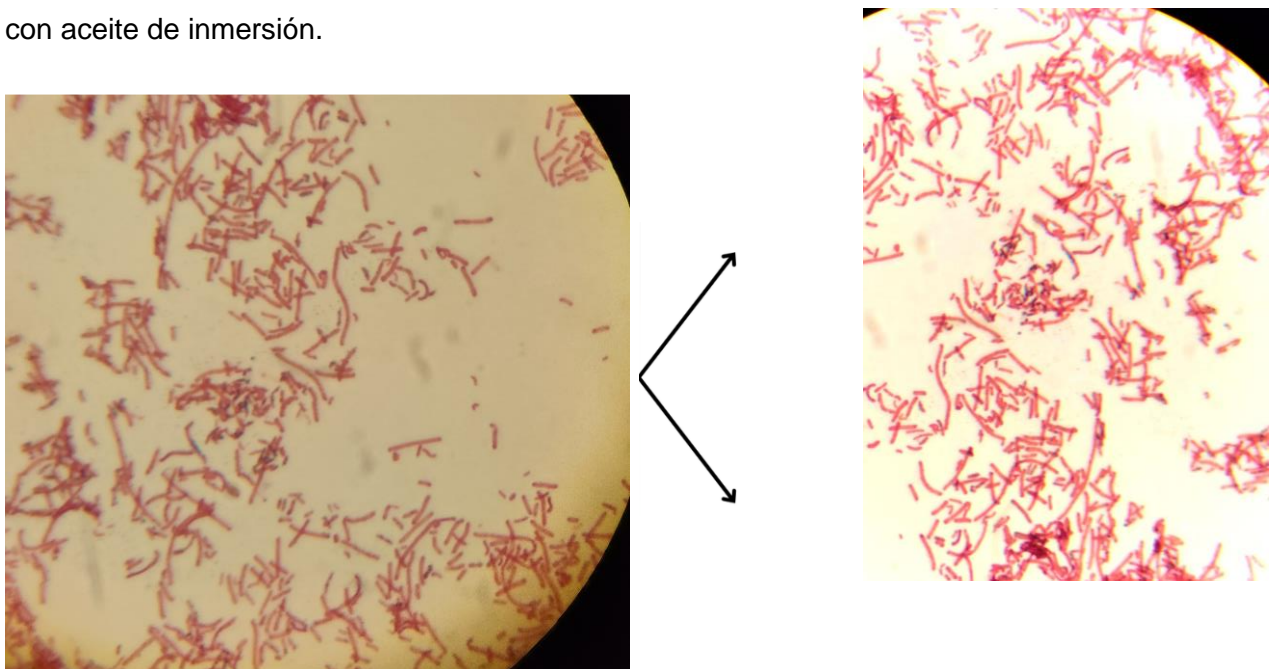
La tinción con negro Sudán permitió confirmar de forma cualitativa la acumulación intracelular de polihidroxicanoatos en células de *Vreelandella venusta Hven10* cultivadas en diferentes concentraciones de NaCl (80, 100 y 120 g/L). En las preparaciones observadas en el microscopio óptico con objetivo de inmersión (100 X), los gránulos de PHA se visualizaron como inclusiones esféricas de color morado oscuro, distribuidas principalmente en el citoplasma de las células. En contraste, el cuerpo celular mostró una coloración rosada clara producto del contraste generado por la safranina. Esta diferenciación permitió una observación clara de los acúmulos intracelulares, que variaron en número e intensidad de tinción entre diferentes muestras, sugiriendo un patrón dependiente de la fase de crecimiento y de las diferentes condiciones salinas del medio de cultivo (**Figuras 2-4**).

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Ortiz (2009) citado por Blanco (2010) y Salinas et al., (2014), quienes señalan que el negro Sudán posee alta afinidad por polímeros de reserva como el PHB, permitiendo una identificación rápida de su presencia en el interior celular. Asimismo, la intensidad de la tinción observada en este estudio fue más pronunciada en las muestras obtenidas en etapas avanzadas de la cinética de crecimiento, lo que coincide con los reportes que asocian la acumulación de PHA con condiciones de estrés nutricional, como la limitación de nitrógeno o fósforo en presencia de una fuente de carbono en exceso (Obruca et al., 2015a; Obruca et al., 2016a).

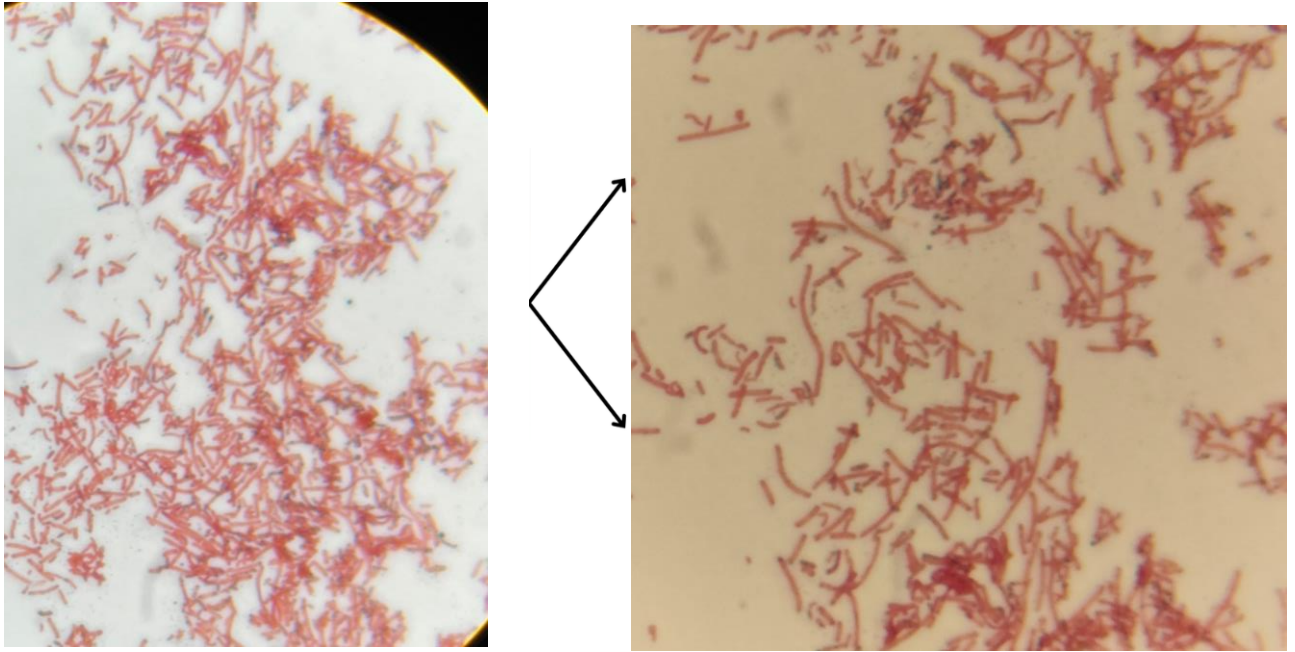
Aunque la técnica no permite una cuantificación precisa, la presencia clara y consistente de gránulos teñidos refuerza la evidencia de que *V. venusta Hven10* es capaz de acumular PHA en condiciones controladas de laboratorio. Estos resultados fueron complementados posteriormente mediante análisis cuantitativos y espectroscópicos, lo que permitió confirmar la identidad y naturaleza de los polímeros observados.



**Figura 2.** Visualización de gránulos intracelulares de PHA en *V. venusta Hven10* cultivada con 80 g/L de NaCl, mediante tinción con negro Sudán. Se observan inclusiones de color morado oscuro correspondientes a PHA, y células teñidas de rosado. Observación a 100 X con aceite de inmersión.



**Figura 3.** Visualización de gránulos intracelulares de PHA en *V. venusta Hven10* cultivada con 100 g/L de NaCl, mediante tinción con negro Sudán. Se observan inclusiones de color morado oscuro correspondientes a PHA, y células teñidas de rosado. Observación a 100 X con aceite de inmersión.

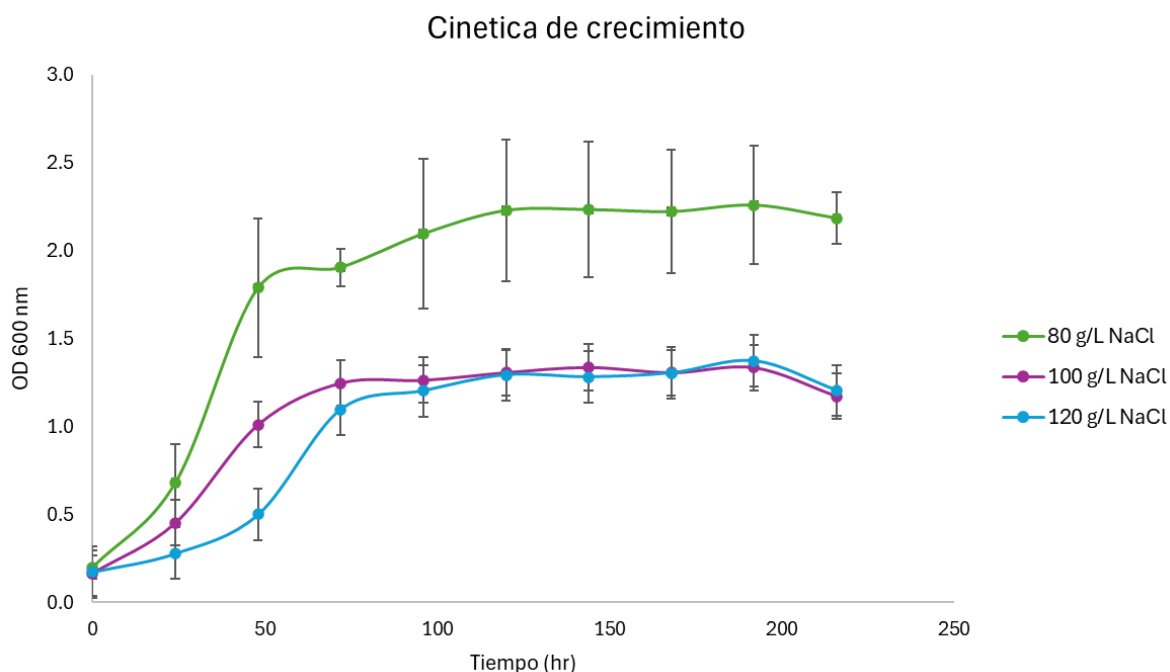


**Figura 4.** Visualización de gránulos intracelulares de PHA en *V. venusta Hven10* cultivada con 120 g/L de NaCl, mediante tinción con negro Sudán. Se observan inclusiones de color morado oscuro correspondientes a PHA, y células teñidas de rosado. Observación a 100 X con aceite de inmersión.

## 5.2 Cinética de crecimiento de *Vreelandella venusta Hven10* bajo diferentes concentraciones de NaCl

Con el objetivo de evaluar el comportamiento del crecimiento bacteriano bajo distintas condiciones de salinidad, se determinó la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) de *V. venusta Hven10* cultivada con 80, 100 y 120 g/L de NaCl.

La **Figura 5** muestra la cinética de crecimiento obtenida a partir de la medición de la densidad óptica a 600 nm durante 216 horas de cultivo. Se observó un incremento sostenido en la biomasa celular hasta alcanzar la fase estacionaria, siendo más pronunciado en el tratamiento con 80 g/L de NaCl.



**Figura 5.** Cinética de crecimiento de *V. venusta Hven10* cultivada bajo diferentes concentraciones de NaCl (80, 100 y 120 g/L). Los valores representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas independientes.

Los valores de los parámetros cinéticos derivados de estas curvas se presentan en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Parámetros cinéticos de crecimiento de *V. venusta Hven10* a diferentes concentraciones de NaCl.

NaCl (g/L)	$\mu$ (OD) (1/h)	td (OD) (h)
80	0.051	32.37
100	0.042	32.82
120	0.033	24.32

Se observó que la mayor tasa de crecimiento específico ( $\mu = 0.051 \text{ h}^{-1}$ ) se registró a 80 g/L de NaCl, indicando que esta concentración fue la más favorable para la división celular. Conforme se incrementó la salinidad, la  $\mu$  disminuyó progresivamente (0.042 y  $0.033 \text{ h}^{-1}$  para 100 y 120 g/L, respectivamente). Aunque el tiempo de duplicación a 120 g/L mostró un valor aparentemente menor, esto podría atribuirse a diferencias en la fase exponencial observada en la curva de crecimiento, más que a un incremento real en la tasa de replicación.

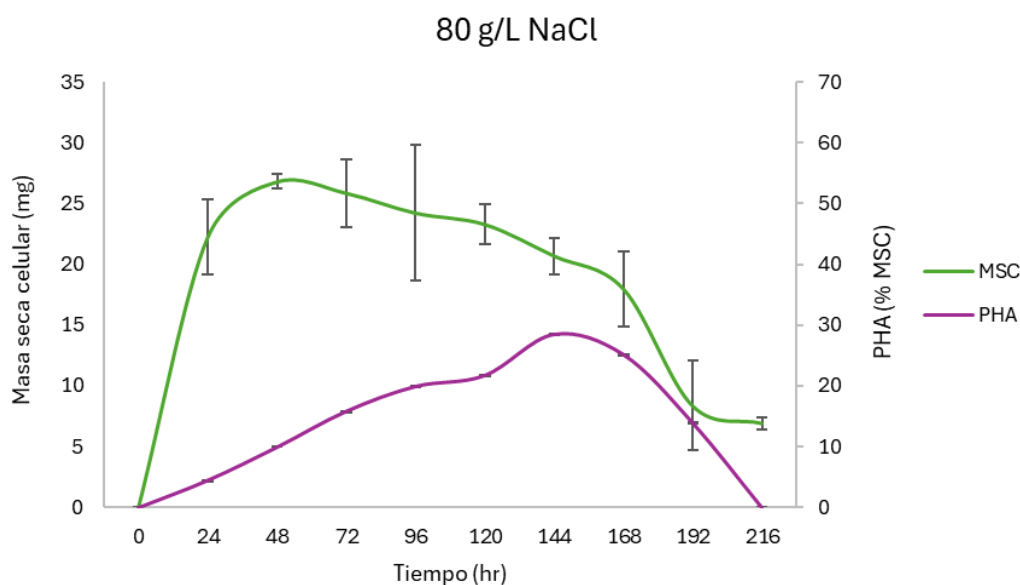
Este comportamiento es característico de bacterias halófilas moderadas, en las cuales el aumento de la concentración salina genera un estrés osmótico que afecta procesos fisiológicos como la captación de nutrientes, la actividad enzimática y la integridad de la membrana celular (Oren, 2011). Ante este tipo de estrés, las células tienden a redirigir el flujo metabólico hacia la síntesis de compuestos de reserva como los polihidroxicanoatos, que funcionan como mecanismos de protección y almacenamiento energético (Madison y Huisman, 1999; Chen y Jiang, 2018).

Por tanto, la determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento no solo permite comprender el comportamiento fisiológico de la cepa *V. venusta Hven10* bajo diferentes condiciones de salinidad, sino también identificar las condiciones óptimas para la etapa de producción de biomasa y la posterior inducción de PHA. En este sentido, conocer la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) es fundamental para definir el momento apropiado de transición entre la fase de crecimiento activo y la fase de acumulación de biopolímero, lo que resulta clave para el diseño y optimización de procesos biotecnológicos a escala mayor.

### 5.3 Cuantificación de rendimiento (% PHA/MSC)

En los cultivos con 80 g/L de NaCl (**Figura 6**), *Vreelandella venusta Hven10* mostró un crecimiento progresivo desde las primeras 24 horas, alcanzando una densidad óptica máxima de  $2.23 \pm 0.39$  a las 144 horas. La acumulación de PHA inició a las 24 horas con  $1.0 \pm 0.10$  mg y se incrementó de manera sostenida hasta un máximo de  $5.9 \pm 0.20$  mg a las 144 horas, lo que correspondió a un rendimiento de 28.50% respecto a la MSC y una concentración equivalente de  $0.59 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de PHA producido bajo esta concentración de NaCl (**Tabla 6**). Posteriormente, se observó una disminución tanto en el contenido de biomasa como en la concentración de PHA, reduciéndose hasta valores nulos a las 216 horas. Este comportamiento puede atribuirse a una preferencia metabólica de la cepa hacia el crecimiento celular más que al almacenamiento de polímero, lo que ha sido descrito previamente en otros halófilos moderados cuando las condiciones no inducen suficiente estrés osmótico (Obruca et al., 2016a).

El rendimiento de PHA en este tratamiento formó parte del análisis de varianza (ANOVA), donde se detectaron diferencias significativas entre los tres niveles de NaCl ( $F = 6.33$ ,  $p = 0.030$ ). La prueba de Tukey indicó que la producción de PHA con 80 g/L no difiere significativamente del tratamiento con 100 g/L ( $p$  ajustada = 0.082), pero sí es significativamente menor que la alcanzada con 120 g/L ( $p$  ajustada = 0.012). Los estadísticos se encuentran en el apartado Anexos (**Tabla 4A y Tabla 5A**).

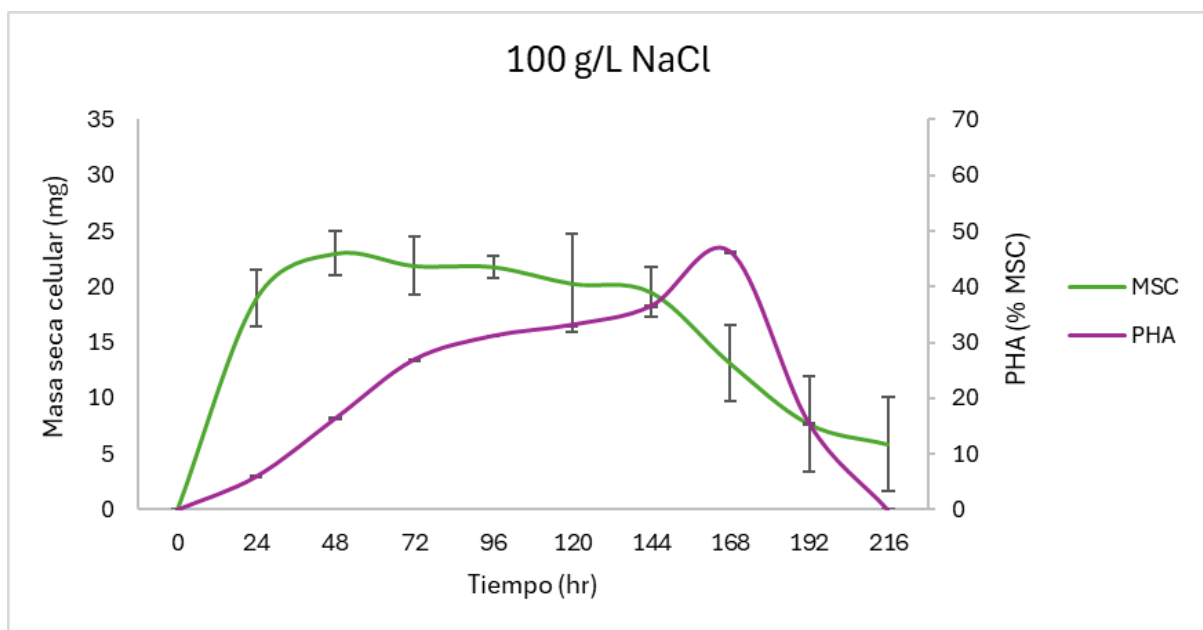


**Figura 6.** Cinética de crecimiento y producción de PHA por *V. venusta Hven10* con 80 g/L de NaCl. Los datos experimentales se encuentran en el apartado Anexos (**Tabla 1A**).

En los cultivos con 100 g/L de NaCl (**Figura 7**), *Vreelandella venusta Hven10* presentó un crecimiento progresivo hasta alcanzar una densidad óptica máxima de  $1.34 \pm 0.46$  a las 144 horas. La MSC se incrementó rápidamente en las primeras 48 horas, con un máximo de 23.0 mg, y posteriormente se mantuvo relativamente estable hasta las 120 horas, seguida de una reducción gradual hacia  $5.9 \pm 0.004$  mg al final del cultivo (216 h). La producción de PHA se inició a las 24 horas con  $1.13 \pm 0.06$  mg y aumentó de manera sostenida hasta alcanzar un máximo de  $7.1 \pm 0.25$  mg a las 144 horas, lo que correspondió al mayor rendimiento observado en esta condición (46.33% respecto a la MSC). Cabe destacar que, aunque el contenido de biomasa disminuyó significativamente después de las 168 horas, el porcentaje relativo de PHA alcanzó hasta 46.33% en ese mismo punto y una concentración final de  $0.61 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de PHA,

sugiriendo una alta acumulación intracelular del polímero bajo condiciones de estrés. Posteriormente, tanto la biomasa como el contenido de PHA decrecieron hasta valores nulos a las 216 horas. Esto sugiere que esta salinidad representa un punto de transición entre el crecimiento celular activo y la inducción del metabolismo de almacenamiento, compatible con lo reportado para *Vreelandella boliviensis* y *Halomonas campaniensis* en condiciones similares (Quillaguamán et al., 2010; Strazzullo et al., 2008a).

Desde un enfoque estadístico, el rendimiento de PHA con 100 g/L no presentó diferencias significativas respecto al tratamiento de 80 g/L ( $p$  ajustada = 0.082) ni al de 120 g/L ( $p$  ajustada = 0.079), lo que indica que, aunque se observa un aumento en el contenido relativo de PHA, esta diferencia no es estadísticamente significativa según la prueba de Tukey. Los estadísticos se encuentran en el apartado Anexos (**Tabla 4A y Tabla 5A**).

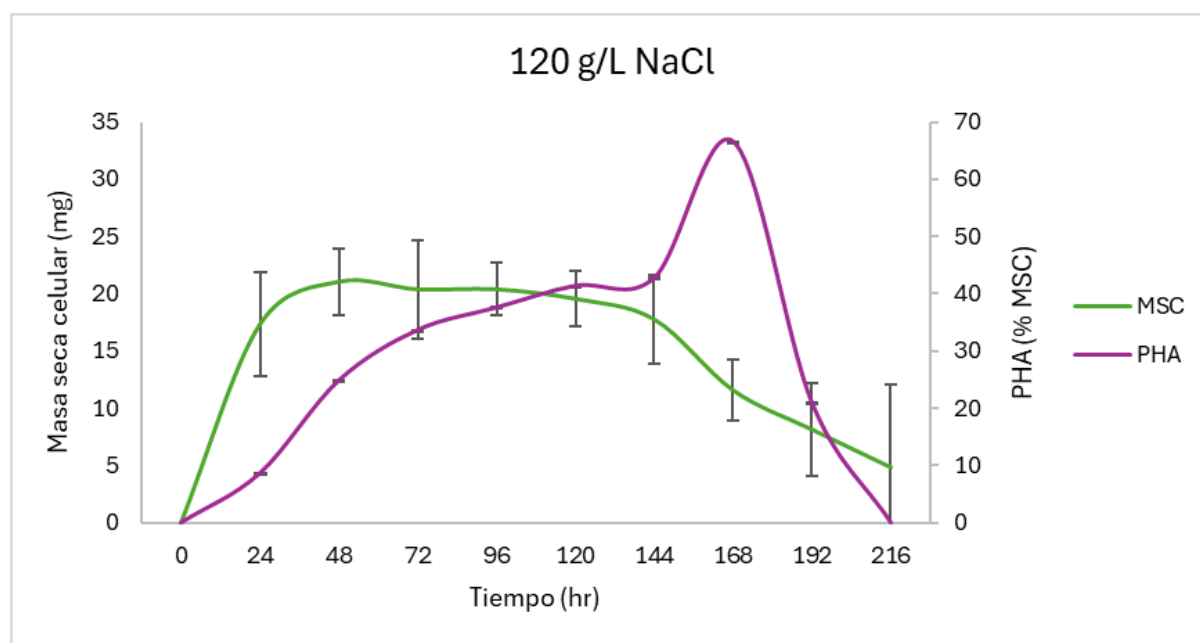


**Figura 7.** Cinética de crecimiento y producción de PHA por *V. venusta Hven10* con 100 g/L de NaCl. Los datos experimentales se encuentran en el apartado Anexos (**Tabla 2A**).

En los cultivos con 120 g/L de NaCl (**Figura 8**), *Vreelandella venusta Hven10* mostró un crecimiento más lento en las primeras 48 horas, alcanzando una OD600 de  $0.50 \pm 0.01$ , pero posteriormente se incrementó de manera sostenida hasta un máximo de

$1.37 \pm 0.32$  a las 192 horas. La MSC alcanzó su mayor valor temprano, con 21.1 mg a las 48 horas, manteniéndose estable alrededor de 20 mg hasta las 120 horas, antes de decrecer paulatinamente hasta  $4.8 \pm 0.007$  mg al final del cultivo (216 h). La producción de PHA inició a las 24 horas con  $1.5 \pm 0.10$  mg y presentó un incremento continuo hasta alcanzar su máximo a las 168 horas con  $7.7 \pm 0.36$  mg, equivalente a 66.57% de la MSC y una producción equivalente a  $0.77 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de PHA lo que evidencia una fuerte acumulación intracelular del polímero en condiciones de alta salinidad y posible estrés celular.

El tratamiento con 120 g/L de NaCl mostró un rendimiento de PHA significativamente mayor que el tratamiento de 80 g/L (diferencia de medias = 0.0403, p ajustada = 0.012), mientras que no difirió significativamente del tratamiento de 100 g/L (p ajustada = 0.079), según la prueba de Tukey Los estadísticos se encuentran en el apartado Anexos (**Tabla 4A y Tabla 5A**).

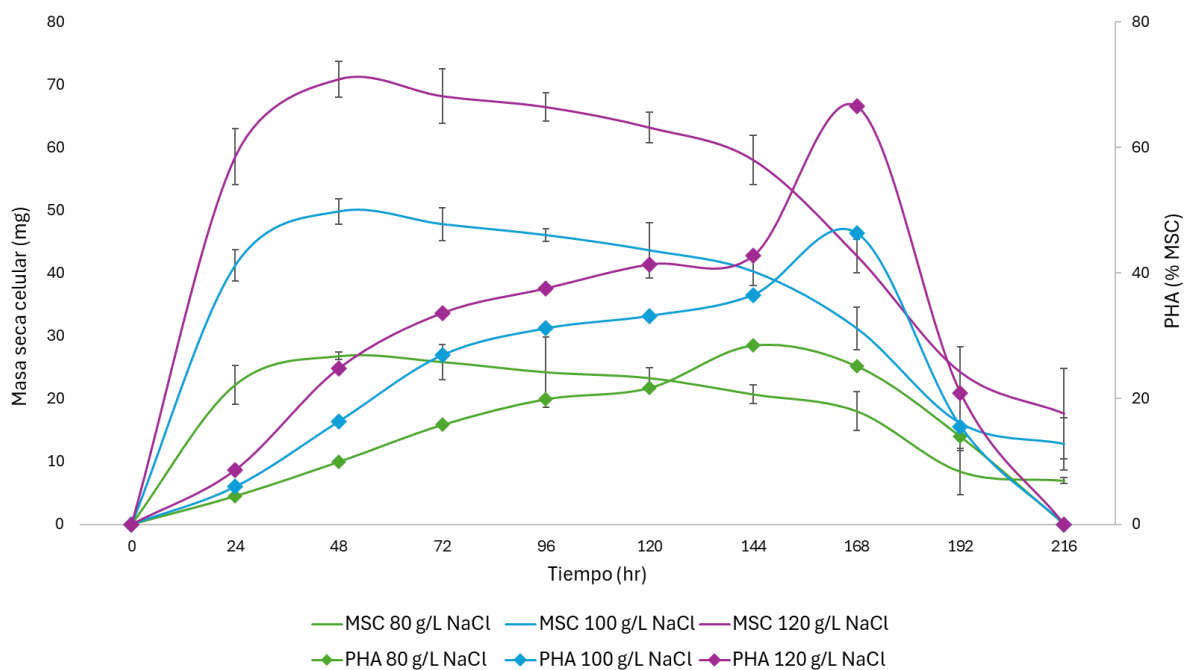


**Figura 8.** Cinética de crecimiento y producción de PHA por *V. venusta Hven10* con 120 g/L de NaCl. Los datos experimentales se encuentran en el apartado Anexos (**Tabla 3A**).

La comparación entre las tres condiciones salinas (**Figura 9**) revela que el rendimiento de PHA respecto a MSC fue significativamente mayor en la condición de 120 g/L de NaCl, alcanzando un máximo de 66.57%, seguido por 100 g/L (46.33%) y

finalmente 80 g/L (28.50%). El análisis de varianza (ANOVA) confirmó diferencias significativas entre los tratamientos ( $F = 6.33$ ,  $p = 0.030$ ). La prueba post hoc de Tukey indicó que la diferencia significativa se presentó únicamente entre los tratamientos de 80 g/L y 120 g/L ( $p$  ajustada = 0.012), mientras que las comparaciones entre 80 g/L y 100 g/L ( $p$  ajustada = 0.082), así como entre 100 g/L y 120 g/L ( $p$  ajustada = 0.079), no fueron significativas (Los estadísticos se encuentran en el apartado Anexos **Tabla 4A y Tabla 5A**).

Esta tendencia sugiere que concentraciones elevadas de NaCl no sólo son toleradas por *Vreelandella venusta Hven10*, sino que promueven la biosíntesis y acumulación de PHA, posiblemente como mecanismo de adaptación al estrés osmótico.



**Figura 9.** Comparación de la acumulación de PHA en *V. venusta Hven10* cultivada a diferentes concentraciones de NaCl (80, 100 y 120 g/L) durante una cinética de 216 h. Se representa el porcentaje de PHA respecto a la masa seca celular (% PHA/MSC) a lo largo del tiempo.

**Tabla 6.** Rendimiento de polihidroxicanoatos (PHA) por *V. venusta Hven10* en función de la concentración de NaCl. Los valores de PHA (% MSC) representan el contenido máximo de polímero acumulado respecto a la masa seca celular. La concentración de PHA ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) se calculó a partir de la cantidad total de PHA obtenida en 10 mL de cultivo.

NaCl (g/L)	PHA (%MSC)	PHA ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
80	28.50	0.59
100	46.33	0.61
120	66.57	0.77

El aumento significativo en la acumulación de PHA observado a alta salinidad (120 g/L de NaCl) en *V. venusta Hven10* puede atribuirse a varios mecanismos fisiológicos interconectados. En primer lugar, la respuesta al estrés osmótico bajo condiciones hipersalinas induce la acumulación de solutos compatibles y compuestos de almacenamiento energético; los gránulos de PHA desempeñan así una doble función como depósitos de carbono/energía y como amortiguadores osmóticos, protegiendo la integridad celular. En segundo lugar, se ha documentado una redirección del flujo metabólico del carbono desde rutas de crecimiento hacia la biosíntesis de PHA en bacterias halófilas sometidas a estrés, lo cual reduce la presión redox intracelular y mejora la eficiencia energética (Dutta y Bandopadhyay 2022). Finalmente, el incremento en la demanda de ATP necesaria para mantener la homeostasis iónica en medios hipersalinos podría promover la síntesis de PHA como un mecanismo eficiente de almacenamiento de energía y balance redox (Santana-Morales et al., 2022).

Asimismo, se evidenció que la producción de biomasa máxima no necesariamente coincide con la máxima acumulación de PHA, lo que respalda la idea de que la síntesis de PHA es un proceso inducido en fases estacionarias o post exponenciales, asociado con la limitación de nutrientes esenciales no carbonados. En conjunto, la combinación de exceso de carbono y estrés osmótico favorece la acumulación de PHA como estrategia metabólica adaptativa frente a la hipersalinidad.

En este sentido, la comparación mostrada en la **Tabla 7** evidencia que *V. venusta Hven10* alcanzó uno de los porcentajes más altos de acumulación de PHB (66.57%) reportados entre bacterias halófilas, incluso superior al de *Halomonas elongata* 2FF

(40%) cultivada a 100 g/L de NaCl (Cristea et al., 2018) y comparable con *H. halophila* CCM 3662 y *Halomonas* TD01, ambas cultivadas a 60 g/L de NaCl (Kucera et al., 2018; Tan et al., 2011). Esta capacidad de mantener una elevada acumulación de PHA a una salinidad extrema (120 g/L) sugiere que *V. venusta Hven10* posee una tolerancia osmótica intrínseca y una eficiente adaptación metabólica, posicionándola como un modelo halófilo prometedor para la producción biotecnológica de PHA bajo condiciones de alta salinidad.

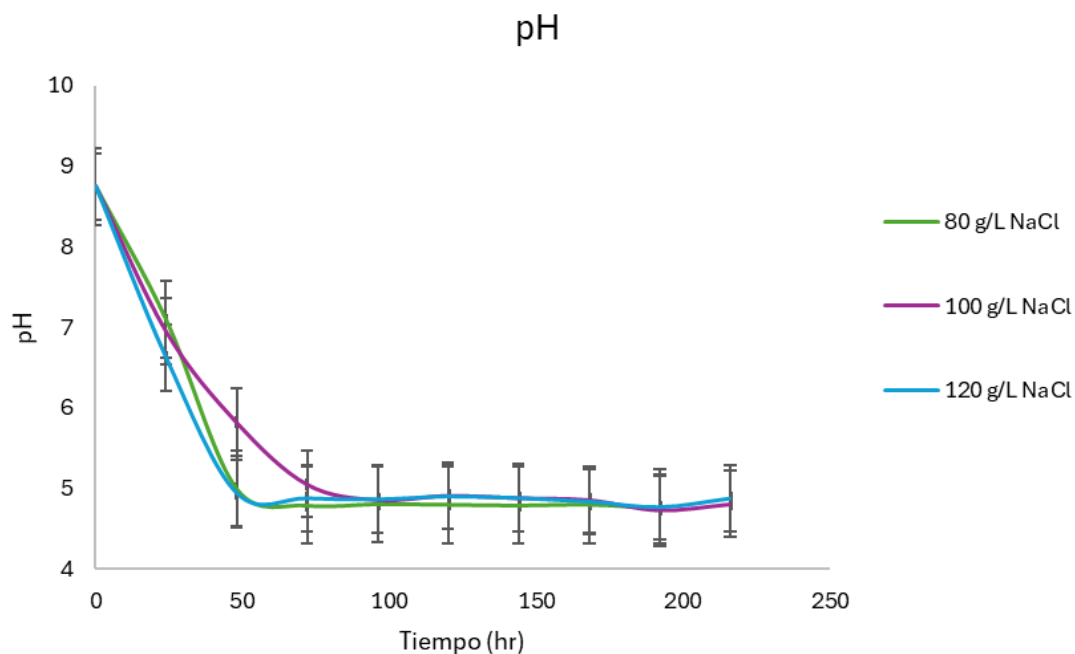
**Tabla 7.** Comparación de la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) por bacterias halófilas en diferentes concentraciones de NaCl reportadas en la literatura y por *V. venusta Hven10* en este estudio.

Microorganismo (cepa)	Tipo de PHA	PHA/MSC (%)	Contenido de PHA (g/L)	Fuente de carbono	Salinidad (NaCl g/L)	Referencia
<i>Vreelandella venusta Hven10</i>	PHB	66.57	0.77	Glucosa	120	Este estudio
<i>Halomonas elongata 2FF</i>	PHB	40.00	0.95	Glucosa	100	Cristea et al., 2018
<i>Halomonas halophila CCM 3662</i>	PHB	72.01	3.68	Glucosa	60	Kucera et al., 2018
<i>Halomonas TD01</i>	PHB	69.00	4.14	Glucosa	60	Tan et al., 2011
<i>Halomonas elongata DSM 2581</i>	PHB	32.00	2.2	Glucosa	10	Ilham et al., 2014
<i>Halomonas boliviensis LC1</i>	PHB	58.80	0.55	Maltosa	45	Quillaguaman et al., 2005
<i>Cobetia marina DSM 4741<sup>T</sup></i>	PHB	61.00	2.4	Glucosa + Acetato	12.9	Christensen et al., 2021

## 5.4 Seguimiento del pH durante la cinética de cultivo

El monitoreo del pH en cultivos biotecnológicos representa una herramienta clave para comprender el metabolismo celular y los procesos de transformación de sustratos durante el crecimiento microbiano. En este estudio, el comportamiento del pH fue registrado durante 216 horas de cultivo en medio HM2 suplementado con 80, 100 y 120 g/L de NaCl, partiendo de un pH inicial alcalino de 8.75 en todos los tratamientos.

De manera general, en los tres cultivos se observó una disminución sostenida del pH durante las primeras 72 horas, seguido por una tendencia a la estabilización entre 96 y 216 horas, con valores que oscilaron entre 4.74 y 4.90 (**Figura 10**). En las tres condiciones evaluadas (80, 100 y 120 g/L de NaCl), el pH presentó un comportamiento similar, alcanzando su valor mínimo (4.76 - 4.77) a las 192 horas y manteniéndose estable en esa etapa, sin observarse recuperación hacia el pH inicial en ninguno de los tratamientos.



**Figura 10.** Evolución del pH durante la cinética de crecimiento de *V. venusta Hven10* cultivada con diferentes concentraciones de NaCl (80, 100 y 120 g/L). Los datos del seguimiento de pH se encuentran en el apartado Anexos (**Tabla 6A**).

La disminución progresiva del pH observada durante la cinética de cultivo en los tres tratamientos salinos puede explicarse a partir del metabolismo central de la glucosa como fuente principal de carbono. En condiciones aerobias y con alta disponibilidad de glucosa, *Vreelandella venusta Hven10* metaboliza este azúcar mediante las rutas glucolíticas clásicas (Embden-Meyerhof-Parnas) y la ruta de las pentosas fosfato, produciendo piruvato, que es convertido en acetil-CoA. Este intermediario puede seguir diferentes rutas metabólicas, incluyendo la producción de ATP por el ciclo de Krebs y la biosíntesis de PHA como producto de almacenamiento.

Durante este proceso, especialmente bajo exceso de carbono y/o limitación de nitrógeno o fósforo, una porción significativa del flujo de carbono puede desviarse hacia la producción de metabolitos ácidos (por ejemplo ácidos acético, láctico o succínico) — un fenómeno que se observa tanto en sistemas fermentativos anaerobios como en cultivos aerobios sobrecargados o con estrés metabólico — lo cual conduce a la acidificación progresiva del medio (Anderson y Dawes, 1990; Obruca et al., 2015b). En particular, en condiciones anaerobias la formación de ácidos orgánicos es un mecanismo clásico de regeneración de  $\text{NAD}^+$  y generación de ATP por fermentación, lo que favorece la acidificación del medio (Abedi y Hashemi, 2020; Zhao et al., 2024).

Esta acidificación también puede estar asociada a un desequilibrio entre la velocidad con que las células captan y metabolizan la glucosa y la capacidad del sistema respiratorio para oxidar los equivalentes reducidos (NADH) generados. Cuando el flujo de carbono hacia la glucólisis es alto, pero la cadena respiratoria no logra reoxidar el NADH con la misma eficiencia — ya sea por limitaciones en oxígeno disuelto, estrés osmótico o saturación enzimática —, el exceso de poder reductor se disipa mediante rutas alternas que producen metabolitos ácidos y liberan protones al medio. Este proceso contribuye de manera significativa a la acidificación progresiva del cultivo (Obruca et al., 2015b).

En el caso de bacterias halófilas, como *Halomonas spp.*, esta acidificación del medio es un fenómeno común reportado durante cultivos en exceso de glucosa, y se ha asociado con un cambio metabólico hacia la síntesis de compuestos de almacenamiento como el PHB (Quillaguamán et al., 2010). A medida que disminuye la disponibilidad de nutrientes esenciales como el nitrógeno o el fósforo, pero se

mantiene el suministro de carbono, las bacterias redirigen su metabolismo hacia la producción de PHA como una estrategia de supervivencia y balance redox. Esta conversión de acetil-CoA a PHB ayuda a mitigar la acumulación de NADH, pero no detiene completamente la producción de ácidos secundarios, que contribuyen al descenso del pH.

Finalmente, es importante destacar que el descenso de pH observado durante el cultivo no parece comprometer la viabilidad y actividad metabólica de *Vreelandella venusta Hven10*, entendida como la capacidad de las células para mantenerse activas y continuar dividiéndose a lo largo del tiempo. Esto podría deberse a su tolerancia intrínseca a condiciones ácidas moderadas y a su capacidad para regular el pH intracelular mediante la acumulación de solutos compatibles, como ectoína, lo cual ha sido previamente descrito en otras especies del género *Halomonas* (Sedlacek et al., 2019; Tanne et al., 2014).

## 5.5 Cuantificación de PHA mediante el método del ácido crotónico

El método del ácido crotónico se utilizó para cuantificar el contenido de polihidroxicanoatos en los cultivos de *Vreelandella venusta Hven10* sometidos a diferentes concentraciones de NaCl (80, 100 y 120 g/L) (**Tabla 8**). En este análisis, se tomó una muestra de PHA (mg) correspondiente al polímero previamente extraído y purificado a partir de la biomasa bacteriana, la cual se sometió a digestión con ácido sulfúrico concentrado para inducir la conversión del poli(3-hidroxi-butirato) en ácido crotónico.

La absorbancia medida a 235 nm (OD 235 nm) reflejó la intensidad de dicha conversión, directamente proporcional a la cantidad de PHA presente en la muestra. A partir de esta lectura, se calculó la concentración de PHA (mg/mL) corregido, derivada de la ecuación de la curva de calibración elaborada con estándares de PHB y ajustada considerando el volumen total de reacción. Finalmente, el PHA total (mg) representó la cantidad total del polímero presente en la muestra analizada.

Los resultados obtenidos mostraron que la concentración de NaCl influyó significativamente en la acumulación de PHA. En cultivos con 80 g/L de NaCl se

cuantificaron 27.06 mg de PHA, mientras que con 100 g/L se alcanzaron 28.02 mg de PHA, valores que coincidieron con los incrementos observados en el porcentaje de PHA respecto a la biomasa seca celular (28.50% y 46.33%, respectivamente). En contraste, la condición de 120 g/L de NaCl produjo la mayor acumulación con 43.02 mg de PHA, lo que correspondió con el mayor rendimiento relativo registrado en los experimentos cinéticos bajo esta concentración salina (66.57% respecto a MSC).

Este comportamiento sugiere que el aumento de la salinidad hasta 120 g/L favoreció la acumulación intracelular del polímero, probablemente como respuesta osmótica y de almacenamiento energético, alcanzando valores que se aproximan a la completa sustitución de la biomasa por PHA. Los resultados cuantitativos obtenidos por el método del ácido crotonico son congruentes con los análisis previos de crecimiento, biomasa y rendimiento, confirmando la capacidad de *V. venusta Hven10* para acumular altos niveles de PHA bajo condiciones de estrés salino.

**Tabla 8.** Cuantificación de PHA mediante el método del ácido crotonico. La curva de calibración se encuentra en el apartado Anexos (**Tabla 7A, 8A, Gráfico 1A**).

g/L NaCl	muestra de PHA (mg)	OD 235 nm	PHA (mg/mL) corregido	PHA total (mg)
80	51	0.698	9.02	27.06
100	47	0.727	9.34	28.02
120	44	1.188	14.34	43.02

## 5.6 Caracterización de PHA mediante FTIR

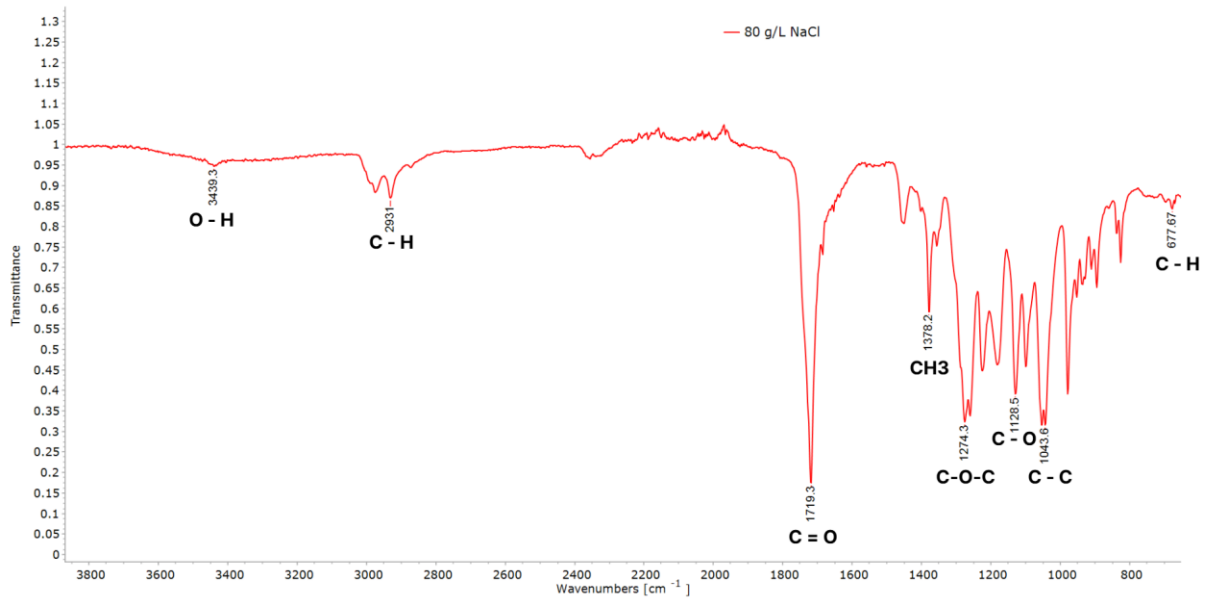
En las **Figuras 11, 12 y 13** se muestran los espectros FTIR obtenidos para los polímeros extraídos de *Vreelandella venusta Hven10* cultivada en medios con 80, 100 y 120 g/L de NaCl, respectivamente.

En todos los espectros, se observó una banda intensa alrededor de  $1720\text{ cm}^{-1}$ , atribuida al estiramiento del grupo carbonilo (C=O) del enlace éster, considerada una

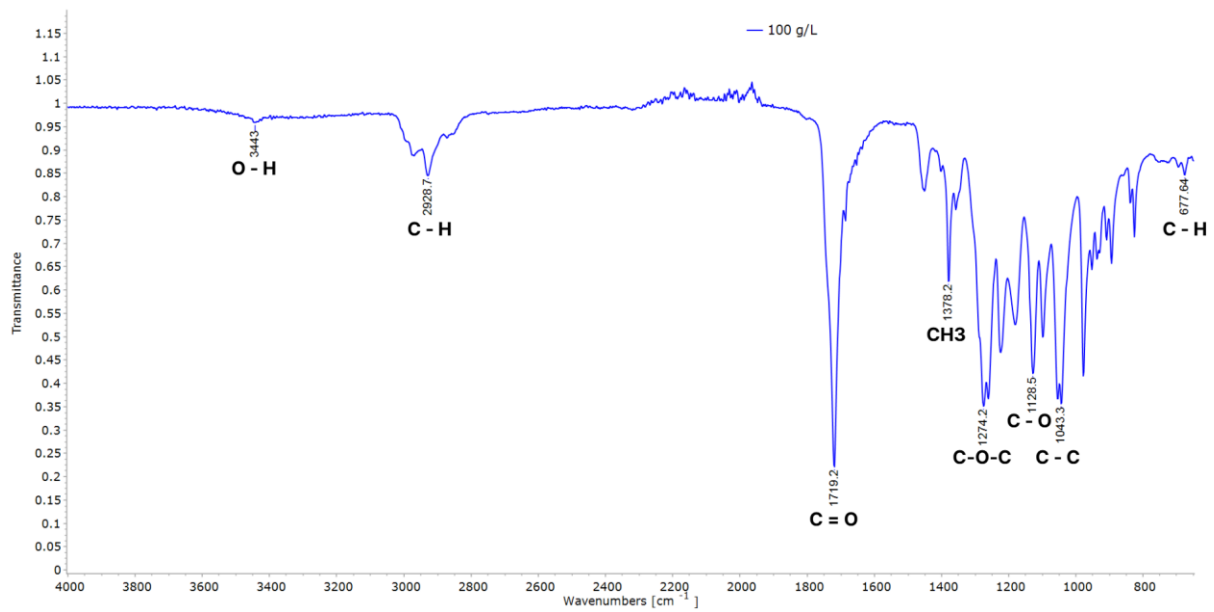
de las señales más distintivas del PHB (Valappil et al., 2007). Asimismo, se detectaron bandas entre  $1275$  y  $1050\text{ cm}^{-1}$  asociadas al estiramiento de enlaces C–O y deformaciones del grupo  $\text{CH}_3$ , típicas de los enlaces éster en los PHA (Zhao et al., 2020). Las señales entre  $2920$ – $2970\text{ cm}^{-1}$  corresponden al estiramiento simétrico y asimétrico de los grupos metilo y metileno ( $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_2$ ), confirmando la naturaleza alifática del polímero (Yasin y Al-Mayaly, 2021).

Los espectros de las muestras experimentales mostraron una alta similitud con el espectro del PHB comercial, lo que sugiere que el polímero producido por *Vreelandella venusta Hven10* corresponde mayoritariamente a PHB. Cabe destacar que la muestra obtenida en  $120\text{ g/L}$  de NaCl presentó una señal más intensa en  $1720\text{ cm}^{-1}$  y mayor resolución en la región de los enlaces C–O.

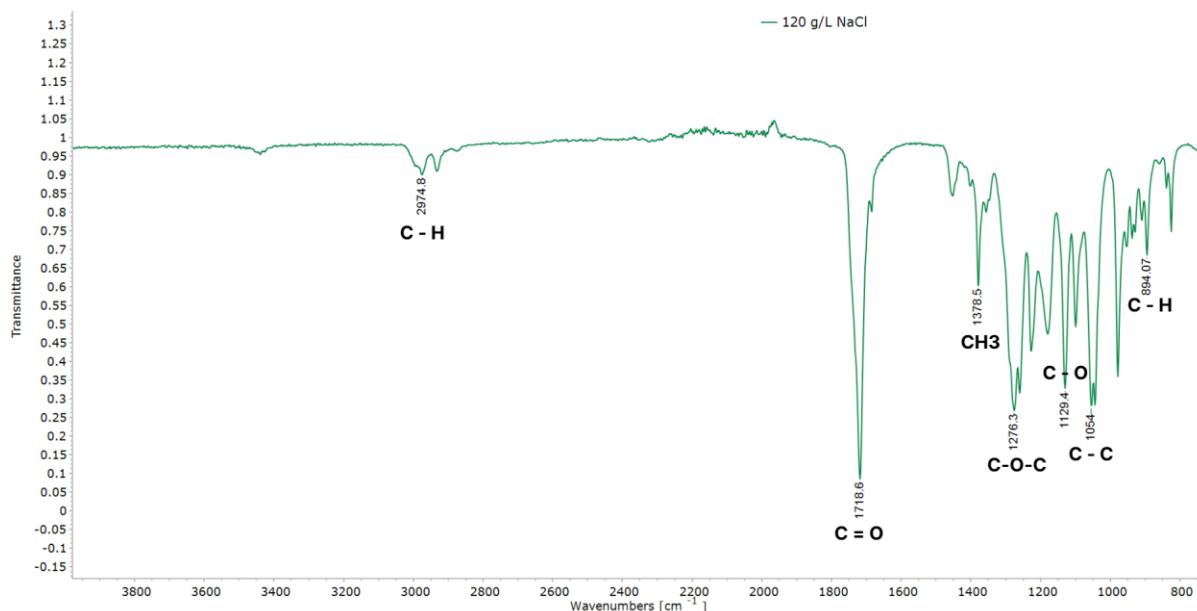
Este patrón espectral concuerda con estudios previos en bacterias halófilas como *Vreelandella boliviensis* (Quillaguamán et al., 2008) y *Halomonas campaniensis* (Strazzullo et al., 2008), que han demostrado la producción de PHB con perfiles FTIR prácticamente idénticos al polímero comercial. Además, se ha documentado que condiciones de estrés salino favorecen la producción de polímeros con una estructura más definida y homogénea (Kannah et al., 2022).



**Figura 11.** Espectro FTIR de PHA extraídos de *V. venusta Hven10* cultivada con 80 g/L de NaCl.



**Figura 12.** Espectro FTIR de PHA extraídos de *V. venusta Hven10* cultivada con 100 g/L de NaCl.

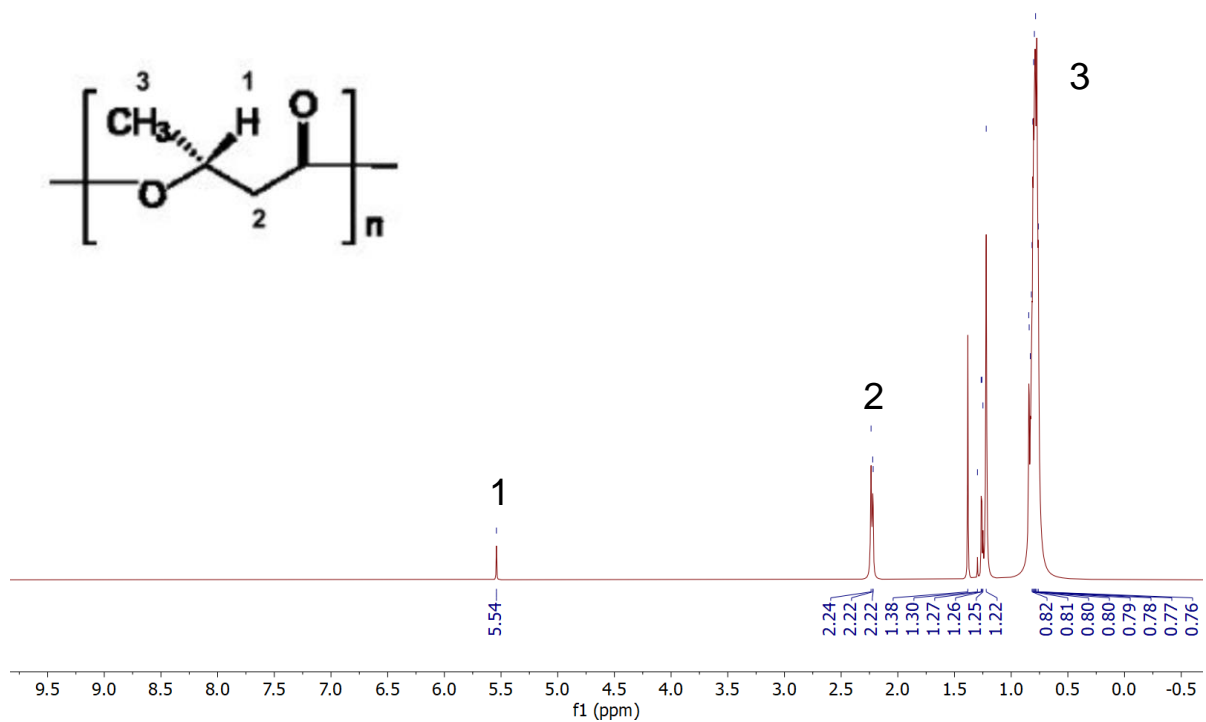


**Figura 13.** Espectro FTIR de PHA extraídos de *V. venusta Hven10* cultivada con 120 g/L de NaCl.

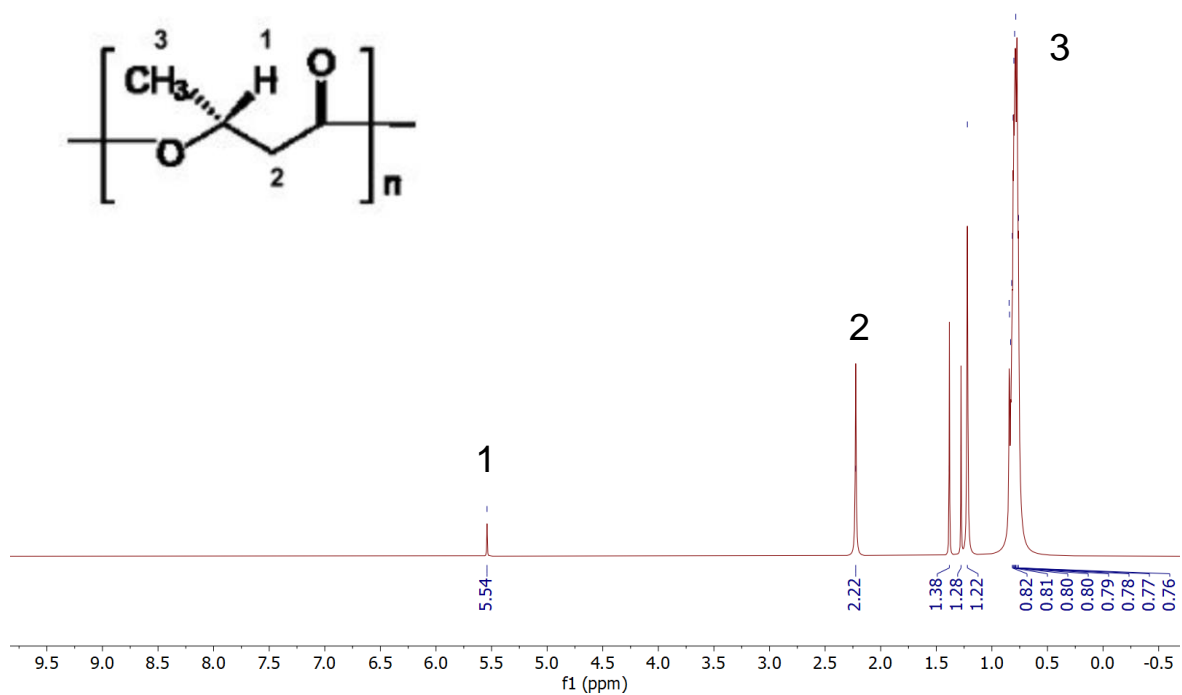
## 5.7 Caracterización de PHA mediante RMN-<sup>1</sup>H

Los espectros obtenidos para los PHA extraídos de cultivos con 80, 100 y 120 g/L de NaCl revelaron señales características de PHB (**Figuras 14-16**), confirmando que el biopolímero sintetizado por la cepa corresponde principalmente a este tipo de homopolímero.

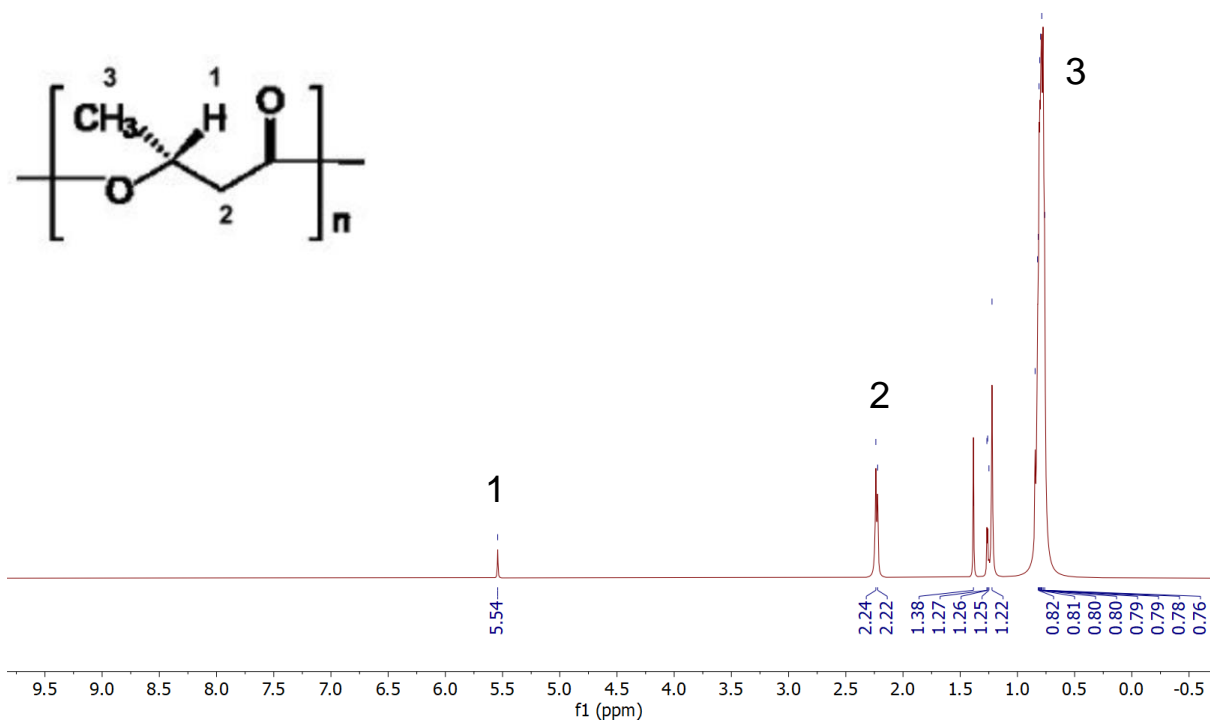
En los tres espectros se observaron señales en  $\delta = 5.25 - 5.27$  ppm, correspondientes al protón metílico (-CH) adyacente al grupo éster, mientras que los protones metilénicos (-CH<sub>2</sub>) y metilos (-CH<sub>3</sub>) aparecen alrededor de  $\delta = 2.4-2.6$  ppm y  $\delta = 1.2-1.3$  ppm, respectivamente. Estos desplazamientos químicos concuerdan con los reportados para PHB en estudios previos (Koller et al., 2010b; López-Cuellar et al., 2011). La ausencia de señales adicionales en la región alifática o aromática sugiere que el producto obtenido no contiene unidades de comonómeros como 3-hidroxivalerato, lo cual indica que se trata de un PHA de cadena corta y específicamente del homopolímero PHB (Nishida et al., 2018).



**Figura 14.** Espectro RMN-<sup>1</sup>H de PHA extraído de *V. venusta* Hven10 cultivada con 80 g/L de NaCl.



**Figura 15.** Espectro RMN-<sup>1</sup>H de PHA extraído de *V. venusta* Hven10 cultivada con 100 g/L de NaCl.

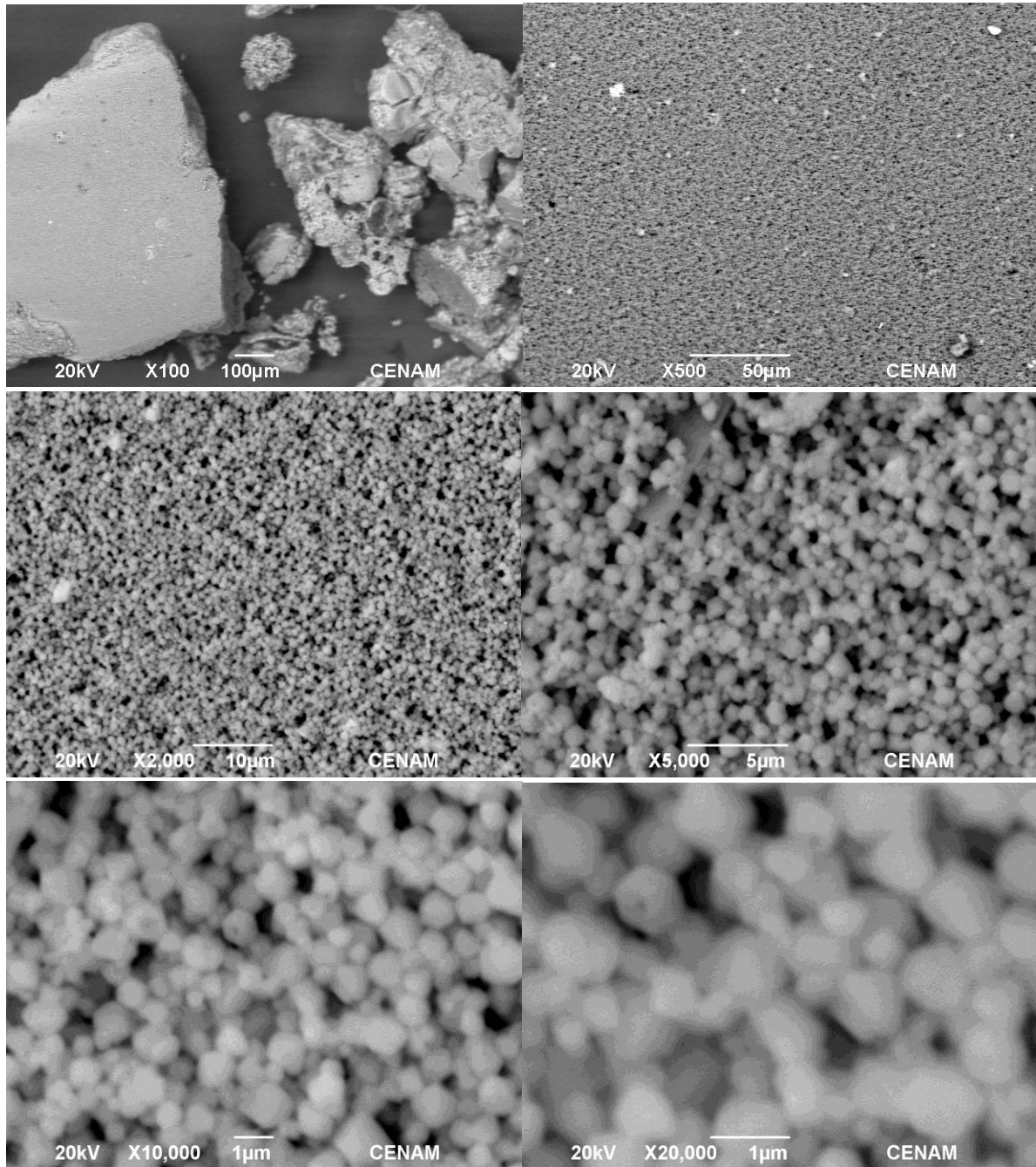


**Figura 16.** Espectro RMN-<sup>1</sup>H de PHA extraído de *V. venusta Hven10* cultivada con 120 g/L de NaCl.

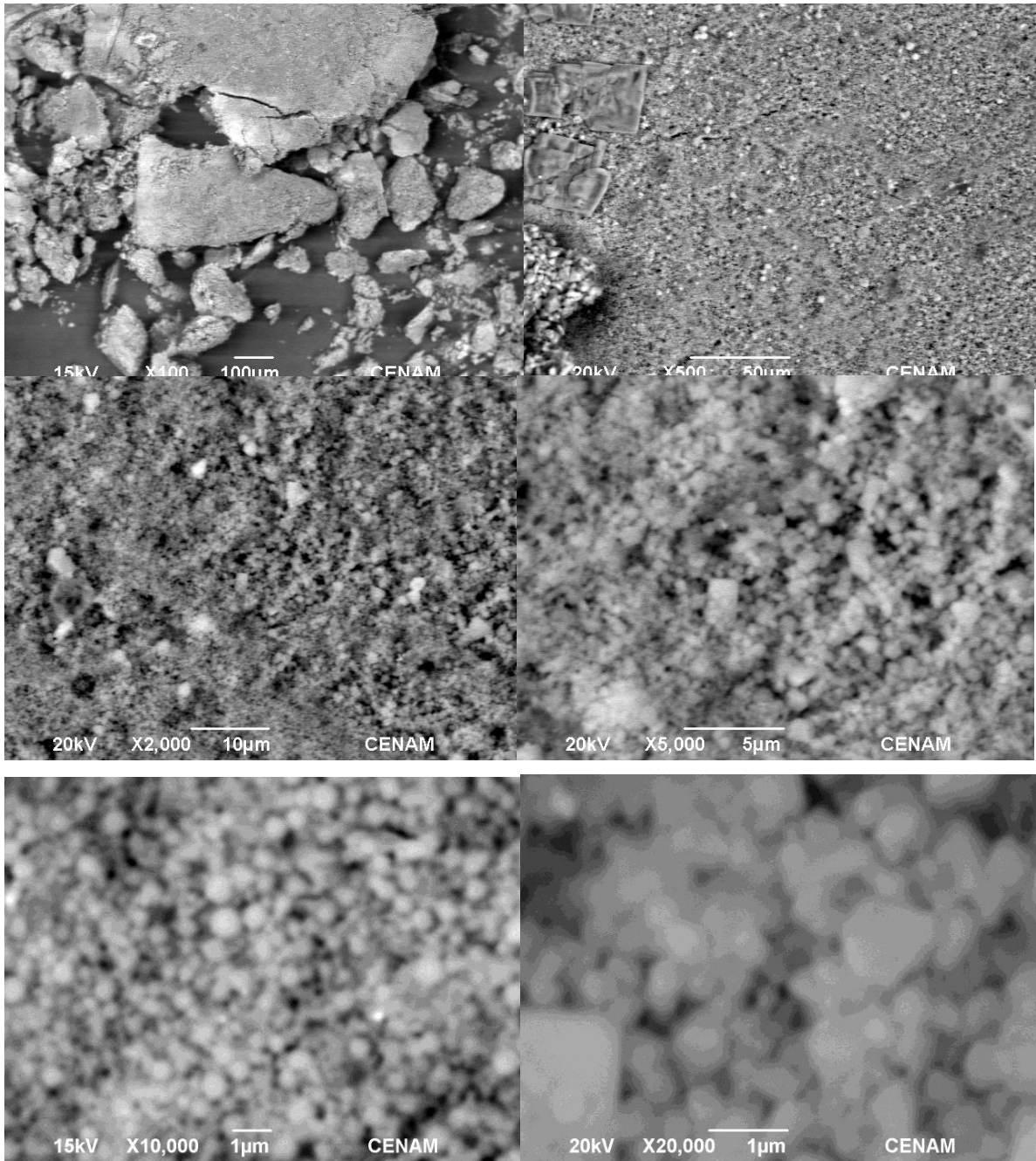
Comparando los espectros de las tres condiciones salinas, no se observaron diferencias en la posición ni en la intensidad relativa de las señales, lo que sugiere que la composición química del polímero fue consistente en todas las condiciones evaluadas. Esto es relevante, ya que, aunque el rendimiento de PHA fue mayor a 120 g/L de NaCl, el tipo de PHA producido permaneció sin cambios estructurales detectables por RMN-<sup>1</sup>H, lo que también ha sido reportado en otros trabajos con bacterias halófilas (Ahn et al., 2000; Khatami et al., 2021).

Estas observaciones confirman que *Vreelandella venusta Hven10* es capaz de sintetizar PHB con alta fidelidad estructural incluso en condiciones de estrés salino, lo cual representa una ventaja en la producción industrial, en donde la consistencia del biopolímero es un factor clave.

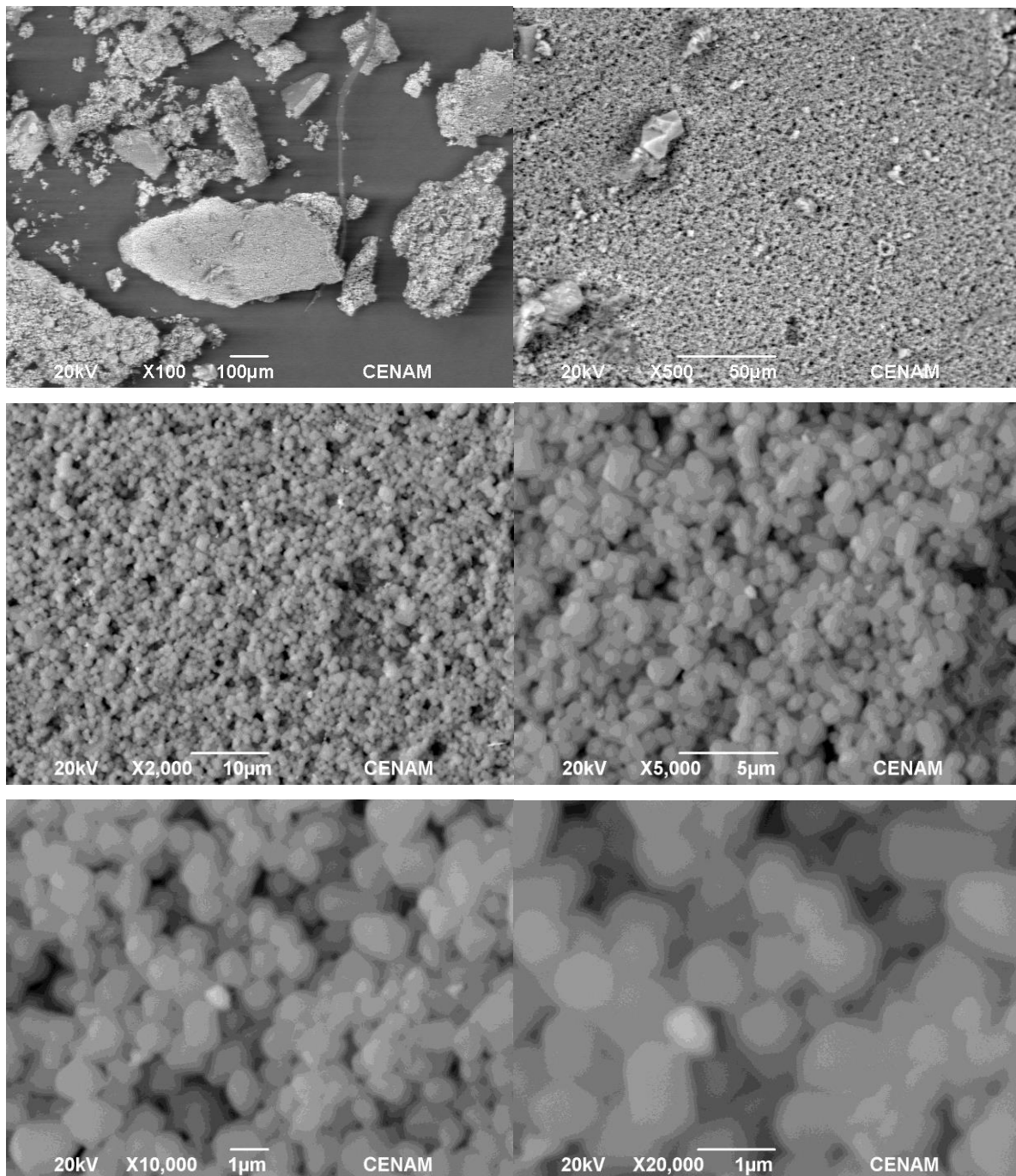
## 5.8 Caracterización de PHA mediante SEM



**Figura 17.** Micrografías electrónicas de barrido a diferentes magnificaciones (100, 500, 2000, 5000, 10000, 20000 X) de PHA extraído de *V. venusta Hven10* cultivada con 80 g/L de NaCl.



**Figura 18.** Micrografías electrónicas de barrido a diferentes magnificaciones (100, 500, 2000, 5000, 10000, 20000 X) de PHA extraído de *V. venusta* Hven10 cultivada con 100 g/L de NaCl.



**Figura 19.** Micrografías electrónicas de barrido a diferentes magnificaciones (100, 500, 2000, 5000, 10000, 20000 X) de PHA extraído de *V. venusta* Hven10 cultivada con 120 g/L de NaCl.

En las micrografías electrónicas del polímero extraído y purificado obtenido bajo las diferentes condiciones salinidad (80, 100 y 120 g/L de NaCl) (**Figuras 17, 18 y 19 respectivamente**), se observa una superficie heterogénea y de apariencia rugosa, característica de los polihidroxialcanoatos tras los procesos de extracción y

purificación. A bajas magnificaciones (100 y 500 X), el material se presenta como aglomerados irregulares con distribución no uniforme.

A mayores aumentos (5000, 10000, 20000 X) se distinguen estructuras compactas con zonas de fractura y superficies porosas, atribuibles a la cristalización parcial del polímero. Este tipo de morfología ha sido reportada previamente en PHA extraídos de bacterias halófilas, donde el alto contenido salino favorece la formación de biopolímeros con estructuras semi-cristalinas y una topografía irregular (Samrot et al., 2021; Cervantes-Uc et al., 2014).

En conjunto, las micrografías confirman la presencia de un material polimérico con morfología típica de PHA, coherente con los resultados previos de cuantificación y caracterización fisicoquímica.

## Capítulo 6: Conclusiones

- La cepa *Vreelandella venusta Hven10* mostró capacidad para producir polihidroxialcanoatos (PHA) en condiciones halófilas, utilizando glucosa como fuente de carbono. La concentración de NaCl tuvo un efecto decisivo sobre el metabolismo bacteriano y la acumulación de PHA, alcanzando el mayor rendimiento (66.57% PHA/MSC) a 120 g/L de NaCl.
- La caracterización espectroscópica mediante FTIR y RMN-<sup>1</sup>H confirmó que el biopolímero corresponde principalmente a poli(3-hidroxibutirato) (PHB), con perfiles espectrales típicos reportados en la literatura científica para este tipo de polímero.
- Las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) evidenciaron una morfología granular homogénea, con partículas bien definidas y superficies lisas en los biopolímeros extraídos y purificados. Este resultado refuerza la eficacia del proceso de purificación empleado y la estabilidad estructural del polímero producido bajo condiciones extremas de salinidad.
- De manera destacable, la producción de PHA bajo condiciones halófilas ofrece una ventaja biotecnológica significativa, ya que la elevada concentración de sal en el medio de cultivo reduce el riesgo de contaminación por otros microorganismos, permitiendo procesos de fermentación más limpios y con menores requerimientos de esterilidad.
- En conjunto, estos resultados respaldan el potencial de *V. venusta Hven10* como plataforma biotecnológica para la obtención de bioplásticos, resaltando la influencia del estrés osmótico como factor clave en la regulación de la acumulación de PHA y en la obtención de biopolímeros de alta calidad estructural.

## Capítulo 7: Perspectivas

- Escalabilidad del proceso:  
Evaluar la producción de PHA en biorreactor bajo condiciones halófilas para optimizar variables como aireación, agitación y relación C/N, con el fin de incrementar la productividad.
- Uso de sustratos alternativos:  
Explorar fuentes económicas y sostenibles de carbono (melazas, glicerol crudo, aguas residuales ricas en carbohidratos) para fortalecer la viabilidad industrial y el enfoque de economía circular.
- Caracterización avanzada del polímero:  
Analizar propiedades fisicoquímicas y térmicas del PHB (DSC, TGA, GPC) para determinar su grado de cristalinidad, peso molecular y posibles aplicaciones industriales.
- Estudio genético y metabólico:  
Identificar y caracterizar los genes implicados en la biosíntesis de PHA (*phaA*, *phaB*, *phaC*), con el propósito de comprender la regulación metabólica y potenciales estrategias de mejora genética.
- Aplicaciones biotecnológicas y ambientales:  
Integrar *V. venusta Hven10* en procesos combinados de biorremediación y producción de bioplásticos, aprovechando su capacidad halófila y resistencia a ambientes extremos.
- Evaluación de la biodegradación del polímero:  
Investigar la degradación del PHB en condiciones de composta, suelo y ambientes marinos o salinos, a fin de validar su potencial como bioplástico biodegradable y ambientalmente seguro, así como definir condiciones óptimas de compostaje o disposición final.

## Capítulo 8: Bibliografía

- Abedi, E., y Hashemi, S. M. B. (2020). Lactic acid production - producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*, 6(10), e04974. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04974>
- Aguirre-Garrido, J. F., Ramírez-Saad, H. C., Toro, N., y Martínez-Abarca, F. (2016). Bacterial diversity in the soda saline crater lake from Isabel Island, Mexico. *Microbial Ecology*, 71(1), 68–77. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0676-6>
- Ahn, W. S., Park, S. J., y Lee, S. Y. (2000). Production of Poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. *Applied and environmental microbiology*, 66(8), 3624–3627. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3624-3627.2000>
- Akiyama, M., Tsuge, T., y Doi, Y. (2003). Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation. *Polymer Degradation and Stability*, 80(1), 183–194. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(02\)00400-7](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(02)00400-7)
- Alcocer, J., Lugo, A., Sánchez, M., y Escobar, E. (1998). Isabela crater-lake: a Mexican insular saline lake. *Hydrobiologia*, 381, 1–7.
- Anderson, A. J., y Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54(4), 450–472. <https://doi.org/10.1128/mr.54.4.450-472.1990>
- Beijerinck, M. W. (1888). Die Bakterien der Papilionaceen-Knöllchen. *Botanische Zeitung*, 46, 726–732.
- Ben Abdallah, M., Saadaoui, I., Al-Ghouti, M. A., Zouari, N., Hahladakis, J. N., Chamkha, M., y Sayadi, S. (2025). Advances in polyhydroxyalkanoate (PHA) production from renewable waste materials using halophilic microorganisms: A comprehensive review. *The Science of the total environment*, 963, 178452. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2025.178452>

- Biswas, J., Jana, S. K., y Mandal, S. (2023). Biotechnological impacts of Halomonas: a promising cell factory for industrially relevant biomolecules. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 39(2), 348-377.
- Blanco, K. (2010). *Detección de gránulos de polihidroxicanoatos en la cepa USBA 355 Tistlia consotensis* [Tesis de licenciatura, Universidad Javeriana].
- Braunegg, G., Sonnleitner, B., y Lafferty, R. M. (1978). A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 6(1), 29–37. <https://doi.org/10.1007/BF00500854>
- Cervantes-Uc, J. M., Catzin, J., Vargas, I., Herrera-Kao, W., Moguel, F., Ramirez, E., Rincón-Arriaga, S., y Lizama-Uc, G. (2014). Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates produced by an extreme halophilic bacterium, *Halomonas nitroreducens*, isolated from hypersaline ponds. *Journal of applied microbiology*, 117(4), 1056–1065. <https://doi.org/10.1111/jam.12605>
- Che, L., Jin, W., Zhou, X., Han, W., Chen, Y., Chen, C., y Jiang, G. (2023). Current status and future perspectives on the biological production of polyhydroxyalkanoates. *Asia- Pacific Journal of Chemical Engineering*, 18(3), e2899.
- Cheffi, M., Maalej, A., Mahmoudi, A., Hentati, D., Marques, A. M., Sayadi, S., y Chamkha, M. (2021). Lipopeptides production by a newly *Halomonas venusta* strain: Characterization and biotechnological properties. *Bioorganic chemistry*, 109, 104724. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104724>
- Chen, G. Q. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews*, 38(8), 2434–2446. <https://doi.org/10.1039/B812677C>
- Chen, G. Q., y Jiang, X. R. (2017). Engineering bacteria for enhanced polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis. *Synthetic and systems biotechnology*, 2(3), 192–197. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.09.001>

- Chen, G. Q., y Jiang, X. R. (2018). Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 50, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.11.016>
- Chen, G. Q., y Patel, M. K. (2012). Plastics derived from biological sources: Present and future – A technical and environmental review. *Chemical Reviews*, 112(4), 2082–2099. <https://doi.org/10.1021/cr200162d>
- Chen, G. Q., y Wu, Q. (2005). The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, 26(33), 6565–6578. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.036>
- Chen, Y., Awasthi, A. K., Wei, F., Tan, Q., y Li, J. (2021). Single-use plastics: production, usage, disposal, and adverse impacts. *Science of the Total Environment*, 752, 141772. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141772>
- Cho, J. Y., Lee Park, S., Lee, H. J., Kim, S. H., Suh, M. J., Ham, S., Bhatia, S. K., Gurav, R., Park, S. H., Park, K., Yoo, D., y Yang, Y. H. (2021). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) degradation by the newly isolated marine *Bacillus* sp. JY14. *Chemosphere*, 283, 131172. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131172>
- Christensen, M., Jablonski, P., Altermark, B., Irgum, K., y Hansen, H. (2021). High natural PHA production from acetate in *Cobetia* sp. MC34 and *Cobetia marina* DSM 4741T and in silico analyses of the genus specific PhaC2 polymerase variant. *Microbial cell factories*, 20(1), 225. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01713-0>
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas [CONANP]. (2005). *Programa de conservación y manejo del Parque Nacional Isla Isabel*. SEMARNAT.
- Cristea, A., Baricz, A., Leopold, N., Floare, C. G., Borodi, G., Kacso, I., Tripon, S., Bulzu, P. A., Andrei, A. Ş., Cadar, O., Levei, E. A., y Banciu, H. L. (2018). Polyhydroxybutyrate production by an extremely halotolerant *Halomonas elongata* strain isolated from the hypersaline meromictic Fără Fund Lake

(Transylvanian Basin, Romania). *Journal of applied microbiology*, 125(5), 1343–1357. <https://doi.org/10.1111/jam.14029>

- Dai, Y., Lambert, L., Yuan, Z., y Keller, J. (2008). Characterisation of polyhydroxyalkanoate copolymers with controllable four-monomer composition. *Journal of biotechnology*, 134(1-2), 137-145.
- de la Haba, R. R., Arahal, D. R., Sánchez-Porro, C., Chuvochina, M., Wittouck, S., Hugenholtz, P., y Ventosa, A. (2025). Corrigendum: A long-awaited taxogenomic investigation of the family *Halomonadaceae*. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1549745. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1549745>
- Dutta, B., y Bandopadhyay, R. (2022). Biotechnological potentials of halophilic microorganisms and their impact on mankind. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 11(1), 75.
- European Committee for Standardization. (2000). *EN 13432:2000 – Requirements for packaging recoverable through composting and biodegradation*. CEN.
- Galán, B., Dinjaski, N., Maestro, B., de Eugenio, L. I., Escapa, I. F., Sanz, J. M., García, J. L., y Prieto, M. A. (2011). Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442. *Molecular microbiology*, 79(2), 402–418. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07450.x>
- Gautam, S., Gautam, A., Pawaday, J., Kanzariya, R. K., y Yao, Z. (2024). Current status and challenges in the commercial production of polyhydroxyalkanoate-based bioplastic: a review. *Processes*, 12, 1720. <https://doi.org/10.3390/pr12081720>
- Habibi, Y., Lucia, L. A., y Rojas, O. J. (2010). Cellulose nanocrystals: Chemistry, self-assembly, and applications. *Chemical Reviews*, 110(6), 3479–3500. <https://doi.org/10.1021/cr900339w>
- He, H., Jer, N. W., Hu, Q., Zhang, Z., Sun, S., Xu, G., Yang, S., Zheng, S., Wu, F., Wu, Q., y Chen, G. Q. (2025). Engineering *Halomonas* bluephagenesis for pilot production of terpolymers containing 3-hydroxybutyrate, 4-

hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate from glucose. *Metabolic engineering*, 90, 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2025.03.003>

- Hernández-Soto, L. M., Martínez-Abarca, F., Ramírez-Saad, H., López-Pérez, M., y Aguirre-Garrido, J. F. (2023). Genome analysis of haloalkaline isolates from the soda saline crater lake of Isabel Island; comparative genomics and potential metabolic analysis within the genus *Halomonas*. *BMC genomics*, 24(1), 696. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09800-9>
- Ilham, M., Nakanomori, S., Kihara, T., Hokamura, A., Matsusaki, H., Tsuge, T., y Mizuno, K. (2014). Characterization of polyhydroxyalkanoate synthases from *Halomonas* sp. O-1 and *Halomonas elongata* DSM2581: Site-directed mutagenesis and recombinant expression. *Polymer degradation and stability*, 109, 416-423.
- Jendrossek, D., y Handrick, R. (2002). Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology*, 56, 403–432. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160838>
- Jendrossek, D., y Pfeiffer, D. (2014). New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environmental microbiology*, 16(8), 2357–2373. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12356>
- Jiang, G., Hill, D. J., Kowalczyk, M., Johnston, B., Adamus, G., Irorere, V., y Radecka, I. (2016). Carbon sources for polyhydroxyalkanoates and an integrated biorefinery. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1157. <https://doi.org/10.3390/ijms17071157>
- Juengert, J. R., Patterson, C., y Jendrossek, D. (2018). Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Polymerase PhaC1 and PHB Depolymerase PhaZa1 of *Ralstonia eutropha* Are Phosphorylated *In Vivo*. *Applied and environmental microbiology*, 84(13), e00604-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00604-18>
- Kadouri, D., Jurkevitch, E., Okon, Y., y Castro-Sowinski, S. (2005). Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Critical*

*Reviews in Microbiology*, 31(2), 55–67.  
<https://doi.org/10.1080/10408410590899228>

- Kalia, V. C., Patel, S. K. S., y Lee, J.-K. (2023). Exploiting Polyhydroxyalkanoates for Biomedical Applications. *Polymers*, 15(8), 1937. <https://doi.org/10.3390/polym15081937>
- Kannah, R. Y., Kumar, M. D., Kavitha, S., Banu, J. R., Tyagi, V. K., Rajaguru, P., & Kumar, G. (2022). Production and recovery of polyhydroxyalkanoates (PHA) from waste streams—A review. *Bioresource technology*, 366, 128203.
- Khan, M. N., Uhrig, T., Steinmetz, H., de Best, J., y Raingue, A. (2021, November). *Techno-economic assessment of producing bioplastics from sewage* (WPT1 Deliverable 3.1, part 2 of 3). VITO, TU Kaiserslautern, Avans, NaturePlast. [https://vb.nweurope.eu/media/16015/wpt1\\_deliverable\\_3\\_1\\_pha\\_tea\\_final.pdf](https://vb.nweurope.eu/media/16015/wpt1_deliverable_3_1_pha_tea_final.pdf)
- Khanna, S., y Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40(2), 607–619. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.053>
- Khatami, K., Perez-Zabaleta, M., Owusu-Agyeman, I., y Cetecioglu, Z. (2021). Waste to bioplastics: How close are we to sustainable polyhydroxyalkanoates production? *Waste Management*, 119, 374–388. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.10.008>
- Koller, M., Atlić, A., Dias, M., Reiterer, A., y Braunegg, G. (2010a). Microbial PHA production from waste raw materials. En *Plastics from bacteria* (pp. 85–119). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_5)
- Koller, M., Maršálek, L., de Sousa Dias, M. M., y Braunegg, G. (2017). Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New biotechnology*, 37(Pt A), 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.001>
- Koller, M., Salerno, A., Dias, M., Reiterer, A., y Braunegg, G. (2010b). Modern biotechnological polymer synthesis: a review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 255–269.

- Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H. N., y Reis, M. A. M. (2017). Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Bioengineering*, 4(2), 55. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020055>
- Kucera, D., Pernicová, I., Kovalcik, A., Koller, M., Mullerova, L., Sedlacek, P., Mravec, F., Nebesarova, J., Kalina, M., Marova, I., Krzyzanek, V., y Obruca, S. (2018). Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresource technology*, 256, 552–556. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.062>
- Kumar, P., y Kim, B. S. (2018). Valorization of polyhydroxyalkanoates production process by co-synthesis of value-added products. *Bioresource Technology*, 269, 544–556. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.120>
- Kunasundari, B., y Sudesh, K. (2011). Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters*, 5(7), 620–634. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2011.60>
- Kushner, D. J. (1978). Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. En D. J. Kushner (Ed.), *Microbial Life in Extreme Environments* (pp. 317–368). Londres: Academic.
- Kushner, D. J. (1992). Growth and nutrition of halophilic bacteria. En R. H. Vreeland y L. I. Hochstein (Eds.), *The Biology of Halophilic Bacteria*
- Lemoigne, M. (1926). Produits de déshydratation et de polymérisation de l'acide  $\beta$ -oxybutyrique. *Bulletin de la Société Chimique de France*, 10, 594–600.
- Lim, S. W., Kansedo, J., Tan, I. S., Tan, Y. H., Nandong, J., Lam, M. K. y Ongkudon, C. M. (2023). Microbial valorization of oil-based substrates for polyhydroxyalkanoates (PHA) production – Current strategies, status, and perspectives. *Process Biochemistry*, 130, 715–733. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.05.013>
- Loo, C. Y., Lee, W. H., Tsuge, T., Doi, Y. y Sudesh, K. (2005). Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from palm

oil products in a *Wautersia eutropha* mutant. *Biotechnology Letters*, 27, 1405–1410. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-0690-8>

- López-Cuellar, M. del R., Alba-Flores, J., Rodríguez, J., y Pérez-Guevara, F. (2011). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(1), 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.09.016>
- Lu, J., Tappel, R. C., y Nomura, C. T. (2009). Mini-review: Biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates). *Polymer Reviews*, 49(3), 226–248. <https://doi.org/10.1080/15583720903048243>
- Macrae, R. M., y Wilkinson, J. F. (1958). Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus*. *Journal of General Microbiology*, 19(1), 210–222. <https://doi.org/10.1099/00221287-19-1-210>
- Madhusoodhanan, G., KS, S., Hariharapura, R. C., y Somashekara, D. M. (2023). Cascading beta-oxidation intermediates for the polyhydroxyalkanoate copolymer biosynthesis by metabolic flux using co-substrates and inhibitors. *Designed Monomers and Polymers*, 26(1), 1–14. <https://doi.org/10.1080/15685551.2023.2179763>
- Madison, L. L., y Huisman, G. W. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 21–53. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.1.21-53.1999>
- Maestro, B., y Sanz, J. M. (2017). Polyhydroxyalkanoate- associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1323–1337.
- Magdouli, S., Brar, S. K., Blais, J. F., y Tyagi, R. D. (2015). How to direct the fatty acid biosynthesis towards polyhydroxyalkanoates production? *Biomass and Bioenergy*, 74, 268–279.
- Mai, J., Kockler, K., Parisi, E., Chan, C. M., Pratt, S., y Laycock, B. (2024). Synthesis and physical properties of polyhydroxyalkanoate (PHA)-based block copolymers: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 263(Part 1), 130204. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130204>

- Meereboer, K. W., Misra, M., y Mohanty, A. K. (2020). Review of recent advances in the biodegradability of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics and their composites. *Green Chemistry*, 22(17), 5519-5558.
- Mitra, R., Xu, T., Xiang, H., y Han, J. (2020). Current developments on polyhydroxyalkanoates synthesis by using halophiles as a promising cell factory. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 86.
- Mohanan, N., Montazer, Z., Sharma, P. K., y Levin, D. B. (2020). Microbial and enzymatic degradation of synthetic plastics. *Frontiers in microbiology*, 11, 580709.
- Mothes, G., Schubert, T., Harms, H., y Maskow, T. (2008). Biotechnological coproduction of compatible solutes and polyhydroxyalkanoates using the genus *Halomonas*. *Engineering in Life Sciences*, 8(6), 658–662.
- Możejko-Ciesielska, J., Ray, S., y Sankhyan, S. (2023). Recent challenges and trends of polyhydroxyalkanoate production by extremophilic bacteria using renewable feedstocks. *Polymers*, 15(22), 4385. <https://doi.org/10.3390/polym15224385>
- Narancic, T., Verstichel, S., Reddy Chaganti, S., Morales-Gamez, L., Kenny, S. T., De Wilde, B., y O'Connor, K. E. (2018). Biodegradable plastic blends create new possibilities for end-of-life management of plastics but they are not a panacea for plastic pollution. *Environmental Science & Technology*, 52(18), 10441–10452. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02963>
- Nishida, M., Tanaka, T., Hayakawa, Y., y Nishida, M. (2018). Solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) and nuclear magnetic relaxation time analyses of molecular mobility and compatibility of plasticized polyhydroxyalkanoates (PHA) copolymers. *Polymers*, 10(5), 506.
- Obruca, S., Marova, I., y Staňková, M. (2015a). Production of polyhydroxyalkanoates and metabolic stress response of bacteria under conditions of nutrient limitation. *New Biotechnology*, 32(5), 538–546. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.10.010>

- Obruca, S., Sedlacek, P., Koller, M. y Krzyzanek, V. (2015b). PHA accumulation and its effect on cell physiology in halophilic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(11), 5031–5045. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6560-6>
- Obruca, S., Sedlacek, P., Koller, M., Kucera, D., Pernicova, I. y Eremka, L. (2016a). The role of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological implications. *Biotechnology Advances*, 34(5), 665–670. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.03.004>
- Obruca, S., Sedlacek, P., Krzyzanek, V., Mravec, F., Hrubanova, K., Samek, O. y Koller, M. (2016b). Accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) helps bacterial cells to survive freezing. *PLoS ONE*, 11(6), e0157778. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157778>
- Obruca, S., Sedlacek, P., Slaninova, E., Fritz, I., Daffert, C., Meixner, K., Sedrlova, Z. y Koller, M. (2020). Novel unexpected functions of PHA granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(11), 4795–4810. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10568-1>
- Obruca, S., Snajdar, O., Svoboda, Z. y Marova, I. (2013). Application of random mutagenesis to enhance the production of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16 on waste frying oil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 29(12), 2417–2428. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1410-5>
- Obulisamy, P. K., y Mehariya, S. (2021). Polyhydroxyalkanoates from extremophiles: a review. *Bioresource technology*, 325, 124653.
- Oren A. (2024). Novel insights into the diversity of halophilic microorganisms and their functioning in hypersaline ecosystems. *npj biodiversity*, 3(1), 18. <https://doi.org/10.1038/s44185-024-00050-w>
- Paloyan, A., Tadevosyan, M., Ghevondyan, D., Khoyetsyan, L., Karapetyan, M., Margaryan, A., Antranikian, G., y Panosyan, H. (2025). Biodegradation of polyhydroxyalkanoates: current state and future prospects. *Frontiers In Microbiology*, 16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1542468>

- Parte, A. C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C., y Göker, M. (2020–2024). LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. *Vreelandella venusta* (comb. nov.). DSMZ.
- Pernicova, I., Kucera, D., Nebesarova, J., Kalina, M., Novackova, I., Koller, M. y Obruca, S. (2019). Production of polyhydroxyalkanoates on waste frying oil employing selected *Halomonas* strains. *Bioresource Technology*, 292, 122028. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122028>
- Pfeiffer, D., Wahl, A. y Jendrossek, D. (2011). Identification of a multifunctional protein, PhaM, that determines number, surface to volume ratio, subcellular localization and distribution to daughter cells of poly(3- hydroxybutyrate), PHB, granules in *Ralstonia eutropha* H16. *Molecular Microbiology*, 82(4), 936–951.
- Plastics Europe Deutschland. (2022). *Plastics-the Facts 2022*. Düsseldorf.
- Pötter, M., Müller, H. y Steinbüchel, A. (2005). Influence of homologous phasins (PhaP) on PHA accumulation and regulation of their expression by the transcriptional repressor PhaR in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*, 151(3), 825–833.
- Prieto, A., Escapa, I. F., Martínez, V., Dinjaski, N., Herencias, C., de la Peña, F., Tarazona, N. y Revelles, O. (2016). A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, 18(2), 341–357. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12760>
- Qu, J., Zhang, J., Zhang, X., Liu, H. y Wang, S. (2022). A comparative study of PHA production by halophilic bacteria using glucose as carbon source. *Bioresource Technology Reports*, 17, 100881. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100881>
- Quillaguamán, J., Delgado, O., Mattiasson, B. y Hatti-Kaul, R. (2010). Poly(3-hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis*. *Bioresource Technology*, 101(11), 3176–3183. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.003>
- Quillaguamán, J., Doan-Van, T., Guzmán, H., Guzmán, D., Martín, J., Everest, A., & Hatti-Kaul, R. (2008). Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas*

boliviensis in fed-batch culture. *Applied microbiology and biotechnology*, 78(2), 227–232. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1297-x>

- Quillaguamán, J., Hashim, S., Bento, F., Mattiasson, B., & Hatti-Kaul, R. (2005). Poly(beta-hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1 using starch hydrolysate as substrate. *Journal of applied microbiology*, 99(1), 151–157. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02589.x>
- Reddy, C. S. K., Ghai, R. y Kalia, V. C. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, 87(2), 137–146. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00212-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00212-2)
- Reddy, M. M., Vivekanandhan, S., Misra, M., Bhatia, S. K., y Mohanty, A. K. (2013). Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. *Progress in Polymer Science*, 38(10–11), 1653–1689. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.05.006>
- Rehm, B. H. A. (2003). Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal*, 376(1), 15–33. <https://doi.org/10.1042/BJ20031254>
- Rehm, B. H. A. (2010). Bacterial polymers: Biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), 578–592. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2354>
- Rekhi, P., Goswami, M., Ramakrishna, S., y Debnath, M. (2021). Polyhydroxyalkanoates biopolymers toward decarbonizing economy and sustainable future. *Critical Reviews in Biotechnology*, 42(5), 668–692. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1960265>
- Riedel, S. L., Jahns, S., Koenig, S., Bock, M. C., Brigham, C. J., Bader, J. y Stahl, U. (2015). Polyhydroxyalkanoates production with *Ralstonia eutropha* from low quality waste animal fats. *Journal of Biotechnology*, 214, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.09.002>
- Roberts, M. F. (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*, 1, 5. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-5>

- Rojas, E. R. y Huang, K. C. (2017). Regulation of microbial growth by turgor pressure. *Current Opinion in Microbiology*, 42, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.015>
- Romano, I., Giordano, A., Lama, L., Nicolaus, B. y Gambacorta, A. (2005). *Halomonas campaniensis* sp. nov., a haloalkaliphilic bacterium isolated from a mineral pool of Campania Region, Italy. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(7), 610–618. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.03.010>
- Romano, I., Lama, L., Nicolaus, B., Poli, A., Gambacorta, A. y Giordano, A. (2006). *Halomonas alkaliphila* sp. nov., a novel halotolerant alkaliphilic bacterium isolated from a salt pool in Campania (Italy). *The Journal of General and Applied Microbiology*, 52(6), 339–348. <https://doi.org/10.2323/jgam.52.339>
- Roychoudhury, A. (2013). Role of compatible solutes in salt stress tolerance of halophilic microorganisms. *International Journal of Life Sciences and Pharma Research*, 3(2), L1–L8.
- Samrot, A. V., Samanvitha, S. K., Shobana, N., Renitta, E. R., Senthilkumar, P., Kumar, S. S., Abirami, S., Dhiva, S., Bavanilatha, M., Prakash, P., Saigeetha, S., Shree, K. S., y Thirumurugan, R. (2021). The Synthesis, Characterization and Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) and PHA-Based Nanoparticles. *Polymers*, 13(19), 3302. <https://doi.org/10.3390/polym13193302>
- Salinas, C. A., Muñoz, V. M. y Delgado, F. J. (2014). Aislamiento e identificación de bacterias potencialmente productoras de biopolímeros en suelos de la zona norte de Colima. *Academia Journals*, 6(4), 1481–1485.
- Sedlacek, P., Slaninova, E., Koller, M., Nebesarova, J., Marova, I., Krzyzanek, V. y Obruca, S. (2019). PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnology*, 49, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.10.005>
- Seitz, M., Rihm, R., y Bonten, C. (2024). Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Reinforced with Regenerated Cellulose Fibers. *Polymers*, 16(14), 2070. <https://doi.org/10.3390/polym16142070>

- Sharma, N. (2019). Polyhydroxybutyrate (PHB) production by bacteria and its application as biodegradable plastic in various industries. *Acad. J. Polym. Sci*, 2(3).
- Stanley, A., Kumar, H. P., Mutturi, S. y Vijayendra, S. V. N. (2017). Fed batch strategies for production of PHA using a native isolate of *Halomonas venusta* KT832796 strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184(3), 935–952. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2601-6>
- Stanley, A., Murthy, P. S. K. y Vijayendra, S. V. N. (2020). Characterization of polyhydroxyalkanoate produced by *Halomonas venusta* KT832796. *Journal of Polymers and the Environment*, 28(4), 973–983. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01662-6>
- Strazzullo, G., Gambacorta, A., Vella, F. M., Immirzi, B., Romano, I., Calandrelli, V., y Lama, L. (2008). Chemical-physical characterization of polyhydroxyalkanoates recovered by means of a simplified method from cultures of *Halomonas campaniensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(8), 1513-1519.
- Sudesh, K. e Iwata, T. (2008). Sustainability of biobased and biodegradable plastics. *Clean – Soil, Air, Water*, 36(5–6), 433–442. <https://doi.org/10.1002/clen.200700183>
- Sudesh, K., Abe, H. y Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 25(10), 1503–1555. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00035-6)
- Sun, Z., Ramsay, J. A., Guay, M. y Ramsay, B. A. (2007). Fermentation process development for the production of medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0857-4>
- Sznajder, A., Pfeiffer, D., y Jendrossek, D. (2015). Comparative proteome analysis reveals four novel polyhydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins in *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and environmental microbiology*, 81(5), 1847–1858. <https://doi.org/10.1128/AEM.03791-14>

- Tamang, P., y Nogueira, R. (2021). Valorisation of waste cooking oil using mixed culture into short- and medium-chain length polyhydroxyalkanoates: Effect of concentration, temperature and ammonium. *Journal of biotechnology*, 342, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.10.006>
- Tan, D., Xue, Y. S., Aibaidula, G., y Chen, G. Q. (2011). Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas TD01*. *Bioresource technology*, 102(17), 8130–8136. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.068>
- Tan, G. Y. A., Chen, C. L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I. M. N., Li, Y., Zhao, L., Mo, Y. y Wang, J. Y. (2014). Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review. *Polymers*, 6(3), 706–754. <https://doi.org/10.3390/polym6030706>
- Thu, N. T. T., Hoang, L. H., Cuong, P. K., Nguyen, T. V., Pham, V. T., Nguyen, D. T. y Nguyen, H. T. (2023). Evaluation of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by *Pichia* sp. TSL24 yeast isolated in Vietnam. *Scientific Reports*, 13, 3137. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28220-z>
- Tokiwa, Y., y Calabia, B. P. (2006). Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). *Applied microbiology and biotechnology*, 72(2), 244–251. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0488-1>
- Valappil, S. P., Boccaccini, A. R., Bucke, C., y Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9095-5>
- Verlinden, R. A. J., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D. y Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), 1437–1449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x>
- Vicente, D., Proença, D. N. y Morais, P. V. (2023). The role of bacterial polyhydroalkanoate (PHA) in a sustainable future: a review on biological

diversity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(4), 2959. <https://doi.org/10.3390/ijerph20042959>

- Volova, T. G., Boyandin, A. N., Vasil'ev, A. D., Karpov, V. A., Kozhevnikov, I. V., Prudnikova, S. V., y Gitel'Zon, I. I. (2011). Biodegradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in the South China Sea and identification of PHA-degrading bacteria. *Microbiology*, 80(2), 252-260.
- Wang, J., Liu, S., Huang, J. y Qu, Z. (2021). A review on polyhydroxyalkanoate production from agricultural waste biomass: development, advances, circular approach, and challenges. *Bioresource Technology*, 342, 126008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126008>
- Wang, L., Liu, H. y Liu, D. (2014). Characterization of PHB extracted from fermented waste activated sludge. *Journal of Environmental Sciences*, 26(4), 729–734. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(13\)60467-2](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(13)60467-2)
- Wang, Q., Tappel, R. C., Zhu, C., y Nomura, C. T. (2012). Development of a new strategy for production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by recombinant *Escherichia coli* via inexpensive non-fatty acid feedstocks. *Applied and environmental microbiology*, 78(2), 519–527. <https://doi.org/10.1128/AEM.07020-11>
- Wieczorek, R., Pries, A., Steinbüchel, A., Mayer, F. y Steinbüchel, A. (2018). PHA granules as bacterial organelles: Recent advances in structural and functional understanding. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(11), 4781–4791. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8912-9>
- Winnacker, M. (2019). Polyhydroxyalkanoates: Recent Advances in Their Synthesis and Applications. *European Journal Of Lipid Science And Technology*, 121(11). <https://doi.org/10.1002/ejlt.201900101>
- Yasin, A. R., y Al-Mayaly, I. K. (2021). Study of the fermentation conditions of the *Bacillus cereus* strain ARY73 to produce polyhydroxyalkanoate (PHA) from glucose. *Journal of Ecological Engineering*, 22(8).

- Yin, J., Chen, J. C., Wu, Q. y Chen, G. Q. (2015). Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnology Advances*, 33(7), 1433–1442. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.06.001>
- Yue, H., Ling, C., Yang, T., Chen, X., Chen, Y., Deng, H., Wu, Q., Chen, J., y Chen, G. (2014). A seawater-based open and continuous process for polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Halomonas campaniensis* LS21 grown in mixed substrates. *Biotechnology For Biofuels*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-108>
- Zhao, C., Yang, L., Li, H., y Deng, Z. (2024). Nitrogen Metabolism during Anaerobic Fermentation of Actual Food Waste under Different pH Conditions. *Fermentation*, 10(3), 129. <https://doi.org/10.3390/fermentation10030129>
- Zhao, Y., Liu, H. y Zhang, J. (2020). Application of FTIR spectroscopy to identify PHB produced by *Bacillus* species. *Polymers*, 12(1), 189. <https://doi.org/10.3390/polym12010189>
- Zinn, M., Witholt, B., y Egli, T. (2001). Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced drug delivery reviews*, 53(1), 5–21. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00218-6](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00218-6)

## Anexos

**Tabla 1A.** Cinética de crecimiento y producción de PHA por *V. venusta Hven10* con 80 g/L de NaCl. Se presentan los valores de densidad óptica (OD 600), masa seca celular (MSC), cantidad de PHA extraído (mg) y el rendimiento expresado como porcentaje de PHA respecto a MSC (% PHA/MSC), medidos cada 24 h durante 216 h.

Tiempo (h)	OD 600	MSC (mg)	PHA (mg)	% PHA/MSC
0	0.20 ± 0.07	0.00	0.00	0.00
24	0.68 ± 0.22	22.2 ± 0.003	1.0 ± 0.10	4.50
48	1.79 ± 0.39	26.8 ± 0.001	2.7 ± 0.15	9.95
72	1.9 ± 0.11	25.9 ± 0.003	4.1 ± 0.36	15.85

96	2.10 ± 0.42	24.2 ± 0.006	4.8 ± 0.25	19.94
120	2.23 ± 0.40	23.3 ± 0.002	5.1 ± 0.25	21.75
144	2.23 ± 0.39	20.7 ± 0.002	5.9 ± 0.20	28.50
168	2.22 ± 0.35	18.0 ± 0.003	4.5 ± 0.21	25.19
192	2.26 ± 0.34	8.4 ± 0.004	1.2 ± 0.25	13.94
216	2.18 ± 0.15	6.9 ± 0.001	0.00	0.00

**Tabla 2A.** Cinética de crecimiento y producción de PHA por *V. venusta Hven10* con 100 g/L de NaCl. Se presentan los valores de densidad óptica (OD 600), masa seca celular (MSC), cantidad de PHA extraído (mg) y el rendimiento expresado como porcentaje de PHA respecto a MSC (% PHA/MSC), medidos cada 24 h durante 216 h.

Tiempo (h)	OD 600	MSC (mg)	PHA (mg)	% PHA/MSC
0	0.17 ± 0.03	0.00	0.00	0.00
24	0.45 ± 0.26	19.0 ± 0.002	1.13 ± 0.06	5.98
48	1.01 ± 0.03	23.0 ± 0.002	3.8 ± 0.25	16.38
72	1.25 ± 0.52	21.9 ± 0.003	5.9 ± 0.46	26.94
96	1.26 ± 0.47	21.8 ± 0.001	6.8 ± 0.36	31.19
120	1.31 ± 0.45	20.3 ± 0.004	6.7 ± 0.47	33.17
144	1.34 ± 0.46	19.5 ± 0.002	7.1 ± 0.25	36.52

168	1.30 ± 0.45	13.2 ± 0.003	6.1 ± 0.20	46.33
192	1.33 ± 0.43	7.7 ± 0.004	1.2 ± 0.40	15.58
216	1.17 ± 0.03	5.9 ± 0.004	0.00	0.00

**Tabla 3A.** Cinética de crecimiento y producción de PHA por *V. venusta Hven10* con 120 g/L de NaCl. Se presentan los valores de densidad óptica (OD 600), masa seca celular (MSC), cantidad de PHA extraído (mg) y el rendimiento expresado como porcentaje de PHA respecto a MSC (% PHA/MSC), medidos cada 24 h durante 216 h.

Tiempo (h)	OD 600	MSC (mg)	PHA (mg)	% PHA/MSC
0	0.17 ± 0.02	0.00	0.00	0.00
24	0.28 ± 0.07	17.3 ± 0.004	1.5 ± 0.10	8.65
48	0.50 ± 0.01	21.1 ± 0.003	5.2 ± 0.51	24.84
72	1.10 ± 0.33	20.4 ± 0.004	6.9 ± 0.35	33.66
96	1.20 ± 0.23	20.4 ± 0.002	7.7 ± 0.15	37.58
120	1.29 ± 0.29	19.6 ± 0.002	8.1 ± 0.30	41.40
144	1.28 ± 0.17	17.8 ± 0.004	7.6 ± 0.10	42.78
168	1.30 ± 0.30	11.6 ± 0.003	7.7 ± 0.36	66.57
192	1.37 ± 0.32	8.1 ± 0.004	1.7 ± 0.20	20.90
216	1.20 ± 0.04	4.8 ± 0.007	0.00	0.00

**Tabla 4A.** ANOVA del rendimiento de PHA en *Vreelandella venusta Hven10*.

Fuente de variación	SC	gl	MS	F	p-valor
Entre grupos	0.002067	2	0.001034	6.33	0.030
Dentro de grupos	0.000981	6	0.000164		
<b>Total</b>	0.003048	8			

**Tabla 5A.** Comparaciones múltiples de Tukey para el rendimiento de PHA.

Comparación	Diferencia de medias	q calculado	q crítico (k=3, gl=6)	p-ajustada	Significativa
80 vs 100	0.0200	3.80	4.34	0.082	No
80 vs 120	0.0403	7.65	4.34	0.012	Sí
100 vs 120	0.0203	3.85	4.34	0.079	No

**Tabla 6A.** Evolución del pH durante la cinética de crecimiento de *V. venusta Hven10* en medio HM2 con diferentes concentraciones de NaCl (80, 100 y 120 g/L).

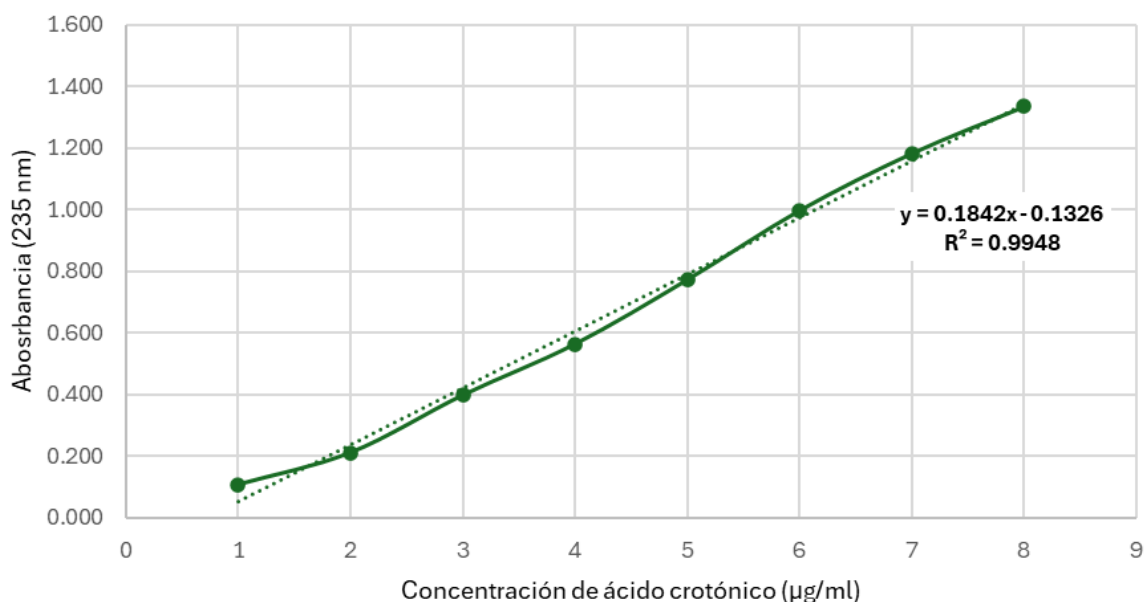
Tiempo (h)	80 g/L NaCl	100 g/L NaCl	120 g/L NaCl
0	8.75	8.75	8.75
24	7.09 ± 0.12	6.95 ± 0.15	6.63 ± 0.10
48	5.00 ± 0.24	5.82 ± 0.35	4.95 ± 0.03
72	4.79 ± 0.10	5.06 ± 0.26	4.88 ± 0.05
96	4.81 ± 0.07	4.86 ± 0.21	4.87 ± 0.06

120	4.80 ± 0.08	4.92 ± 0.21	4.90 ± 0.06
144	4.79 ± 0.04	4.88 ± 0.18	4.88 ± 0.07
168	4.80 ± 0.03	4.86 ± 0.19	4.84 ± 0.06
192	4.76 ± 0.04	4.74 ± 0.19	4.77 ± 0.05
216	4.83 ± 0.03	4.81 ± 0.10	4.88 ± 0.06

**Tabla 7A.** Datos obtenidos para la curva de calibración del ácido crotónico.

	Ácido crotónico (μL)	Ácido sulfúrico (μL)	Concentración (μg)	Absorbancia a 235 nm
1	-	3	-	-
2	300	2700	5	0.1070
3	600	2400	10	0.2111
4	900	2100	15	0.3977
5	1200	1800	20	0.5640
6	1500	1500	25	0.7731
7	1800	1200	30	0.9981
8	2100	900	40	1.1833
9	2400	600	50	1.3355

### Curva de calibración de PHB



**Figura 1A.** Gráfico estándar de ácido crotonico para cuantificar PHA

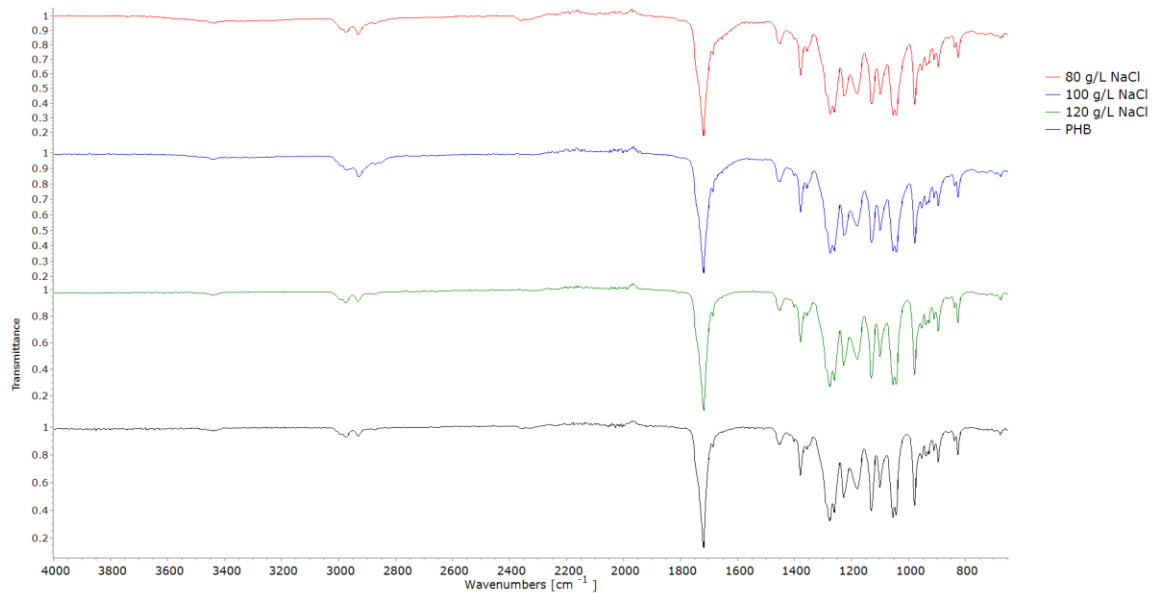
**Tabla 8A.** Cuantificación de PHA por medio del ácido crotonico extraído por *V. venusta Hven10* con diferentes concentraciones de NaCl (80, 100 y 120 g/L).

NaCl (g/L)	Muestra de PHA (mg)	OD 235 nm	PHA (mg/mL) corregido	PHA total (mg)
80	50	0.698	9.02	27.06
100	50	0.727	9.34	28.02
120	50	1.188	14.34	43.02

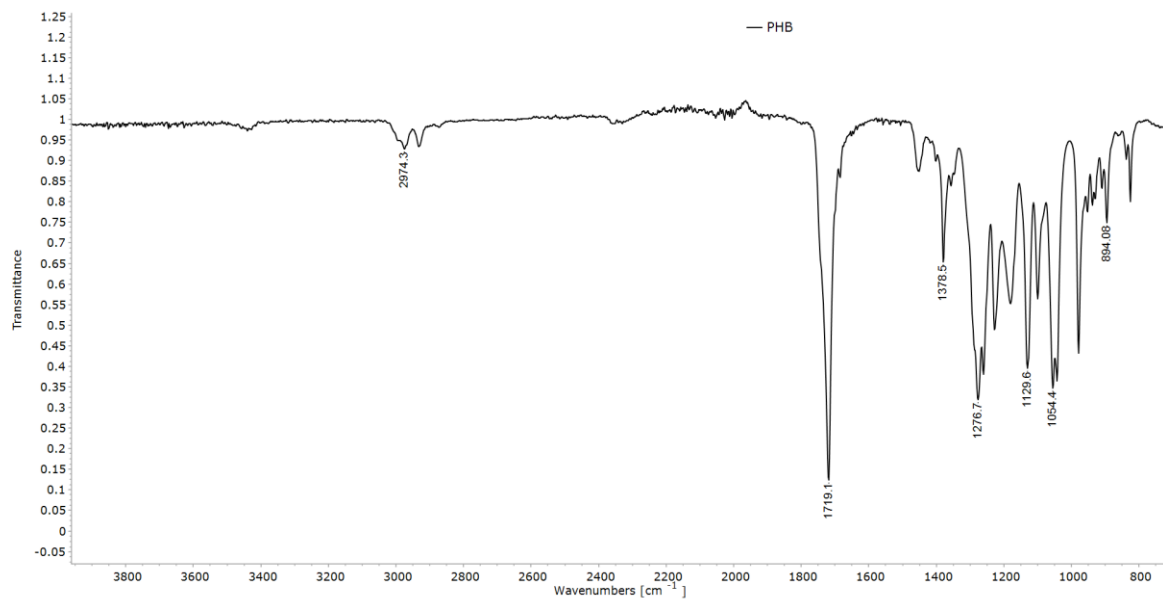
En esta tabla, la columna “Muestra de PHA (mg)” se refiere a la masa de polímero seco previamente extraído y purificado a partir de la biomasa bacteriana, la cual fue empleada como muestra para el ensayo del ácido crotonico. Es decir, no corresponde a biomasa seca total, sino exclusivamente al polímero purificado obtenido tras el proceso de extracción y secado.

El valor de “PHA (mg/mL) corregido” corresponde a la concentración de PHA determinada espectrofotométricamente a 235 nm, calculada mediante la ecuación de la curva de calibración y ajustada (“corregida”) con base en el factor de dilución aplicado a cada muestra.

Por último, el parámetro “PHA total (mg)” se obtiene multiplicando la concentración corregida por el volumen total del extracto analizado; por esta razón, los valores son menores que la masa inicial (50 mg), ya que esta última representa la cantidad total de muestra sólida utilizada para el análisis, no el contenido de PHA cuantificado dentro de ella.



**Figura 2A.** Espectros FTIR de los PHA extraídos de *V. venusta Hven10* cultivada con 80, 100 y 120 g/L de NaCl, comparados con PHB comercial de Sigma-Aldrich.



**Figura 3A.** Espectro FTIR de PHB adquirido a Sigma-Aldrich.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 06331

Matricula: 2233803900

Producción y caracterización de polihidroxialcanoatos por *Vreelandella venusta*.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 13:30 horas del día 14 del mes de noviembre del año 2025 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. OMAR OLTEHUA LOPEZ
- DR. JOSE FELIX AGUIRRE GARRIDO
- DR. HUMBERTO GARCIA ARELLANO
- DR. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA MARTINEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

DE: ANDREA TREJO HERNANDEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

**APROBAR**

Acto continuo, el presidente del jurado comunico a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



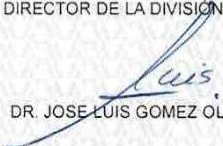
ANDREA TREJO HERNANDEZ  
ALUMNA

REVISÓ



MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS



DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE



DR. OMAR OLTEHUA LOPEZ

VOCAL



DR. JOSE FELIX AGUIRRE GARRIDO

VOCAL



DR. HUMBERTO GARCIA ARELLANO

SECRETARIO



DR. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA MARTINEZ