

Biorremediación y procesos de economía circular empleando haloarqueas

ROSA MARÍA MARTÍNEZ ESPINOSA Y CARMEN PIRE GALIANA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Edafología y Química Agrícola. Facultad de Ciencias. Instituto Multidisciplinar para el Estudio del Medio Ambiente "Ramón Margalef" Universidad de Alicante, Ap. 99, E-03080 Alicante, Spain.

✉ rosa.martinez@ua.es | carmen.pire@ua.es

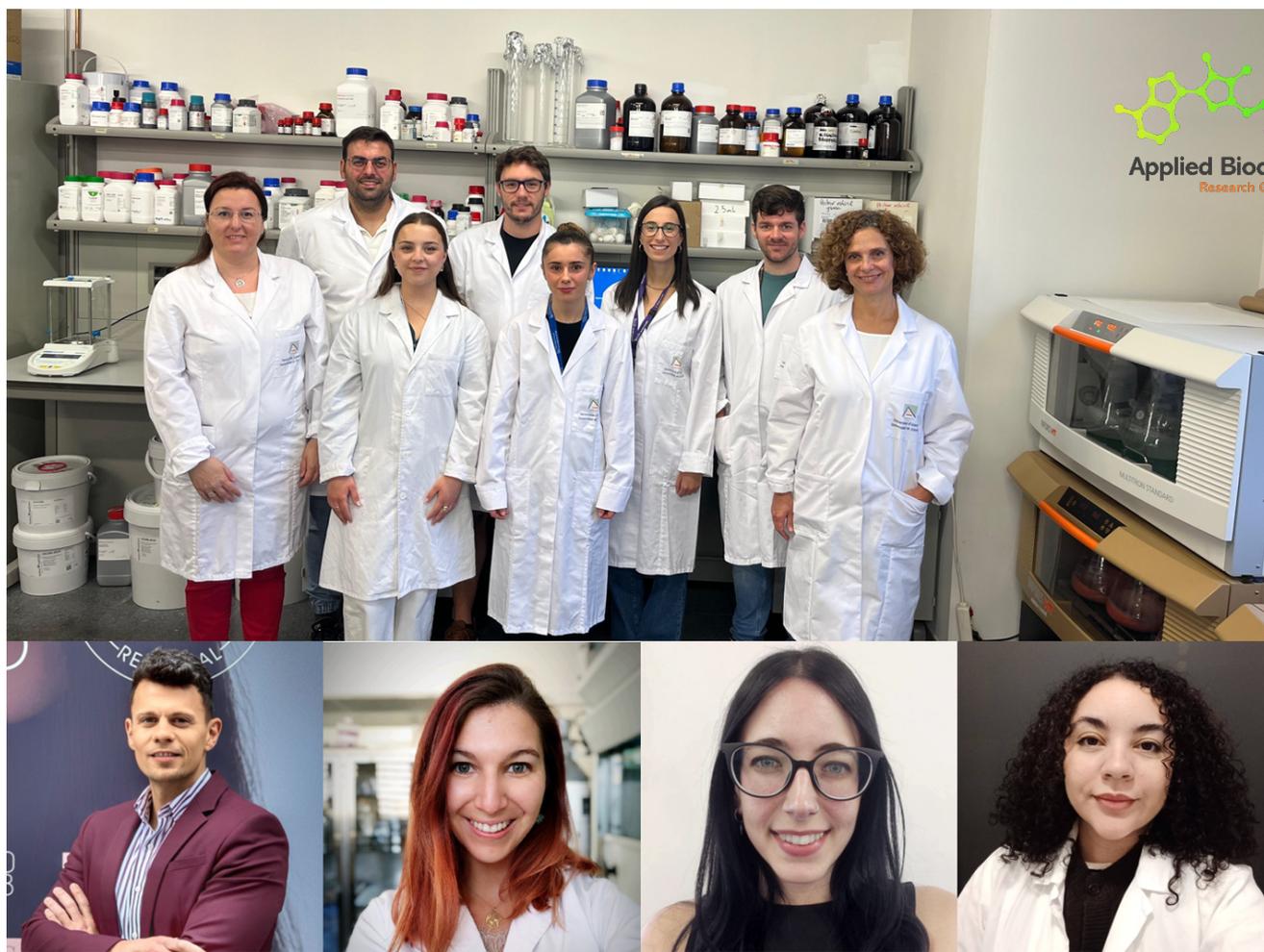


Figura 1. Logotipo del grupo de investigación y fotografía de los miembros del grupo (en la web que se indica abajo se puede encontrar información también sobre colaboradores externos del grupo). Fotografía superior (de izquierda a derecha): Rosa María Martínez Espinosa (investigadora principal), Guillermo Martínez Martínez, Alexandra Simica, Eric Bernabeu Sempere, Iraide Saez Zamacona, Elena Valdes Perpiña, José María Miralles Robledillo, Carmen Pire Galiana. Fotografías inferiores (de izda a derecha): Javier Torregrosa Crespo, Micaela Giani Alonso, Lorena Simó Cabrera y Nadia Harfi.

El grupo "Bioquímica Aplicada" fue creado oficialmente en la Universidad de Alicante en 2017 ([https://cvnet.cpd.ua.es/curriculum-breve/grp/es/bioquimica-aplicada-applied-biochemistry-\(appbiochem\)/659](https://cvnet.cpd.ua.es/curriculum-breve/grp/es/bioquimica-aplicada-applied-biochemistry-(appbiochem)/659), <https://www.flamingoua.com/>), como un

equipo de investigación multidisciplinar cuyos principales objetivos son:

- i) caracterizar microorganismos halófilos del dominio Archaea (haloarqueas) aislados principalmente de ecosistemas hipersalinos de la provincia de

Alicante, España (salinas costeras y de interior, así como lagunas saladas con concentraciones de sal superiores a las del agua de mar: saleros de Villena, salinas de Santa Pola y Laguna de Torrevieja) (Martínez *et al.*, 2022).

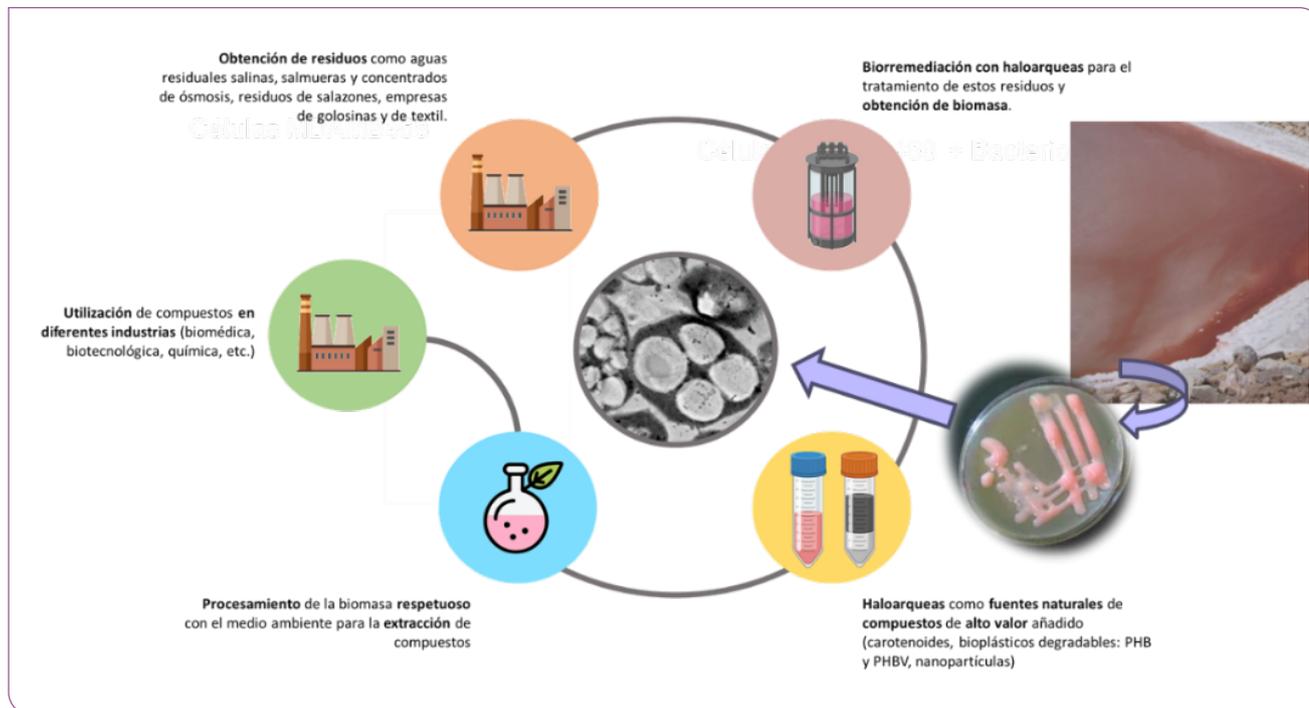


Figura 2. Esquema resumen del proceso de economía circular diseñado y desarrollado a escala laboratorio y prepiloto.

ii) explorar posibles aplicaciones biotecnológicas de dichos microorganismos y/o sus moléculas (en particular enzimas, carotenoides y biopolímeros de naturaleza plástica, o bien rutas metabólicas que permiten diseñar procesos de bioremediación de aguas residuales salinas y salmueras contaminadas) (Moopantakath *et al.*, 2023).

El objetivo último es diseñar e implementar procesos de economía circular que permitan realizar tratamientos de bioremediación de suelos y aguas salinas contaminadas empleando haloarqueas, así como valorizar residuos de otros procesos industriales al ser usados como materia prima para crecer haloarqueas que se emplean como factorías celulares para producir pigmentos naturales, enzimas y biopolímeros de naturaleza plástica.

En esta línea de investigación, inicialmente se llevó a cabo la caracterización a nivel bioquímico y molecular de la ruta metabólica denominada "Desnitrificación" en varias especies del género *Haloferax* (perteneciente a la familia *Haloferacaceae* del Dominio Archaea). Gracias a esta ruta, las haloarqueas desnitrificantes completas son capaces de utilizar el nitrato y el nitrito como aceptores terminales de electrones

en un proceso respiratorio anaeróbico que produce finalmente dinitrógeno como gas inocuo emitido a la atmósfera. Estos compuestos son tóxicos para la mayor parte de seres vivos cuando sus concentraciones en suelo y/o agua superan valores de 10 mg/L (ppm) para el nitrato y 1 mg/L (ppm) para el nitrito. En algunas regiones del sur y del litoral Mediterráneo Español, dichas concentraciones en suelos y aguas son elevadas por el uso excesivo de fertilizantes. Eso sumado a la aridez y la salinización de los suelos, está desembocando en un proceso de deterioro ecosistémico significativo, siendo el Mar Menor un claro ejemplo de ello (Bernabeu *et al.*, 2021; Miralles-Robledillo *et al.*, 2021).

Gracias al empleo de haloarqueas desnitrificantes completas, hemos demostrado que tanto el amonio (gracias a la ruta metabólica de reducción asimilativa de nitrato y asimilación de amonio), como el nitrato y el nitrito (vía desnitrificación) pueden ser eficientemente usados por las haloarqueas como fuente de nitrógeno en la primera de las rutas y para respirar en la segunda. Como consecuencia, estas especies nitrogenadas son eliminadas de suelos y salmueras, junto con otros compuestos como cloratos y percloratos (frecuentes en las formulaciones de mate-

rial pirotécnico, por ejemplo), ya que la primera enzima de la ruta de desnitrificación es capaz de reconocer también estos compuestos como sustratos.

El análisis molecular de los genomas de estas especies ha mostrado que tiene capacidad para metabolizar compuestos de azufre (muchos de los cuales son también tóxicos a baja concentración para la mayor parte de seres vivos), así como metales pesados y metaloides como el selenio. De entre todas las especies analizadas, *Haloferax mediterranei* ha resultado ser la más eficiente metabolizando los compuestos mencionados (Miralles-Robledillo *et al.*, 2019; Torregrosa-Crespo *et al.*, 2019; Torregrosa-Crespo *et al.*, 2020a; 2020b; Llorca *et al.*, 2022; Saez-Zamarcona *et al.*, 2023; Miralles Robledillo *et al.*, 2024). Eso nos llevó a planificar estudios para monitorizar el crecimiento de las haloarqueas en residuos de diversos procesos industriales para explorar la valorización de los mismos y en paralelo monitorizar la capacidad de bioremediación de dichos residuos por parte de las haloarqueas. De esta manera hemos utilizado mezclas eutécticas ampliamente utilizadas en diversos procesos catalíticos, salmueras de una empresa de explotación minera de la sal, residuos de empresas de encurtidos

y salazones, textil, así como residuos de industrias de golosinas (en este caso para emplearlos como fuente de carbono) (Torregrosa-Crespo *et al.*, 2020c; Martínez-Espinosa 2024).

La biomasa de haloarqueas que se obtenía en los procesos de estudio de capacidades metabólicas y posible uso en biorremediación, ha sido analizada encontrando que varias especies de haloarqueas producen moléculas de interés como pigmentos naturales (en particular el carotenoides raro C₅₀ denominado bacteriorrubrina), biopolímeros plásticos (polihidroxialcanoatos), además de nanopartículas (cuando crecen en salmueras contaminadas con metales pesados y metaloides) (Simó-Cabrera *et al.*, 2021; Rodrigo-Baños *et al.*, 2021; Moopantakath *et al.*, 2022). De esta forma, ha sido posible empezar a diseñar y desarrollar procesos basados en economía circular (figura 2)

Dichos procesos permiten integrar la biorremediación de suelos, salmueras contaminadas y residuos de determinadas empresas con la producción de compuestos de alto valor añadido en el mercado como pigmentos naturales (que se emplean posteriormente para formulaciones cosméticas, farmacológicas y en alimentos procesados), bioplásticos con propiedades fisicoquímicas genuinas que los hacen idóneos para la fabricación de material quirúrgico y prótesis, así como nanopartículas (en estos momentos utilizadas entre otros sectores en el de electricidad, administración de fármacos, industria de las pinturas y cristales) (Martínez-Espinosa 2024; Simó-Cabrera *et al.*, 2024).

Bibliografía

- Bernabeu E, Miralles-Robledillo JM, Giani M, Valdés E, Martínez-Espinosa RM, Pire C.** (2021). In silico analysis of the enzymes involved in haloarchaeal denitrification. *Biomolecules*. 11(7):1043. doi: <https://doi.org/10.3390/biom11071043>
- Llorca MG, Martínez-Espinosa RM.** (2022). Assessment of *Haloferax mediterranei* genome in search of copper-molecular machinery with potential applications for bioremediation. *Front Microbiol*. 13:895296. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.895296>
- Martínez GM, Pire C, Martínez-Espinosa RM.** (2022). Hypersaline environments as natural sources of microbes with potential applications in biotechnology: The case of solar evaporation systems to produce salt in Alicante County (Spain). *Curr Res Microb Sci*. 3:100136. doi: <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100136>
- Martínez-Espinosa RM.** (2024). Halophilic archaea as tools for bioremediation technologies. *Appl Microbiol Biotechnol*. 108(1):401. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13241-z>
- Miralles-Robledillo JM, Martínez-Espinosa RM, Pire C.** (2024). Transcriptomic profiling of haloarchaeal denitrification through RNA-Seq analysis. *Appl Environ Microbiol*. 90(6):e0057124. doi: <https://doi.org/10.1128/aem.00571-24>
- Miralles-Robledillo JM, Bernabeu E, Giani M, Martínez-Serna E, Martínez-Espinosa RM, Pire C.** (2021). Distribution of denitrification among haloarchaea: a comprehensive study. *Microorganisms*. 9(8):1669. doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081669>
- Miralles-Robledillo JM, Torregrosa-Crespo J, Martínez-Espinosa RM, Pire C.** (2019). DMSO Reductase Family: Phylogenetics and applications of extremophiles. *Int J Mol Sci*. 20(13):3349. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms20133349>
- Moopantakath J, Imchen M, Anju VT, Busi S, Dyavaiah M, Martínez-Espinosa RM, Kumavath R.** (2023). Bioactive molecules from haloarchaea: Scope and prospects for industrial and therapeutic applications. *Front Microbiol*. 14:1113540. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1113540>
- Moopantakath J, Imchen M, Sreevalsan A, Siddhardha B, Martínez-Espinosa RM, Kumavath R.** (2022). Biosynthesis of silver chloride nanoparticles (AgCl-NPs) from extreme halophiles and evaluation of their Biological Applications. *Curr Microbiol*. 79(9):266. doi: <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02970-x>
- Rodrigo-Baños M, Montero Z, Torregrosa-Crespo J, Garbayo I, Vílchez C, Martínez-Espinosa RM.** (2021). Haloarchaea: A promising biosource for carotenoid production. *Adv Exp Med Biol*. 1261:165-174. doi: https://doi.org/10.1007/978-981-15-7360-6_13
- Saez-Zamacona I, Grindlay G, Martínez-Espinosa RM.** (2023). Evaluation of *Haloferax mediterranei* Strain R4 capabilities for cadmium removal from brines. *Mar Drugs*. 21(2):72. doi: <https://doi.org/10.3390/md21020072>
- Simó-Cabrera L, García-Chumillas S, Benítez-Benitez SJ, Cánovas V, Monzó F, Pire C, Martínez-Espinosa RM.** (2024). Production of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) by *Haloferax mediterranei* using candy industry waste as raw materials. *Bioengineering (Basel)*. 11(9):870. doi: <https://doi.org/10.3390/bioengineering11090870>
- Simó-Cabrera L, García-Chumillas S, Hagagy N, Saddiq A, Tag H, Selim S, AbdElgawad H, Arribas Agüero A, Monzó Sánchez F, Cánovas V, Pire C, Martínez-Espinosa RM.** (2021). Haloarchaea as cell factories to produce bioplastics. *Mar Drugs*. 19(3):159. doi: <https://doi.org/10.3390/md19030159>
- Torregrosa-Crespo J, Pire C, Richardson DJ, Martínez-Espinosa RM.** (2020a). Exploring the molecular machinery of denitrification in *Haloferax mediterranei* through proteomics. *Front Microbiol*. 11:605859. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.605859>
- Torregrosa-Crespo J, Pire C, Bergaust L, Martínez-Espinosa RM.** (2020b). *Haloferax mediterranei*, an archaeal model for denitrification in saline systems, characterized through integrated physiological and transcriptional analyses. *Front Microbiol*. 11:768. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00768>
- Torregrosa-Crespo J, Maset X, Guillena G, Ramón DJ, Martínez-Espinosa RM.** (2020c). New guidelines for testing "Deep eutectic solvents" toxicity and their effects on the environment and living beings. *Science of The Total Environment*, 704, 135382, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135382>
- Torregrosa-Crespo J, Pire C, Martínez-Espinosa RM, Bergaust L.** (2019). Denitrifying haloarchaea within the genus *Haloferax* display divergent respiratory phenotypes, with implications for their release of nitrogenous gases. *Environ Microbiol*. 21(1):427-436. doi: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14474>