



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA

AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MATEMÁTICA APLICADA

***Hacia la Agricultura Espacial: un Sistema Hipercíclico de
Microorganismos para la Biorremediación y
Fertilización del Regolito Marciano***

TRABAJO FIN DE GRADO

Autor/a: Elena García Arroyo

Tutores: Juan Carlos Nuño, José Ángel Capitán Gómez

Junio de 2025



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
Escuela Técnica Superior De
Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas

GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

**HACIA LA AGRICULTURA ESPACIAL: UN SISTEMA HIPERCÍCLICO DE
MICROORGANISMOS PARA LA BIORREMEDIACIÓN Y FERTILIZACIÓN DEL REGOLITO
MARCIANO**

TRABAJO FIN DE GRADO

Elena García Arroyo

MADRID, 2025

Tutores: Juan Carlos Nuño, José Ángel Capitán Gómez
Departamento de Matemática Aplicada, Universidad Politécnica de Madrid



TITULO DEL TFG- Hacia la Agricultura Espacial: un Sistema Hiperclíclico de Microorganismos para la Biorremediación y Fertilización del Regolito Marciano

Memoria presentada por Elena García Arroyo para la obtención del título de Graduado en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Madrid

Fdo:

VºBº Tutor y Director del TFG

**Juan Carlos Nuño.
Profesor Titular de Universidad.
Dpto de Matemática Aplicada.
E.T.S.I Montes, Forestal y Medio Natural - Universidad Politécnica de Madrid.**

VºBº Cotutor y Codirector del TFG

**José Ángel Capitán Gómez.
Profesor Titular de Universidad.
Dpto de Matemática Aplicada
E.T.S de Edificación-Universidad Politécnica de Madrid**

Madrid 24 de Junio 2025

A mi hermana Lucía (Cuchi)

Agradecimientos

A mi familia, por haber sido siempre un ejemplo de esfuerzo y vocación. Por inculcarme la importancia del trabajo y la perseverancia, por hacerme consciente del privilegio que supone poder estudiar, y por quererme de forma incondicional. En especial a mi hermana, que va a ser la mejor ingeniera biomédica del mundo.

A mis amigos. A los de siempre, por ser refugio. A los de Gante, por volverse mi casa fuera de casa. Y a los más recientes, por la confianza genuina. De los biotecnólogos, agradezco a Naroa el habernos cuidado durante toda la carrera.

Y a mis tutores, en especial a Juan Carlos, por todas esas reuniones tratando de materializar una idea tan bonita como ambiciosa.

Tabla de Contenido

Lista de Figuras	v
Lista de Tablas	ix
Abreviaturas y acrónimos	x
Símbolos	xi
Abstract	xii
Resumen	xiii
1 CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Agricultura espacial y terraformación	1
1.2 Hiperciclos y comunidades microbianas sintéticas para biorremediación de suelos	2
1.3 Análisis de balance de flujo y análisis de balance de flujo dinámico para el modelado de poblaciones microbianas	3
1.4 Objetivo del trabajo de fin de grado	5
2 CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	6
2.1 Búsqueda bibliográfica, selección de especies microbianas y diseño del sistema hipercíclico	6
2.2 Modelado metabólico	7
2.2.1 Herramientas computacionales	7
2.2.2 Generación y curación de modelos metabólicos	7
2.3 Simulación dinámica del compartimento 3	8
3 CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
3.1 Diseño del hiperciclo compartimentalizado para la biorremediación del regolito marciano	9
3.1.1 Compartimento 1: Detoxificación de percloratos	10
3.1.2 Compartimento 2: Producción de nutrientes esenciales	11
3.1.3 Compartimento 3: Enriquecimiento del regolito	12
3.1.4 Compartimento 4: Refinamiento final del regolito	14
3.2 Curación de los modelos metabólicos de las especies del hiperciclo	16
3.2.1 Generación de modelos draft y evaluación inicial	16
3.2.2 Anotación cruzada de metabolitos, genes y reacciones	17

3.2.3	Balance de masa y carga	17
3.2.4	Corrección de la ecuación de biomasa y desbloqueo de rutas	17
3.2.5	Evaluación de la reversibilidad y corrección de ciclos de energía	18
3.2.6	Evaluación global de mejoras estructurales	18
3.2.7	Próximos pasos según la literatura	19
3.3	Modelado metabólico y análisis matemático del compartimento 3	19
3.3.1	Aproximación matemática del modelado metabólico	22
3.3.2	Evaluación de la viabilidad del sistema frente a la extracción de oxígeno	25
3.3.3	Evaluación conjunta de las tasas de extracción de oxígeno y dióxido de carbono	26
3.3.4	Aproximación analítica mediante linealización del sistema y análisis de bifurcación	27
3.3.5	Análisis de la cuenca de atracción del sistema	29
4	CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES	30
5	CAPÍTULO 5. BIBLIOGRAFÍA	31
A.	ANEXO: Mejoras tras el Proceso de Curación de los Modelos	38
B.	ANEXO: Diagrama de Bifurcación del Compartimento 3	40
C.	ANEXO: Repositorio de GitHub	42

Lista de Figuras

1.1	Plan de Trabajo. El proyecto comienza con el diseño del consorcio microbiano, estructurado en cuatro compartimentos funcionales. A partir de ahí, se desarrollan en paralelo dos líneas necesarias para el modelado metabólico del sistema: la curación de seis modelos no publicados y el análisis matemático del compartimento 3.	5
3.1	Esquema del sistema hipercíclico compartimentalizado propuesto. Cada compartimento transforma el regolito y produce biomasa residual que alimenta al siguiente. La biomasa generada en el último compartimento recircula hacia el primero, cerrando el ciclo.	10
3.2	Resultados del análisis dinámico (dFBA) para el compartimento 3 del hiperciclo. Se alcanza estabilidad en ambas biomasa y concentraciones de gases, indicando una coexistencia funcional y un equilibrio atmosférico sostenido. Los valores de d_c y d_b empleados son 0,008 y 0,005 respectivamente. Los valores de E_{O_2} y E_{CO_2} empleados son 0,1 y 0,6 respectivamente. Las condiciones iniciales se establecieron como $X_1 = 0,3$ $X_2 = 0,2$ $C_{O_2} = C_{CO_2} = 1$. El tiempo de simulación es de 10 000h	21
3.3	Distribución porcentual de nutrientes generados en el compartimento 3 del hiperciclo tras 10,000 horas de simulación. La estimación se obtiene multiplicando el flujo de producción de cada metabolito por la biomasa total generada al final de la simulación dinámica. Se observa que predominan las fuentes de carbono (42.5%), entre las que se incluyen ácidos orgánicos y alcoholes de fermentación generados por <i>Bacillus subtilis</i> , así como azúcares y polialcoholes fotosintéticos producidos por <i>Chlorella vulgaris</i> . Los azúcares (21.3%) incluyen principalmente glucosa, maltosa y EPS secretados por ambas especies. La presencia de aminoácidos, amonio, fosfato y otros micronutrientes refleja una diversidad metabólica que contribuye a la fertilidad del regolito. Los parámetros empleados son los mismos que para la simulación dFBA. . .	22

3.4	Comparación entre la solución del modelo matemático aproximado y el modelo dFBA. Se muestra cómo la aproximación mediante ecuaciones diferenciales reproduce con alta similitud las dinámicas de biomasa de <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Bacillus subtilis</i> (izquierda), así como las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono (derecha), respecto a los resultados obtenidos mediante análisis de FBA dinámico. Esto valida el uso del modelo matemático para análisis teóricos y exploración de parámetros. Los valores de las constantes utilizados son los que se mencionaron anteriormente en este capítulo. El tiempo de simulación es de 10 000h. Las condiciones iniciales son las mismas que en dFBA.	24
3.5	Evaluación de la viabilidad del sistema en función de la tasa de extracción de oxígeno (E_{O_2}). A la izquierda se muestra la biomasa final de <i>Chlorella vulgaris</i> (X_1) y <i>Bacillus subtilis</i> (X_2), y a la derecha las concentraciones finales de oxígeno y dióxido de carbono. A medida que aumenta E_{O_2} , el sistema mantiene una zona viable (verde) hasta alcanzar un valor crítico de extracción ("tipping point" ≈ 4.16), a partir del cual colapsa (zona rosa). Los valores de los parámetros empleados son los mencionados en este capítulo. Las condiciones iniciales son las mismas que en dFBA. El tiempo de simulación es de 5000h.	25
3.6	Análisis de sensibilidad y viabilidad del compartimento 3 en función de la extracción simultánea de oxígeno ((E_{O_2})) y dióxido de carbono ((E_{CO_2})). La imagen superior muestra la región de viabilidad del sistema (verde) frente a colapso (rojo), concluyendo que existe una frontera clara de sostenibilidad, más restrictiva para E_{O_2} que para E_{CO_2} . Las imágenes inferiores representan las concentraciones finales de biomasa de <i>Bacillus subtilis</i> (X_2) y <i>Chlorella vulgaris</i> (X_1) en función de E_{O_2} y E_{CO_2} , mostrando cómo ambas especies mantienen altos niveles de supervivencia en amplias zonas del espacio de parámetros. Los valores de los parámetros empleados son los mencionados en este capítulo. Las condiciones iniciales son las mismas que en dFBA. El tiempo de simulación es de 5000h.	27
3.7	Comparación entre la simulación en función de E_{O_2} del sistema de EDOs tipo Monod vs su aproximación linealizada. Los valores de los parámetros empleados son los mencionados en este capítulo. Las condiciones iniciales son las mismas que en dFBA. El tiempo de simulación es de 10 000h.	28

3.8	<p>Cuenca de atracción del punto de equilibrio de coexistencia para distintas condiciones iniciales de biomasa de <i>Chlorella vulgaris</i> (X_1) y <i>Bacillus subtilis</i> (X_2). El análisis muestra las regiones en las que el sistema evoluciona hacia un estado estable de coexistencia (amarillo, supervivencia) o colapsa (morado, extinción). Los valores de los parámetros empleados son los mencionados en este capítulo. Las condiciones iniciales fueron las mismas que en dFBA. El tiempo de simulación es de 10000h.</p>	29
1	<p>Porcentaje de anotaciones recuperadas para cada especie microbiana del hiperciclo mediante las bases de datos BIGG y KEGG. Se muestran las coberturas relativas de reacciones metabólicas y metabolitos asignados en cada base, tras el proceso de curación inicial de los modelos draft generados con ModelSEED. La combinación de anotaciones múltiples mejora la calidad del modelo reconstruido y permite identificar lagunas metabólicas relevantes para cada especie.</p>	38
2	<p>Evaluación de la consistencia de los modelos metabólicos tras el proceso de curación. Se presentan los porcentajes de reacciones que cumplen con el balance de masa, el balance de carga y la capacidad de flujo sin restricciones en cada modelo microbiano, según los criterios del análisis MEMOTE. Los elevados valores validan el aumento de calidad de los modelos tras las primeras etapas de curación</p>	38
3	<p>Reversibilidad de las reacciones en función de la energía libre de Gibbs calculada. Se presentan las cantidades de reacciones clasificadas como reversibles e irreversibles tras el análisis termodinámico preliminar, utilizando estimaciones obtenidas mediante la herramienta Equilibrator. Esta información permite refinar los modelos metabólicos y mejorar la predicción del flujo de materia en el hiperciclo.</p>	39
4	<p>Propiedades generales de los modelos metabólicos tras el proceso de curación. Se muestran el número total de metabolitos, reacciones y genes asociados en cada modelo, así como su cobertura metabólica estimada como el cociente entre reacciones y genes. Las especies presentan coberturas cercanas a 1, lo que indica una adecuada asignación funcional y una base sólida para simulaciones metabólicas.</p>	39

5	Diagrama de bifurcación en función de la tasa de extracción de oxígeno (E_{O_2}). Se representan dos variables: X_1 (en azul) y X_2 (en verde). Para cada una, se muestra la rama estable (línea continua) e inestable (línea discontinua). El equilibrio trivial aparece como una línea roja sobre el eje horizontal. Los valores de los parámetros utilizados son los mencionados en el Capítulo 3.	40
---	---	----

Lista de Tablas

- 3.1 **Comparación entre tasas de crecimiento experimentales y predichas por cada modelo microbiano.** Las tasas predichas se obtienen mediante simulaciones de flujo metabólico bajo condiciones definidas ajustando las reacciones de intercambio de los modelos. Aunque los valores son realistas y consistentes en orden de magnitud, tienden a estar inflados respecto a los datos experimentales debido a los ciclos de energía incorrectos y desajustes termodinámicos. 19
- 3.2 **Puntos de equilibrio y su estabilidad.** Los valores de los parámetros empleados son los mencionados anteriormente en este capítulo. Las condiciones iniciales son las mismas que en dFBA. 24

Lista de Abreviaturas y acrónimos

MELiSSA – Micro-Ecological Life Support System Alternative

ESA – European Space Agency

VEGGIE – Vegetable Production System

NASA – National Aeronautics and Space Administration

BLLS – Bioregenerative Life Support System

FBA – Flux Balance Analysis

dFBA – Dynamic Flux Balance Analysis

GEM – Genome-Scale Metabolic Model

ODE – Ecuación Diferencial Ordinaria (Ordinary Differential Equation)

CO₂ – Dióxido de Carbono

O₂ – Oxígeno

NH₄⁺ – Ion amonio

DW – Dry Weight (peso seco)

MEMOTE – Metabolic Model Testing

KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

BiGG – Biochemical, Genetic and Genomic knowledgebase

RefSeq – Reference Sequence Database

SBLM – Systems Biology Markup Language

PATRIC – Pathosystems Resource Integration Center

COBRApy – COstraints-Based Reconstruction and Analysis in Python

KBase – U.S. Department of Energy Systems Biology Knowledgebase)

ClO₄⁻ – Perclorato

N₂ – Nitrógeno

H₂ – Hidrógeno

AO – Ácidos Orgánicos

EPS – Exopolisacáridos

UPM – Universidad Politécnica de Madrid

Lista de Símbolos

x_1 – Biomasa de *Chlorella vulgaris* (g DW/L)

x_2 – Biomasa de *Bacillus subtilis* (g DW/L)

O_2 – Concentración de oxígeno disuelto (mmol/L)

CO_2 – Concentración de dióxido de carbono (mmol/L)

μ – Tasa de crecimiento específica (h^{-1})

μ_{\max} – Tasa máxima de crecimiento (h^{-1})

K_s – Constante de saturación de Monod (mmol/L)

E_{O_2} – Tasa de extracción de oxígeno (mmol/h)

E_{CO_2} – Tasa de extracción de dióxido de carbono (mmol/h)

d – Tasa de mortalidad (h^{-1})

f – Flujo metabólico (mmol/gDW/h)

$\frac{dx}{dt}$ – Derivada temporal de una variable x

Δx – Variación o incremento de x

S – Substrato o nutriente limitante

V – Velocidad de reacción (mmol/h)

ΔG° – Energía libre estándar de Gibbs (kJ/mol)

Abstract

The colonization of Mars presents numerous technological, biological, and environmental challenges, one of the most pressing being the sustainable production of food in a hostile environment. Martian regolith, which constitutes the planet's surface substrate, exhibits several limitations such as the absence of organic matter, high salinity, alkaline pH, poor water retention capacity, and the presence of toxic compounds like perchlorates. Bioremediation through specialized microorganisms is a promising strategy to transform regolith into fertile soil capable of supporting plant growth.

This Bachelor's Thesis is part of a broader project in the field of synthetic microbial ecosystem design for the fertilization of Martian soils. Specifically, a compartmentalized hypercyclic system composed of eight microbial species has been developed, organized into four functional compartments. Each compartment was designed to perform a specific task in the conditioning of regolith: (1) perchlorate detoxification, (2) production of basic nutrients, (3) organic enrichment, and (4) final soil refinement. The design was based on an extensive literature review of the physiological and metabolic capacities of the selected species.

In addition to the conceptual design, the work includes two complementary methodological approaches. On the one hand, the curation process of genome-scale metabolic models (GEMs) was initiated for six of the proposed species (for which no previously published models existed). This process included cross-annotation with specialized databases, mass and charge balancing, correction of biomass equations, and an initial thermodynamic analysis.

On the other hand, a full dynamic modeling of Compartment 3 was carried out, using both Dynamic Flux Balance Analysis (dFBA) simulations and a continuous approximation based on Ordinary Differential Equations (ODEs). This model enables the representation of metabolic cooperation between *Chlorella vulgaris* and *Bacillus subtilis*, key species for oxygen production and organic enrichment of regolith. The system was used to perform stability analysis, sensitivity to initial conditions, equilibrium point evaluation, and simulations with variable gas extraction rates.

This work represents a first approach to the computational design of cooperative microbial systems for space agriculture, laying the groundwork for future stages of the project, such as full-scale modeling of the hypercycle and its experimental validation.

Resumen

La colonización de Marte plantea numerosos desafíos tecnológicos, biológicos y ambientales, siendo uno de los más relevantes la producción sostenible de alimentos en un entorno hostil. El regolito marciano, que constituye el sustrato superficial del planeta, presenta múltiples limitaciones como la ausencia de materia orgánica, elevada salinidad, pH alcalino, deficiente retención hídrica y la presencia de compuestos tóxicos como los percloratos. La biorremediación mediante microorganismos especializados es una estrategia prometedora para transformar el regolito en un suelo fértil capaz de sostener el crecimiento vegetal.

Este Trabajo de Fin de Grado se enmarca en un proyecto más amplio en el campo del diseño de ecosistemas microbianos sintéticos para la fertilización de suelos marcianos. En concreto, se ha desarrollado un sistema hipercíclico compartimentalizado compuesto por ocho especies microbianas, organizado en cuatro compartimentos funcionales. Cada compartimento ha sido diseñado para cumplir una tarea específica en el acondicionamiento del regolito: (1) detoxificación de percloratos, (2) producción de nutrientes básicos, (3) enriquecimiento orgánico y (4) refinamiento final del suelo. El diseño se ha fundamentado en un análisis bibliográfico exhaustivo de las capacidades fisiológicas y metabólicas de las especies seleccionadas.

Además del diseño conceptual, el trabajo incluye dos líneas metodológicas complementarias. Por un lado, se ha iniciado el proceso de curación de modelos metabólicos a escala genómica (GEMs) para seis de las especies propuestas (para las que no existían modelos previamente publicados). Este proceso ha incluido la anotación cruzada con bases de datos especializadas, el balance de masa y carga, la corrección de ecuaciones de biomasa y un primer análisis termodinámico.

Por otro lado, se ha llevado a cabo un modelado dinámico completo del compartimento 3, empleando tanto simulaciones de Análisis de Balance de Flujos Dinámico (dFBA) como una aproximación continua basada en ecuaciones diferenciales ordinarias (EDOs). Este modelo permite representar la cooperación metabólica entre *Chlorella vulgaris* y *Bacillus subtilis*, especies clave para la producción de oxígeno y compuestos orgánicos enriquecedores del regolito. A partir de este sistema se han realizado análisis de estabilidad, sensibilidad a condiciones iniciales, evaluación de puntos de equilibrio y simulaciones con tasas variables de extracción de gases.

Este trabajo constituye una primera aproximación al diseño computacional de sistemas microbianos cooperativos para la agricultura espacial, sentando las bases para futuras fases del proyecto como la modelización completa del hiperciclo y su validación experimental.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Agricultura espacial y terraformacion

En las últimas décadas, Marte ha dejado de ser solo un objeto de estudio para convertirse en un objetivo estratégico. La posibilidad de establecer misiones tripuladas de larga duración ha impulsado inversiones en tecnologías que permitan la subsistencia humana fuera de la Tierra. Uno de los mayores retos es asegurar un suministro autónomo de alimentos, lo que ha dado origen a la disciplina de la **agricultura espacial**.

Esta se enfoca en el cultivo de plantas en entornos controlados fuera del planeta, como ocurre en proyectos pioneros: *MELiSSA* (ESA), que busca reciclar residuos humanos en un ecosistema cerrado para producir oxígeno, agua y alimento mediante procesos biológicos (Frossard et al., 2024), y *VEGGIE* (NASA), centrado en el cultivo de vegetales en condiciones espaciales para mejorar la dieta y el bienestar de los astronautas (NASA, 2014).

Sin embargo, el cultivo en Marte enfrenta condiciones extremas. Su atmósfera está compuesta mayoritariamente por dióxido de carbono (CO_2) (95.32 %), con solo 0.13 % de oxígeno (O_2) y 2.7 % de nitrógeno (N_2). Las temperaturas varían entre -125°C y 20°C , y la ausencia de campo magnético expone al planeta a una intensa radiación. Además, su gravedad es un 38 % de la terrestre, lo que podría afectar el desarrollo vegetal (Mahaffy et al., 2013).

Para contrarrestar estas condiciones se han propuesto tecnologías como invernaderos presurizados, enterrados o con protección contra radiación; sistemas térmicos alimentados por energía solar; y fuentes de luz adaptadas al fototropismo vegetal (Babakhanova et al., 2019). También se contempla producir agua localmente mediante extracción de hielo o reacciones químicas con oxígeno atmosférico (Drysdale et al., 2004, Hecht, 2002).

Estas soluciones hacen viable el desarrollo de **sistemas biológicos cerrados de soporte vital (BLSS)**, capaces de reciclar recursos y mantener la vida en entornos aislados. Para Eckart (1996), un BLSS eficiente debe controlar la atmósfera, recuperar agua, producir alimentos nutritivos, reciclar residuos en nutrientes, emplear organismos seguros y contar con

una arquitectura modular y autosuficiente (Eckart, 1996).

Sin embargo, incluso con estos avances, el gran obstáculo sigue siendo el **regolito marciano**, la capa superficial del suelo. Este sustrato carece de materia orgánica, lo que dificulta la retención de agua y el intercambio de nutrientes. Contiene altas concentraciones de sales, especialmente percloratos, tóxicos para plantas y humanos incluso a bajas concentraciones (Wadsworth y Cockell, 2017).

Aunque el regolito contiene elementos esenciales como C, N, P, K, Mg y Ca, no están en formas disponibles para las plantas. Su pH alcalino y estructura poco cohesionada dificultan la formación de agregados estables, lo que impide el desarrollo radicular adecuado (Caporale et al., 2020, Fritsche et al., 2024). Por tanto, no puede utilizarse directamente como sustrato agrícola.

Una de las soluciones más prometedoras es la **biorremediación**, que emplea microorganismos capaces de transformar el regolito mediante procesos metabólicos. Estos pueden degradar percloratos, liberar nutrientes, ajustar el pH, mejorar la estructura física del suelo y aumentar su capacidad de retención de agua mediante la producción de exopolisacáridos y compuestos estabilizadores.

1.2 Hiperciclos y comunidades microbianas sintéticas para biorremediación de suelos

La fertilización del regolito marciano no puede depender únicamente de cepas microbianas individuales, sino que requiere un sistema cooperativo robusto capaz de producir y reciclar nutrientes de forma constante en condiciones extremas. En este contexto, los **hiperciclos microbianos** surgen como una estrategia prometedora. Inspirados por el modelo teórico de Eigen y Schuster, estos sistemas consisten en redes catalíticas cíclicas donde cada especie facilita el crecimiento de la siguiente, generando interdependencia funcional y propiedades colectivas como estabilidad y autorregulación (Eigen y Schuster, 1977).

Este tipo de cooperación ha sido aplicado en restauración de suelos áridos, donde la inoculación controlada de microorganismos fotosintéticos y diazótrofos ha demostrado mejorar la retención de agua, la fijación de carbono y el contenido orgánico del suelo (Chamizo et al., 2018). Además, los hiperciclos permiten una circulación eficiente de la materia y una mayor resistencia frente a perturbaciones externas, aspectos críticos en ecosistemas como el regolito marciano.

Desde el punto de vista teórico, estos sistemas han sido modelizados como EDOs que incorporan

tanto el crecimiento poblacional como la producción y consumo de metabolitos esenciales (Amor et al., 2017, Solé y Sardanyés, 2009).

En el caso del regolito, los hiperciclos podrían organizar comunidades microbianas capaces de llevar a cabo funciones clave como la detoxificación, la producción de compuestos orgánicos y la mejora estructural del suelo. Además, al estructurarse en **compartimentos funcionales**, cada grupo microbiano puede especializarse en una tarea específica, lo que permite distribuir el esfuerzo metabólico, reducir la carga individual y aumentar la eficiencia del sistema en su conjunto.

1.3 Análisis de balance de flujo y análisis de balance de flujo dinámico para el modelado de poblaciones microbianas

Los **modelos metabólicos a escala genómica** (GEMs, por sus siglas en inglés) son herramientas fundamentales en biología de sistemas para comprender y predecir el comportamiento metabólico de microorganismos en distintos entornos. Se construyen a partir de la anotación funcional del genoma, identificando genes que codifican enzimas y asociándolos a reacciones bioquímicas conocidas. Estas se integran en una red donde cada nodo representa un metabolito y cada arista una reacción, formando una reconstrucción detallada del metabolismo celular (Gu et al., 2019).

Matemáticamente, esta red de reacciones bioquímicas se representa mediante una **matriz estequiométrica** $A \in \mathbb{R}^{m \times n}$, donde cada entrada a_{ij} es el coeficiente estequiométrico del metabolito i en la reacción j (negativo si es reactivo, positivo si es producto). Esto permite cuantificar el flujo metabólico bajo distintas condiciones y simular el comportamiento celular.

Sobre esta base se aplica el **Análisis de Balance de Flujos** (FBA), una técnica de optimización que, bajo la suposición de estado estacionario ($A \cdot \vec{v} = 0$), busca maximizar una función objetivo (generalmente la producción de biomasa), representada como una combinación lineal de los flujos:

$$\text{máx } Z = \vec{w}^T \cdot \vec{v}, \quad (1.1)$$

donde \vec{v} es el vector de flujos y \vec{w} es el vector de coeficientes que ponderan cada reacción en la función objetivo (Orth et al., 2010).

Para evitar esta suposición de estado estacionario, se emplea el **Análisis Dinámico de Balance de Flujos** (dFBA), que permite modelar cómo cambian en el tiempo las concentraciones de metabolitos extracelulares y la biomasa celular. El algoritmo se basa en pasos discretos de tiempo y sigue cuatro fases:

1. Se resuelve el FBA con las condiciones actuales;
2. Se actualizan las concentraciones de metabolitos:

$$\Delta C_M = v_M(t_i) \cdot X(t_i) \cdot \Delta t, \quad (1.2)$$

donde ΔC_M es el cambio en la concentración del metabolito, $v_M(t_i)$ es el flujo de consumo/producción del metabolito M calculado con FBA, $X(t_i)$ la biomasa y Δt el paso temporal;

3. Se actualiza la biomasa:

$$\Delta X = \mu(t_i) \cdot X(t_i) \cdot \Delta t, \quad (1.3)$$

donde $\mu(t_i)$ es la tasa de crecimiento, calculada con FBA y ΔX el cambio en la concentración de biomasa;

4. Se ajustan los límites de captación de metabolitos según la concentración disponible, usando una relación tipo Michaelis-Menten:

$$v_{\text{uptake}} = \frac{V_{\text{máx}} \cdot C_M}{K_m + C_M}, \quad (1.4)$$

donde $V_{\text{máx}}$ es la tasa máxima, K_m la constante de semisaturación y C_M la concentración externa del metabolito. Este paso es clave, ya que al modificar los límites de entrada en función de las nuevas concentraciones, la siguiente resolución del FBA se realiza bajo condiciones diferentes. Esto implica que la nueva distribución de flujos metabólicos \vec{v} será distinta, y por tanto, también cambiarán las concentraciones externas de metabolitos en el siguiente paso de simulación.

Este ciclo se repite en cada instante $t_{i+1} = t_i + \Delta t$, permitiendo modelar la interacción dinámica entre metabolismo y entorno. El dFBA es especialmente útil para analizar hiperciclos microbianos, ya que permite evaluar su capacidad de producción de nutrientes respecto del tiempo (Henson y Hanly, 2014).

1.4 Objetivo del trabajo de fin de grado

El objetivo de este trabajo de fin de grado es el diseño de un sistema hipercíclico microbiano para la fertilización del regolito marciano y la evaluación de su viabilidad. El trabajo se estructurará en tres fases principales (ver Figura 1.1):

1. En primer lugar, se diseñará un consorcio microbiano compartimentalizado a partir de una revisión bibliográfica dirigida, seleccionando especies con funciones complementarias y potencial para sobrevivir en condiciones similares al regolito marciano. Esta búsqueda permitirá definir un sistema compuesto por ocho microorganismos distribuidos en cuatro compartimentos funcionales.

2. En segundo lugar, se modelará el hiperciclo representando cada microorganismo mediante un GEM, conectando metabólicamente los compartimentos mediante flujos de intercambio. Dado que seis de las ocho especies no disponen de modelos curados y validados, se iniciará un proceso de curación manual de estos modelos. Aunque no se completará por la alta complejidad y duración del proceso, se establecerá una base estandarizada para futuras simulaciones.

3. En tercer lugar, se aplicará un análisis dinámico (dFBA) sobre el compartimento 3, ya que las especies implicadas (*Chlorella vulgaris* y *Bacillus subtilis*) sí disponen de GEMs curados y publicados. Esta simulación permitirá estudiar la evolución temporal del sistema en condiciones específicas. No obstante, al tratarse de una técnica computacional que no permite observar directamente las relaciones matemáticas subyacentes, se desarrollará en paralelo un modelo basado en EDOs que reproduzca las dinámicas observadas en el dFBA. Este modelo permitirá analizar propiedades fundamentales del sistema, como la existencia de equilibrios, la estabilidad y posibles bifurcaciones, ofreciendo así una comprensión más profunda de las dependencias entre variables clave como biomasa, oxígeno y dióxido de carbono.

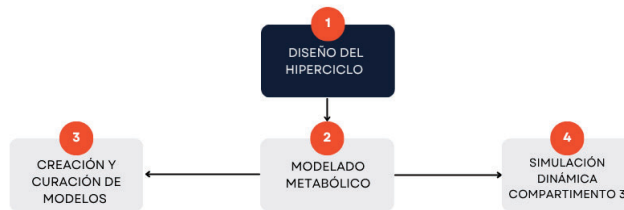


Figura 1.1: Plan de Trabajo. El proyecto comienza con el diseño del consorcio microbiano, estructurado en cuatro compartimentos funcionales. A partir de ahí, se desarrollan en paralelo dos líneas necesarias para el modelado metabólico del sistema: la curación de seis modelos no publicados y el análisis matemático del compartimento 3.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Búsqueda bibliográfica, selección de especies microbianas y diseño del sistema hipercíclico

La primera fase del trabajo consiste en una revisión bibliográfica orientada a identificar especies microbianas con perfiles metabólicos compatibles con un sistema hipercíclico para el acondicionamiento del regolito marciano. La búsqueda se centra en microorganismos con tolerancia a condiciones extremas (baja disponibilidad de nutrientes, pH alcalino, presión reducida, etc.) y con capacidad de producir compuestos útiles para la mejora del suelo, como azúcares, ácidos orgánicos, exopolisacáridos o biomasa residual.

Se emplean bases de datos como *PubMed*, *Google Scholar* y *ScienceDirect*, priorizando estudios experimentales y revisiones sistemáticas. Las búsquedas se realizan mediante combinaciones de términos clave como “*microbial remediation*”, “*Mars surviving bacteria*”, “*carbon fixation*” o “*extremophiles*”. Además, se consultan bases especializadas como *BacDive*, *KEGG*, *UniProt*, *MetaCyc*, *BioCyc* y *NCBI Genome* para obtener información detallada sobre rutas metabólicas, condiciones de cultivo y productos extracelulares.

Las especies seleccionadas se organizan en un sistema hipercíclico compartimentalizado, distribuyéndose en cuatro grupos funcionales según sus capacidades metabólicas y requerimientos ambientales. Se prioriza la compatibilidad ecológica y metabólica entre especies, analizando estudios de co-cultivo y considerando tanto los productos secretados como los nutrientes requeridos por cada cepa. El diseño final consiste en un ciclo cerrado de cooperación, en el que los productos del último compartimento nutren al primero, cerrando el sistema.

Toda la información se recoge en una tabla comparativa con los criterios clave de selección: metabolismo central, productos extracelulares, tolerancia a condiciones extremas y requisitos atmosféricos. A partir de este análisis, se asignan las especies a cada compartimento según su función principal: detoxificación, provisión de nutrientes básicos, estabilización del suelo y refinamiento final del sustrato.

2.2 Modelado metabólico

2.2.1 Herramientas computacionales

Para el desarrollo y análisis de los modelos metabólicos, se emplean diversas herramientas computacionales utilizadas en biología de sistemas. Entre ellas destaca **COBRAPy** (*Constraint-Based Reconstruction and Analysis*), una biblioteca en **Python** para análisis de redes metabólicas. Esta herramienta permite cargar modelos en formato **SBML** (*Systems Biology Markup Language*), realizar simulaciones de FBA y dFBA, y editar reacciones, metabolitos y genes. Todo el trabajo se desarrolla en entornos **Jupyter Notebook**, lo que facilita la visualización paso a paso del proceso, incluyendo resultados intermedios.

Para la generación automática de modelos de las especies sin GEMs disponibles, se utiliza la plataforma web **KBase** (*U.S. Department of Energy Systems Biology Knowledgebase*), que ofrece una interfaz gráfica para el acceso a genomas, anotaciones funcionales y herramientas de modelado metabólico como **ModelSEED**. Esta plataforma permite importar genomas desde bases de datos públicas y ejecutar flujos de trabajo estándar.

2.2.2 Generación y curación de modelos metabólicos

Se generan modelos metabólicos preliminares (*draft*) para aquellas especies sin GEMs curados, utilizando la plataforma **KBase** con la herramienta **ModelSEED**. Los genomas se seleccionan de las bases **PATRIC** y **RAST**, y su calidad se evalúa mediante **CheckM**, considerando métricas de cobertura y contaminación. Los modelos se exportan en formato **SBML** y se manipulan mediante **COBRAPy** en entornos **Python/Jupyter**.

La curación inicial incluye la evaluación con **MEMOTE** para detectar problemas de conectividad, balance de masa y anotación. Se asignan fórmulas químicas y enlaces cruzados con bases de datos (**KEGG**, **BiGG**, **MetaCyc**) utilizando los archivos `compounds.tsv` y `reactions.tsv` de **ModelSEED**. Los genes se mapean de **PATRIC** a **RefSeq**.

La ecuación de biomasa se edita manualmente para corregir los coeficientes estequiométricos y permitir el uso del flujo de biomasa como tasa de crecimiento. Finalmente, se asigna direccionalidad a las reacciones mediante **eQuilibrator**, calculando la energía libre de Gibbs estándar ($\Delta G'$) y clasificando cada reacción como reversible o irreversible según su valor.

2.3 Simulación dinámica del compartimento 3

Para la simulación dinámica del compartimento 3, se utilizan los modelos metabólicos curados de *Bacillus subtilis* (modelo iY0844, obtenido de BiGG Models) y *Chlorella vulgaris* (modelo iCZ843, descargado desde su repositorio original en GitHub), ambos en formato SBML.

Los modelos se importan en un entorno `Jupyter Notebook` mediante `COBRApy`. Las condiciones del regolito marciano se simulan ajustando los límites de las reacciones de intercambio para ambos modelos. El análisis dinámico se realiza mediante dFBA, resolviendo la evolución temporal con el método 'BDF' del módulo `solve_ivp` de `SciPy`, aplicando tolerancias estrictas y eventos personalizados para interrumpir la simulación en caso de crecimiento nulo o agotamiento de gases clave.

La búsqueda de puntos de equilibrio y el análisis de estabilidad se realiza con la función `fsolve` de `SciPy`. La visualización de resultados se lleva a cabo con `Matplotlib`, generando gráficos bidimensionales, tridimensionales y animaciones para representar dinámicas de biomasa, consumo de nutrientes y producción de O_2/CO_2 .

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Diseño del hiperciclo compartimentalizado para la biorremediación del regolito marciano

El sistema propuesto se basa en un diseño compartimentalizado e hipercíclico, orientado a abordar de forma secuencial las limitaciones del regolito marciano como sustrato agrícola. Consta de cuatro compartimentos funcionales, cada uno especializado en una etapa crítica del acondicionamiento del suelo. Su característica central es el flujo circular de biomasa y metabolitos entre compartimentos, lo que genera retroalimentación positiva y promueve la autosostenibilidad del sistema (ver Figura 3.1).

- **Compartimento 1: Detoxificación.** Utiliza *Dechloromonas aromatica* para reducir percloratos a cloruro y oxígeno, eliminando compuestos tóxicos del regolito.
- **Compartimento 2: Producción de nutrientes básicos.** Incluye *Anabaena cylindrica*, *Nostoc muscorum* y *Clostridium aminophilum*, responsables de generar azúcares, amonio, oxígeno y biomasa.
- **Compartimento 3: Enriquecimiento del suelo.** Combina *Chlorella vulgaris* y *Bacillus subtilis* para aportar lípidos, ácidos orgánicos y exopolisacáridos (EPS), mejorando la estructura y fertilidad del regolito.
- **Compartimento 4: Refinamiento final.** Integra *Halomonas elongata* y *Rhizobium leguminosarum*, productoras de osmoprotectores y compuestos que mejoran la retención de agua y la biodisponibilidad de nutrientes.

Este diseño favorece la especialización metabólica y la cooperación entre especies, facilitando la conversión progresiva del regolito en un sustrato fértil apto para la agricultura marciana.

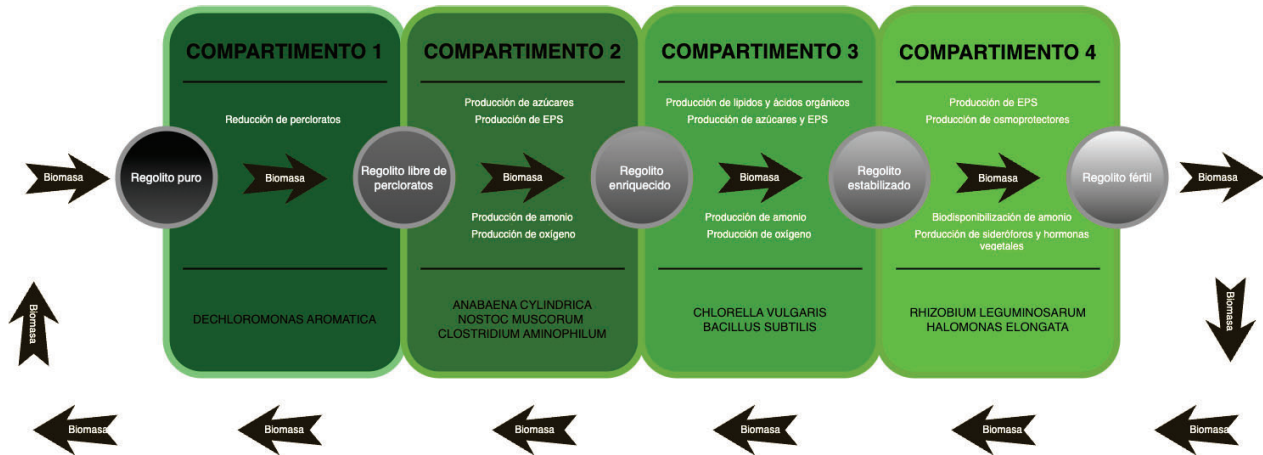


Figura 3.1: Esquema del sistema hipercíclico compartimentalizado propuesto. Cada compartimento transforma el regolito y produce biomasa residual que alimenta al siguiente. La biomasa generada en el último compartimento recircula hacia el primero, cerrando el ciclo.

3.1.1 Compartimento 1: Detoxificación de percloratos

El diseño del hiperciclo incorpora un compartimento inicial dedicado exclusivamente a la detoxificación del regolito marciano, debido a la presencia de percloratos (ClO_4^-) en concentraciones del 0.4 %–0.6 % en masa, tal como han documentado las misiones *Phoenix* y *Curiosity* (Davila et al., 2013). Estos compuestos altamente solubles y oxidantes interfieren con procesos fisiológicos fundamentales en plantas y microorganismos, y su exposición a radiación ultravioleta (como la de Marte) puede generar especies reactivas aún más tóxicas, como cloratos y radicales libres (Kumar et al., 2023, Oze et al., 2021, Wadsworth y Cockell, 2017).

Para abordar esta limitación crítica, se seleccionó *Dechloromonas aromatica*, una β -proteobacteria anaerobia facultativa con capacidad para reducir perclorato mediante respiración anaerobia, incluso en presencia de aceptores alternativos como nitrato (“*Dechloromonas aromatica* RCB Proteobacteria”, 2013, Bender et al., 2002, Bender et al., 2005, Van Trump y Coates, 2009). Su metabolismo incluye dos enzimas clave: la perclorato reductasa, que convierte ClO_4^- en clorito (ClO_2^-), y la clorito dismutasa, que transforma el clorito en cloruro (Cl^-) y O_2 , un subproducto beneficioso para los compartimentos aeróbicos posteriores (Bender et al., 2005).

D. aromatica presenta además una alta tolerancia a medios con baja disponibilidad de nutrientes, lo que la hace adecuada para operar en condiciones marcianas simuladas. Según Salinero et al., 2009, esta bacteria puede mantenerse activa si se le proporciona una fuente de carbono reducido y ciertos micronutrientes esenciales.

En este sistema, se plantea utilizar una solución de arranque compuesta por acetato y

lactato como cebadores orgánicos. Ambos compuestos son fácilmente metabolizables por *Dechloromonas*, no generan productos tóxicos y pueden incorporarse como suplemento inicial para garantizar la actividad del sistema durante su fase de implantación (Ginige et al., 2005). A medida que el sistema se estabilice, esta fuente será sustituida progresivamente por biomasa residual procedente del compartimento 4.

El compartimento 1 operaría bajo condiciones controladas de microaerobiosis o anaerobiosis, con temperatura y humedad ajustadas artificialmente para maximizar la actividad enzimática. El regolito detoxificado al final del proceso, ya libre de percloratos, se transferiría al compartimento 2 para su posterior acondicionamiento. Simultáneamente, la biomasa generada por *D. aromatica*, compuesta por restos celulares, EPS y metabolitos secundarios, se incorporaría también al compartimento 2, actuando como fuente inicial de carbono para especies como *Clostridium aminophilum* y contribuyendo al establecimiento de las cianobacterias.

3.1.2 Compartimento 2: Producción de nutrientes esenciales

El compartimento 2 del hiperciclo está diseñado para enriquecer el regolito detoxificado con compuestos esenciales como oxígeno, carbono asimilable y nitrógeno biodisponible. Para ello, se ha seleccionado una combinación estratégica de dos cianobacterias fotoautótrofas diazótrofas (*Anabaena cylindrica* y *Nostoc muscorum*) junto a una bacteria anaerobia heterótrofa (*Clostridium aminophilum*) con capacidad proteolítica.

Tanto *Anabaena cylindrica* como *Nostoc muscorum* son cianobacterias filamentosas ampliamente estudiadas por su resistencia a condiciones extremas y su potencial como biofertilizantes naturales (Yadav et al., 2022). Ambas presentan metabolismo fotoautótrofo oxigénico: emplean la luz solar y el CO₂ como únicas fuentes de energía y carbono, respectivamente, y liberan oxígeno como subproducto. Esto las hace particularmente adecuadas para el entorno marciano, donde el 95.3 % de la atmósfera está compuesta por CO₂ y existe irradiación solar suficiente para mantener la fotosíntesis (X. Chen et al., 2022, Zhang et al., 2024).

Además, ambas especies poseen la capacidad de fijar N₂ mediante heterocistos, estructuras celulares especializadas con pared celular engrosada que impide la entrada de oxígeno y protege la actividad de la nitrogenasa, enzima responsable de la conversión de N₂ en amonio (NH₄⁺) (Murry et al., 1984).

Durante su crecimiento, secretan compuestos clave para el acondicionamiento del suelo: azúcares solubles (glucosa, trehalosa), como fuente de carbono; NH₄⁺, producto de la fijación de nitrógeno; O₂, subproducto fotosintético; y EPS, que mejoran la retención hídrica y la

estructura del regolito (Laroche, 2022; Macário et al., 2022; Naseem y Bano, 2022; Wolk et al., 1976).

Ambas especies han sido evaluadas en simulantes de regolito marciano, mostrando tolerancia a baja presión parcial de oxígeno, salinidad moderada y ciclos térmicos amplios (Arai et al., 2008, Ramalho et al., 2022, Averagesch, 2021).

Para complementar la fijación de nitrógeno y aprovechar los residuos generados en el compartimento anterior, se incorpora *Clostridium aminophilum*, una bacteria grampositiva anaerobia conocida por su metabolismo proteolítico. Esta especie degrada proteínas, péptidos y ácidos nucleicos presentes en la biomasa residual (como la generada por *Dechloromonas aromatica*), liberando una mezcla de productos que enriquecen tanto a las especies del compartimento como al sustrato: NH_4^+ , como fuente de nitrógeno asimilable; ácidos orgánicos (acético, butírico, propiónico); CO_2 , que puede ser reciclado por las cianobacterias; y aminoácidos solubles (Russell y Rychlik, 1999; Rychlik y Russell, 2002; Sangavai y Chellapandi, 2017).

C. aminophilum tolera condiciones de pH neutro-alcalino y salinidad moderada (Paster et al., 1993), lo que la hace adecuada para las características fisicoquímicas del regolito. Este compartimento operaría bajo ciclos de iluminación artificial para sostener la fotosíntesis de las cianobacterias.

La compatibilidad ecológica de este sistema ha sido respaldada por estudios de co-cultivo. *Anabaena cylindrica* y *Nostoc muscorum* muestran cooperación metabólica en sistemas mixtos, y se han documentado sinergias positivas entre cianobacterias y bacterias clostridiales en sistemas simbióticos cerrados, donde el intercambio de metabolitos mejora la eficiencia del consorcio (Morris et al., 2014)

Al finalizar su paso por el compartimento 2, el regolito se encuentra enriquecido con azúcares, amonio, y EPS. Este sustrato se transfiere al compartimento 3 para su enriquecimiento metabólico avanzado. Paralelamente, la biomasa residual generada por las tres especies del compartimento, compuesta por restos celulares, proteínas, EPS y metabolitos secundarios, también se transfiere y servirá como fuente de carbono, nitrógeno y energía para los microorganismos posteriores.

3.1.3 Compartimento 3: Enriquecimiento del regolito

El compartimento 3 del hiperciclo está diseñado para realizar un enriquecimiento metabólico más avanzado del regolito marciano. Este módulo combina dos especies con funciones metabólicas complementarias: la microalga eucariota fotosintética *Chlorella vulgaris* y la bacteria

grampositiva *Bacillus subtilis*, conocida por su versatilidad y capacidad biofertilizante.

Chlorella vulgaris presenta un metabolismo fotoautótrofo oxigénico eficiente, basado en la fijación de CO₂ mediante luz solar o iluminación artificial en espectros rojo y azul. Requiere agua líquida para su metabolismo celular, lo cual representa uno de los principales desafíos para su cultivo marciano (Likai et al., 2025, C. Chen et al., 2024). No obstante, tolera condiciones variables y se caracteriza por su rápido crecimiento, alta eficiencia fotosintética y bajo requerimiento de nutrientes inorgánicos, como amonio, fosfatos, sulfatos y trazas metálicas (Mountourakis et al., 2021).

Durante su desarrollo, *Chlorella* secreta metabolitos que enriquecen directamente el sustrato: ácidos orgánicos (málico, succínico, acético), que acidifican localmente el regolito y mejoran la disponibilidad de micronutrientes; lípidos y esteroides, estabilizadores estructurales del sistema; polisacáridos extracelulares, que mejoran la cohesión del regolito y su capacidad de retención hídrica; y O₂, esencial para respiración aerobia en co-cultivos (Mendes et al., 2024; Wong et al., 2017).

Bacillus subtilis, por su parte, es una bacteria de vida libre robusta y metabólicamente versátil. Su metabolismo anaerobio facultativo le permite prosperar en condiciones variables y metabolizar compuestos orgánicos provenientes de la biomasa residual del compartimento anterior. Además, produce compuestos beneficiosos para la fertilidad del suelo a través de diversas rutas metabólicas: ácidos orgánicos (láctico, acético), que modulan el pH y solubilizan minerales; EPS como levano y dextrano, que mejoran la estructura y humedad del suelo; y péptidos y biomoléculas nitrogenadas, que contribuyen al enriquecimiento nitrogenado del sustrato (Halmschlag et al., 2023; Marvasi et al., 2010; Valencia-Marin et al., 2024),

Esta especie tolera pH neutro-alcalino y salinidad moderada, y puede crecer en microambientes líquidos o semisólidos simulados mediante sistemas hidropónicos o cultivos en gel, especialmente adaptados a los requerimientos de *Chlorella vulgaris*. Las condiciones artificiales del compartimento incluirían ciclos de luz optimizados, temperatura controlada entre 25–30 °C mediante calefacción solar, y niveles de humedad regulados para mantener un entorno favorable para ambas especies (Nugroho et al., 2024, Thomas et al., 2024).

Estudios de co-cultivo han demostrado la sinergia entre *Chlorella vulgaris* y *Bacillus subtilis*, observándose mayor productividad de biomasa, mayor tolerancia al estrés y eficiencia metabólica compartida (Zhou et al., 2023). *Chlorella* proporciona oxígeno y compuestos carbonados que nutren a *Bacillus*, mientras que este genera CO₂ y nutrientes que retroalimentan a la microalga, manteniendo un microambiente funcionalmente estable (Zhou et al., 2023).

Al finalizar esta etapa, el regolito se habrá enriquecido con compuestos orgánicos estructurales y

nutrientes asimilables. La biomasa residual generada (incluyendo restos celulares de *Chlorella* y *Bacillus*, polisacáridos, lípidos, proteínas y fragmentos de pared celular) se transfiere junto con el regolito al compartimento 4, donde será aprovechada por los microorganismos encargados del refinamiento final del sustrato.

3.1.4 Compartimento 4: Refinamiento final del regolito

El compartimento 4 constituye la última fase funcional del hiperciclo compartimentalizado y tiene como objetivo realizar el refinamiento final del regolito, permitiendo su transición definitiva a un sustrato fértil, estructurado y apto para el cultivo vegetal en condiciones marcianas. En este compartimento se emplea una combinación de *Halomonas elongata* y *Rhizobium leguminosarum*, dos especies bacterianas seleccionadas por su capacidad de sobrevivir en condiciones adversas, su tolerancia a la salinidad y su importante papel en la generación de compuestos osmoprotectores y en la biodisponibilidad de nutrientes esenciales, particularmente nitrógeno (Yu et al., 2022, Rutten y Poole, 2019).

Halomonas elongata es una bacteria halotolerante gramnegativa perteneciente al filo Proteobacteria, adaptada a vivir en ambientes hipersalinos como lagunas salobres, suelos costeros o desiertos salinos (Yu et al., 2022, Hobmeier et al., 2022). Esta especie ha sido seleccionada por su capacidad metabólica única para producir compuestos osmoprotectores, especialmente ectoína (1,4,5,6-tetrahidro-2-metil-4-pirrolo-carboxílico ácido), un soluto compatible que estabiliza las proteínas y las membranas celulares en entornos con alto contenido de sales (Pastor et al., 2010).

El metabolismo central de *H. elongata* incluye el uso de fuentes de carbono simples como glucosa, lactato, piruvato o glicerol, que estarían presentes en la biomasa residual del compartimento 3. Se trata de una bacteria aerobia, con capacidad de crecer en pH neutro-alcalino (Hobmeier et al., 2020).

La ectoína producida por *H. elongata* tiene un papel clave en el acondicionamiento del regolito, ya que actúa como osmoprotector extracelular, facilitando la retención de agua en el sustrato y mejorando la tolerancia de las futuras plantas al estrés hídrico. Este compuesto también puede estabilizar estructuras micelares en el suelo, incrementar la cohesión física y prevenir la pérdida de humedad en suelos porosos como el regolito marciano (Fatollahi et al., 2021).

Rhizobium leguminosarum es una bacteria gramnegativa del orden Rhizobiales, ampliamente conocida por su capacidad de establecer simbiosis con raíces de plantas leguminosas, formando nódulos en los que lleva a cabo la fijación biológica del nitrógeno atmosférico. Esta capacidad

resulta especialmente relevante en el contexto marciano, donde la baja concentración de nitrógeno atmosférico (2.7 %) y la escasa materia orgánica del suelo dificultan la biodisponibilidad de este macronutriente clave (Lu et al., 2017, Rutten y Poole, 2019).

El proceso de fijación de nitrógeno en *R. leguminosarum* se realiza mediante la enzima nitrógenasa, altamente sensible al oxígeno, que convierte el N_2 en NH_4^+ , un compuesto directamente asimilable por las plantas. En condiciones simbióticas, esta bacteria también secreta ácidos orgánicos (malato, succinato) que participan en el ciclo de nutrientes; aminoácidos (glutamina, alanina) y compuestos fenólicos; y factores de crecimiento vegetal como auxinas y citoquininas (Rutten y Poole, 2019).

Aunque esta especie está típicamente asociada a plantas, puede crecer como vida libre en el suelo bajo condiciones controladas, especialmente si se encuentra en un medio parcialmente enriquecido con compuestos orgánicos como los generados en el compartimento 3 (Rutten y Poole, 2019). Además, su capacidad de sobrevivir en sustratos alcalinos y de establecer interacciones con una variedad de raíces la convierte en una excelente candidata para precondicionar el suelo antes de la siembra de cultivos vegetales (Lu et al., 2017).

El funcionamiento óptimo de este compartimento requerirá condiciones artificialmente generadas para replicar ambientes microaerófilos y salinos moderados: favoreciendo la producción de ectoína por *Halomonas*, y protegiendo la actividad nitrógenasa de *Rhizobium*. Se establecerá una temperatura estable entre 25–30°C, con humedad controlada y aportes de biomasa residual como sustrato.

Ensayos de co-cultivo entre especies del género *Halomonas* y *Rhizobium* han mostrado compatibilidad metabólica y crecimiento sinérgico, especialmente en suelos marginales o salinos. El co-cultivo de bacterias halófilas con rizobios puede aumentar la eficiencia de fijación de nitrógeno y mejorar las propiedades físicas del sustrato (Masmoudi et al., 2023).

Tras el paso por este compartimento, el regolito marciano habrá sido transformado en un suelo fértil con las siguientes características clave: alta retención hídrica gracias a los osmoprotectores; biodisponibilidad de nitrógeno en forma de NH_4^+ y aminoácidos; estructura física estabilizada mediante EPS y secreciones bacterianas; y presencia de cepas simbióticas aptas para establecer interacciones con cultivos vegetales.

Este suelo se considerará listo para su extracción y uso en módulos agrícolas, pudiendo albergar cultivos en condiciones controladas dentro de cápsulas presurizadas. La presencia de *Rhizobium leguminosarum in situ* permitirá iniciar cultivos leguminosos sin necesidad de reinoculación (Lu et al., 2017).

Finalmente, la biomasa residual generada en este compartimento (compuesta por restos celulares, EPS, aminoácidos, osmoprotectores no absorbidos y metabolitos secundarios) será reintroducida en el compartimento 1, cerrando el ciclo. Esta biomasa actuará como cebador metabólico para sostener el crecimiento de *Dechloromonas aromatica* y mantener el sistema en funcionamiento continuo sin necesidad de aportes externos.

3.2 Curación de los modelos metabólicos de las especies del hiperciclo

Tras el diseño del hiperciclo, se plantea como siguiente paso la modelización computacional a escala genómica de cada una de las especies. El objetivo es representar de forma matemática el metabolismo global del sistema, incluyendo los intercambios de nutrientes entre compartimentos.

Sin embargo, esta tarea encuentra un primer obstáculo: solo dos de las ocho especies propuestas cuentan con modelos metabólicos curados, publicados y listos para análisis computacional.

Dado que un análisis preciso mediante simulaciones requiere que todos los modelos estén bien curados, y que los modelos *draft* generados automáticamente suelen contener numerosos errores estructurales y funcionales, se opta por iniciar un proceso de curación manual de los seis modelos restantes. Ello supone un paso intermedio necesario para garantizar que, en el futuro, el sistema pueda ser analizado de forma fiable mediante técnicas como análisis de flujo estacionario o *dynamic Flux Balance Analysis* (dFBA).

3.2.1 Generación de modelos draft y evaluación inicial

Los modelos metabólicos iniciales se generan automáticamente mediante *ModelSEED*. Se utilizan genomas completos obtenidos de la base de datos *PATRIC*, que presenta compatibilidad directa con *ModelSEED*.

Los modelos resultantes se evalúan mediante *MEMOTE*. Entre los principales problemas detectados se encuentran la falta de fórmulas químicas en metabolitos, lo que impide el cálculo de balances de masa y carga; la pobre cobertura metabólica, que refleja la proporción de genes codificados que están efectivamente conectados a rutas metabólicas; la presencia de reacciones universalmente bloqueadas, sin posibilidad de flujo; errores en la ecuación de biomasa, como la inclusión de metabolitos abstractos sin fórmula (e.g., “RNA synthesis”), que

impiden el cálculo correcto de tasas de crecimiento; ciclos de energía incorrectos, derivados de la reversibilidad mal asignada de reacciones; y metabolitos huérfanos, sin conexiones de entrada o salida, así como rutas bloqueadas para precursores de biomasa esenciales.

3.2.2 Anotación cruzada de metabolitos, genes y reacciones

Se procede a realizar una anotación cruzada de todos los elementos del modelo. Para ello, se mapean los identificadores *SEED* con sus equivalentes en *KEGG* y *BiGG* para metabolitos y reacciones, y con *RefSeq* para genes.

Este mapeo permite asignar nombres, identificadores y estructuras químicas a la mayoría de los metabolitos y reacciones. En conjunto, la tasa de anotación cruzada alcanza valores cercanos al 100 % en todos los modelos (ver Anexo A).

3.2.3 Balance de masa y carga

Gracias a que el archivo de mapeo de metabolitos incluye fórmulas químicas, se lleva a cabo el balance de masa y carga. El balance de masa implica que en cada reacción se conservan todos los átomos involucrados, mientras que el balance de carga garantiza la neutralidad eléctrica en los intercambios químicos. Este análisis es fundamental para asegurar que el modelo representa reacciones químicamente posibles y que la estequiometría está bien definida (Marin de Mas et al., 2023). Los resultados son positivos, con valores de masa y carga correctamente balanceados en torno al 90 % en todos los modelos (ver Anexo A).

En contraste, el balance de flujo sin restricciones resulta más bajo. Esta métrica mide el porcentaje de reacciones capaces de transportar flujo cuando no se imponen restricciones. Valores reducidos indican rutas interrumpidas o mal conectadas (Marin de Mas et al., 2023).

3.2.4 Corrección de la ecuación de biomasa y desbloqueo de rutas

La ecuación de biomasa es una de las componentes más críticas del modelo, ya que representa la composición global de una célula en crecimiento. Si esta ecuación contiene metabolitos sin fórmula, errores de balance o coeficientes desproporcionados, se compromete la capacidad del modelo para simular tasas de crecimiento realistas (Choi et al., 2023). Por ello, se corrigen manualmente errores en esta reacción: se eliminan componentes no definibles (como “*RNA transcription*”), se asignan fórmulas correctas y se escala la ecuación para que la suma total

de los coeficientes equivalga a una unidad de biomasa celular, lo que permite estimar tasas de crecimiento directamente a partir del flujo de esa reacción. Además, se identifican y desbloquean rutas de precursores esenciales para la biomasa, cuyas reacciones de intercambio están inactivas.

3.2.5 Evaluación de la reversibilidad y corrección de ciclos de energía

Uno de los mayores retos de la curación es la detección de ciclos de energía erróneos, que permiten la producción de ATP u otros equivalentes energéticos sin consumo neto de sustratos. Estos ciclos, si no se corrigen, dan lugar a tasas de crecimiento infladas o completamente irreales (Choi et al., 2023).

Como primer barrido, se utiliza *Equilibrator*, una herramienta que permite calcular la energía libre estándar de Gibbs (ΔG°) de cada reacción a partir de sus reactivos y productos. Se asume que aquellas reacciones con $|\Delta G^{\circ}| < 30$ kJ/mol pueden considerarse reversibles, y aquellas fuera de ese rango se marcan como irreversibles (Wang et al., 2021). Ello permite una reasignación automática de la reversibilidad de muchas reacciones (ver Anexo A), aunque debe remarcar que este es solo un paso preliminar. Para que un modelo sea publicable o utilizable en análisis avanzados, es necesario revisar cada reacción de forma individual y corroborar sus parámetros termodinámicos y cinéticos, basándose en literatura específica o ensayos experimentales.

3.2.6 Evaluación global de mejoras estructurales

Tras aplicar todos los pasos anteriores, los modelos presentan mejoras notables en múltiples métricas clave (ver Anexo A): reducción significativa de metabolitos huérfanos; incremento de reacciones metabólicas activas; disminución de reacciones universalmente bloqueadas; mejora en la representación de rutas de biosíntesis y transporte; y mayor número de ciclos estequiométricamente equilibrados.

Además, se comparan tasas de crecimiento simuladas y experimentales (Tabla 3.1). Las simulaciones arrojan valores más altos que los observados en la literatura, lo cual es esperable debido a los ciclos energéticos incorrectos. Este desajuste implica que los pasos de curación posteriores deben continuar con foco en la termodinámica.

Modelo	Tasa Experimental (h^{-1})	Tasa Predicha (h^{-1})
<i>Dechloromonas aromatica</i>	0.0320 ¹	0.1050
<i>Anabaena cylindrica</i>	0.0083 ²	0.0260
<i>Nostoc muscorum</i>	0.0097 ³	0.0180
<i>Clostridium aminophilum</i>	0.4000 ⁴	0.5700
<i>Halomonas elongata</i>	0.1900 ⁵	0.2909
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	0.1700 ⁶	0.2800

¹Han et al., 2019, ² Hakkoum et al., 2025 ³ Ortiz-Moreno et al., 2020 ⁴ Rychlik y Russell, 2002 ⁵ Hobmeier et al., 2020 ⁶ Watkin et al., 1997

Tabla 3.1: Comparación entre tasas de crecimiento experimentales y predichas por cada modelo microbiano. Las tasas predichas se obtienen mediante simulaciones de flujo metabólico bajo condiciones definidas ajustando las reacciones de intercambio de los modelos. Aunque los valores son realistas y consistentes en orden de magnitud, tienden a estar inflados respecto a los datos experimentales debido a los ciclos de energía incorrectos y desajustes termodinámicos.

3.2.7 Próximos pasos según la literatura

Según los *pipelines* de curación más citados (e.g. Thiele y Palsson, 2010, Machado et al., 2018, Jr. et al., 2020), los siguientes pasos para completar el proceso incluyen la curación manual de todas las reacciones involucradas en la generación y consumo de energía; la incorporación de restricciones cinéticas y enzimáticas (k_{cat} , K_m), especialmente en rutas centrales; el *gap-filling* guiado por literatura y simulaciones con herramientas como *Gapseq* o *CarveMe*; el análisis de modos elementales y flujos de intercambio con el entorno para detectar inconsistencias funcionales; la validación cruzada con datos transcriptómicos y proteómicos, cuando estén disponibles; y la comparación con ensayos de laboratorio y datos experimentales.

3.3 Modelado metabólico y análisis matemático del compartimento 3

Una vez identificado que el compartimento 3 contiene dos especies para las que sí se dispone de modelos metabólicos publicados y curados, se decide aplicar la técnica dFBA descrita en la introducción para analizar el comportamiento dinámico de este compartimento. El objetivo es doble: por un lado, comprobar si el sistema es capaz de alcanzar un equilibrio estable entre ambas especies; y por otro, estudiar la producción y consumo de gases clave como el O_2 y el CO_2 , así como otros nutrientes esenciales para el crecimiento vegetal.

El algoritmo base empleado es el mismo que se explicó anteriormente en la introducción:

resolución secuencial de FBA en intervalos de tiempo discretos, actualización de concentraciones de metabolitos y biomasa, y ajuste de los límites de captación mediante cinética de Michaelis-Menten. Sin embargo, al tratarse de un compartimento con dos especies en interacción, se realizan varias adaptaciones fundamentales para reflejar con fidelidad las dinámicas del sistema.

Interdependencia metabólica entre especies. En este compartimento, *Chlorella* realiza fotosíntesis: consume CO_2 y libera O_2 . En cambio, *Bacillus* realiza un metabolismo heterótrofo aerobio: consume O_2 y libera CO_2 . Esta relación simbiótica genera un circuito gaseoso cerrado, en el que los productos metabólicos de una especie son el sustrato de la otra. Como consecuencia, las concentraciones de O_2 y CO_2 en cada paso de tiempo dependen de las dos especies simultáneamente.

Para modelarlo correctamente, la variación de concentración de cada gas se expresa como una suma ponderada de los flujos de ambas especies, teniendo en cuenta sus respectivas biomásas:

$$\Delta C_{\text{O}_2} = (v_{\text{O}_2}^{\text{Chl}} \cdot X_1 + v_{\text{O}_2}^{\text{Bac}} \cdot X_2) \cdot \Delta t \quad (3.1)$$

$$\Delta C_{\text{CO}_2} = (v_{\text{CO}_2}^{\text{Chl}} \cdot X_1 + v_{\text{CO}_2}^{\text{Bac}} \cdot X_2) \cdot \Delta t \quad (3.2)$$

donde:

- $v_{\text{O}_2}^{\text{Chl}}$ es el flujo de producción de O_2 por parte de *Chlorella* (positivo),
- $v_{\text{O}_2}^{\text{Bac}}$ es el flujo de consumo de O_2 por parte de *Bacillus* (negativo),
- X_1 y X_2 son las biomásas de *Chlorella* y *Bacillus*, respectivamente,
- y lo análogo para el CO_2 .

Inclusión de la limitación espacial. A diferencia de los modelos clásicos de cultivo libre en biorreactores, el sistema se encuentra confinado en un espacio reducido y compartimentalizado. Para reflejar esta limitación física, se introduce en el modelo un factor limitante de espacio. Este se aplica tanto en las ecuaciones de crecimiento como en los términos de consumo de metabolitos, mediante un factor multiplicativo: $(1 - X_1 - X_2)$.

Este término penaliza el crecimiento celular y el consumo de gases cuando la suma de biomásas se aproxima al valor 1, considerado el máximo ocupable en el sistema.

Mortalidad celular y extracción de gases. Además, se incluye un término de mortalidad celular constante en las ecuaciones de biomasa, representado como: $-d \cdot X_i$ para cada especie $i = 1, 2$, donde d es la tasa de muerte celular (particularizada como d_c para *Chlorella* y d_b para *Bacillus*).

Finalmente, se introducen en las ecuaciones de los metabolitos los términos de extracción de gases E_{O_2} y E_{CO_2} , que representan el flujo de oxígeno o dióxido de carbono que se extrae activamente del compartimento para su uso externo.

Las ecuaciones finales de actualización por pasos de tiempo discretos, con todos los términos integrados, quedan formuladas de la siguiente forma:

$$\Delta X_1 = \mu_1 \cdot X_1 \cdot (1 - X_1 - X_2) \cdot \Delta t - d_c \cdot X_1 \cdot \Delta t \quad (3.3)$$

$$\Delta X_2 = \mu_2 \cdot X_2 \cdot (1 - X_1 - X_2) \cdot \Delta t - d_b \cdot X_2 \cdot \Delta t \quad (3.4)$$

$$\Delta C_{O_2} = [v_{O_2}^{Chl} \cdot X_1 + v_{O_2}^{Bac} \cdot X_2 \cdot (1 - X_1 - X_2)] \cdot \Delta t - E_{O_2} \cdot C_{O_2} \cdot \Delta t \quad (3.5)$$

$$\Delta C_{CO_2} = [v_{CO_2}^{Bac} \cdot X_2 + v_{CO_2}^{Chl} \cdot X_1 \cdot (1 - X_1 - X_2)] \cdot \Delta t - E_{CO_2} \cdot C_{CO_2} \cdot \Delta t \quad (3.6)$$

La simulación se ejecuta durante 10 000 horas, y los resultados muestran un comportamiento estable tanto en la biomasa como en la producción gaseosa (Figura 3.2). *Bacillus* alcanza una biomasa de 0.7 gDW/L mientras que *Chlorella* se estabiliza en torno a 0.17 gDW/L. El oxígeno y el dióxido de carbono también alcanzan niveles estables, lo que permite plantear su extracción para el compartimento 4 (ver literatura sobre sistemas de captura y compresión de O_2/CO_2 en medios espaciales, e.g. Muscatello y Santiago-Maldonado, 2012)

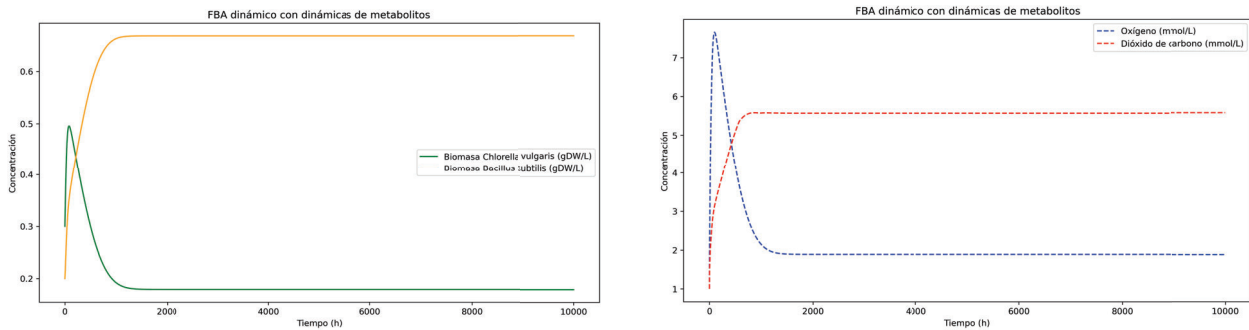


Figura 3.2: Resultados del análisis dinámico (dFBA) para el compartimento 3 del hiperciclo. Se alcanza estabilidad en ambas biomasa y concentraciones de gases, indicando una coexistencia funcional y un equilibrio atmosférico sostenido. Los valores de d_c y d_b empleados son 0,008 y 0,005 respectivamente. Los valores de E_{O_2} y E_{CO_2} empleados son 0,1 y 0,6 respectivamente. Las condiciones iniciales se establecieron como $X_1 = 0,3$ $X_2 = 0,2$ $C_{O_2} = C_{CO_2} = 1$. El tiempo de simulación es de 10 000h

Gracias a que en cada paso de tiempo se calculan los flujos FBA individuales para cada reacción del modelo, es posible estimar la producción neta de metabolitos clave multiplicando dichos flujos por la biomasa correspondiente. Esta técnica permite cuantificar la generación efectiva de compuestos de interés durante todo el periodo simulado.

La Figura 3.3 presenta la distribución porcentual de nutrientes generados por el compartimento.

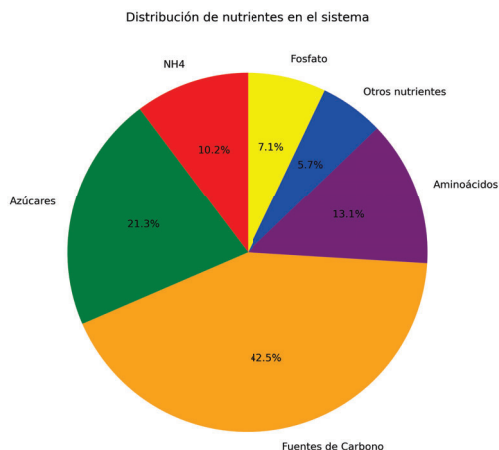


Figura 3.3: Distribución porcentual de nutrientes generados en el compartimento 3 del hiperciclo tras 10,000 horas de simulación. La estimación se obtiene multiplicando el flujo de producción de cada metabolito por la biomasa total generada al final de la simulación dinámica. Se observa que predominan las fuentes de carbono (42.5%), entre las que se incluyen ácidos orgánicos y alcoholes de fermentación generados por *Bacillus subtilis*, así como azúcares y polialcoholes fotosintéticos producidos por *Chlorella vulgaris*. Los azúcares (21.3%) incluyen principalmente glucosa, maltosa y EPS secretados por ambas especies. La presencia de aminoácidos, amonio, fosfato y otros micronutrientes refleja una diversidad metabólica que contribuye a la fertilidad del regolito. Los parámetros empleados son los mismos que para la simulación dFBA.

3.3.1 Aproximación matemática del modelado metabólico

Uno de los principales inconvenientes del enfoque clásico de dFBA es su naturaleza opaca. Aunque se trata de una técnica muy potente para estudiar sistemas metabólicos dinámicos, su resolución se basa en programación lineal, que en cada paso devuelve el conjunto de flujos metabólicos que maximizan la función objetivo (normalmente el crecimiento celular). Sin embargo, este proceso de optimización funciona como una “caja negra”: no se tiene acceso directo ni a las ecuaciones explícitas utilizadas para encontrar esos flujos ni a los parámetros internos que el software aplica durante la resolución.

Con el objetivo de entender en profundidad cómo varían las poblaciones y los metabolitos a lo largo del tiempo, y de identificar con claridad qué parámetros están implicados en estas dinámicas, se formula una aproximación matemática explícita del dFBA en forma de un sistema de EDOs. Esta aproximación parte de una idea clave: en el algoritmo dFBA, los límites de las reacciones de intercambio (como la captación de O_2 y CO_2) se actualizan

dinámicamente en cada paso de tiempo utilizando funciones de tipo Michaelis-Menten, que relacionan la concentración del sustrato con la velocidad de captación.

Inspirándose en esta dinámica, se plantea que tanto los flujos de consumo como las tasas de crecimiento celular pueden modelarse como constantes multiplicadas por funciones de tipo Monod. Estas funciones son una generalización de la cinética de Michaelis-Menten, y permiten describir de forma no lineal la dependencia del crecimiento celular respecto a la concentración de un nutriente limitante. Por tanto, en el sistema aproximado, se modelan las tasas de crecimiento de *Chlorella* y *Bacillus* como funciones de tipo Monod que dependen del CO₂ y del O₂, respectivamente; los flujos de consumo de gases también como funciones no lineales de tipo Monod; y se añaden los mismos términos de mortalidad, limitación espacial y extracción activa de gases que en el dFBA.

El resultado es el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales no lineales:

$$\frac{dX_1(t)}{dt} = c_1 \cdot \left(\frac{\text{CO}_2(t)}{1 + \text{CO}_2(t)} \right) X_1(t) (1 - X_1(t) - X_2(t)) - d_1 \cdot X_1(t) \quad (3.7)$$

$$\frac{dX_2(t)}{dt} = c_2 \cdot \left(\frac{\text{O}_2(t)}{1 + \text{O}_2(t)} \right) X_2(t) (1 - X_1(t) - X_2(t)) - d_2 \cdot X_2(t) \quad (3.8)$$

$$\frac{d\text{O}_2(t)}{dt} = c_3 \cdot X_1(t) - c_4 \cdot \left(\frac{\text{O}_2(t)}{1 + \text{O}_2(t)} \right) (1 - X_1(t) - X_2(t)) \cdot X_2(t) - E_{\text{O}_2} \cdot \text{O}_2(t) \quad (3.9)$$

$$\frac{d\text{CO}_2(t)}{dt} = -c_5 \cdot \left(\frac{\text{CO}_2(t)}{1 + \text{CO}_2(t)} \right) (1 - X_1(t) - X_2(t)) \cdot X_1(t) + c_6 \cdot X_2(t) - E_{\text{CO}_2} \cdot \text{CO}_2(t) \quad (3.10)$$

Estas ecuaciones permiten estudiar de forma mucho más transparente la dinámica temporal del sistema, analizar cómo se alcanza el equilibrio entre ambas especies y qué condiciones conducen al colapso del sistema o a su estabilidad. Además, este enfoque permite realizar un análisis matemático riguroso, como el estudio de la estabilidad de los puntos de equilibrio. Los valores utilizados para las constantes se obtienen del propio modelo metabólico en condiciones estacionarias:

- $c_1 = 0,054$, $c_2 = 0,051$, $c_3 = 1,990$, $c_4 = 1,880$, $c_5 = 0,685$, $c_6 = 5,060$
- Tasas de muerte: $d_1 = 0,008$, $d_2 = 0,005$
- Tasa de extracción: $E_{\text{O}_2} = 0,100$, $E_{\text{CO}_2} = 0,600$

La simulación para 10 000 horas mostró que esta versión continua reproduce con bastante precisión el comportamiento dinámico observado en el dFBA (ver Figura 3.4), lo que valida su uso como herramienta de análisis estructural.

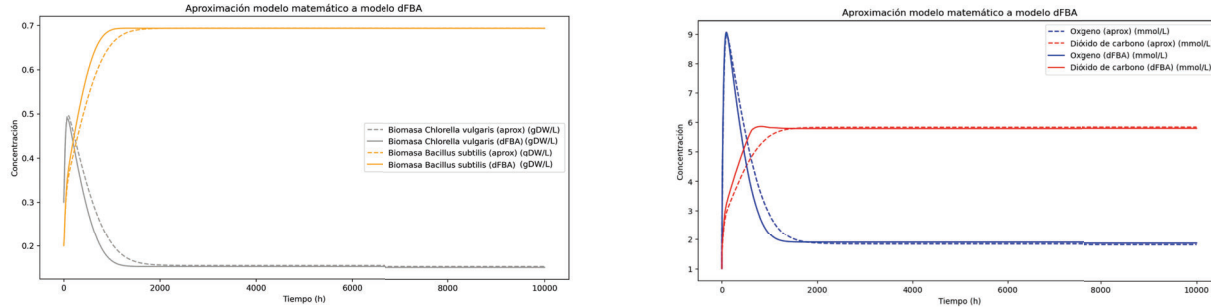


Figura 3.4: Comparación entre la solución del modelo matemático aproximado y el modelo dFBA. Se muestra cómo la aproximación mediante ecuaciones diferenciales reproduce con alta similitud las dinámicas de biomasa de *Chlorella vulgaris* y *Bacillus subtilis* (izquierda), así como las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono (derecha), respecto a los resultados obtenidos mediante análisis de FBA dinámico. Esto valida el uso del modelo matemático para análisis teóricos y exploración de parámetros. Los valores de las constantes utilizados son los que se mencionaron anteriormente en este capítulo. El tiempo de simulación es de 10 000h. Las condiciones iniciales son las mismas que en dFBA.

A continuación, se procede a estudiar los puntos de equilibrio del sistema. En el equilibrio dinámico:

$$\frac{dX_1}{dt} = \frac{dX_2}{dt} = \frac{dO_2}{dt} = \frac{dCO_2}{dt} = 0$$

Se resuelve el sistema de ecuaciones no lineales resultante para encontrar los puntos de equilibrio. Posteriormente, se construye el Jacobiano del sistema evaluado en cada uno de estos puntos. El análisis de los autovalores permite clasificar los puntos de equilibrio como estables o inestables. Se identifican tres puntos de equilibrio (ver Tabla 3.2).

Este análisis confirma la existencia de un equilibrio biológicamente relevante (Punto 1), que permite la coexistencia de ambas especies microbianas y la producción sostenida de nutrientes. Asimismo, el sistema presenta biestabilidad, con dos puntos de equilibrio estables separados por uno inestable, lo que implica que distintas condiciones iniciales pueden conducir tanto a la coexistencia como a la extinción.

Punto	X_1	X_2	O_2	CO_2	Estabilidad
1	0.1559	0.6941	1.8350	5.8276	Estable
2	0.0057	0.0022	0.1085	0.0175	Inestable
3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	Estable

Tabla 3.2: Puntos de equilibrio y su estabilidad. Los valores de los parámetros empleados son los mencionados anteriormente en este capítulo. Las condiciones iniciales son las mismas que en dFBA.

3.3.2 Evaluación de la viabilidad del sistema frente a la extracción de oxígeno

Dado que una de las funciones esenciales del compartimento 3 dentro del hiperciclo es la producción de oxígeno para el resto del sistema (en particular para sostener el metabolismo aeróbico de *Bacillus subtilis* y abastecer a los vegetales), se lleva a cabo un análisis para determinar hasta qué punto se puede extraer oxígeno del sistema sin comprometer su viabilidad.

Para ello, se realizan múltiples simulaciones variando la tasa de extracción de oxígeno (E_{O_2}) dentro de las ecuaciones diferenciales del modelo matemático. La viabilidad del sistema se evalúa en función de la concentración final de biomasa de ambas especies tras 10 000 horas de simulación. Se considera que el sistema es viable si X_1 y X_2 se mantienen por encima del umbral de 0,01.

Los resultados (ver Figura 3.5) muestran que el sistema es capaz de soportar tasas de extracción de oxígeno sorprendentemente elevadas. En particular, la tasa de extracción crítica más alta compatible con un equilibrio viable es de aproximadamente $E_{O_2} = 4,16 \frac{mmol}{h^{-1}}$, valor que supera en más de 40 veces el valor estándar considerado en las simulaciones base ($E_{O_2} = 0,1 \frac{mmol}{h^{-1}}$). Este resultado demuestra que el compartimento 3 puede funcionar como fuente de oxígeno dentro del hiperciclo.

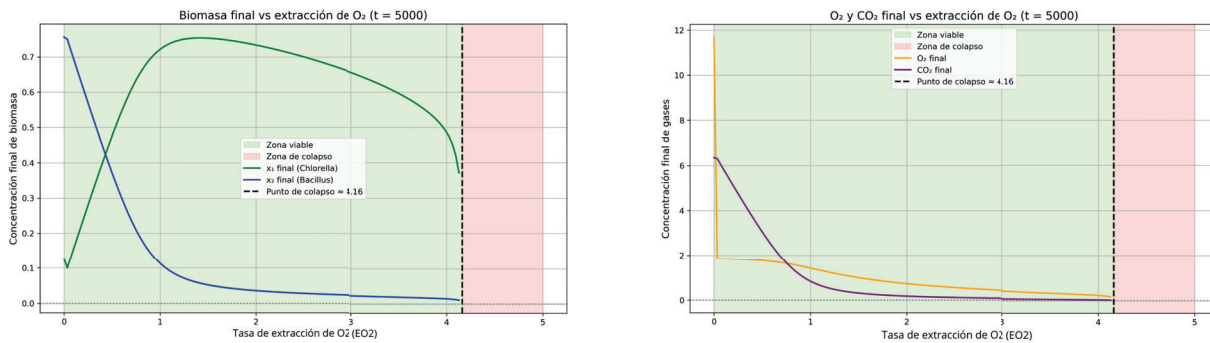


Figura 3.5: Evaluación de la viabilidad del sistema en función de la tasa de extracción de oxígeno (E_{O_2}). A la izquierda se muestra la biomasa final de *Chlorella vulgaris* (X_1) y *Bacillus subtilis* (X_2), y a la derecha las concentraciones finales de oxígeno y dióxido de carbono. A medida que aumenta E_{O_2} , el sistema mantiene una zona viable (verde) hasta alcanzar un valor crítico de extracción ("tipping point" ≈ 4.16), a partir del cual colapsa (zona rosa). Los valores de los parámetros empleados son los mencionados en este capítulo. Las condiciones iniciales son las mismas que en dFBA. El tiempo de simulación es de 5000h.

No obstante, se observa que a medida que la tasa de extracción se acerca a este umbral, la biomasa de *Bacillus subtilis* se ve reducida. Esto supone una pérdida progresiva de capacidad

metabólica asociada a *Bacillus* y, en consecuencia, una menor producción de dióxido de carbono y del resto de nutrientes secretados por la bacteria. Esta tendencia también se refleja en la reducción de la concentración final de CO_2 , que actúa como sustrato clave para el crecimiento de *Chlorella*.

Por tanto, aunque el sistema se mantiene viable hasta $E_{\text{O}_2} \approx 4,16$, valores tan elevados de extracción comprometen la producción de otros nutrientes y su eficiencia en el enriquecimiento del regolito. Esto implica que, desde una perspectiva de diseño funcional, debe encontrarse un compromiso sostenible entre la maximización de la tasa de extracción de oxígeno y la producción de otros nutrientes.

3.3.3 Evaluación conjunta de las tasas de extracción de oxígeno y dióxido de carbono

Con el objetivo de explorar posibles efectos sinérgicos entre la extracción simultánea de oxígeno y dióxido de carbono, se realiza un barrido bidimensional variando simultáneamente los parámetros E_{O_2} y E_{CO_2} . Se analiza la viabilidad del sistema en cada punto de la matriz de parámetros, así como las concentraciones finales de biomasa (X_1 , X_2).

La proyección de viabilidad (ver Figura 3.6) revela que existe una interdependencia entre ambas tasas de extracción: valores bajos de extracción de CO_2 pueden compensar parcialmente valores más elevados de extracción de O_2 , extendiendo así el rango de condiciones viables. Este resultado es coherente con la lógica metabólica del sistema, donde el CO_2 actúa como principal sustrato de *Chlorella*, cuya actividad genera el oxígeno que permite la supervivencia de *Bacillus*. Por tanto, una mayor disponibilidad de CO_2 puede reforzar la producción de oxígeno y, en consecuencia, tolerar mayores tasas de extracción del mismo.

Las gráficas tridimensionales de X_1 y X_2 frente a E_{O_2} y E_{CO_2} permiten visualizar de forma detallada las regiones viables y la distribución de biomasa bajo distintas configuraciones. Estas visualizaciones indican que existe una combinación óptima de extracción donde se maximiza simultáneamente la producción de oxígeno y la estabilidad de las dos especies microbianas (ver Figura 3.6).

Aunque la tasa máxima de extracción viable de oxígeno es de $4,16 \frac{\text{mmol}}{\text{h}_{-1}}$, se propone como configuración óptima una tasa de extracción de $E_{\text{O}_2} \approx 2,0$ y $E_{\text{CO}_2} \approx 15,0 \frac{\text{mmol}}{\text{h}_{-1}}$. Esta elección permite una elevada producción sostenida de oxígeno, evitando el colapso de *Bacillus subtilis* y permitiendo una concentración de biomasa moderadamente alta en ambas especies. Representa un equilibrio entre producción intensiva de nutrientes gaseosos y estabilidad del sistema.

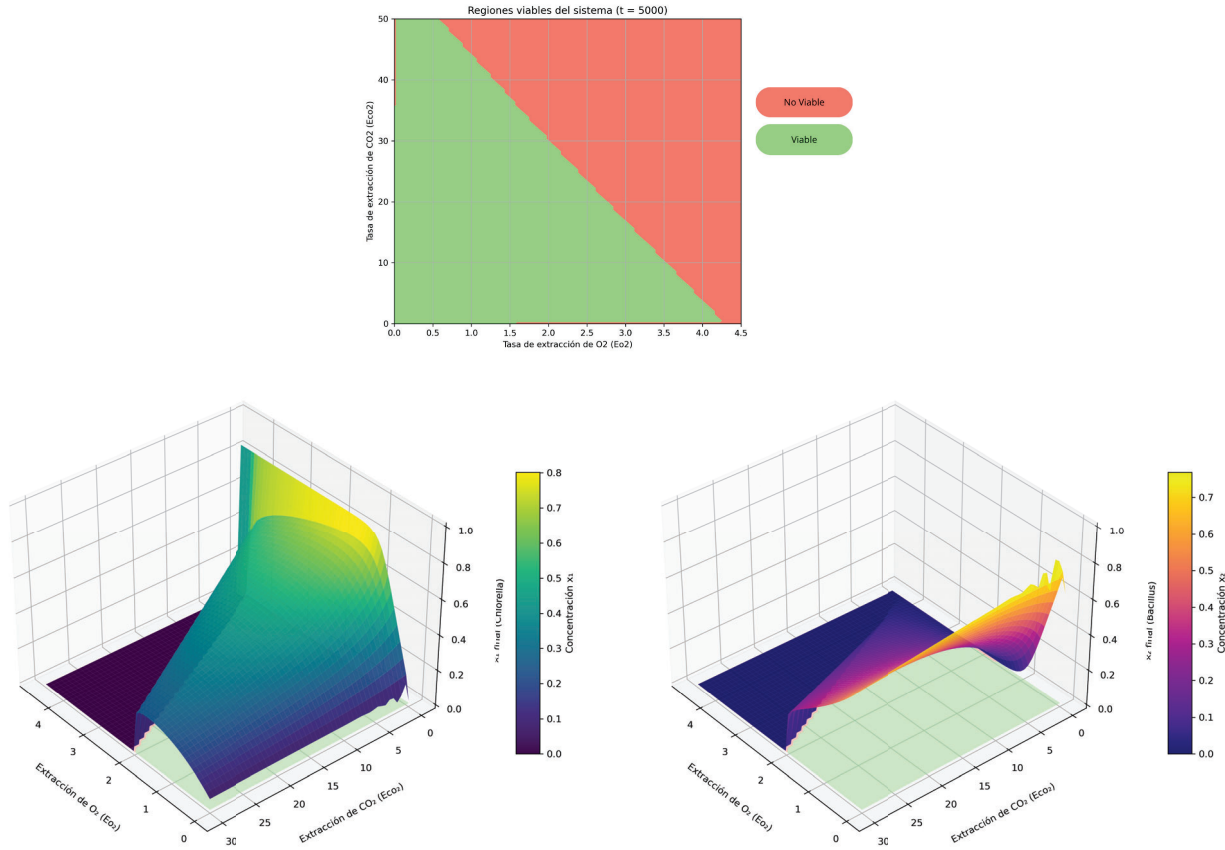


Figura 3.6: Análisis de sensibilidad y viabilidad del compartimento 3 en función de la extracción simultánea de oxígeno ((E_{O_2})) y dióxido de carbono ((E_{CO_2})). La imagen superior muestra la región de viabilidad del sistema (verde) frente a colapso (rojo), concluyendo que existe una frontera clara de sostenibilidad, más restrictiva para E_{O_2} que para E_{CO_2} . Las imágenes inferiores representan las concentraciones finales de biomasa de *Bacillus subtilis* (X_2) y *Chlorella vulgaris* (X_1) en función de E_{O_2} y E_{CO_2} , mostrando cómo ambas especies mantienen altos niveles de supervivencia en amplias zonas del espacio de parámetros. Los valores de los parámetros empleados son los mencionados en este capítulo. Las condiciones iniciales son las mismas que en dFBA. El tiempo de simulación es de 5000h.

3.3.4 Aproximación analítica mediante linealización del sistema y análisis de bifurcación

Los resultados de las simulaciones anteriores indican que E_{O_2} es un parámetro clave en la viabilidad del compartimento 3, ya que el O_2 producido por *Chlorella vulgaris* resulta esencial tanto para el metabolismo de *Bacillus subtilis* como para el funcionamiento del resto del hiperciclo. Sin embargo, las simulaciones discretas y los barridos de parámetros no permiten obtener información sobre la estructura completa del sistema, especialmente en lo que respecta a equilibrios inestables, que no pueden ser detectados mediante integración numérica. Esta

limitación motiva el desarrollo de una aproximación analítica del sistema que permita obtener los diagramas de bifurcación y estudiar de forma exacta cómo la extracción de oxígeno afecta a la estabilidad global y a las cuencas de atracción del sistema.

El principal obstáculo para resolver el sistema original de ecuaciones diferenciales de forma analítica es su naturaleza no lineal. Las funciones tipo Monod introducen términos racionales que dificultan el tratamiento simbólico. No obstante, se sabe que para concentraciones bajas de sustrato, estas funciones pueden aproximarse linealmente:

$$\frac{[S]}{1 + [S]} \approx [S] \quad (3.11)$$

Aplicando esta simplificación, se reemplazan los términos tipo Monod en el sistema anterior por funciones lineales proporcionales a la concentración del metabolito. El sistema de EDOs resultante queda:

$$\frac{dX_1(t)}{dt} = c_1 \cdot CO_2(t) \cdot X_1(t) (1 - X_1(t) - X_2(t)) - d_1 \cdot X_1(t) \quad (3.12)$$

$$\frac{dX_2(t)}{dt} = c_2 \cdot O_2(t) \cdot X_2(t) (1 - X_1(t) - X_2(t)) - d_2 \cdot X_2(t) \quad (3.13)$$

$$\frac{dO_2(t)}{dt} = c_3 \cdot X_1(t) - c_4 \cdot O_2(t) \cdot (1 - X_1(t) - X_2(t)) \cdot X_2(t) - E_{O_2} \cdot O_2(t) \quad (3.14)$$

$$\frac{dCO_2(t)}{dt} = -c_5 \cdot CO_2(t) \cdot (1 - X_1(t) - X_2(t)) \cdot X_1(t) + c_6 \cdot X_2(t) - E_{CO_2} \cdot CO_2(t) \quad (3.15)$$

Este nuevo sistema, aunque aproximado, mantiene la estructura esencial del modelo y puede tratarse analíticamente. De hecho, al comparar las simulaciones generadas por este sistema con las obtenidas con las EDOs no lineales, se observa que las dinámicas reproducidas son similares (ver Figura 3.7).

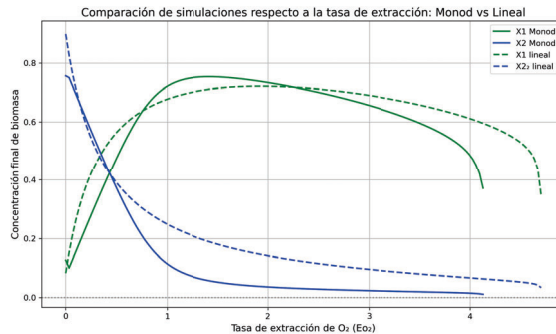


Figura 3.7: Comparación entre la simulación en función de E_{O_2} del sistema de EDOs tipo Monod vs su aproximación linealizada. Los valores de los parámetros empleados son los mencionados en este capítulo. Las condiciones iniciales son las mismas que en dFBA. El tiempo de simulación es de 10 000h.

Aunque los umbrales de colapso no coinciden exactamente, sí se conserva la forma general de los perfiles, así como las regiones estables e inestables del sistema. Esta aproximación linealizada permite obtener analíticamente los diagramas de bifurcación (ver Anexo B).

3.3.5 Análisis de la cuenca de atracción del sistema

Una vez identificada una configuración óptima de extracción de gases ($E_{O_2} = 2$, $E_{CO_2} = 15 \frac{\text{mmol}}{\text{h}^{-1}}$) capaz de sostener niveles elevados y estables de biomasa en ambas especies, y dado que el sistema presenta biestabilidad, se consideró necesario analizar su cuenca de atracción para evaluar si la coexistencia era robusta o requería condiciones iniciales especialmente favorables para mantenerse. Para ello, se explora sistemáticamente el plano de condiciones iniciales $X_1(0), X_2(0)$, manteniendo constantes los niveles iniciales de oxígeno y dióxido de carbono, y clasificando los resultados según la trayectoria final del sistema.

Se considera que el sistema alcanza el equilibrio de coexistencia cuando ambas biomásas se mantienen por encima de 0,01 tras 10 000 horas de simulación; en caso contrario, se asume colapso hacia el estado trivial. El análisis (ver Figura 3.8) muestra que, aunque el equilibrio trivial es un atractor, su cuenca de atracción es reducida: solo condiciones iniciales muy bajas para ambas especies conducen a extinción. Por el contrario, el equilibrio de coexistencia presenta una amplia cuenca de atracción, lo que indica una alta resiliencia del compartimento 3 frente a perturbaciones o inoculaciones subóptimas.

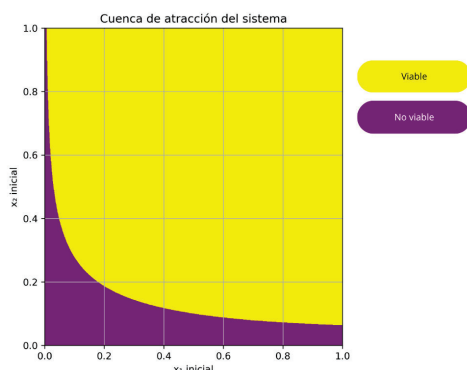


Figura 3.8: Cuenca de atracción del punto de equilibrio de coexistencia para distintas condiciones iniciales de biomasa de *Chlorella vulgaris* (X_1) y *Bacillus subtilis* (X_2). El análisis muestra las regiones en las que el sistema evoluciona hacia un estado estable de coexistencia (amarillo, supervivencia) o colapsa (morado, extinción). Los valores de los parámetros empleados son los mencionados en este capítulo. Las condiciones iniciales fueron las mismas que en dFBA. El tiempo de simulación es de 10000h.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES

Este Trabajo de Fin de Grado presenta una propuesta teórica para diseñar un sistema hipercíclico compartimentalizado capaz de transformar el regolito marciano en un suelo fértil. Para ello, se ha definido un diseño funcional basado en la selección de microorganismos con capacidades metabólicas complementarias, se ha iniciado la curación estructural de modelos metabólicos para seis especies clave, y se ha modelado en profundidad el compartimento 3 mediante simulaciones dinámicas y análisis matemático. Se han extraído las siguientes conclusiones:

1. A lo largo del proyecto se han identificado algunos de los retos principales en el desarrollo de modelos metabólicos precisos, especialmente durante la fase de curación manual. Este proceso resulta lento y propenso a errores humanos. En el futuro, el uso de algoritmos de aprendizaje automático podría facilitar tareas como la detección automática de errores estequiométricos, la asignación de parámetros cinéticos o la validación estructural de rutas metabólicas, haciendo el desarrollo de modelos más reproducible y escalable. Por otro lado, la ingeniería genética ofrece múltiples herramientas para mejorar el funcionamiento del sistema hipercíclico. Modificar las cepas microbianas seleccionadas para aumentar su tolerancia a condiciones extremas, mejorar la eficiencia de rutas metabólicas clave o introducir genes nuevos podría reforzar la productividad del consorcio microbiano propuesto.
2. Aunque este proyecto ha sido concebido en el contexto de la agricultura espacial, muchas de las estrategias que plantea podrían tener aplicaciones relevantes en la Tierra. En particular, la construcción de consorcios microbianos funcionales puede ser una alternativa útil para recuperar suelos degradados en zonas áridas o desertificadas. Adaptar este tipo de sistemas a contextos terrestres permitiría mejorar la calidad del suelo, fomentar la retención de agua y restaurar su capacidad productiva de forma sostenible.
3. Este trabajo no solo ofrece una solución teórica a un reto fascinante como la fertilización del regolito marciano, sino que también establece una base técnica y metodológica para futuras investigaciones. Las ideas, modelos y herramientas desarrolladas aquí podrían contribuir a un objetivo cada vez más realista: convertir Marte en un entorno capaz de sostener vida vegetal.

CAPÍTULO 5

BIBLIOGRAFÍA

- Amor, D. R., Montañez, R., Duran-Nebreda, S., & Solé, R. (2017). Spatial Dynamics of Synthetic Microbial Hypercycles and Their Parasites. *PLoS Computational Biology*, 13(8), e1005689. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005689>
- Arai, M., Tomita-Yokotani, K., Sato, S., Hashimoto, H., & Yamashita, M. (2008). Growth of terrestrial cyanobacterium, *Nostoc* sp., on Martian Regolith Simulant and its vacuum tolerance. *Biological Sciences in Space*, 22(1), 8-17. <https://doi.org/10.2187/bss.22.8>
- Averesch, N. J. H. (2021). Choice of Microbial System for In-Situ Resource Utilization on Mars. *Frontiers in Astronomy and Space Sciences*, 8, 116. <https://doi.org/10.3389/fspas.2021.700370>
- Babakhanova, S., Baber, S., Zazzera, F. B., Hinterman, E., Hoffman, J., Kusters, J., Lordos, G., Lukic, J., Maffia, F., Maggiore, P., Mainini, L., Moccia, A., Nowak, H., Schneiderman, T., Sciarretta, S., Seager, S., Seaman, S., Smith, T., Stamler, N., . . . Zhan, Z. (2019). Mars Garden: An Engineered Greenhouse for a Sustainable Residence on Mars. *AIAA Propulsion and Energy 2019 Forum*. <https://doi.org/10.2514/6.2019-4059>
- Bender, K. S., O'Connor, S. M., Chakraborty, R., Coates, J. D., & Achenbach, L. A. (2002). Sequencing and Transcriptional Analysis of the Chlorite Dismutase Gene of *Dechloromonas agitata* and Its Use as a Metabolic Probe. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 4820-4826. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4820-4826.2002>
- Bender, K. S., Shang, C., Chakraborty, R., Belchik, S. M., Coates, J. D., & Achenbach, L. A. (2005). Identification, Characterization, and Classification of Genes Encoding Perchlorate Reductase. *Journal of Bacteriology*, 187(15), 5090-5096. <https://doi.org/10.1128/JB.187.15.5090-5096.2005>
- Caporale, C., Warner, J., & Gómez, D. (2020). Martian soil analog pH amendment trials for plant growth. *51st Lunar and Planetary Science Conference (LPSC)*, (3016).
- Chamizo, S., Adessi, A., Rodríguez-Caballero, E., & et al. (2018). Cyanobacteria Inoculation Improves Soil Stability and Fertility on Degraded Land. *Frontiers in Environmental Science*, 6, 49. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00049>

- Chen, C., Short, S. M., & Ward, V. C. A. (2024). Nutrient screening of *Chlorella vulgaris* and *C. variabilis* using high-throughput Biolog phenotype arrays. *Algal Research*, *84*, 103740. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103740>
- Chen, X., Li, Y., Wang, Y., Wang, Y., & Wang, Y. (2022). The Impact of Cyanobacteria Blooms on the Aquatic Environment and Human Health. *Toxins*, *14*(11), 795. <https://doi.org/10.3390/toxins14100658>
- Choi, Y.-M., Choi, D.-H., Lee, Y. Q., Koduru, L., Lewis, N. E., Lakshmanan, M., & Lee, D.-Y. (2023). Mitigating biomass composition uncertainties in flux balance analysis using ensemble representations. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *21*, 4235-4246. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.07.025>
- Davila, A. F., Willson, D., Coates, J. D., & McKay, C. P. (2013). Perchlorate on Mars: A Chemical Hazard and a Resource for Humans. *International Journal of Astrobiology*, *12*(4), 321-325. <https://doi.org/10.1017/S1473550413000189>
- Dechloromonas aromatica RCB Proteobacteria [Archived from the original on August 17, 2013. Retrieved August 18, 2016]. (2013).
- Drysdale, A. E., Ewert, M. K., & Hanford, A. J. (2004). Life Support Approaches for Mars Missions. *34th International Conference on Environmental Systems*. <https://doi.org/10.4271/2004-01-2389>
- Eckart, P. (1996). *Spaceflight Life Support and Biospherics* (Vol. 5). Microcosm Press.
- Eigen, M., & Schuster, P. (1977). The hypercycle. A principle of natural self-organization. Part A: Emergence of the hypercycle. *Naturwissenschaften*, *64*(11), 541-565. <https://doi.org/10.1007/BF00450633>
- Fatollahi, P., Ghasemi, M., Yazdian, F., & Sadeghi, A. (2021). Ectoine production in bioreactor by *Halomonas elongata* DSM2581: Using MWCNT and Fe-nanoparticle. *Biotechnology Progress*, *37*(1), e3073. <https://doi.org/10.1002/btpr.3073>
- Fritsche, M., Schneider, L., de Vera, J.-P., Böttger, U., & Rabbow, E. (2024). Overview and recommendations for research on plants and microbes in regolith-based agriculture. *npj Microgravity*, *10*(1), 13. <https://doi.org/10.1038/s44264-024-00013-5>
- Frossard, E., Crain, G., Giménez de Azcárate Bordóns, I., Hirschvogel, C., Oberson, A., Paille, C., Pellegrini, G., & Udert, K. M. (2024). Recycling nutrients from organic waste for growing higher plants in the Micro Ecological Life Support System Alternative (MELiSSA) loop during long-term space missions. *Life Sciences in Space Research*, *40*, 18-27. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2023.08.005>
- Ginige, M. P., Keller, J., & Blackall, L. L. (2005). Investigation of an Acetate-Fed Denitrifying Microbial Community by Stable Isotope Probing, Full-Cycle rRNA Analysis, and

- Fluorescent In Situ Hybridization-Microautoradiography. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8683-8691. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8683-8691.2005>
- Gu, C., Kim, G. B., Kim, W. J., Kim, H. U., & Lee, S. Y. (2019). Current status and applications of genome-scale metabolic models. *Genome Biology*, 20(1), 121. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1730-3>
- Hakkoum, Z., Minaoui, F., Chabili, A., Douma, M., Mouhri, K., & Loudiki, M. (2025). Biofertilizing Effect of Soil Cyanobacterium *Anabaena cylindrica*-Based Formulations on Wheat Growth, Physiology, and Soil Fertility. *Agriculture*, 15(2), 189. <https://doi.org/10.3390/agriculture15020189>
- Halmschlag, B., Völker, F., Hanke, R., Putri, S. P., Fukusaki, E., Büchs, J., & Blank, L. M. (2023). Metabolic engineering of *B. subtilis* 168 for increased precursor supply and poly--glutamic acid production. *Frontiers in Food Science and Technology*, 3, 1111571. <https://doi.org/10.3389/frfst.2023.1111571>
- Han, H., Song, B., Song, M. J., & Yoon, S. (2019). Enhanced Nitrous Oxide Production in Denitrifying *Dechloromonas aromatica* Strain RCB Under Salt or Alkaline Stress Conditions. *Microorganisms*, 7(7), 209. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7070209>
- Hecht, M. H. (2002). Metastability of Liquid Water on Mars. *Icarus*, 156(2), 373-386. <https://doi.org/10.1006/icar.2001.6794>
- Henson, M. A., & Hanly, T. J. (2014). Dynamic flux balance analysis for synthetic microbial communities. *IET Systems Biology*, 8(5), 214-229. <https://doi.org/10.1049/iet-syb.2013.0021>
- Hobmeier, K., Cantone, M., Nguyen, Q. A., Pflüger-Grau, K., Kremling, A., Kunte, H. J., Pfeiffer, F., & Marin-Sanguino, A. (2022). Adaptation to Varying Salinity in *Halomonas elongata*: Much More Than Ectoine Accumulation. *Frontiers in Microbiology*, 13, 846677. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.846677>
- Hobmeier, K., Goëss, M. C., Sehr, C., Schwaminger, S., Berensmeier, S., Kremling, A., Kunte, H. J., Pflüger-Grau, K., & Marin-Sanguino, A. (2020). Anaplerotic Pathways in *Halomonas elongata*: The Role of the Sodium Gradient. *Frontiers in Microbiology*, 11, 561800. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.561800>
- Jr., W. T. S., Smid, E. J., Notebaart, R. A., & Block, D. E. (2020). Curation and Analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* Genome-Scale Metabolic Model for Predicting Production of Sensory Impact Molecules under Enological Conditions. *Processes*, 8(9), 1195. <https://doi.org/10.3390/pr8091195>
- Kumar, P., Srivastava, S., & Singh, V. P. (2023). Perchlorate stress in plants: insights into growth and physiological responses. En P. Kumar, S. Srivastava & V. P. Singh

- (Eds.), *Perchlorate: Environmental Pollution, Health Effects and Remediation Methods* (pp. 15-30). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18985-2.00002-X>
- Laroche, C. (2022). Exopolysaccharides from Microalgae and Cyanobacteria: Diversity of Strains, Production Strategies, and Applications. *Marine Drugs*, 20(5), 336. <https://doi.org/10.3390/md20050336>
- Likai, A., Papazi, A., & Kotzabasis, K. (2025). Resilience of *Chlorella vulgaris* to Simulated Atmospheric Gas Compositions of Mars, Jupiter, and Titan. *Life*, 15(1), 117. <https://doi.org/10.3390/life15010117>
- Lu, J., Yang, F., Wang, S., Ma, H., Liang, J., & Chen, Y. (2017). Co-existence of Rhizobia and Diverse Non-rhizobial Bacteria in the Rhizosphere and Nodules of *Dalbergia odorifera* Seedlings Inoculated with *Bradyrhizobium elkanii*, *Rhizobium multihospitium*-Like and *Burkholderia pyrrocinia*-Like Strains. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2255. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02255>
- Macário, I., Veloso, T., Romão, J., Gonçalves, F., Pereira, J., Duarte, I., & Ventura, S. (2022). Metabolic composition of the cyanobacterium *Nostoc muscorum* as a function of culture time: A 1H NMR metabolomics study. *Algal Research*, 66, 102792. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102792>
- Machado, D., Andrejev, S., Tramontano, M., & Patil, K. R. (2018). Fast automated reconstruction of genome-scale metabolic models for microbial species and communities. *Nucleic Acids Research*, 46(15), 7542-7553. <https://doi.org/10.1093/nar/gky537>
- Mahaffy, P. R., Webster, C. R., Atreya, S. K., Franz, H. B., Wong, M., Conrad, P. G., Harpold, D. N., Jones, J. H., Leshin, L. A., Manning, H., Owen, T., Pepin, R. O., Squyres, S. W., & Steele, A. (2013). Abundance and Isotopic Composition of Gases in the Martian Atmosphere from the Curiosity Rover. *Science*, 341(6143), 263-266. <https://doi.org/10.1126/science.1237966>
- Marin de Mas, I., Herand, H., Carrasco, J., Nielsen, L. K., & Johansson, P. I. (2023). A Protocol for the Automatic Construction of Highly Curated Genome-Scale Models of Human Metabolism. *Metabolites*, 13(5), 618. <https://doi.org/10.3390/metabo13050618>
- Marvasi, M., Visscher, P. T., & Casillas Martinez, L. (2010). Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 313(1), 1-9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02085.x>
- Masmoudi, F., Alsafran, M., AL Jabri, H., Hosseini, H., Trigui, M., Sayadi, S., Tounsi, S., & Saadaoui, I. (2023). Halobacteria-Based Biofertilizers: A Promising Alternative for Enhancing Soil Fertility and Crop Productivity under Biotic and Abiotic Stresses—A Review. *Microorganisms*, 11(5), 1248. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051248>

- Mendes, A. R., Spínola, M. P., Lordelo, M., & Prates, J. A. M. (2024). Chemical Compounds, Bioactivities, and Applications of *Chlorella vulgaris* in Food, Feed and Medicine. *Applied Sciences*, *14*(23), 10810. <https://doi.org/10.3390/app142310810>
- Morris, J. J., Lenski, R. E., & Zinser, E. R. (2014). Inference of interactions in cyanobacterial–heterotrophic co-cultures from transcriptomic data. *The ISME Journal*, *8*(11), 2243-2255. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.69>
- Mountourakis, F., Papazi, A., & Kotzabasis, K. (2021). The Microalga *Chlorella vulgaris* as a Natural Bioenergetic System for Effective CO Mitigation—New Perspectives against Global Warming. *Symmetry*, *13*(6), 997. <https://doi.org/10.3390/sym13060997>
- Murry, M. A., Wolk, C. P., & Mendelson, J. (1984). Physiological Studies of Oxygen Protection Mechanisms in the Heterocysts of *Anabaena cylindrica*. *Applied and Environmental Microbiology*, *47*(3), 449-454.
- Muscatello, A., & Santiago-Maldonado, E. (2012). Mars In Situ Resource Utilization Technology Evaluation [Published online: 6 Nov 2012, Nashville, Tennessee]. *50th AIAA Aerospace Sciences Meeting including the New Horizons Forum and Aerospace Exposition*. <https://doi.org/10.2514/6.2012-360>
- NASA. (2014). VEGGIE - NASA Science [Consultado el 6 de mayo de 2025].
- Naseem, H., & Bano, A. (2022). Bacterial Exopolysaccharides: Insight into Their Role in Plant Abiotic Stress Tolerance. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *32*(1), 1-11. <https://doi.org/10.4014/jmb.2105.05009>
- Nugroho, W. A., Rofiq, H., Estuwilujeng, A., Wibisono, Y., & Bilad, M. R. (2024). Use of hydroponic fertilizers in growth media for *Chlorella vulgaris* for producing affordable protein in developing countries [Published online: 12 Sep 2024]. *Green Technology, Resilience and Sustainability*, 97-110. <https://doi.org/10.1080/26388081.2024.2396881>
- Orth, J. D., Thiele, I., & Palsson, B. Ø. (2010). What is flux balance analysis? *Nature Biotechnology*, *28*(3), 245-248. <https://doi.org/10.1038/nbt.1614>
- Ortiz-Moreno, M. L., Solarte-Murillo, L. V., & Sandoval-Parra, K. X. (2020). Análisis de la producción de biomasa de *Nostoc muscorum* en sistema hidropónico [ISSN impreso: 0121-3709]. *Orinoquia*, *24*(1), 23-31. <https://doi.org/10.22579/20112629.599>
- Oze, C., Beisel, J., Dabsys, E., Dall, J., North, G., Scott, A., Lopez, A. M., Holmes, R., & Fendorf, S. (2021). Perchlorate and Agriculture on Mars. *Soil Systems*, *5*(3), 37. <https://doi.org/10.3390/soilsystems5030037>
- Paster, B. J., Russell, J. B., Yang, C. M. J., Chow, J. M., Woese, C. R., & Tanner, R. (1993). Phylogeny of the Ammonia-Producing Ruminant Bacteria *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii*, and *Clostridium aminophilum* sp. nov. *Internationa-*

- tional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43(1), 107-110. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-1-107>
- Pastor, J. M., Salvador, M., Argandoña, M., Bernal, V., Reina-Bueno, M., Csonka, L. N., Iborra, J. L., Vargas, C., Nieto, J. J., & Cánovas, M. (2010). Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production. *Biotechnology Advances*, 28(6), 782-801. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.06.005>
- Ramalho, T. P., Chopin, G., Salman, L., Baumgartner, V., Heinicke, C., & Verseux, C. (2022). On the growth dynamics of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7938 in Martian regolith. *npj Microgravity*, 8(43). <https://doi.org/10.1038/s41526-022-00240-5>
- Russell, J. B., & Rychlik, J. L. (1999). Isolation and Characterization of Proteolytic Ruminant Bacteria from Grazing Cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 3075-3083. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.7.3075-3083.1999>
- Rutten, P. J., & Poole, P. S. (2019). Oxygen regulatory mechanisms of nitrogen fixation in rhizobia. En *Advances in Microbial Physiology* (pp. 325-389, Vol. 75). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2019.08.001>
- Rychlik, J. L., & Russell, J. B. (2002). The adaptation and resistance of *Clostridium aminophilum* F to the butyrovibriocin-like substance of *Butyrovibrio fibrisolvens* JL5 and *monensin*. *FEMS Microbiology Letters*, 209(1), 93-98. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11115.x>
- Salinero, K. K., Keller, K., Feil, W. S., Feil, H., Trong, S., Di Bartolo, G., & Lapidus, A. (2009). Metabolic analysis of the soil microbe *Dechloromonas aromatica* str. RCB: indications of a surprisingly complex life-style and cryptic anaerobic pathways for aromatic degradation. *BMC Genomics*, 10(1), 351. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-351>
- Sangavai, C., & Chellapandi, P. (2017). Amino acid catabolism-directed biofuel production in *Clostridium sticklandii*: An insight into model-driven systems engineering. *Biotechnology Reports*, 16, 32-43. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.11.002>
- Solé, R., & Sardanyés, J. (2009). The Hypercycle: From Molecular to Ecosystems Dynamics. En A. Dupont & H. Jacobs (Eds.), *Landscape Ecology Research Trends* (pp. 79-104). Nova Science Publishers.
- Thiele, I., & Palsson, B. Ø. (2010). A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nature Protocols*, 5, 93-121. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.203>
- Thomas, B. O., Lechner, S. L., Ross, H. C., Joris, B. R., Glick, B. R., & Stegelmeier, A. A. (2024). Friends and Foes: Bacteria of the Hydroponic Plant Microbiome [Affiliations: University of Waterloo and Ceragen Inc.]. *Microorganisms*.

- Valencia-Marin, M. F., Chávez-Avila, S., Guzmán-Guzmán, P., Orozco-Mosqueda, M. d. C., de los Santos-Villalobos, S., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2024). Survival strategies of *Bacillus* spp. in saline soils: Key factors to promote plant growth and health. *Biotechnology Advances*, *70*, 108303. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108303>
- Van Trump, J. I., & Coates, J. D. (2009). Thermodynamic targeting of microbial perchlorate reduction by selective electron donors. *The ISME Journal*, *3*, 466-476. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.119>
- Wadsworth, J., & Cockell, C. S. (2017). Perchlorates on Mars enhance the bacteriocidal effects of UV light. *Scientific Reports*, *7*(1), 4662. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04910-3>
- Wang, L., Upadhyay, V., & Maranas, C. D. (2021). dGPredictor: Automated fragmentation method for metabolic reaction free energy prediction and de novo pathway design. *PLoS Computational Biology*, *17*(9), e1009324. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009324>
- Watkin, E. L. J., O'Hara, G. W., & Glenn, A. R. (1997). Calcium and acid stress interact to affect the growth of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Soil Biology and Biochemistry*, *29*(5-6), 831-836. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00046-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00046-1)
- Wolk, C. P., Thomas, J., Shaffer, P. W., Austin, S. M., & Galonsky, A. (1976). Pathway of nitrogen metabolism after fixation of ¹³N-labeled nitrogen gas by the cyanobacterium, *Anabaena cylindrica*. *Journal of Biological Chemistry*, *251*(16), 5027-5034. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)33216-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)33216-7)
- Wong, Y., Ho, Y., Ho, K., Leung, H., & Yung, K. (2017). Growth Medium Screening for *Chlorella vulgaris* Growth and Lipid Production. *Journal of Aquaculture Marine Biology*, *6*(1), 00143. <https://doi.org/10.15406/jamb.2017.06.00143>
- Yadav, P., Singh, R. P., Rana, S., Joshi, D., Kumar, D., Bhardwaj, N., Gupta, R. K., & Kumar, A. (2022). Mechanisms of Stress Tolerance in Cyanobacteria under Extreme Conditions. *Stresses*, *2*(4), 531-549. <https://doi.org/10.3390/stresses2040036>
- Yu, J., Wang, Z., Wang, J., Mohisin, A., Liu, H., Zhang, Y., Zhuang, Y., & Guo, M. (2022). Physiological metabolic topology analysis of *Halomonas elongata* DSM 2581T in response to sodium chloride stress. *Biotechnology and Bioengineering*, *119*(12), 3509-3525. <https://doi.org/10.1002/bit.28222>
- Zhang, J., Zhang, F., Dong, Z., Zhang, W., Sun, T., & Chen, L. (2024). Response and acclimation of cyanobacteria to acidification: A comprehensive review. *Science of The Total Environment*, *945*, 173978. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173978>
- Zhou, Y., Li, X., Chen, J., & Wang, F. (2023). Treatment of antibiotic-containing wastewater with self-suspended algae-bacteria symbiotic particles: Removal performance and reciprocal mechanism. *Chemosphere*, *338*, 138240. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138240>

A. ANEXO: Mejoras tras el Proceso de Curación de los Modelos

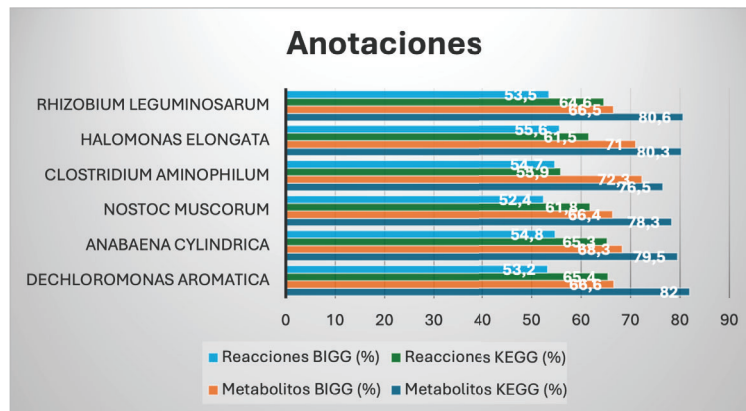


Figura 1: Porcentaje de anotaciones recuperadas para cada especie microbiana del hiperciclo mediante las bases de datos BIGG y KEGG. Se muestran las coberturas relativas de reacciones metabólicas y metabolitos asignados en cada base, tras el proceso de curación inicial de los modelos draft generados con ModelSEED. La combinación de anotaciones múltiples mejora la calidad del modelo reconstruido y permite identificar lagunas metabólicas relevantes para cada especie.

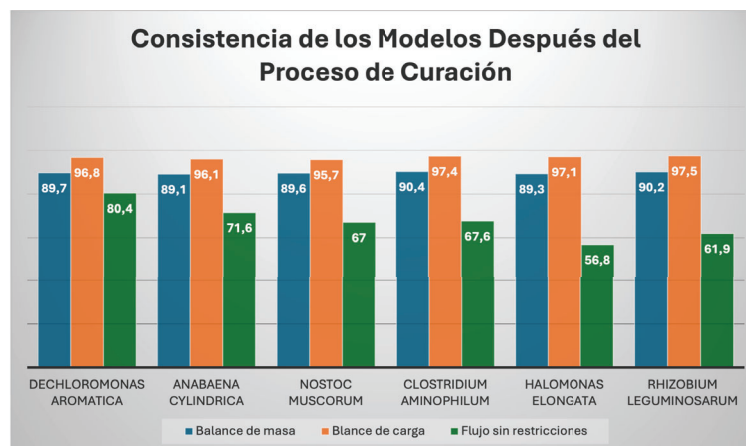


Figura 2: Evaluación de la consistencia de los modelos metabólicos tras el proceso de curación. Se presentan los porcentajes de reacciones que cumplen con el balance de masa, el balance de carga y la capacidad de flujo sin restricciones en cada modelo microbiano, según los criterios del análisis MEMOTE. Los elevados valores validan el aumento de calidad de los modelos tras las primeras etapas de curación

Energía libre de Gibbs calculada por modelo

Modelo	Reacciones Reversibles	Reacciones Irreversibles
Dechloromonas aromatica	376	314
Anabaena cylindrica	319	281
Nostoc muscorum	329	221
Clostridium aminophilum	743	268
Halomonas elongata	344	184
Rhizobium leguminosarum	708	522

Figura 3: Reversibilidad de las reacciones en función de la energía libre de Gibbs calculada. Se presentan las cantidades de reacciones clasificadas como reversibles e irreversibles tras el análisis termodinámico preliminar, utilizando estimaciones obtenidas mediante la herramienta Equilibrator. Esta información permite refinar los modelos metabólicos y mejorar la predicción del flujo de materia en el hiperciclo.

Información básica de los modelos bacterianos

Modelo	Metabolitos	Reacciones	Genes	Cobertura metabólica
Dechloromonas aromatica	1439	1293	1378	0.94
Anabaena cylindrica	1348	1228	1406	0.87
Nostoc muscorum	1531	1425	1662	0.86
Clostridium aminophilum	1209	1098	990	1.11
Halomonas elongata	1589	1530	1710	0.89
Rhizobium leguminosarum	1833	1753	2468	0.71

Figura 4: Propiedades generales de los modelos metabólicos tras el proceso de curación. Se muestran el número total de metabolitos, reacciones y genes asociados en cada modelo, así como su cobertura metabólica estimada como el cociente entre reacciones y genes. Las especies presentan coberturas cercanas a 1, lo que indica una adecuada asignación funcional y una base sólida para simulaciones metabólicas.

B. ANEXO: Diagrama de Bifurcación del Compartimento 3

En este anexo se presenta el diagrama de bifurcación del sistema linealizado correspondiente al compartimento 3, centrado en la tasa de extracción de oxígeno. Esta tasa representa una de las variables críticas del sistema, ya que el oxígeno es un nutriente esencial producido por las especies microbianas presentes en este compartimento. Comprender cuánta cantidad de oxígeno puede extraerse sin comprometer la estabilidad del sistema resulta clave para el diseño y optimización del hiperciclo.

Dado que el sistema original está descrito mediante un conjunto de ecuaciones diferenciales no lineales de tipo Monod, se realiza una aproximación linealizada para facilitar la obtención analítica de los equilibrios. Esta aproximación permite representar de forma exacta las ramas estables e inestables del sistema y construir el diagrama de bifurcación correspondiente.

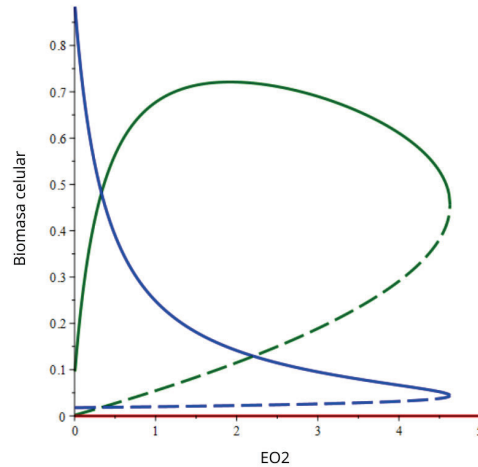


Figura 5: Diagrama de bifurcación en función de la tasa de extracción de oxígeno (E_{O_2}). Se representan dos variables: X_1 (en azul) y X_2 (en verde). Para cada una, se muestra la rama estable (línea continua) e inestable (línea discontinua). El equilibrio trivial aparece como una línea roja sobre el eje horizontal. Los valores de los parámetros utilizados son los mencionados en el Capítulo 3.

El diagrama revela un fenómeno de biestabilidad para un intervalo intermedio de valores de E_{O_2} , donde coexisten dos equilibrios estables: el estado trivial $(0, 0, 0, 0)$ y un punto de coexistencia positivo en el que todas las especies mantienen poblaciones distintas de cero.

Entre ambos se sitúa un equilibrio inestable, que actúa como frontera entre sus respectivas cuencas de atracción.

Esta configuración implica que la dinámica del sistema depende de las condiciones iniciales: para ciertas condiciones, el sistema alcanza un equilibrio de coexistencia funcional, mientras que en otras colapsa hacia la extinción total. Este comportamiento resulta especialmente relevante en el contexto marciano, donde la capacidad de retener condiciones ecológicamente viables podría depender de pequeñas perturbaciones o decisiones en el diseño del sistema.

Es importante señalar que, al tratarse de un sistema de cuatro dimensiones, el estudio completo de la cuenca de atracción no resulta trivial. El diagrama presentado corresponde a una proyección de la dinámica sobre dos variables, lo que permite visualizar los puntos de bifurcación y los cambios de estabilidad, pero no captura toda la complejidad geométrica del sistema completo. Aun así, este tipo de representación proporciona una herramienta muy útil para anticipar el comportamiento cualitativo del sistema frente a variaciones en la tasa de extracción de oxígeno, y para establecer límites operativos seguros en el diseño de futuros sistemas biotecnológicos en Marte.

C. ANEXO: Repositorio de GitHub

Con el objetivo de garantizar la trazabilidad, reproducibilidad y accesibilidad del trabajo realizado, se ha habilitado un repositorio público en GitHub que contiene todos los cuadernos de Jupyter y modelos metabólicos asociados al presente Trabajo de Fin de Grado. Puede consultarse en el siguiente enlace:

- **Repositorio:** <https://github.com/elenagasl/regolith-fertilization-models>

Estructura del repositorio

El contenido del repositorio se organiza en tres carpetas principales:

- **model_curation/:** incluye los cuadernos de Jupyter empleados para la curación de modelos draft generados con ModelSEED, utilizando genomas obtenidos de la base de datos PATRIC y contrastados con información de KEGG, BiGG y MetaNetX.
- **metabolic_simulations/:** contiene los cuadernos de simulación dinámica (dFBA) centrados en el compartimento 3 del sistema hipercíclico, implementando balances de masa, las aproximaciones matemáticas y exploraciones paramétricas.
- **data/:** almacena los modelos metabólicos microbianos draft en formato SBML (.xml).

Además, el repositorio cuenta con un archivo `README.md` donde se detallan los objetivos del proyecto, la organización de archivos y los requisitos técnicos para su ejecución.