

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida
con orientación en Biotecnología Marina**

**Caracterización molecular y crecimiento fotomixotrófico de
una cianobacteria del género *Synechocystis* productora del
biopolímero poli- β -hidroxibutirato**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Abril Alison Ortega Lama

Ensenada, Baja California, México
2021

Tesis defendida por
Abril Alison Ortega Lama

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Directora de tesis

Dra. Edna Sánchez Castrejón

Dra. Beatriz Cordero Esquivel



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Abril Alison Ortega Lama © 2021

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Abril Alison Ortega Lama** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

**Caracterización molecular y crecimiento fotomixotrófico de una cianobacteria del género
Synechocystis productora del biopolímero poli-β-hidroxibutirato**

Resumen aprobado por:

Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Directora de tesis

El uso excesivo de materiales plásticos de origen petroquímico ha causado uno de los problemas ambientales más grandes de los últimos años. La biotecnología se ha enfocado en abordar esta problemática a través de microorganismos que sintetizan polímeros sustentables y totalmente biodegradables, como: el poli-β-hidroxibutirato (PHB). Este biopolímero es producido de forma natural por algunos microorganismos incluyendo a la cianobacteria modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803, la cual tiene la capacidad de llevar a cabo crecimiento fotoautotrófico, mixotrófico o heterotrófico en medio de cultivo suplementado con glucosa. Esta cepa cuenta con su genoma secuenciado y los genes de la vía de síntesis de PHB ya han sido descritos. Sin embargo, debido a las restricciones de uso que presentan las cepas modelos es importante identificar nuevas cepas productoras naturales de este biopolímero, que brinden la posibilidad de encontrar características sobresalientes a las ya conocidas. La taxonomía de cianobacterias basadas en el DNA se centra en las similitudes entre secuencias conservadas como 16S ribosomal y diferencias entre la el 16S-23S espaciador ribosomal intergénico (ITS). El análisis de las cianobacterias de la colección del laboratorio, basada en la amplificación del gen *phaC* evidenció a la cepa B6B como una cianobacteria con potencial en la producción PHB de manera natural. En este sentido, el objetivo del presente estudio fue evaluar el crecimiento y producción de PHB por las cepas *Synechocystis* sp. PCC 6803 (control) y B6B diferentes medios de cultivo: fotoautótrofa (BG11) y fotomixotróficas que incluyen BG11 adicionada con glucosa (G+) o acetato (A+) y/o limitación de nitrógeno (N-). Así mismo, se llevó a cabo la caracterización molecular de B6B para su identificación a nivel de género. El análisis de la región ITS de la cepa B6B mostró un alto porcentaje de identidad con especies del género *Synechocystis* (94.48%) y un alto porcentaje de GC (42.9%), además de codificar para un tRNA^{le} característico del género. Así mismo, los árboles filogenéticos obtenidos con secuencias rRNA 16S e ITS se agrupó a la cepa B6B en el clado de *Synechocystis*. Las regiones ITS de B6B y PCC 6803 presentan 21 nucleótidos de diferencias entre sí, mismos que permitieron diferenciar a las dos cepas mediante el análisis de RFLP. Las curvas de crecimiento en medio BG11 obtenidas tanto por conteo celular como por mediciones de densidad óptica (730 nm) mostraron una mayor velocidad de crecimiento por la cepa B6B ($\mu_{\max} = 1.36$) en comparación con la cepa modelo ($\mu_{\max} = 0.91$). En condiciones fotomixotróficas, la producción de biomasa mostró ser inversamente proporcional a la producción de PHB para ambas cepas, obteniéndose la mayor cantidad de biomasa bajo la condición BG11 A+. La mayor producción de PHB en la cepa B6B se obtuvo en BG11 N- A+ y BG11 N- G+ con 2.09 ± 0.32 y 1.10 ± 0.06 %PHB (w/w), respectivamente. Sin embargo, los niveles de PHB en B6B fueron 25% menores a lo obtenido por la cepa modelo. Los cultivos con limitación de nitrógeno solo o en combinación con glucosa o acetato en las cepas B6B y PCC 6803 presentaron blanqueamiento y bajo crecimiento. Esto sugiere que la cepa B6B presenta ajustes metabólicos para la obtención de nitrógeno a partir de componentes relacionados con los pigmentos, como se ha observado en la cepa modelo PCC 6803.

Palabras clave: PHB, *Synechocystis*, B6B, filogenética, 16S-ITS, mixotrofia.

Abstract of the thesis presented by **Abril Alison Ortega Lama** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology.

Molecular characterization and photomyxotrophic growth of a cyanobacterium of the genus *Synechocystis* that produces the poly- β -hydroxybutyrate biopolymer

Abstract approved by:

Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Thesis director

The excessive use of petrochemical-based plastics has caused one of the biggest environmental problems in recent years. Biotechnology has focused on addressing this problem through microorganisms that synthesize sustainable and fully biodegradable polymers, such as poly- β -hydroxybutyrate (PHB). This biopolymer is produced naturally by some microorganisms, including the model cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 that can carry out photoautotrophic, mixotrophic, or heterotrophic growth in a culture medium supplemented with glucose. This strain has its genome sequenced, and the genes of the PHB synthesis pathway have been described. However, due to the restrictions of use presented by the model strains, it is important to identify new natural producing strains of this biopolymer, which offer the possibility of finding outstanding characteristics to those already known. The DNA-based taxonomy of cyanobacteria focuses on the similarities among conserved sequences such as 16S ribosomal and differences among the 16S-23S intergenic ribosomal spacer (ITS). The analysis of the cyanobacteria from the laboratory collection, based on the amplification of the *phaC* gene, showed the B6B strain as a cyanobacterium with the potential to produce PHB naturally. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the growth and production of PHB by the *Synechocystis* sp. PCC 6803 (control) and B6B strain in different media: photoautotrophic (BG11) and photomyxotrophic (BG11 added with glucose (G+) or acetate (A+)) and/or nitrogen limitation (N-) culture media. Besides, the molecular characterization of B6B was carried out for its identification at the genus level. The ITS region of the B6B strain showed a high percentage of GC (42.9%) and a high percentage of identity with species of the genus *Synechocystis* (94.48%), in addition to coding for the characteristic tRNA^{Ile} of the genus. The phylogenetic trees obtained with 16S rRNA and ITS sequences grouped the B6B strain in the *Synechocystis* clade. The ITS regions of B6B and PCC 6803 showed 21 nucleotides of differences between them, which allowed the two strains to be differentiated by RFLP analysis. The growth curves in BG11 medium obtained by cell counting and optical density measurements (730 nm) showed a higher growth rate for the B6B strain ($\mu_{\max} = 1.36$) compared to the model strain ($\mu_{\max} = 0.91$). Under photomyxotrophic conditions, biomass production was inversely proportional to PHB production for both strains, obtaining the highest biomass under the BG11 A + condition. The highest PHB production in the B6B strain was obtained for BG11 N- A + (2.09 ± 0.32 w/w) and BG11 N- G + ($1.10 \pm 0.06\%$ w/w). However, the PHB levels in B6B were 25% lower than that obtained by the model strain. Nitrogen-limited cultures without or combined with glucose or acetate in the strains B6B and PCC 6803 presented bleaching and low growth. This finding suggests that the B6B strain had metabolic adjustments for obtaining nitrogen from components related to pigments, as has already been seen by the model strain PCC 6803.

Keywords: PHB, *Synechocystis*, B6B, phylogenetics, 16S-ITS, mixotrophy.

Dedicatoria

A mi abuelo, me hubiera encantado que me miraras subir un escalón más en mi vida. Te extraño.

A mi Roberttt, aunque te nos adelantaste en esta vida, te recuerdo cada día amigo y siempre te llevo en mi corazón.

A toda persona que no tiene miedo de cuidar el medio ambiente, que no siente pena de alzar la voz. A quienes procuran el bien común, aun cuando no se lo han pedido.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme brindado el apoyo financiero a lo largo de 2 años (No. Becario: 894211) permitiéndome realizar mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, en especial al Posgrados en Ciencias de la Vida, por haberme considerado y aceptado para realizar mis estudios de maestría en su institución. Además, por haberme apoyado con una beca manutención durante mi periodo de prórroga.

A mi directora de tesis la Dra. Elizabeth Ponce Rivas, por haber descubierto mí el interés por la ciencia ofreciéndome el proyecto, su conocimiento, instalaciones, dirección y apoyo.

A mi comité de tesis: Dra. Edna Sánchez Castrejón y la Dra. Beatriz Cordero Esquivel, por su tiempo, conocimiento, observaciones y apoyo durante el desarrollo de la tesis. En especial a la Dra. Beatriz y a su Tec. M.C. Abelardo Campos, por brindarnos un espacio en su laboratorio en el departamento de Acuicultura para continuar con ensayos durante la parte experimental del proyecto.

A Dra. Patricia Paredes “Paty” y M. C. Luis Duarte “Luisito” por ser mi socorro en temas de bioinformática y filogenética.

A M.C. Cindy Manríquez, M.C. Genesis León y M.C Aritz Barrondo por su apoyo en aspectos estadísticos.

A Leticia Ruiz por su apoyo en el laboratorio durante su estancia en el departamento de Biotecnología Marina.

A Don Mario, guardia del departamento de Acuicultura, por vigilar mis experimentos por la noche.

A mis amigos y compañeros de generación, por el apoyo y lazo tan fuerte que hemos creado. Compartir con ellos momentos buenos y otros no tan buenos, hicieron darme cuenta que uno nace con hermanos que no son de sangre y que sin duda la vida te va guiando para írtelos encontrando. Gracias por estar
ELEPE.

A mi amiga María Rivera, por siempre estar pendiente de mí. Siempre apoyándome y siendo ejemplo.

Por supuesto a mi familia, no hay nada en mi vida por lo cual no esté agradecida con ellos. En especial a mi mamá, este logro también es tuyo ma.

A Ricardo Gamiz, por ser mi compañero de viaje en esta vida. Por su todo su apoyo y amor.

Gracias a la vida, Alhamdulillah.

Gracias a mí.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	3
1.1.1 Taxonomía de cianobacterias.....	3
1.1.2 Producción de Poli- β -hidroxibutirato en cianobacterias.....	6
1.1.3 Vías del metabolismo central.....	7
1.1.4 Estrategias de sobreproducción de PHB en <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803, como organismo modelo.....	10
1.2 Justificación.....	11
1.3 Hipótesis.....	12
1.4 Objetivos.....	13
1.4.1 Objetivo general.....	13
1.4.2 Objetivos específico.....	13
Capítulo 2. Metodología.....	14
2.1 Organismo y condiciones de cultivo.....	14
2.2 Análisis moleculares y bioinformáticos.....	15
2.2.1 Extracción de DNA cromosomal de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y B6B.....	15
2.2.2 PCR punto final para amplificación de región 16S ribosomal y región espaciadora ribosomal intergénica (ITS).....	16
2.2.3 RFLP de regiones intergénicas amplificadas de PCC 6803 y B6B.....	18
2.2.4 Análisis de secuencias ribosomales.....	18
2.2.5 Análisis filogenéticos.....	18
2.3 Dinámica de crecimiento en cianobacterias B6B y PCC 6803.....	19
2.3.1 Curvas de crecimiento.....	19
2.3.2 Conteo celular y parámetro de crecimiento.....	20

2.4 Crecimiento y obtención de PHB en las cepas B6B y PCC 6803.....	20
2.4.1 Obtención de PHB por mixotrofia en B6B.....	21
2.4.2 Determinación de Peso Seco.....	22
2.4.3 Extracción y cuantificación de PHB.....	23
2.5 Análisis estadísticos.....	24
Capítulo 3. Resultados.....	25
3.1 Obtención de cultivo monocianobacteriano de la cianobacteria B6B.....	25
3.2 Identificación de la cianobacteria B6B.....	26
3.2.1 Análisis por RFLP.....	27
3.2.2 Análisis de secuencias: Región ITS.....	29
3.2.3 Análisis de secuencias: Región 16S ribosomal.....	31
3.2.4 Análisis filogenéticos.....	33
3.2.5 Cinética de crecimiento de PCC 6803 y B6B por DO ₇₃₀ y conteo celular.....	39
3.3 Crecimiento y producción de PHB por PCC 6803 y B6B en mixotrofia.....	41
3.3.1. Curva de crecimiento de las cepas B6B y PCC 6803 en diferentes condiciones de cultivo.....	42
3.3.2 Obtención de PHB por condiciones de mixotróficas en B6B y PCC 6803.....	47
Capítulo 4. Discusión.....	50
4.1 Caracterización molecular: región ribosomal 16S y región espaciadora ribosomal intergénica (ITS).....	50
4.2 Curvas de crecimiento de las cianobacterias B6B y PCC 6803.....	53
4.3 Desarrollo celular de las cianobacterias B6B y PCC 6803 en respuesta a condiciones mixotróficas.....	55
4.4 Producción de PHB por las cepas B6B y PCC 6803 en condiciones mixotróficas.....	59
Capítulo 5. Conclusiones.....	62
Literatura citada.....	64
Anexos.....	72

Lista de figuras

Figura		Página
1	Estructura básica de PHA.....	2
2	División celular de cianobacterias por fisión binaria.....	5
3	División celular de cianobacterias por fisión múltiple.....	5
4	Vía de la biosíntesis de PHB.....	7
5	Rutas de metabolismo central de carbono de la cepa <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	9
6	Microscopia electrónica sobre el efecto de privación de nitrógeno en el medio, en la cepa <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	11
7	Diagrama experimental del trabajo de tesis.....	14
8	Representación gráfica de la posición de cebadores y la región 16S e ITS.....	16
9	Cepa B6B en medio BG11 con crecimiento bacteriano.....	25
10	DNA cromosomal de cianobacterias.....	26
11	Cultivo monocianobacteriano de la cepa B6B en medio sólido BG11.....	26
12	Electroforesis de productos de PCR amplificador por los oligonucleótidos ciano16sFinFor y RNA23S-ciano.....	27
13	Electroforesis de digestión enzimática de <i>DdeI</i> y <i>HhaI</i>	28
14	Electroforesis de digestión enzimática de <i>AluI</i>	28
15	Búsqueda de tRNA en la secuencia de PCC 6803 y B6B.....	30
16	Alineamiento múltiple de las regiones ITS de PCC 6803 y B6B.....	31
17	Alineamiento múltiple de las regiones 16S de PCC 6803 y B6B.....	32
18	Árbol filogenético de máxima verosimilitud de la región 16S de cianobacterias.....	34
19	Árbol filogenético de máxima verosimilitud de la región ITS de cianobacterias.....	37
20	Cinética de crecimiento por DO_{730} de PCC 6803 y B6B en un periodo de 30 días.....	39
21	Cinética de crecimiento por conteo celular en cámara de PCC 6803 y B6B en un periodo de 20 días.....	40

22	Curva estándar y ecuación de regresión lineal de PCC 6803 y B6B obtenida de mediciones DO ₇₃₀ y conteo celular.....	41
23	Producción de PHB por B6B y PCC 6803 en modo basal.....	42
24	Evolución en coloración de cianobacterias B6B bajo condiciones de cultivo durante 20 días de experimentación.....	43
25	Evolución en coloración de cianobacterias PCC 6803 bajo condiciones de cultivo durante 20 días de experimentación.....	44
26	Cinética de crecimiento de B6B y PCC 6803 bajo condiciones de cultivo durante un periodo de 20 días.....	46
27	Contenido peso seco total de B6B y PCC 6803 en condiciones de crecimiento.....	47
28	Producción de PHB por B6B y PCC 6803 por mixotrofia.....	48
29	Crecimiento bacteriano en medio de cultivo BG11 con antibiótico en B6B.....	74

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Condiciones de cultivo a utilizar.....	21
2	Resultado de patrón de bandas por digestión <i>in silico</i> de B6B y PCC 6803.....	27
3	Resultado de alineamiento con alto porcentaje de identidad con la secuencia ITS de B6B.....	29
4	Resumen de alineamientos con alto porcentaje de identidad con la secuencia 16S de B6B.....	32
5	Porcentaje de identidades en secuencias 16S.....	35
6	Porcentaje de identidades en secuencias ITS.....	38
7	Reactivos para medio BG11 100x sin Fe ⁺	72
8	Reactivos para minerales traza.....	72
9	Volúmenes para la preparación de medio líquido BG11 sin Fe ⁺	73
10	Reactivos para la elaboración de medio BG11 sólido.....	73
11	Lista de cianobacterias con regiones 16S utilizadas para los análisis filogenéticos.....	77
12	Lista de cianobacterias con regiones ITS utilizadas para los análisis filogenéticos.....	79
13	Datos de DO ₇₃₀ en cepas B6B y PCC 6803 utilizados en la construcción de curvas de crecimiento.....	80
14	Datos de conteo celular de B6B y PCC 6803 utilizados para la construcción de curvas de crecimiento.....	80
15	Cálculo de tasa de crecimiento y tasas de duplicación de PCC 6803.....	81
16	Cálculo de tasa de crecimiento y tasa de duplicación de B6B.....	81
17	DO ₇₃₀ de la cepa PCC 6803 en condiciones de cultivo.....	82
18	DO ₇₃₀ de la cepa B6B en condiciones de crecimiento.....	82
19	Tasas de crecimiento y duplicación de B6B bajo condiciones de cultivo.....	83
20	Tasas de crecimiento y duplicación de PCC 6803 bajo condiciones de cultivo.....	84
21	Peso seco total de la cepa B6B en condiciones de cultivo.....	85
22	Peso seco total de la cepa PCC 6803 bajo condiciones de cultivo.....	85
23	Porcentajes de PHB obtenidos por B6B bajo condiciones de cultivo.....	85

24 Porcentaje de PHB obtenido por PCC 6803 bajo condiciones de cultivo..... 86

Capítulo 1. Introducción

A través de los años el plástico de origen petroquímico se ha posicionado como el material más utilizado por la industria para el consumo humano. Dadas sus características físicas y químicas se han aprovechado para elaborar una gran variedad de objetos y productos (Alam et al., 2018).

La principal desventaja de utilizar materiales elaborados con plástico petroquímicos es su baja degradabilidad, motivo por el cual se fomenta su reciclaje. La característica que define la lenta degradación es la falta de variedad de grupos funcionales en su composición, su alto peso molecular y cristalinidad, entre otras, provocando que estos no se solubilizan con facilidad en medios acuosos y sean muy estables, lo que permite que permanezcan en su estado y forma por un periodo de tiempo largo, abarcando de cientos a miles de años (Wang et al., 2016).

Existen microorganismos que llevan a cabo la síntesis de biopolímeros o “bioplásticos” los cuales tienen características homólogas a los plásticos de origen petroquímico, destacando su biodegradación al 100%. Estos bioplásticos pueden dividirse en dos grandes grupos: los ácidos polilácticos producidos por plantas y los polihidroxicanoatos (PHA's) producidos por microorganismos (Urtuvia et al., 2014).

Los polihidroxicanoatos son producidos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas por diversos microorganismos de manera natural, y pueden ser encontrados en el suelo, mar e incluso aguas residuales. Por lo general, estos biopolímeros son sintetizados por los microorganismos bajo condiciones de estrés nutricional o ambiental, formando pequeños gránulos de PHA que se almacenan de manera intracelular (Sagong et al., 2018). Los PHA's son biopolímeros isotácticos, altamente cristalinos y rígidos. Sus propiedades mecánicas como el módulo de Young y la resistencia a la tracción son comparables con el polipropileno isotáctico (comúnmente conocido como polipropileno). Otras propiedades aprovechadas en múltiples áreas son su resistencia a la humedad, biocompatibilidad, piezoelectricidad y pureza óptica (Khanna y Srivastava, 2005). La composición estructural de los PHA's es aquella que le da las propiedades que lo califican, es decir, la variación del grupo R logra conferir características sobresalientes como biopolímero (Figura 1).

De las 14 vías biosintéticas para los polihidroxicanoatos, la primera de ellas es para la síntesis de poli- β -hidroxibutirato o polihidroxibutirato (PHB), homopolímero de hidroxibutirato que a la fecha es considerado uno de los más sobresalientes por sus características como son su capacidad de moldeo, termoplaticidad, biocompatibilidad y sobre todo biodegradabilidad (Panda y Mallick, 2006).

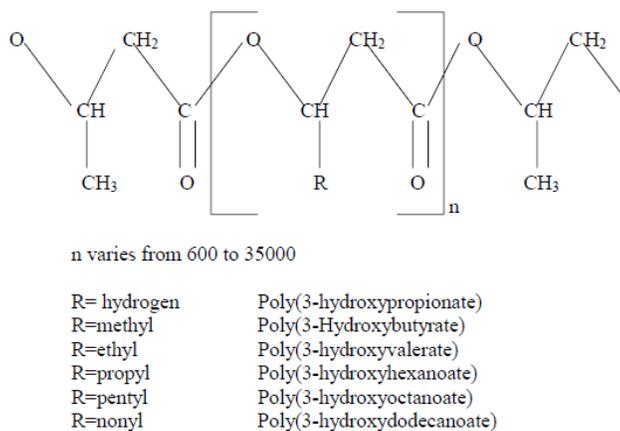


Figura 1 Estructura básica de PHA (Figura tomada de Khanna y Srivastava, 2005).

Se han identificado microorganismos productores de PHB, bacterias principalmente, destacando aquellas que lo sintetizan de manera natural como *Ralstonia eutropha* (Carpine et al., 2018) o modificadas genéticamente para sobre producir el biopolímero como *Escherichia coli* (Chen y Jiang, 2018). Sin embargo, algunos de los factores biológicos que limitan la producción de PHB en este tipo de bacterias son los altos costos de la fuente de carbono requerida para su biosíntesis. Por otro lado, microorganismos como las cianobacterias son capaces de generar una gran cantidad de biomasa en corto tiempo por medio de la fijación del dióxido de carbono disponible en la atmosfera utilizando luz solar como única fuente de carbono y energía.

Las cianobacterias, son bacterias fotoautótrofas oxigénicas que poseen morfologías variadas incluyendo formas unicelulares y filamentosas. Son uno de los principales microorganismos capaces de captar y distribuir el carbono y el oxígeno en todo océano (Shih et al., 2013). Habitan una gran diversidad de ecosistemas, incluyendo ambientes extremos debido a que cuentan con una amplia diversidad metabólica. Son capaces de realizar fermentación bajo condiciones anóxicas, ser heterótrofas facultativas y algunas de sus especies fijan nitrógeno vía heterocistos (Balaji et al., 2013).

Además de representar una alternativa fotosintética de bajo costo, las cianobacterias presentan una alta tasa de crecimiento por lo cual su mantenimiento y obtención de biomasa es rápida, permitiendo ser utilizada para procesos biotecnológicos en masa (Carpine et al., 2017). Algunos de los productos obtenidos a partir de ellas son biocombustibles, metabolitos secundarios y compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana, antiviral, citotóxica y antitumoral, así como su uso en la biorremediación (Abed et al.,

2009; Angermayr et al., 2015; Zhang y Song, 2018). Por lo tanto, la implementación de estos microorganismos ha permitido encontrar alternativas de producción y sustentabilidad de recursos.

Una cianobacteria productora natural de polihidroxitirato es la cepa modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803. La vía biosintética de PHB de esta cianobacteria ya ha sido caracterizada (Takeya et al., 2017) debido a que su genoma fue el primero en ser secuenciado dentro de los organismos fotoautótrofos (Kaneko et al., 1996; GenBank: GCA_000009725.1). Esto ha permitido llevar a cabo modificaciones genéticas para la sobre expresión del polímero y de compuestos específicos a partir de cianobacterias (Wang et al., 2004; Khetkorn et al., 2016; Mo et al., 2017). Así mismo *Synechocystis* sp. PCC 6803 ha mostrado flexibilidad metabólica en el reemplazamiento, silenciamiento o inserción de genes (Xue et al., 2014) aún en condiciones de limitación de nutrientes e incluso al utilizar fuentes de carbono adicionales como la glucosa (Glc), que favorecen la síntesis del biopolímero.

Una alternativa a la edición de vías metabólicas para la obtención de altos niveles de biopolímeros, sin las restricciones legales que supone el uso de las cepas de colección, es la identificación de nuevas cepas de cianobacterias productoras naturales de PHB y la optimización de su producción en diferentes condiciones de estrés. La bioprospección de cianobacterias abre la posibilidad de encontrar nuevos polímeros con diferentes estructuras y propiedades. Con el creciente interés en el cuidado del medio ambiente y la búsqueda de un sustituto a los plásticos provenientes de materiales fósiles, el aprovechamiento de las cianobacterias se ha convertido en el foco de atención en los últimos años debido a sus capacidades de cultivo y características metabólicas (Carpine et al., 2017).

1.1 Antecedentes

1.1.1 Taxonomía de Cianobacterias

Las cianobacterias (antes conocidas como algas verdes-azules) son uno de los Phylum bacterianos más antiguos de la tierra y con una gran diversidad, por lo que presentan la taxonomía más compleja entre los procariotas. Su clasificación representa un desafío ya que es difícil identificarlas sólo por su morfología (Komárek et al, 2014). Incluyen células redondas, alargadas, filamentos con extremos redondos, además de células especializadas como acinetos y heterocistos, entre muchas otras estructuras (Juteršek et al., 2017).

Hasta finales del siglo XX el sistema de nomenclatura de las cianobacterias siguió el Código Internacional de Nomenclatura Botánica, el cual asigna nombres a los grupos taxonómicos de algas, hongos y plantas. En 1978 Stanier y colaboradores, trabajaron en el reconocimiento de las cianobacterias como organismos procariontes, ya que a pesar de pertenecer a uno de los grupos taxonómicos más complejos su composición celular es la de una bacteria. Por ello, se aprobó su clasificación taxonómica siguiendo el Código de Nomenclatura para Bacterias (Stanier et al., 1978).

Por otro lado, el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey utilizado para identificar las principales características morfológicas y fisiológicas de las bacterias (Demoulin et al., 2019), se enfocó en seguir los conceptos de Stanier et al. (1978) y Rippka et al. (1979) para ubicar a las cianobacterias específicamente dentro del reino de las procariontes. Llevando a las cianobacterias a agruparlas en 5 subdivisiones basadas en criterios morfológicos: Chroococcales (I), Pleurocapsales (II) y Oscillatoriales (III), Nostocales (IV), Stigonematales (V).

Las cianobacterias que conforman a las Chroococcales incluyen formas unicelulares que pueden encontrarse dispersas en el medio en forma de baeocitos (endosporas) o también en colonias; sin embargo, no presentan la característica de fijar nitrógeno. Mientras que las filamentosas, representan el mayor grupo de cianobacterias productoras de metabolitos secundarios (Tidgewell et al., 2010) y pueden presentar heterocitos, es decir, células capaces de fijar nitrógeno aún en ambientes anóxicos y convierten el N_2 en amonio (NH_4) para más tarde ser aprovechado en la producción de aminoácidos y proteínas (Sánchez-Baracaldo, 2015).

Una característica básica distintiva entre subdivisiones de cianobacterias es el método de división celular que emplean. En el caso de las Chroococcales la división es llevada a cabo por fisión binaria (Figura 2), mientras que las cianobacterias Pleurocapsales y Nostocales son por fisión múltiple (Figura 3) (Cirés y Quesada, 2011).

A pesar de que la clasificación de cianobacterias se ha basado en sus características morfológicas, empleado como un método práctico. Por ello, los métodos de caracterización molecular y microscopía electrónica complementan el sistema de clasificación de cianobacterias (Komárek et al., 2014), conociendo la filogenia permitiendo identificar y agrupar correctamente a las especies.



Figura 3 División celular de cianobacterias por fisión binaria (*Synechococcus aeruginosus*; Tomada de Evans, 2015).



Figura 2 División celular de cianobacterias por fisión múltiple (*Dermocarpa violacea*; Tomada de Dennis Kunkel, 2019).

Además de las características morfológicas, la taxonomía de cianobacterias se basa en la similitud de las secuencias de ribosomas 16S (de ahora en adelante "16S"), donde se asume que individuos de la misma especie comparten mayor similitud en esta región que organismos de diferentes especies. Esto es gracias a las mutaciones ocurridas en los operones que contiene, generando genes parálogos dentro de esta secuencia logrando la diferenciación de nuevas especies (Brito et al., 2017). Y aunque la evolución del rRNA 16S es lenta, existen regiones con mayor variabilidad como son las regiones espaciadoras ribosomales intergénicas (de ahora en adelante "ITS") comúnmente entre el 16S y el 23S, que permiten para discriminar entre cianobacterias del género *Synechocystis* (Juteršek et al., 2017). Los ITS de cianobacterias se clasifican en tres tipos con base a la presencia de genes para un determinado RNA de transferencia (tRNA) específicos. El primer tipo contiene un tRNA^{Ile} (Isoleucina) y tRNA^{Ala} (Alanina), el segundo tipo contiene sólo tRNA^{Ile}, mientras que en el tercer tipo no se ha encontrado una secuencia identificable que codifique para tRNAs (Sarma, 2012).

Asimismo, la digestión con enzimas de restricción de regiones genómicas (RFLP, por sus siglas en inglés: Polimorfismo de restricción de los fragmentos de restricción) de rRNA-ITS ha sido utilizado para diferenciar entre especies de cianobacterias cercanas (Lu et al., 1997).

1.1.2 Producción de Poli- β -hidroxibutirato en cianobacterias

Las cianobacterias producen polihidroxialcanoatos (PHA's) de manera natural, como un proceso de almacenamiento interno de carbono y energía. Siendo los polihidroxibutirato (PHB) los principales productos encontrados a partir de las vías para la biosíntesis PHA de manera natural, estos son obtenidos principalmente bajo condiciones de limitación de nutrientes. El primer registro de estudios realizados en cianobacterias relacionados con la síntesis de PHB fue con la especie de *Chlorogloeafritschii* sp. en 1966 (Balaji, 2013), siendo el punto clave para comenzar a estudiar a estos microorganismos. Varias especies de cianobacterias filamentosas acumulan cantidades considerables de PHB de forma natural: *Spirulina platensis* (6% con base en peso seco (w/w)), *Oscillatoria limnosa* (6% w/w), *Nostoc muscorum* (8.5% w/w), mientras que entre las cianobacterias unicelulares destaca *Synechocystis* sp. PCC 6803 (4.3% w/w) en medio BG11 (Bhati et al., 2010; López, 2010; Singh y Mallick, 2017). La especie *Synechococcus* MA19 produce hasta 27% w/w de PHB, sin embargo, su crecimiento es a 50°C dificultando su cultivo (Panda y Mallick., 2006).

En general en cianobacterias, la vía de síntesis de PHB a partir de acetil coenzima A (acetil CoA) se lleva a cabo por el operón *phaA phaB phaE/C*, donde cada gen codifica para una de las tres enzimas de la ruta. Existen 4 clases de sintasas con base en su composición: clase I y II de una sola subunidad, como es el caso de *phaC*, clase III y IV de dos subunidades como en *phaE/C* o *phaC/par*, respectivamente (Teh et al., 2018). Las subunidades más estudiadas son I y II, ya que a partir de ellas se ha caracterizado la longitud de la cadena polimérica que sintetizan.

La clase I sintetizan cadenas cortas de 3 a 5 carbonos (SCL-PHA's por sus siglas en inglés, short-chain length) y la clase II cadenas de longitud media de 6 a 14 carbonos (MCL-PHA's, medium-chain length) (Martínez-Gutiérrez et al., 2018). También se pueden encontrar cadenas largas de más de 15 carbonos, conocidas como LCL-PHA's e incluso cadenas mixtas, sintetizadas por subunidades como III y IV (González et al., 2013).

Dentro de las clasificaciones antes mencionadas, a diferencia de las bacterias, solo ciertas cianobacterias pueden acumular naturalmente los PHA's del tipo SCL. Estos biopolímeros pueden ser biodegradados en ambientes de aguas dulces como marinas, suelos e incluso en el cuerpo humano (Pérez-Rivero et al., 2019). Debido a esto es que nace el interés de la obtención de este biopolímero que puede ser aprovechado de gran manera por la industria biotecnológica y biomédica.

1.1.3 Vías del metabolismo central

Las cianobacterias cuentan con dos fuentes de suministro energético: fotosíntesis oxigénica y respiración simultánea con el ciclo de Krebs o TCA (Xiong et al., 2017). Algunas cianobacterias pueden ajustar su metabolismo de un modo heterotrófico a uno fotoautotrófico o fotomixotrófico e incluso a fotoheterótrofas, lo que resulta una ventaja para su crecimiento en condiciones ambientales variables (Zhou et al., 2014).

La biosíntesis de PHB por *Synechocystis* sp. PCC 6803 está dada por la enzima β -cetotiolasa (codificada por el gen *phaA*) quien condensa dos moléculas de acetyl-CoA en una molécula de acetoacetyl-CoA. Posteriormente la enzima acetoacetyl reductasa (*phaB*) dependiente de NADPH, sintetiza D-3 hidroxibutiril CoA a partir de acetoacetyl-CoA. Por último, la enzima PHB sintasa, un heterodímero clase III codificada por los genes *phaC phaE*, cataliza el enlace de D-3-hidroxibutirilo dando como producto al poli- β -hidroxibutirato o PHB (Balaji et al., 2013) (Figura 4). Para que se produzca este biopolímero debe haber un flujo de carbono desde el exterior de la célula hasta las vías metabólicas.

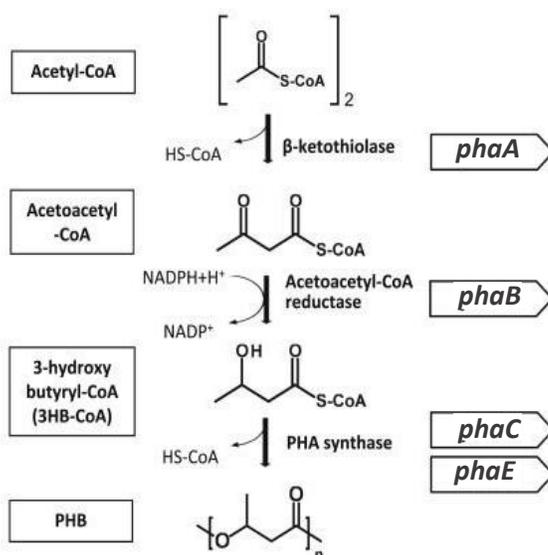


Figura 4 Vía de la biosíntesis de PHB (Tomada de Hondo et al., 2015; con modificaciones)

El metabolismo central de *Synechocystis* sp. PCC 6803 comprende el ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB), las vías glicolíticas: Embden Meyerhoff Parnas (EMP), la vía oxidativa de las pentosas fosfato (OPP), la vía Entner Doudoroff (ED) y la vía de la fosfoacetolasa, además del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA)

(Figura 5) (Zhou et al., 2014; Carpine et al., 2017). Cada una desempeña un papel importante, ya que a partir de ellas se producen diversos precursores que alimentan la red metabólica de las cianobacterias, principalmente el piruvato y acetil Co-A.

Resulta especialmente interesante que en *Synechocystis* sp. PCC 6803 la vía EMP puede metabolizar a la glucosa como una fuente alterna de carbono, catabolizándola en procesos diurnos. Esta fuente es doblemente fosforilada hasta formar bifosfato de fructuosa que da lugar a dos gliceraldehídos trifosfatos (3-GAP) y dihidroxiacetona fosfato, utilizado ampliamente en la producción de ATP, NADH y FDH_2 , independientemente de la fotosíntesis (Kanno et al., 2017). Cabe mencionar que EMP y ED son dos vías que se traslapan en el procesamiento de la glucosa a través de diversas enzimas, diferenciándose en el consumo y producción de ATP por cada vía. La glucosa por ED es fosforilada una vez convirtiéndose en 6-fosfogluconato y 2-ceto-3-desoxi-6-fosfo-gluconato (KDPG) quien es catabolizado a 3-GAP para posteriormente generar dos moléculas de ATP y dos piruvatos, mientras que en EMP la glucosa es doblemente fosforilada formando dos 3-GAP de donde son obtenidas cuatro moléculas de ATP y dos piruvatos. Sin embargo, al contrarrestar el consumo, la producción de ATP queda: ED con una molécula y EMP con dos ATP (Stettner y Segrè, 2013).

Por otro lado, OPP redirige el 6-fosfogluconato hacia las pentosas fosfatos aprovechado por la enzima ribulosa-5-fosfato quien juega un papel importante en la fijación del carbono, además que a partir de ella también se obtiene un 3-GAP (Chen et al., 2016). Por último, la intervención de la vía de fosfocetolasa cataboliza a partir de xilulosa-5-fosfato uno de los precursores de acetil-coA: acetilfosfato (Xiong et al., 2017).

Anteriormente se creía que el ciclo TCA en *Synechocystis* sp. PCC 6803 estaba incompleto. A partir de la secuenciación de su genoma, se demostró que presentan derivados de 2-oxoglutarato descarboxilasa (OGDC), de ácido g-aminobutírico (GABA) y de glioxilato, formando una alternativa que suple la descarboxilación que comúnmente encontramos en el TCA, otorgando una versatilidad a las cianobacterias (Singh y Mallick, 2017).

El principal flujo de carbono para la síntesis de PHB basado en la fijación de CO_2 en presencia de luz está dado en el ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB) mediante la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCo), dando lugar a dos moléculas de 3-GAP por reacción de carboxilación (Zhou et al., 2017; Zhang et al., 2018). El 3-GAP se cataboliza en la vía glucolítica para obtener piruvato como producto final. Así mismo, el piruvato es el intermediario metabólico ampliamente utilizado para la

síntesis de compuestos químicos producidos en la célula, muchos de ellos de interés biotecnológico como el PHB (Angermayer et al., 2015).

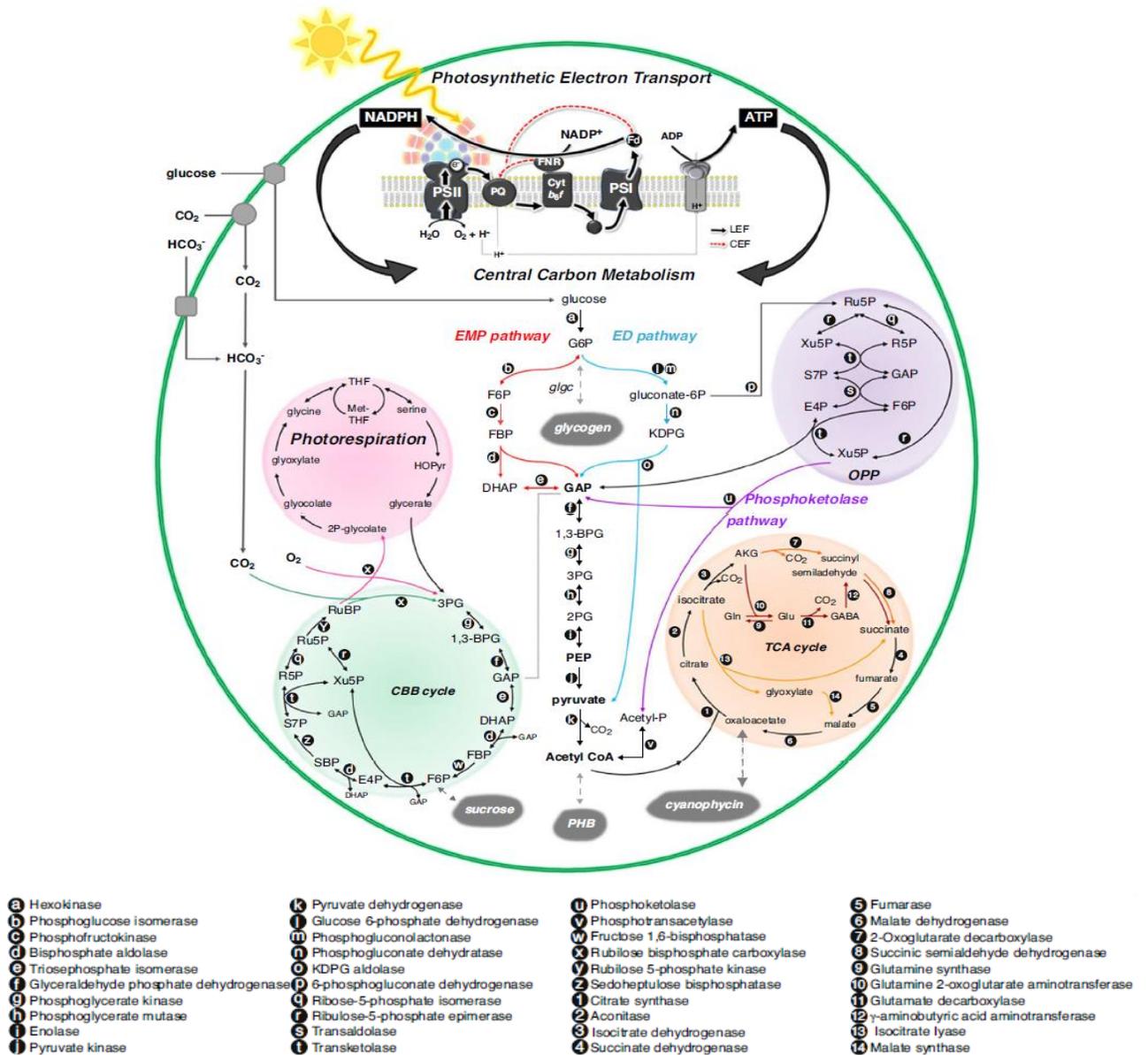


Figura 5 Rutas de metabolismo central de carbono de la cepa *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Tomada de Xiong et al., 2017; con modificaciones).

1.1.4 Estrategias de sobreproducción de PHB en *Synechocystis* sp. PCC 6803, como organismo modelo

Como se mencionó anteriormente, la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 puede crecer de manera exitosa utilizando glucosa como fuente de carbono. Esto le permite adaptarse al medio en el que se encuentra y utilizar las rutas adecuadas para asegurar su subsistencia, obtener precursores a partir de una vía para alimentar a otra y seguir con los diversos procesos metabólicos (Chen et al., 2016).

Al contar con su genoma secuenciado, es posible implementar herramientas biotecnológicas como el análisis molecular para la identificación de regiones específicas, modificaciones genéticas en el metabolismo, entre otras, esto con el fin de mejorar la obtención del biopolímero PHB.

Se ha observado que al someter a *Synechocystis* sp. PCC 6803 a un estrés por deficiencia de nutrientes se incrementan los niveles de PHB encontrados intracelularmente (Panda et al., 2006; Namakoshi et al., 2016). Diferentes autores (Wu et al., 2001; Panda y Mallick, 2006; Bhati et al., 2010; Zhang et al., 2018), han demostrado que esta cepa en condiciones fotoautotróficas puede producir cantidades significativas de PHB de hasta un 26% de PHB (w/w), por limitación de nitrógeno. Así mismo, se ha documentado que, la adición de acetato al medio de cultivo en ausencia de nitrógeno incrementa los niveles de PHB hasta un 44-48% (w/w), ya sea por medio fotoautotrófico, fotomixotrófico o mixotrófico (Figura 6) (Dutt y Srivastava, 2018). Debido a esto, se han desarrollado fotobiorreactores con *Synechocystis* sp. PCC 6803 en diferentes medios y con variaciones de la concentración de nitrógeno y fosfatos, para lograr obtener hasta un 20% más de PHB final (Carpine et al., 2018).

Experimentos realizados en el laboratorio de Biología Celular y Molecular del Departamento de Biotecnología Marina del CICESE para evaluar la producción de PHB en *Synechocystis* sp. PCC 6803, utilizando medio BG11 con limitación de nitrógeno (N-), ya sea solo o en combinación con fuentes de carbono exógeno como glucosa (Glc+) y acetato (Ac+), mostraron que la condición BG11 N- Glc+ promovió un mayor contenido de PHB con 11.02 ± 1.14 % de PHB (w/w) así como en BG11 Glc+ con 10.34 ± 0.65 % de PHB (w/w) (Villagómez, 2017).

A pesar de que existen especies productoras de polihidroxibutiratos que ya han sido descritas y caracterizadas incluyendo a *Synechocystis* sp. PCC 6803, continúan existiendo importantes desafíos entre ellos el aislamiento de nuevas especies que puedan producir PHA's de forma natural (Lane et al., 2015), la selección de organismos hospederos que puedan expresar genes involucrados en la síntesis de PHA, la

producción y regulación de la composición de los polímeros y copolímeros a través de la utilización de cultivos con diferentes sustratos, mejoramiento de propiedades fisicoquímicas, entre otros (Singh et al., 2015).

Previamente en el laboratorio de Biología Celular y Molecular del CICESE, la Bioing. Isela Vidriales Saucedo, estudiante de servicio social, realizó la bioprospección en la colección de cianobacterias para encontrar posibles cepas productoras de PHB. A partir de la amplificación por PCR del gen *phaC* que codifica para una de las subunidades de la PHA sintasa (Lane et al., 2015). El análisis de dicha secuencia permitió corroborar la presencia del gen *phaC* en la cepa B6B, lo que sugirió que se trataba de una cianobacteria productora natural de PHB.

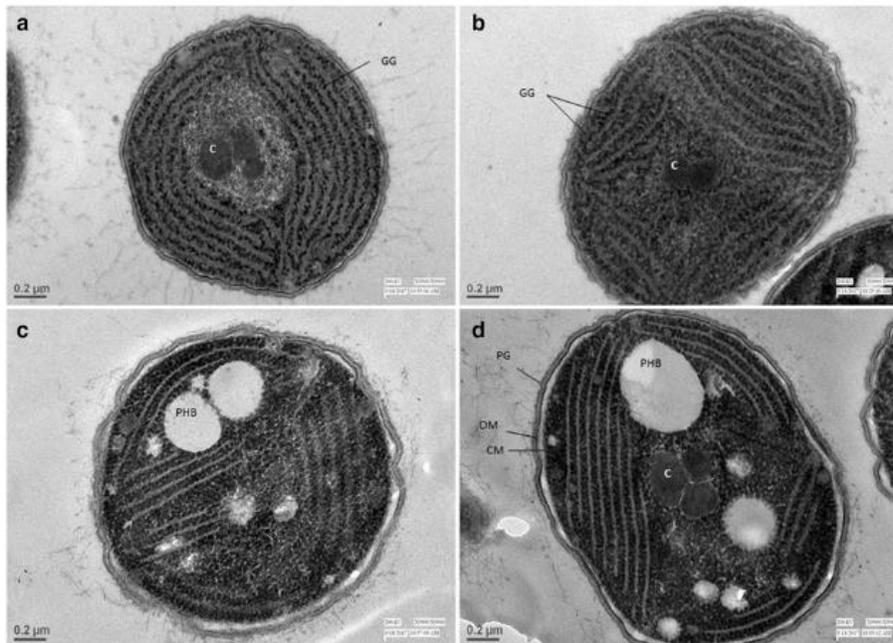


Figura 6 Microscopia electrónica sobre el efecto de privación de nitrógeno en el medio, en la cepa *Synechocystis* sp. PCC 6803. (a) Fase estacionaria temprana después del crecimiento previo en estado fotoautotrófico. (b) Fotomixotrófico. (c) Células fotoautotróficas previamente cultivadas después de 9 días de inanición con nitrógeno y suplementación con acetato. (d) Células mixotróficamente previamente cultivadas en 9 días de limitación con nitrógeno y suplementación con acetato (Tomada de Dutt y Srivastava, 2018).

1.2 Justificación

Debido al alto impacto ecológico que han provocado los productos plásticos provenientes de fuentes fósiles, es necesario desarrollar/investigar materiales que puedan sustituirlos. El polihidroxi-butirato (PHB),

es un polímero amable con el medio ambiente ya que es 100% biodegradable además posee características homólogas al plástico polipropileno, quien es ampliamente utilizado por la industria.

Dentro de los microorganismos capaces de producir PHB de forma natural se encuentran las cianobacterias, las cuales se destacan por su capacidad de utilizar el carbono atmosférico como fuente de carbono y la luz como fuente de energía (fotoautotróficas). Así mismo, gracias a su flexibilidad metabólica puede tener un crecimiento fotoheterotrófico o fotomixotrófico.

Entre las cianobacterias productoras naturales de PHB se encuentra la cepa modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803, la cual cuenta con genoma secuenciado y la descripción de la vía de síntesis de PHB caracterizada. Sin embargo, debido a las restricciones de uso que representan las cepas modelo, es importante contar con nuevas cepas de la región de Baja California con capacidades bioproductoras, mayor flexibilidad metabólica, así como variaciones en estructuras de PHB que permitan obtener propiedades mecánicas favorables e incluso la obtención de candidatos ideales a modificaciones genéticas en vías metabólicas.

En este sentido, en el presente proyecto se planteó llevar a cabo el crecimiento y caracterización de la cianobacteria B6B la cual pertenece a la colección de cianobacterias del laboratorio Biología Celular y Molecular del CICESE. Su crecimiento en diferentes medios de cultivo permitirá tener un mayor conocimiento sobre las condiciones que promuevan la producción del biopolímero y compararlas con las de la cepa modelo. Así mismo, el análisis de secuencias de las regiones ribosomales 16S y espaciadora intergénica (ITS), mediante métodos bioinformáticos, resultará de gran importancia para identificar e iniciar la clasificación de la cepa B6B.

1.3 Hipótesis

El cultivo de la cianobacteria B6B en condiciones de limitación de nutrientes y adición de fuentes de carbono promoverá la biosíntesis del biopolímero polihidroxibutirato (PHB).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Llevar a cabo la caracterización molecular de la cianobacteria unicelular B6B y su crecimiento en diferentes medios de cultivo que promuevan la producción del biopolímero poli- β -hidroxibutirato.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Analizar mediante herramientas bioinformáticas las secuencias 16S rRNA e ITS de la cepa B6B como base para la discriminación molecular entre especies del género *Synechocystis*.
2. Evaluar la dinámica de crecimiento de las cepas *Synechocystis* sp. PCC 6803 y B6B mediante el conteo de células y densidad óptica.
3. Evaluar el efecto de la limitación de nutrientes, y adición de fuentes de carbono alternativas en el crecimiento y producción de PHB.

Capítulo 2. Metodología

Análisis molecular, bioinformático y de cultivo de la cianobacteria B6B

1

- ✓ **Análisis molecular y bioinformático**
 - a. Extracción DNA cromosomal de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y B6B
 - b. PCR punto final para la amplificación de regiones 16S e ITS
 - c. RFLP de regiones intergénicas amplificadas de PCC 6803 y B6B
 - d. Análisis de secuencias ribosomales
 - e. Análisis filogenéticos

Efectos de la limitación de nutrientes en el crecimiento y la producción de PHB en cianobacterias *Synechocystis*

2

- ✓ **Dinámica de crecimiento en cianobacterias B6B y PCC 6803**
 - a. Curvas de crecimiento
 - b. Conteo celular y parámetros de crecimiento
- ✓ **Crecimiento y obtención de PHB en las cepas B6B y PCC 6803**
 - a. Obtención de PHB por mixotrofia en B6B
 - b. Determinación de Peso Seco
 - c. Extracción y cuantificación de PHB
- ✓ **Análisis estadístico**

Figura 7 Diagrama experimental del trabajo de tesis.

2.1 Organismos y condiciones de cultivo

Como control de los ensayos moleculares y de producción se utilizó a cepa *Synechocystis* sp. PCC 6803 que pertenece a la colección de cianobacterias del Laboratorio de Biología Celular y Molecular del CICESE, la cual fue obtenida de la colección de cepas de la ATCC (American Type Culture Collection). Así mismo se utilizó la cepa "B6B" de la colección de cianobacterias, no identificada ni anotada en ninguna base de

datos; previamente aislada de una muestra de agua del Valle de los Cirios en Baja California por M.C Eulogio López del Departamento de Biología de la Conservación.

Para el mantenimiento de ambas cepas se utilizó el medio BG11 (Anexo 1). Las condiciones de luz y temperatura fueron provistas por lámparas de luz blanca de 40W Philips F40T12/DX, a 100 μmol fotones/ m^2/s y a una temperatura de $29.5 \pm 2^\circ\text{C}$.

La observación de la forma y el tipo de división celular que presentaban las cepas B6B y *Synechocystis* sp. PCC 6803 se realizó en el microscopio óptico Primo Star Zeiss.

Para la obtención de colonias aisladas, se realizaron múltiples sembrados de la cepa B6B en medio BG11 sólido (Anexo 1). A partir de medio de cultivo preexistente, se centrifugó 1 ml a 8000 rpm por 10 min en una centrifuga 5804 R Eppendorf y se descartó el medio de cultivo. Con un asa estéril se tomaron células y se sembraron por estría en una caja de Petri (90mmx15mm) con 25 ml de medio BG11 sólido. Las colonias aisladas se resuspendieron en medio líquido y se escalaron a 200 ml de medio BG11 con esferas de vidrio de 4 mm (4 ml) para la obtención de biomasa.

2.2 Análisis moleculares y bioinformáticos

2.2.1 Extracción de DNA cromosomal de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y B6B

Con el objetivo de identificar el género de la cepa B6B se analizaron las secuencias ribosomales. Para ello se realizó la extracción de DNA cromosomal de *Synechocystis* sp. PCC 6803 de la ATCC (de ahora en adelante "PCC 6803") y de la cepa B6B de acuerdo al protocolo de Singh et al. (2011) con modificaciones. Se tomaron 20 ml de medio de cultivo y se centrifugaron a 8520 rpm por 3 min descartando el sobrenadante. El paquete celular obtenido se resuspendió en 1 ml de agua desionizada estéril y se transfirió a un tubo de 2.0 ml, el cual se centrifugó nuevamente para obtener un pellet de aproximadamente 100 μl . A este tubo se le adicionaron 400 μl de buffer de lisis (Urea 4 M; Tris-HCl 0.2 M, pH 7.4; NaCl 20 mM y EDTA 0.2 M) y 50 μl de proteinasa K (20 mg/ml), se mezcló por pipeteo y se incubó a 55°C por 1 h, agitando cada 10 min. Posteriormente se adicionó 1 ml de buffer de extracción (CTAB 3%; NaCl 1.4 M; EDTA 20 mM; Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0; Sarkosil 1% y mercaptoetanol 1%) precalentado a 55°C , se mezcló e incubó a 55°C por 1 h, mezclando cada 10 min. La mezcla obtenida se colocó en 2 tubos de 2.0

ml para proseguir la extracción. A cada tubo se le adicionaron 2 volúmenes de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezclaron por inversión y se centrifugaron por 5 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo de 1.5 ml y se lavó con 2 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de acetato de sodio 3M (pH 5.2). Posteriormente se incubó a -20°C por 1 h y se centrifugó por 10 min. Por último, el DNA fue lavado con 1 ml de etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente. El DNA cromosomal fue resuspendido en 50 µl de agua desionizada estéril y fue almacenado a -20°C.

El DNA extraído se cuantificó en Nanodrop 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific, y se evaluó mediante una electroforesis (80V) en un gel de agarosa al 0.8%, visualizado mediante el fotodocumentador ChemiDOC™ MP Imaging System BIORAD.

2.2.2 PCR punto final para amplificación de región 16S ribosomal y región espaciadora ribosomal intergénica (ITS).

Para amplificación de los genes por PCR, en la región conservada 16S ribosomal se utilizaron los oligonucleótidos sentido (CYA106F): 5' CGG ACG GGT GAG TAA CGG TGA 3' y el antisentido (CYA781Ra): 5' GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T 3', mencionados en Nübel et al. (1997) (Figura 8). Para identificación de la región espaciador ribosomal intergénica en las cianobacterias PCC 6803 y B6B se amplificó por PCR a partir de los oligonucleótidos sentido (ciano16SfinFor): 5' CTGGGGTGAAGTCGTAACAAG 3' y el antisentido (RNA23S-ciano): 5' GATACCTAGGCACACAGAGC 3'.

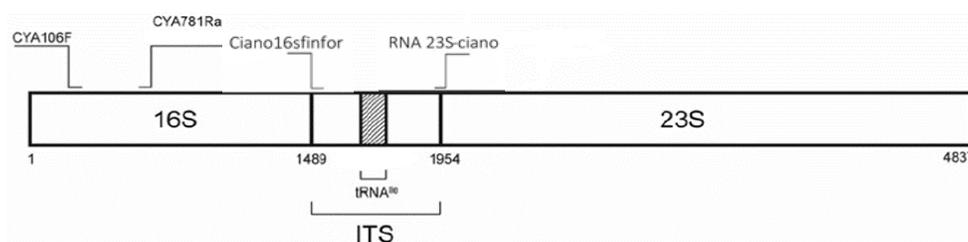


Figura 8 Representación gráfica de la posición de los cebadores de la región 16S e ITS. (Tomada de Juteršek et al., 2017)

Para la reacción de PCR se emplearon 4 µl de Green GoTaq Flexi Buffer [5x], 2.4 µl de MgCl₂ [25mM], 0.5 µl de dNTP's [10 mM], 1 µl de oligonucleótido sentido [10 µM], 1 µl de oligonucleótido antisentido [10

μM] y 0.1 μl de GoTaq Polimerasa [5u/ μl] de PROMEGA y 1 μl DNA (10 ng/ μl) para un volumen total de 20 μl . Como control positivo se utilizó una muestra previa de DNA cromosomal de PCC 6803 y como control negativo se utilizó agua desionizada estéril.

El programa utilizado para la amplificación por PCR fue: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 60°C por 30 s y extensión a 72°C por 1 min y un ciclo de extensión final a 72°C por 7 min. El ensayo de PCR se realizó en un termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Los productos de las reacciones de amplificación fueron analizados en una electroforesis en gel de agarosa (1.2%) con TBE 1x, utilizando volúmenes de 2 μl de producto, 3 μl de agua desionizada y 2 μl de buffer de carga Gel Red (6x), como marcador de peso molecular se utilizó 5 μl de Hyper Ladder 100 pb de BioLine.

La extracción y precipitación del DNA se realizó siguiendo el protocolo descrito por Sambrook y Russell (2006). La metodología consistió en aforar los tubos con los productos de PCR (20 μl) a 100 μl con agua desionizada estéril, adicionando 100 μl de fenol Sigma (pH 7.9) y mezclando por inversión. Posteriormente, se adicionaron 100 μl de cloroformo ACS y se dio vortex. La mezcla se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min, se removió la fase acuosa y se colocó en un tubo nuevo estéril.

Para la precipitación de ADN se agregaron 1/25 de NaCl 5M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto agitando por inversión. Se dejó incubar a -20°C por 30 min, después se centrifugó a 13000 rpm por 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Finalmente, el DNA obtenido fue lavado con 3 volúmenes de etanol al 70%. Los tubos fueron centrifugados y el sobrenadante fue descartado. La muestra de DNA se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente se resuspendió en 30 μl de agua desionizada estéril y fue cuantificado utilizando el equipo Nanodrop.

Para realizar la caracterización molecular de la cepa B6B a partir de PCC 6803, los productos de PCR previamente mencionados de las regiones 16S e ITS fueron enviados a secuenciar a la compañía Retrogen (San Diego, CA) y las secuencias obtenidas fueron analizadas.

2.2.3 RFLP de regiones intergénicas amplificadas de PCC 6803 y B6B

Los productos de PCR correspondientes a la región ITS purificados previamente, fueron digeridos con las enzimas de restricción *HhaI* (New England BioLabs), *HpyF3I* o *DdeI* (Invitrogen) y *AluI* (Sigma-Aldrich) a 37 °C por 12 h de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se empleó un volumen de reacción de 20 µl con 200 ng de DNA de cada cianobacteria. Los productos digeridos fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa 1.2% en TBE 1x y teñidos con Gel Red. Los geles fueron fotodocumentados para el análisis de fragmentos generados.

Una vez que se obtuvieron las secuencias de los productos de PCR correspondientes al ITS de aproximadamente 540 pb, de ambas cepas se llevó a cabo una digestión *in-silico* utilizando el programa NEB Cutter V2.0 de New England BioLabs (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>).

2.2.4 Análisis de secuencias ribosomales

A partir de las regiones ribosomales obtenidas de la secuenciación, se realizó el análisis bioinformático utilizando como punto de referencia la cepa PCC 6803. Se realizaron alineamientos en la base de datos de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y EMBL (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>) para confirmar el porcentaje de identidad entre las secuencias, los alineamientos múltiples se realizaron utilizando MultiAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Para identificar las regiones que codifican para tRNA dentro del ITS, se utilizó el software tRNAscan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>).

2.2.5 Análisis filogenéticos

El análisis de la filogenia del género *Synechocystis* se llevó a cabo utilizando las regiones 16S e ITS de la cianobacteria B6B, y de la cepa modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803 de la ATCC. Para ello se elaboró una búsqueda bibliográfica que nos permitió conocer los diferentes clados formados entre las cianobacterias y se logró ubicar los números de identificadores (ID) de GenBank de cada una (Iteman et al., 2000; Juhling et al., 2008; Korelusová et al., 2009; Komárek et al., 2014; Juteršek et al., 2017). El alineamiento de las secuencias se elaboró utilizando el software Mega X mediante el algoritmo de Clustal W, eliminando previamente sitios hipervariables.

Para la elaboración de árboles filogenéticos se utilizaron los métodos de Mínimas Distancias/Evolución (Neighbor Joining) y Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood), mientras que los modelos fueron Tiempo General Reversible (GTR, por sus siglas en inglés: Generalized time reversible) con distribución gamma con sitios invariantes categoría 2 para la región 16S y para la región ITS fue a través del modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) con distribución gamma discreta categoría 2. En ambos árboles el valor de soporte se calculó en 500 réplicas buscando fiabilidad y robustez.

Los árboles se enraizaron con la secuencia de las cepas cepa *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 y *Gloeobacter violaceus* PCC 8105 para la región 16S, mientras que para ITS fue utilizando la cepa *Gloeobacter violaceus* PCC 7421.

2.3 Dinámica de crecimiento en cianobacterias B6B y PCC 6803

2.3.1 Curvas de crecimiento

Los inóculos para las curvas de crecimiento de las cepas B6B y PCC 6803 se obtuvieron a partir de 23 ml de un pre-cultivo de colonias axénicas crecidas hasta la fase exponencial tardía en medio BG11, a una densidad óptica (730 nm) (de ahora en adelante "DO₇₃₀") de 0.9. Estos cultivos sirvieron como inóculo para los análisis de crecimiento. Para la elaboración de las curvas de crecimiento se realizaron cultivos en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 200 ml de medio de cultivo, por triplicado. El ensayo inició con una DO₇₃₀ de 0.19. Las condiciones del cultivo fueron en fotoperiodo (14 h luz y 10 h oscuridad) bajo las condiciones de intensidad de luz y temperatura, mencionadas previamente. La agitación de los matraces se realizó de manera manual cada 2 días por un total de 30 días, con la ayuda de esferas de vidrio de 2 mm (3ml).

La biomasa fue evaluada cada tercer día, tomando 1 ml de muestra y cuantificando su DO en el espectrofotómetro Spectronic 200 a 730 nm, así como por conteo directo de células fijadas con Lugol al 5% a partir de 1 ml de cultivo.

2.3.2 Conteo celular y parámetros de crecimiento

El conteo celular se realizó utilizando una cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad y un microscopio óptico Promo Star (Zeiss) de acuerdo a lo sugerido por Arredondo-Vega y Voltolina (2007).

La velocidad específica de crecimiento o tasa de crecimiento (μ_e) fue calculada con la ecuación de Guillard (1973):

$$\mu_e = \frac{\text{Ln } X_t - \text{Ln } X_0}{t_t - t_0} \quad (1)$$

donde X_0 es la concentración celular inicial, X_t es la concentración celular después de t días y Ln indica el logaritmo natural (base e).

Sin embargo, se utilizó logaritmo base 2 para el cálculo de la tasa de crecimiento como se sugiere para cultivos algales (Stein et al., 1973), donde μ es la división celular por día, es importante utilizar la relación entre logaritmo natural y base 2 con respecto a "e" (constante de Euler); 0.6931 para Log 2 y 2.3026 1/Log e, entonces:

$$\mu \left(\frac{\text{div}}{\text{día}} \right) = \frac{\mu_e}{(\text{Log } 2)} = \frac{2.3026}{0.6931} = 3.322 \quad (2)$$

Por lo tanto, los cálculos obtenidos de μ_e se multiplican por 3.322. Mientras que para el cálculo de la tasa de duplicación es $1/\mu$.

2.4 Crecimiento y obtención de PHB en las cepas B6B y PCC 6803.

Con el objetivo de confirmar la producción de PHB por la cepa B6B y comparar su producción con la cepa control PCC 6803, se realizaron cultivos en matraces Fernbach de 2800 ml con 2090 ml de medio de cultivo y 14 ml de esferas de vidrio de 4 mm, para auxiliar en la agitación de los cultivos. Se utilizaron las condiciones de intensidad de luz y temperatura, mencionadas previamente.

Para obtener el inóculo de los cultivos se tomó 1 ml de cultivo preexistente en medio BG11 de las cepas B6B y PCC 6803 y se midió su DO_{730} . A partir de ello, se elaboraron los cálculos para determinar el volumen necesario de biomasa para comenzar los cultivos de ambas cepas con un inóculo de DO_{730} 0.18.

Los muestreos se realizaron los días 0, 5, 10 y 15 hasta llegar a una $DO_{730} \sim 1.0$. Para la determinación de la biomasa se tomaron 1 ml del medio de cultivo midiendo su DO_{730} , 10 ml para los análisis de peso seco y 10 ml para la extracción de PHB, todos los muestreos se hicieron por triplicado.

2.4.1 Obtención de PHB por mixotrofia en B6B

Para evaluar el efecto de diferentes medios de cultivo en la biosíntesis de PHB de la cepa B6B, se seleccionaron 6 condiciones diferentes (Tabla 1), tomando como base lo indicado por Panda et al. (2006) (Tabla 1). Estas condiciones incluyeron limitación de nutrientes, así como suplemento de fuentes de carbono.

Tabla 1 Condiciones de cultivo a utilizar

Condición	Descripción
BG11	BG11 estándar
BG11 A+	BG11 suplementado con 0.4% de acetato de sodio
BG11 G+	BG11 suplementado con 0.4% de glucosa anhidra
BG11 N-	BG11 deficiente en nitratos
BG11 N- A+	BG11 deficiente en nitratos y suplementado con acetato de sodio
BG11 N- G+	BG11 deficiente en nitratos y suplementado con glucosa anhidra

Para la deficiencia de nitrógeno (N-) se sustituyó nitrato de sodio $NaNO_3$ del medio de cultivo por citrato férrico $Fe(C_6H_5O_7)$, mientras que el nitrato de cobalto $Co(NO_3)_2$ fue sustituido por cloruro de cobalto $CoCl_2$. Para las condiciones de crecimiento fotoheterótrofo se adicionaron glucosa anhidra ($C_6H_{12}O_6$) o acetato de sodio ($NaC_2H_3O_2$) al 0.4%.

Para el ensayo se realizó un pre-cultivo para obtener el inóculo el cual consistió en 3 matraces Fernbach de 2800 ml con 2090 ml de medio BG11 y DO_{730} inicial de 0.18, finalizando con una DO_{730} de 1.17. Posteriormente el cultivo fue centrifugado a 8000 rpm por 15 min descartando el medio. Los pellets fueron

lavados en 50 ml del medio correspondiente y utilizados para inocular los matraces Erlenmeyer de 250 ml con 200 ml de medio de las diferentes condiciones mencionadas en la Tabla 1 a una DO_{730} de ~ 1.0 .

Las condiciones de luz (fotoperiodo), temperatura y agitación antes mencionadas fueron empleadas para este experimento. Los muestreos se realizaron los días 0, 5, 10, 15 y 20 para la cepa B6B, con el fin de evaluar los cambios en la producción de biomasa y PHB. Mientras que para la cianobacteria PCC 6803 fueron los días 0, 5 y 15, que de acuerdo a datos previamente obtenidos en experimentación con la cepa modelo bajo las condiciones antes mencionadas, los días seleccionados fueron en donde la cepa PCC 6803 mostró resultados sobresalientes en la producción de PHB, los cuales pueden ser utilizados como punto de comparación con respecto a la cepa B6B.

Para la determinación de la densidad celular se tomó 1 ml del medio de cultivo midiendo su DO_{730} . Para ensayo de peso seco y extracción de PHB fue necesario tomar 10 ml, respectivamente. Los ensayos se realizaron por triplicado.

2.4.2 Determinación de Peso Seco

Para la obtención del peso seco se siguió la metodología de Arredondo-Vega y Voltolina (2007). Los 10 ml de cultivos fueron filtrados utilizando filtros de microfibras de vidrio Whatman (696 VWR) de 1 μm de poro. Previamente, los filtros fueron lavados con agua destilada e incinerados a 500°C por 5 h en una mufla Eurotherm Thermolyne, y pesados en una balanza analítica GR-202 (A&D) (PSF; peso seco filtro).

Los filtros con las muestras de biomasa fueron lavados con 10 ml de agua destilada y secados a 70°C en un horno Oven Series 9000 (Thermolyne). Posteriormente fueron colocados en un desecador por 1.5 h y pesados en una balanza analítica para la obtención del peso seco total (PST). El filtro con la muestra se incineró en la mufla a 500°C por 5 h y transcurrido este tiempo fueron puestas en el desecador por 1.5 h antes de ser pesados y obtener el peso cenizas (PC). El peso seco orgánico (PSO) fue calculado a partir de la diferencia de pesos: peso seco total y el peso de cenizas, como se muestra en las siguientes ecuaciones:

$$PST \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = \frac{[(PSFM) - PSF]}{VF} \quad (3)$$

$$PC \left(\frac{\mu g}{ml} \right) = \frac{PCFM - PSF}{VF} \quad (4)$$

$$PSO \left(\frac{\mu g}{ml} \right) = PST - PSI \quad (5)$$

Donde PSFM es el peso seco del filtro con muestra, PSF es el peso seco del filtro sin muestra y PCFM es el peso de las cenizas del filtro con la muestra y PC es el peso seco de las cenizas de la muestra sin el filtro.

Cabe señalar que para la normalización del contenido de PHB, se utilizaron los datos de PST ya que, al incinerar las muestras para PC el peso disminuyó significativamente.

2.4.3 Extracción y cuantificación de PHB

Para la extracción de PHB se siguió la metodología reportada por Troschl et al. (2018) con modificaciones, en donde se requirió tomar 10 ml de cultivo celular para la obtención del pellet. El cultivo fue centrifugado a 8000 rpm por 5 min y el sobrenadante fue descartado. La biomasa obtenida fue lavada con agua desionizada y secada a 80°C en un horno Oven Series 9000 (Thermolyne) por 48 h. Posteriormente, la biomasa se trató con hipoclorito de sodio al 6% (10 ml por cada gramo de biomasa) y se dejó incubar en hielo por 1 h. El pellet obtenido fue lavado con 10 ml de agua desionizada (2 veces) por 5 min a 8000 rpm, descartando el sobrenadante en cada lavado. Posteriormente, el pellet fue lavado con 5 ml isopropanol por 5 min a 8000 rpm, descartando el sobrenadante. Finalmente, el PHB obtenido fue extraído con 10 ml de cloroformo en baño maría a 50°C durante 12 h en de la campana de extracción. Transcurrido ese tiempo, el cloroformo fue pasado por filtro de papel de 5.5 cm de diámetro (VWR) para eliminar residuos celulares y depositado en una caja de Petri de vidrio para su posterior evaporación, obteniendo de esa manera una película de PHB.

Para la cuantificación de PHB se siguió el método espectrofotométrico de Panda et al. (2006). Se elaboró una curva estándar utilizando una solución de PHB [(R)-3-hydroxybutyric acid]] (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1000 µg/ml en ácido sulfúrico (36 N). La curva se preparó en un rango de concentración de 0.5 a 3.0 µg/ml en intervalos de 0.5 µg/ml. Una vez elaboradas las soluciones se colocaron en baño maría a 100°C por 10 min (Thermostatic Water Bath, Fried Electric) para hidrolizar el PHB y transformarlo

en ácido crotónico (Khetkorn et al., 2016), el cual fue cuantificado a DO de 235 nm utilizando el espectrofotómetro Multiskan GO UV/Vis (Thermo Scientific™). A partir de estos datos se obtuvo una curva estándar y la ecuación de regresión lineal.

El polímero recién extraído de las cepas PCC 6803 y B6B fue sometido a los mismos pasos antes mencionados. Las mediciones de las muestras a DO_{235} fueron interpoladas en la curva estándar y posteriormente el contenido de PHB se normalizó con el peso seco total (PST) correspondiente, para expresarse como % PHB (w/w) de acuerdo a la fórmula:

$$\% \text{ PHB} = \frac{[\text{PHB}]}{\text{PST}} * 100 \quad (6)$$

2.5 Análisis estadístico

Para comparar las diferencias de crecimiento entre la cepa B6B y PCC 6803 en los puntos de muestreos realizados para la construcción de las curvas de crecimiento, se realizó un análisis de varianzas por medio de la Distribución F de Fisher y para determinar si se encuentran diferencias significativas entre las dos cepas se realizó una Prueba t de Student, con un nivel de significancia de 0.05.

Para evaluar la producción de PHB por las cianobacterias B6B y PCC 6803, en distintos tratamientos se realizaron análisis de varianza ANOVA, con un nivel de significancia de 0.05. En los casos en los que se encontraron diferencias significativas, se realizaron pruebas de comparaciones múltiples de Duncan con un nivel de significancia de 0.05. Previamente en todos los casos, se realizó un análisis de normalidad a los datos obtenidos mediante el software Statistica versión 7 (Star Soft Inc.).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Obtención de cultivo monocianobacteriano de la cianobacteria B6B

A partir de la visualización de la cepa B6B al microscopio óptico se observó que es una cianobacteria unicelular circular color verde con división celular por fusión binaria (datos no mostrados), como ocurre con PCC 6803. Por otro lado, se observó que el medio de cultivo de la cepa B6B presentaba contaminación bacteriana. El estriado de la cianobacteria B6B en medio BG11 sólido confirmó la contaminación (Figura 9).



Figura 9 Cepa B6B en medio sólido BG11 con crecimiento bacteriano.

Debido a que continuó observándose crecimiento bacteriano en las células estriadas en medio BG11 con los antibióticos cloranfenicol y kanamicina (Anexo 2), se realizaron estriados consecutivos con asa de siembra forzando la formación de colonias independientes. En la quinta resiembra de la cepa B6B se lograron obtener células libres de bacterias (Figura 11), las cuales se utilizaron para los inóculos en medio líquido para las curvas de crecimiento, así como para la extracción de DNA cromosomal (Figura 10) junto

con la cepa PCC 6803. La cepa B6B libre de bacterias fue criopreservada empleando Dimetilsulfóxido (DMSO).

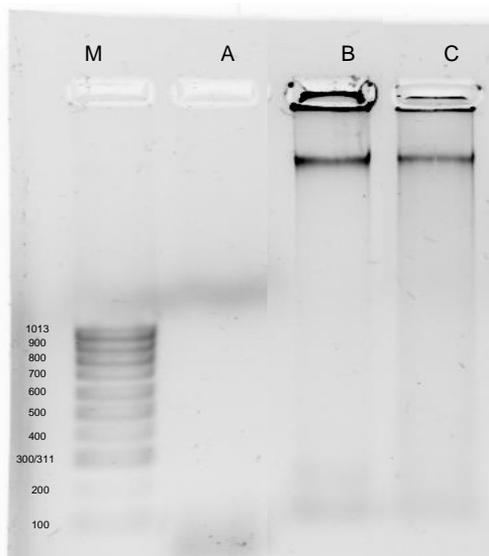


Figura 11 DNA cromosomal de cianobacterias. A: Control negativo. B: B6B. C: PCC 6803. M: Marcador de peso molecular Hyper Ladder 100 pb (BioLine). Tinción de muestras por Gel Red.

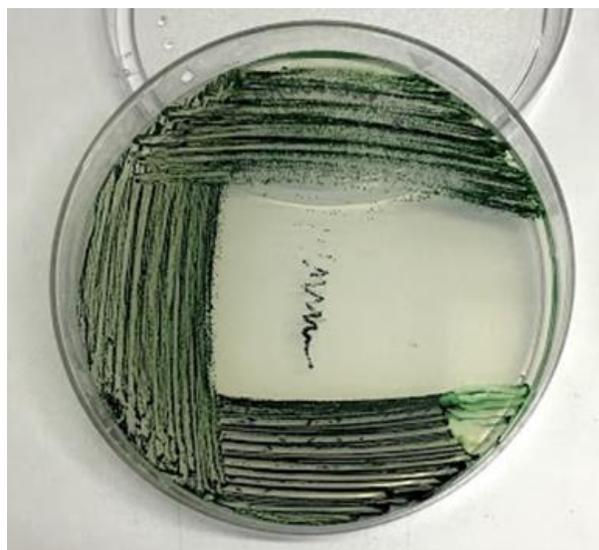


Figura 10 Cultivo monocianobacteriano de la cepa B6B en medio sólido BG11.

3.2 Identificación de la cianobacteria B6B

Como parte de la identificación taxonómica de la cepa B6B, se analizaron las regiones 16S e ITS ribosomales, esta última comprendida entre el 16S y el 23S tomando como referencia a la cepa PCC 6803.

Estudiar la región ITS permite la discriminación especies de cianobacterias en géneros (Juteršek et al., 2017) a través de la diferencia nucleotídica en la región, así como las diferencias en los RNA's de transferencia (RNAt) específicos que codifican. La amplificación de la región ITS utilizando los oligonucleótidos ciano16SfinFor y RNA23S-ciano, produjo fragmentos de DNA de un tamaño aproximado de 540 pb para la cepa B6B y PCC 6803 (Figura 12).

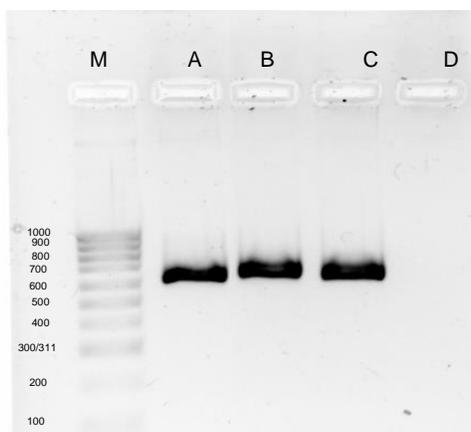


Figura 12 Electroforesis de productos de PCR amplificados por los oligonucleótidos ciano16SFinFor y RNA23S-ciano. M: Escalera HyperLadder 100 pb. A: B6B. B: PCC 6803. C: Control positivo. D: Control negativo. Tinción de muestras por Gel Red.

3.2.1 Análisis por RFLP

El análisis de digestiones enzimáticas *in silico* realizadas a los productos de la secuenciación de los fragmentos ITS de las cepas PCC 6803 y B6B utilizando el programa de NEB Cutter V2.0 mostró que las cepas B6B y PCC 6803 producen un patrón de bandas diferentes con la enzima *AluI*, pero no con las enzimas *HhaI* y *DdeI* (Tabla 2), quienes prácticamente se mostraron iguales.

Tabla 2 Resultado de patrón de bandas por digestión *in silico* de B6B y PCC 6803.

Enzima	B6B – Patrón de bandeos (pb)	PCC 6803 – Patrón de bandeos (pb)
<i>AluI</i>	205, 196, 111, 24 y 5	315, 196, 24 y 5
<i>DdeI</i>	344 y 197	239, 197 y 104
<i>HhaI</i>	328 y 213	327 y 213

Las digestiones realizadas de manera experimental utilizando los productos de PCR y las tres enzimas de restricción corroboraron los análisis *in silico* (Figuras 13 y 14). Aunque la digestión fue parcial con las tres enzimas.

La digestión realizada por la enzima *DdeI* (Figura 14) confirmó que hay diferencias en el contenido de bases entre las cepas B6B y PCC 6803 lo que da lugar a fragmentos de diferentes tamaños. Como se esperaba,

los productos obtenidos con la enzima *HhaI* (Figura 13) mostraron tamaños similares para ambas cepas, por lo que esta enzima no puede emplearse para diferenciar entre ambas cepas. Si bien la digestión con la enzima *AluI* fue parcial, la electroforesis no evidenció todas las bandas esperadas en la digestión *in silico*, si se observó una diferencia en el patrón de digestión entre ambas cepas (Figura 14).

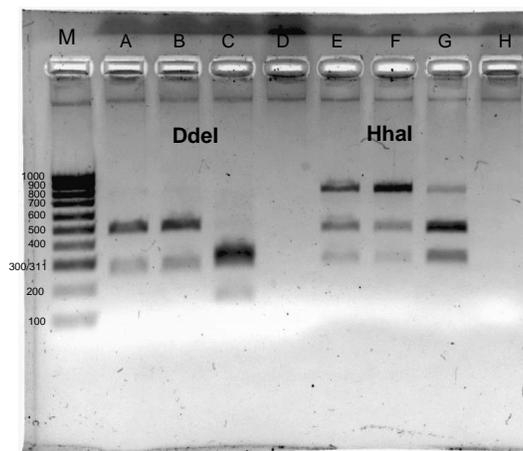


Figura 13 Electroforesis de digestión enzimática de *DdeI* y *HhaI*. M: Escalera Hyper Ladder 100 pb. A: DNA B6B digerido con *DdeI*. B: DNA cianobacteria no utilizada en este trabajo de investigación. C: DNA PCC 6803 con *DdeI*. D: Control negativo. E: DNA B6B digerido con *HhaI*. F: DNA cianobacteria no utilizada en este trabajo de investigación. G: DNA de PCC 6803 digerido con *HhaI*. H: Control negativo. Tinción de muestras con Gel Red.

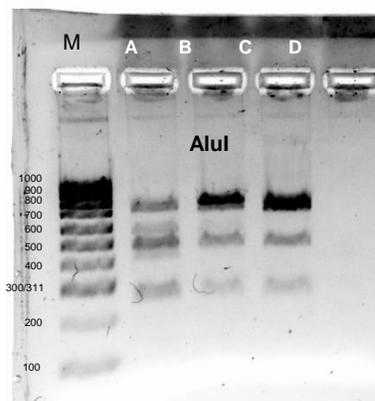


Figura 14 Electroforesis de digestión enzimática de *AluI*. M: Escalera HyperLadder 100 pb. A: DNA de B6B digerido con *AluI*. B: DNA de cianobacteria no utilizada en este trabajo de investigación. C: DNA de PCC 6803 digerido con *AluI*. D: Control negativo. Tinción de muestras con Gel Red.

Estos resultados mostraron que, aunque entre las cepas PCC 6803 y B6B muestran aparentemente una morfología semejante y comparten una longitud similar en su región ITS, podrían ser fácilmente diferenciadas mediante un ensayo de RFLP de la región ITS utilizando a la enzima *DdeI* o su isoesquizómero *HpyF3I*.

3.2.2 Análisis de secuencias: Región ITS

Conforme a los resultados previamente mostrados, se continuó analizando la región ITS para encontrar una similitud con otras cianobacterias depositadas en la base de datos. El alineamiento entre los fragmentos ITS secuenciados de la cepa B6B y las cianobacterias encontradas en GenBank mostraron secuencias con un alto porcentaje de identidad con cianobacterias del género *Synechocystis*, en particular con *Synechocystis* sp. PCC 6803 clona b (94.48%), *Synechocystis* sp. PCC 6714 (94.30%), entre otras. Estos alineamientos cubrieron el 100% de la región analizada y tuvieron un valor de E de cero.

Tabla 3 Resumen de alineamientos con alto porcentaje de identidad con la secuencia ITS de B6B.

Nombre	Max Score	Total, Score	Query Cover	E-Value	% Identidad	ID
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 clona b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; tRNA-Ile (trnI) gene, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	832	832	100 %	0	94.48 %	KT371492.1
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6714 clona a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; tRNA-Ile (trnI) gene, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	826	826	100 %	0	94.30%	KT371494.1
<i>Synechocystis</i> sp. PAK12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	826	826	100%	0	94.29%	EF555570.1
<i>Gloeothece</i> sp. PCC 6909 clona a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; tRNA-Ile (trnI) gene, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	756	756	100%	0	91.93%	KT354208.1
<i>Synechocystis salina</i> CICALA 192 clona b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; tRNA-Ile (trnI) gene, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	750	750	100%	0	91.74%	KT354212.1
<i>Synechocystis minuscula</i> SAG 258.80 clona b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; tRNA-Ile (trnI) gene, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	472	472	100%	1e-128	83.01%	KT354195.1

El e-value (Expect) es el número de alineamientos que esperamos para una determinada puntuación (score) en la búsqueda que estamos realizando si la base de datos fuese una colección al azar. Entre más pequeño es el valor de E, se tienen resultados altamente significativos. Estos resultados junto con las observaciones de su morfología y planos de división sugirieron que la cepa B6B pertenece al género *Synechocystis*, por lo que de aquí en adelante se nombrará como *Synechocystis* sp. B6B.

A través de los datos recabados por los análisis de alineamiento se determinó que la longitud exacta de la región ITS de la cianobacteria B6B es de 466 pb (color gris), mientras que en PCC 6803 es de 465 pb. Por

otro lado, al llevar a cabo la caracterización de la región ITS utilizando el portal de tRNAscan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) de acuerdo a Juhling et al. (2008), se logró identificar la región codificante para un tRNA (color verde). El análisis mostró que tanto el ITS de PCC 6803 como el de la cepa B6B contienen una secuencia de 74 pb que codifica para una tRNA^{Ile} (isoleucina) (Figura 15).

```

B20B.trna1 (187-260)      Length: 74 bp
Type: Ile                Anticodon: GAT at 35-37 (221-223)      Score: 83.07
* | * | * | * | * | * | * | * |
Seq: GGGCTATTAGCTCAGCTGGTtAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGtCTCTGGTTCAAGTCCAGAATGGCCCA
Str: >>>>>>..>>>>.....<<<<<.>>>>.....<<<<<.....>>>>.....<<<<<<<<<<<.

```

Figura 15 Búsqueda de tRNA en las secuencias de las cepas PCC 6803 y B6B.

>PCC 6803

```

AACAAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTAAGGGAGACCTTTACCCCTTCATCTTGAAAGCAAAGTGCA
AATAGAGAGAAGTTGGTCAACCAAAAAGGTCGAGCAAGGGATTAACCGAGAGGTTAAAGAGTAGAAGTCTTTCAAATATTGC
CTAGGCGAGGTTAAAAGGCAA GGGCTATTAGCTCAGCTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGCTCTGGTTCAAGTCC
AGAATGGCCCA CCTAACCAAAAAGCCAAAAGAGAAGGATAAACCTTCAGCATCCTGTCTGATGAGAGTCAGAGGGAATGCTG
GATGTAAGTCCAGTAAGGACCTTGAAAAGTGCATAAAGAAAAGAGAAAGCAGGGAAAATCTTGCTCTTCTAACCGTTTTGAT
GTTAACCAAGGCTTTTGGCTGAGTGTGAGACTGAAGGGCGGTGAAGGTAGGGGGAAAGATGATCCTAGTTAGCAAAAAGA
AGATCTTAAAAAGGTCAAGCTACAAAGGGCTAACGGTGGATAC

```

>B6B

```

AACAAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTAAGGGAGACCTTTACCCCTTCATCTTGAAAGCAAAGTGCA
AATAGAGAGAAGTTGGTCAACCAAAAAGGTCGAGCAAGGGATTAAGCCGAGAGGTTAAAGAGTAGAAGTCTTTCAAATATTGC
CTAGGCGAGGTTAAAAGGCAA GGGCTATTAGCTCAGCTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGCTCTGGTTCAAGTCC
AGAATGGCCCA CCTAACCAAAAAGCCAAAAGAGAAGGATAAACCTTCAGCATCCTGTCTGGTGAGAATCAGAAGGAATGCTG
GATGTAAGTCCAGTAAGAACCTTGAAAAGTGCATAAAGAAAAGAGAAAGCAGGGAAAATCTTAATCCCCCTAGCTGTTTTTAA
ATTAACCACAAGGCTTCTGGCTGAAGTGTGAGATTAAGATAGCAAAGGTGAGGAGGAAGATAATCCTAGTTAGCAAAAAG
AAGATCTTAAAAAGGTCAAGCTACAAAGGGCTAACGGTGGATAC

```

Cabe destacar que ambas secuencias ITS comparten un %GC alto, 42.9% para la cepa B6B y 44.7% para *Synechocystis* sp. PCC 6803 de la ATCC.

Finalmente, se realizó el alineamiento con las dos secuencias ITS de las cepas B6B y PCC 6803 de la ATCC utilizando el algoritmo de Clustal (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) esto para identificar las diferencias nucleotídicas entre ellas (Figura 16). Los resultados mostraron que las regiones ITS de

Tabla 4 Resumen de alineamientos con alto porcentaje de identidad con la secuencia 16S de B6B.

Nombre	Max Score	Total, Score	Query Cover	E-Value	% Identidad	ID
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 clone d 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1179	1179	100%	0	99.69%	KT371499.1
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6714 gene for 16S rRNA, partial sequence	1170	1170	99%	0	99.53%	AB041937.1
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6702 gene for 16S rRNA, partial sequence	1170	1170	99%	0	99.53%	AB041936.1
<i>Synechocystis salina</i> LEGE 06155 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1164	1164	99%	0	99.38%	HQ832911.1
<i>Synechocystis pevalekii</i> PUPCCC 062.1/1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1158	1158	99%	0	99.38%	MT514701.1
<i>Synechocystis</i> sp. MBCCC1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1158	1158	99%	0	99.22%	MF444861.1
<i>Synechocystis</i> sp. IPPAS B-1207 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1116	1116	99%	0	98.13%	MN400422.1

Finalmente, se realizó el alineamiento entre la región 16S de la cepa PCC 6803 proveniente de la colección de ATCC y el fragmento 16S secuenciado de la cepa B6B utilizando el algoritmo de Clustal (Figura 17). Los resultados mostraron que las regiones 16S de ambas cepas son idénticas.

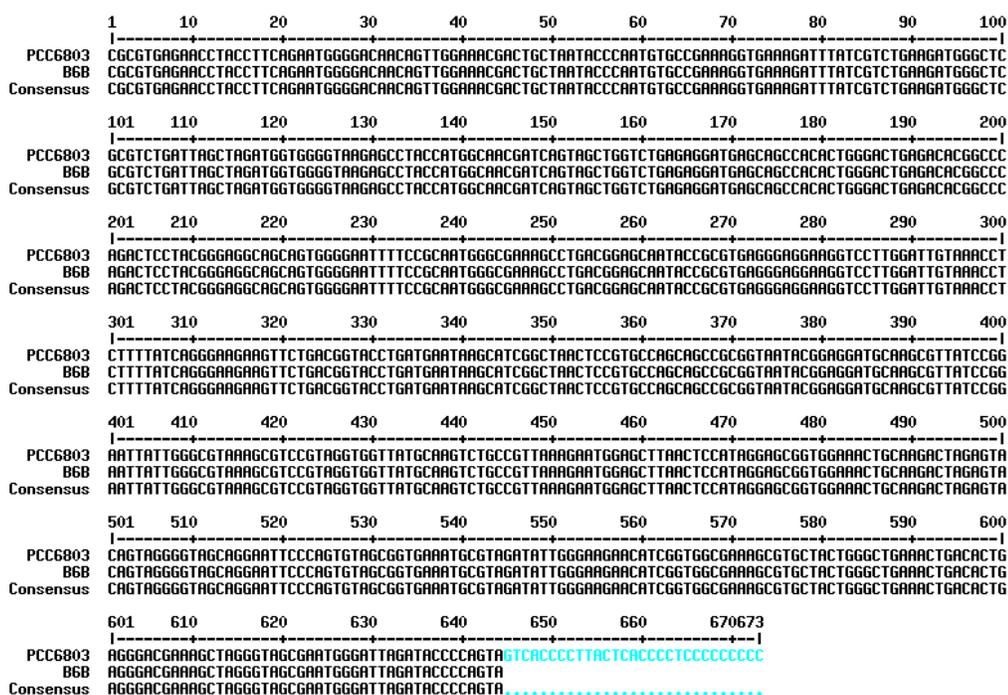


Figura 17 Alineamiento múltiple de las regiones 16S de PCC 6803 y B6B. Donde nucleótidos de color negro indican porcentajes altos en valores consenso ($\geq 90\%$).

3.2.4 Análisis filogenéticos

Con base a la información proporcionada por los análisis de las regiones 16S e ITS de la cepa B6B, se realizó la comparación de estas regiones con cianobacterias de diferentes géneros y especies para realizar un análisis de relación filogenética de la cepa B6B con miembros del género *Synechocystis*, para lo cual se recopiló un grupo 45 cianobacterias (Anexo 5) anotadas en la base de datos de NCBI que compartieron un grado de similitud significativo con la secuencia de B6B, además de secuencias con porcentajes de identidad y cobertura menores.

Al utilizar las secuencias ribosomales 16S de diferentes cianobacterias con similitud morfológica con la cepa B6B y *Synechocystis* sp. PCC 6803, se logró obtener un clado distintivo para las especies del género *Synechocystis* (Figura 18). Los resultados mostraron que la B6B pertenece al género *Synechocystis*, conservando un 100% de identidad con la cepa *Synechocystis* sp. PCC 6803 de la ATCC y alto porcentaje de identidad (99.68%) con otras cepas: *Synechocystis* sp. PCC 6805, *Synechocystis* sp. PCC 6714 y *Synechocystis* sp. 6702. El menor porcentaje de identidad dentro de este clado se obtuvo con la cepa *Synechocystis minuscula* con 96.63% (Tabla 5). Entre otros clados separados se observaron cepas que comparten una similitud morfológica con B6B como *Cyanothece* sp. SKTU126 con 92.71% de identidad en la región 16S, *Synechococcus* sp. PCC 8807 con 90.42%, *Cyanothece* sp. PCC 7424 con 90.28% y *Chroococcus turgidus* HUW 799 con 89.80%.

Cada rama está acompañada por el valor de soporte, donde >50 son confiables en la construcción de árboles filogenéticos.

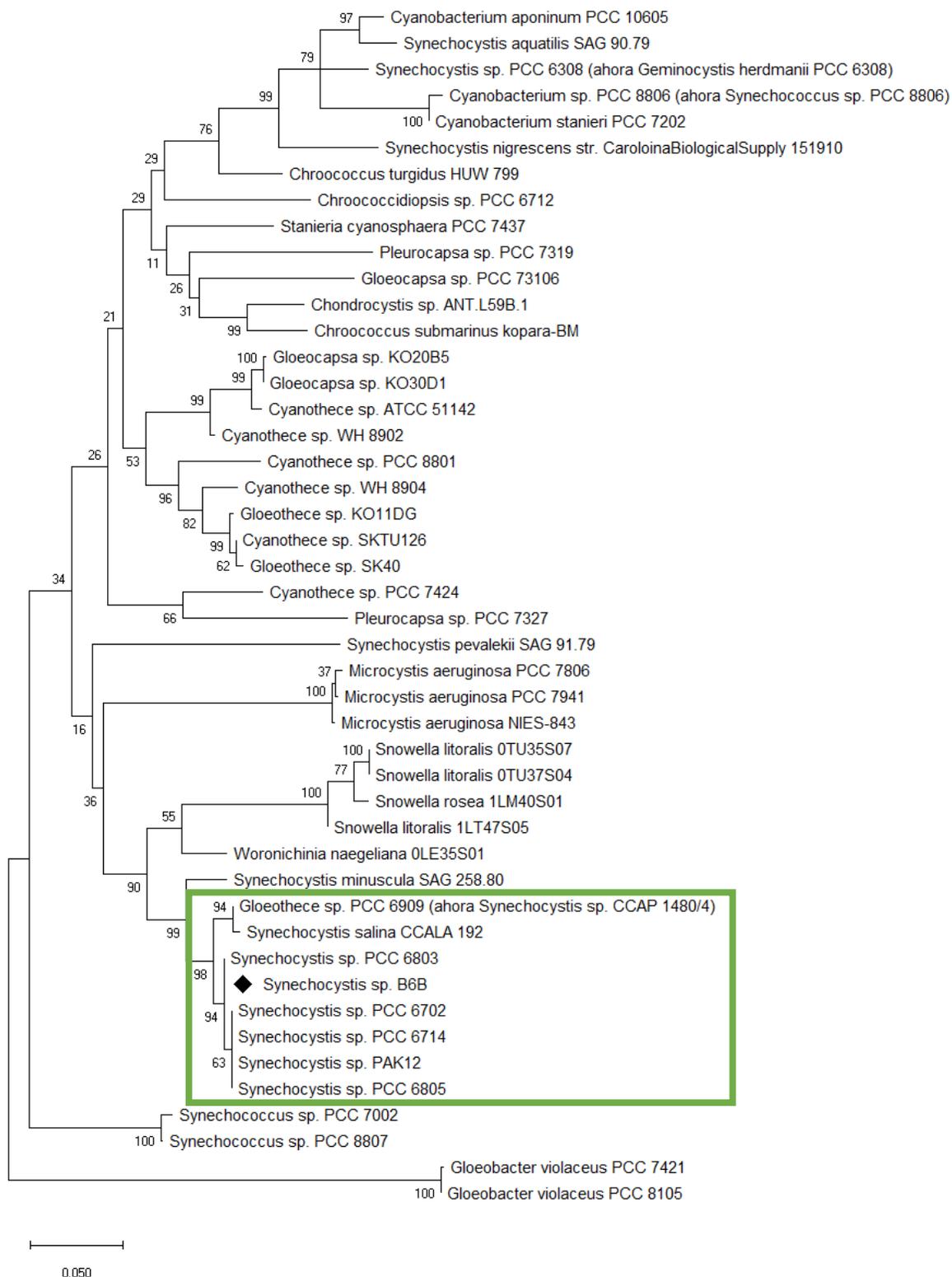


Figura 18 Árbol filogenético de máxima verosimilitud de región 16S de cianobacterias, generado a través del modelo de Tiempo General Reversible. Su probabilidad logarítmica fue de -4702.99. Se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias de tasa de evolución entre los sitios. El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en el número de sustituciones por sitio. Este análisis involucró 46 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 623 posiciones en el conjunto de datos final. Recuadro azul: clado *Synechocystis*. “◆” Cepa de caracterización de este estudio: B6B.

Tabla 5 Porcentaje de identidades en secuencias 16S, señalado en color amarillo los más altos con la cepa B6B.

Columna1	Chondrocystis sp. ANT.L59B.1	Chroococcus submarinus kopara-BM	Cyanothecce sp. ATCC 51142	Gloeocapsa sp. KO20B5	Gloeocapsa sp. KO30D1	Cyanothecce sp. WH 8902	Cyanothecce sp. SKTU126	Gloeothecce sp. SK40	Gloeothecce sp. KO11DG	Cyanothecce sp. WH 8904	Cyanothecce sp. PCC 8801	Stanieria cyanosphaera PCC 7437	Cyanothecce sp. PCC 7424	Gloeothecce sp. PCC 6909 (Synchocystis sp. CCAP 1480/4)	Synechocystis salina CCALA 192	Synechocystis sp. PAK12	Synechocystis sp. PCC 6702	Synechocystis sp. PCC 6714	Synechocystis sp. PCC 6805	Synechocystis sp. PCC 6803	Synechocystis sp. B6B
Chondrocystis sp. ANT.L59B.1	95.26																				
Chroococcus submarinus kopara-BM	91.90	91.83																			
Cyanothecce sp. ATCC 51142	91.40	91.33	98.86																		
Gloeocapsa sp. KO20B5	91.56	91.49	97.56																		
Gloeocapsa sp. KO30D1	92.69	91.49	97.56	99.84																	
Cyanothecce sp. WH 8902	92.22	91.50	94.33	97.40	97.56																
Cyanothecce sp. SKTU126	91.90	91.50	94.00	94.16	94.32	94.81															
Gloeothecce sp. SK40	92.38	91.18	94.33	94.16	94.32	94.48	99.68														
Gloeothecce sp. KO11DG	91.57	90.85	93.84	93.83	93.99	94.97	99.51	99.19													
Cyanothecce sp. WH 8904	91.25	91.84	93.35	92.86	93.02	93.83	95.62	95.62	94.81												
Cyanothecce sp. PCC 8801	91.73	91.68	91.90	91.40	91.56	92.05	91.73	91.41	91.73	91.90	92.07	92.36	90.41								
Stanieria cyanosphaera PCC 7437	88.87	88.55	91.06	90.37	90.54	91.89	92.75	92.41	92.58	91.74	90.74	89.85	90.57								
Cyanothecce sp. PCC 7424	88.53	88.22	90.73	90.03	90.20	91.55	92.41	92.07	92.24	91.40	90.40	88.52	90.04	99.66							
Gloeothecce sp. PCC 6909 (Synchocystis sp. CCAP 1480/4)	85.61	84.59	89.30	88.15	88.52	89.67	91.51	91.14	91.51	91.14	90.04	88.52	90.04	98.79	98.79						
Synechocystis sp. PAK12	88.82	87.91	90.92	90.42	90.58	91.72	92.71	92.38	92.71	91.73	90.11	90.08	90.60	98.48	98.15	100.00					
Synechocystis sp. PCC 6702	88.82	87.91	90.92	90.42	90.58	91.72	92.71	92.38	92.71	91.73	90.11	90.08	90.60	98.48	98.15	100.00					
Synechocystis sp. PCC 6714	88.82	87.91	90.92	90.42	90.58	91.72	92.71	92.38	92.71	91.73	90.11	90.08	90.60	98.48	98.15	100.00					
Synechocystis sp. PCC 6805	88.82	87.75	90.92	90.42	90.58	91.72	92.71	92.38	92.71	91.73	90.11	90.08	90.28	98.65	98.31	99.63	99.68	99.68	99.68	99.68	99.68
Synechocystis sp. B6B	87.82	87.75	90.92	90.42	90.58	91.72	92.71	92.38	92.71	91.73	90.11	90.08	90.28	96.29	95.95	95.55	96.80	96.80	96.80	96.63	96.63
Synechocystis minuscula SAG 258.80	89.63	88.24	90.60	90.42	90.58	92.21	92.22	92.22	92.22	92.22	90.76	89.79	93.76	93.42	94.10	94.65	94.65	94.65	94.33	94.33	94.33
Woronichinia nagekana OLE3501	88.01	87.28	89.30	88.80	88.96	89.12	90.76	90.92	91.09	90.11	89.81	88.46	88.35	91.41	91.08	92.25	91.25	91.25	91.25	91.25	91.25
Snowella floridis OTU35507	88.01	87.28	89.30	88.80	88.96	89.12	90.76	90.92	91.09	90.11	89.81	88.46	88.35	91.41	91.08	92.25	91.25	91.25	91.25	91.25	91.25
Snowella floridis OTU37504	88.01	87.28	89.30	88.80	88.96	89.12	90.76	90.92	91.09	90.11	89.81	88.46	88.35	91.41	91.08	92.25	91.25	91.25	91.25	91.25	91.25
Snowella floridis IL174305	87.52	86.62	88.65	88.15	88.31	88.96	90.44	90.60	90.76	89.79	89.16	87.97	88.19	91.58	91.25	92.25	91.57	91.57	91.57	91.57	91.57
Synechococcus sp. PCC 7002	89.63	89.22	91.73	90.91	91.07	92.53	89.63	89.95	89.63	89.95	89.95	91.54	88.67	90.56	90.22	88.56	90.28	90.28	89.95	89.95	89.95
Synechococcus sp. PCC 8807	90.10	89.53	92.21	91.54	91.71	93.01	90.10	90.42	90.10	90.42	90.10	91.37	88.82	90.54	90.20	88.19	90.75	90.75	90.42	90.42	90.42
Snowella floridis OTU37504	88.01	87.28	89.30	88.80	88.96	89.12	90.76	90.92	91.09	90.11	89.81	88.46	88.35	91.41	91.08	92.25	91.25	91.25	91.25	91.25	91.25
Chroococcus lurgidus HUW 799	93.27	93.42	93.06	93.25	93.46	93.67	93.47	93.27	93.47	93.88	93.69	93.66	92.06	90.36	90.15	87.78	90.00	90.00	89.80	89.80	89.80
Cyanobacterium sp. PCC 8806 (Synchococcus sp. PCC 8806)	89.92	89.85	88.13	87.79	87.95	88.76	89.43	89.27	89.76	88.62	89.45	88.58	88.64	86.82	86.49	84.13	86.67	86.67	86.67	86.67	86.67
Cyanobacterium stanieri PCC 7202	89.92	90.51	88.46	88.11	88.27	88.76	89.59	89.76	89.92	89.11	89.94	88.58	88.80	86.66	86.32	84.50	86.50	86.50	86.50	86.50	86.50
Cyanobacterium oprimum PCC 10605	90.24	90.67	88.29	87.95	88.11	88.60	89.92	90.08	89.92	89.59	90.10	88.42	89.94	88.85	88.51	85.24	87.80	87.80	87.80	87.80	87.80
Synechocystis aquetilis SAG 90.79	89.34	89.19	86.29	85.93	86.10	87.29	89.34	89.17	89.34	88.42	88.85	86.76	88.34	88.01	87.67	84.21	86.63	86.63	86.63	86.80	86.80
Gemmatimonas hedmani PCC 6308 (Synchocystis sp. PCC 6308)	90.70	91.79	87.44	87.42	87.58	89.05	88.74	88.91	89.07	88.44	89.05	88.40	89.90	88.31	87.97	86.67	87.77	87.77	87.77	87.44	87.44
Synechocystis nigrescens str. CarolinabiologicalSupply 151910	90.02	89.19	87.48	86.95	87.12	88.31	89.00	88.83	89.00	88.66	90.54	88.12	90.54	88.68	88.34	86.23	87.48	87.48	87.65	87.65	87.65
Pleurocapsa sp. PCC 7319	91.54	91.00	90.73	91.21	91.37	92.02	90.24	90.41	90.08	89.59	89.12	90.55	89.77	89.53	89.19	87.04	88.46	88.46	88.46	88.46	88.46
Gloeocapsa sp. PCC 73106	91.54	90.83	91.71	91.21	91.37	92.02	90.24	90.41	90.08	89.59	89.12	90.55	89.77	89.53	89.19	87.04	88.46	88.46	88.46	88.46	88.46
Microcystis aeruginosa NIES-843	88.65	86.76	89.63	89.29	89.45	91.23	89.79	89.79	89.79	89.79	88.33	91.06	88.98	89.88	89.54	90.04	90.76	90.76	90.44	90.44	90.44
Microcystis aeruginosa PCC 7941	88.82	86.60	89.63	89.29	89.45	91.07	89.63	89.63	89.63	89.79	88.33	91.06	88.98	89.88	89.54	90.04	90.76	90.76	90.44	90.44	90.44
Microcystis aeruginosa PCC 7806	88.33	86.76	89.47	89.29	89.45	91.23	89.79	89.79	89.79	89.79	88.33	91.06	88.98	89.88	89.54	90.04	90.76	90.76	90.44	90.44	90.44
Synechocystis pevekii SAG 91.79	87.52	88.05	88.20	88.18	88.34	88.34	90.05	89.95	89.88	90.22	88.55	88.49	87.37	89.38	89.04	90.04	90.76	90.76	90.44	90.44	90.44
Chroococcoidopsis sp. PCC 6712	89.74	90.16	91.21	90.54	90.70	90.54	91.37	91.53	91.37	91.37	90.57	91.68	89.77	88.49	88.16	86.57	87.62	87.62	87.62	87.62	87.62
Pleurocapsa sp. PCC 7327	90.38	88.83	90.54	89.71	89.87	90.70	89.23	89.07	89.40	89.56	88.60	89.89	91.08	84.63	84.29	80.60	88.01	88.01	88.09	88.09	88.09
Gloeobacter violaceus PCC 7421	85.15	84.78	86.30	85.78	85.95	86.44	85.15	85.48	84.99	85.64	84.67	85.60	85.48	84.63	84.29	80.60	88.01	88.01	84.18	84.18	84.18
Gloeobacter violaceus PCC 8105	85.23	84.78	86.36	85.85	86.02	86.50	85.23	85.55	85.06	85.71	84.74	85.67	85.55	84.63	84.29	80.81	84.09	84.09	84.42	84.42	84.42

géneros y especies con morfología similar a la cepa B6B (Anexo 6), las cuales se encuentran anotadas en la base de datos de NCBI y en su mayoría codificantes para un tRNA^{lle}. A la fecha se cuentan con pocas secuencias registradas en la base de datos de dicha región ribosomal.

El árbol filogenético obtenido con las regiones ITS mostró un clado muy definido para las cepas del género *Synechocystis* (Figura 19). Entre ellas se encontró el ITS de la cepa B6B, la cual se agrupó principalmente con la cepa modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803 de la ATCC con quien mostró el valor de identidad más alto con un 93.97% (Tabla 6), seguido de la cepa *Synechocystis* sp. PCC 6714 con 93.32%. Los porcentajes de identidad más bajos en este clado fueron obtenidos con *Gloeotheca* sp. PCC 6909 (*Synechocystis* sp. CCAP 1480/4) y *Synechocystis salina* CCALA 192 con 90.09%, y *Synechocystis minuscula* SAG 258.80 con 80.97%.

En los clados restantes, se observaron cepas que comparten una similitud morfológica con la B6B como *Cyanothece* sp. SKTU126 con 62.74% de identidad en la región ITS, *Cyanobacterium* sp. PCC 8806 (*Synechococcus* sp. PCC 8806) con 62.18% y *Geminocystis herdmanii* PCC 6308 con 57.55%.

Cada rama está acompañada por el valor de soporte, donde >50 son confiables para la construcción de árboles filogenéticos.

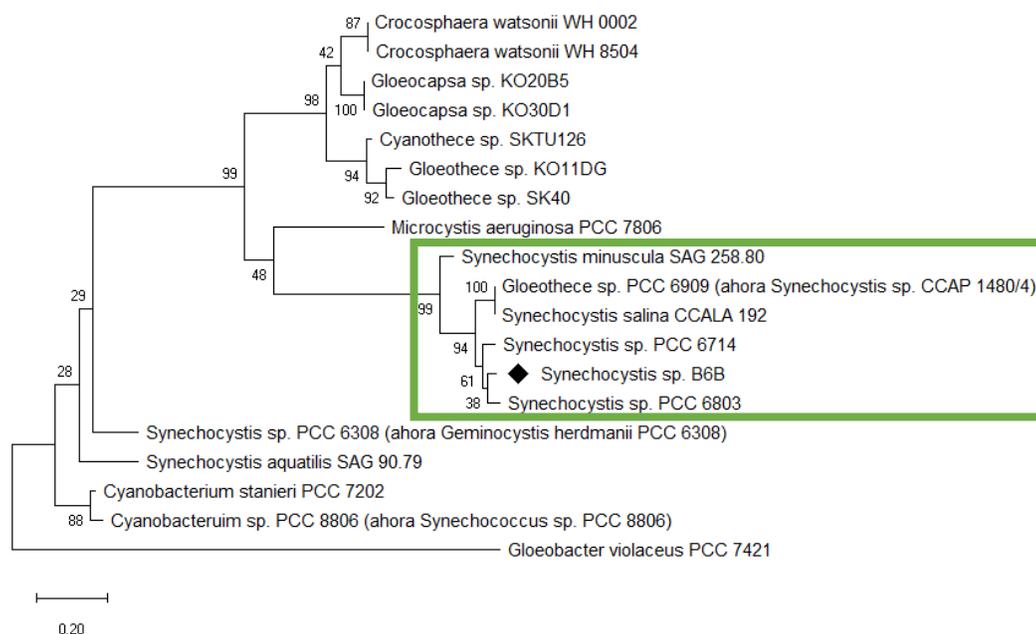


Figura 19 Árbol filogenético de máxima verosimilitud de región ITS de cianobacterias generado a través del modelo Hasegawa-Kishino-Yano. Su probabilidad logarítmica fue de -4313.70. Se utilizó una distribución gamma discreta para modelar las diferencias de tasa de evolución entre los sitios. El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en el número de sustituciones por sitio. Este análisis involucró 19 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 528 posiciones en el conjunto de datos final. Recuadro azul: clado *Synechocystis*. “◆” Cepa de caracterización en este estudio: B6B.

3.2.5 Cinética de crecimiento de PCC 6803 y B6B por DO_{730} y conteo celular

Las curvas de crecimiento realizadas en medio BG11 tanto con la cepa PCC 6803 como con la B6B tuvieron una DO_{730} inicial 0.188 ± 0.0016 . El crecimiento fue similar entre ellas hasta el día 8 de la curva (Figura 20 A), momento en el cual las mediciones mostraron diferencias y cada cepa desarrollo su propia tendencia, en donde la cepa B6B alcanzó una DO_{730} de 0.915 ± 0.0037 mientras que PCC 6803 0.871 ± 0.0059 (Anexo 7). En ambas cepas se presentó una distribución normal en los datos de DO_{730} y células/ml.

Durante el crecimiento, la coloración de las cianobacterias cambió con respecto al tiempo indicando que la calidad de las células iba deteriorándose. Las fases de crecimiento fueron más evidentes al graficarlas en escala logarítmica (Figura 20 B) que en escala lineal. Como se puede observar, ambas cepas tuvieron crecimiento exponencial-lineal hasta aproximadamente el día 20, después del cual se pudo apreciar la formación de meseta en la curva de crecimiento, indicando el inicio de la fase estacionaria. Las DO_{730} al día 30 fueron de 3.577 ± 0.0315 para PCC 6803 y 4.956 ± 0.0199 para B6B.

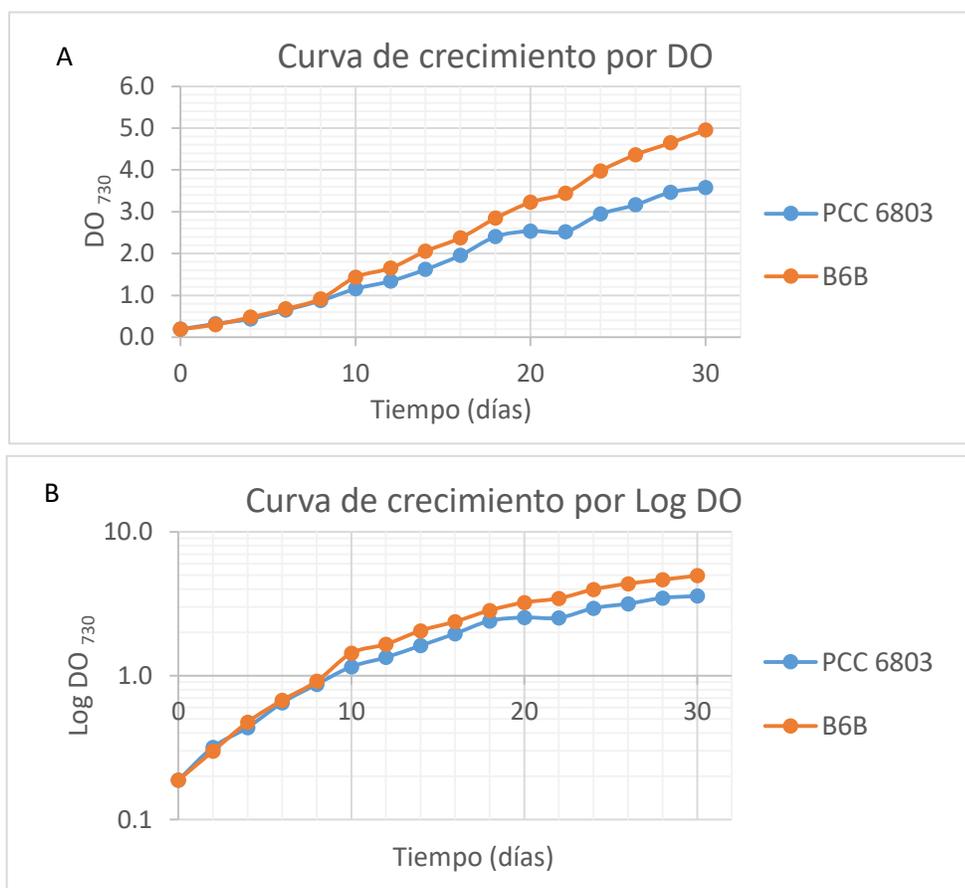


Figura 20 Curvas de crecimiento de PCC 6803 y B6B en un periodo de 30 días. **A:** Gráfico de DO_{730} en escala lineal (n=3). **B:** Gráfico de DO_{730} en escala logarítmica (n=3).

Por otro lado, al realizar la curva de crecimiento por conteo celular en la cámara de Neubauer se pudieron apreciar mejor las fases de crecimiento (Figura 21) de cada cepa y con ello obtener los cálculos de tasas de crecimiento y duplicación (Anexo 8).

En este caso ambas curvas se ven diferenciadas y no sobrepuestas desde el día 0, donde PCC 6803 comenzó con 9.23 ± 0.12 [$E10^6$] células/ml mientras que B6B con 5.61 ± 0.24 [$E10^6$] células/ml. El crecimiento de las cepas mantuvo un comportamiento exponencial al día 2 con una μ_2 de 1.36 para B6B y μ_2 de 0.91 para PCC 6803 pasando posteriormente a una fase lineal que se observó hasta los días 14-16, donde PCC 6803 disminuyó su tasa de crecimiento a $\mu_{14} = 0.02$ (día 14) y B6B a $\mu_{16} = 0.07$ (día 16). Estos resultados indicaron que las células redujeron su división celular por día y señalaron el inicio de la fase estacionaria. A este tiempo PCC 6803 se encontraba con una población de 66.44 ± 0.95 [$E10^6$] células/ml, mientras que B6B con 73.63 ± 0.53 [$E10^6$] células/ml.

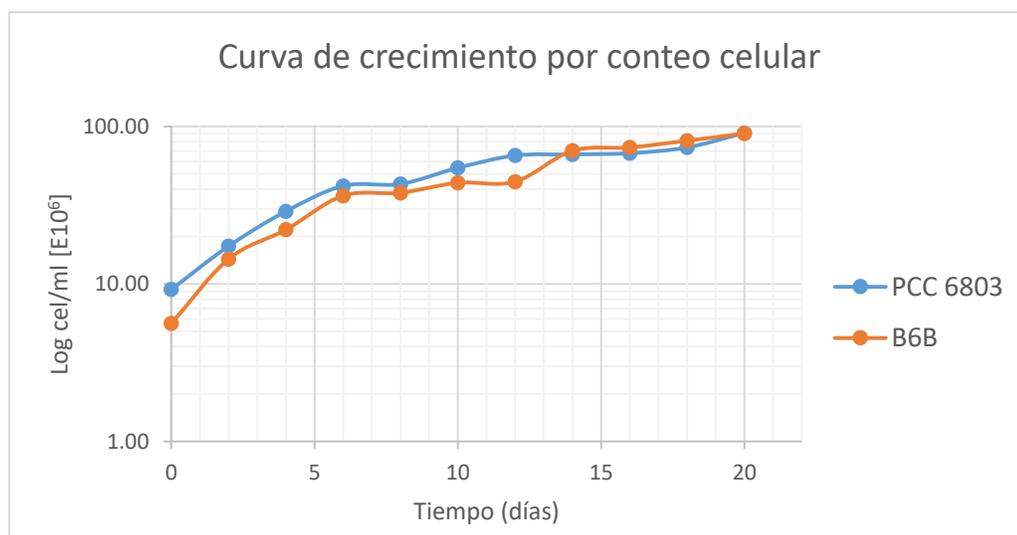


Figura 21 Curva de crecimiento por conteo celular en cámara Neubauer de PCC 6803 y B6B en un periodo de 20 días. Gráfico conteo [$E10^6$] células/ml en escala logarítmica en 20 días de experimento ($n=3$).

A partir de los datos de DO_{730} y conteo celular obtenidos en medio BG11 se construyó una curva estándar ($DO_{730} \sim 1$) para cada cianobacteria (Figura 22) con el objetivo de conocer su comportamiento y ajustarlo a un modelo lineal, además de obtener una ecuación de regresión lineal para poder estimar la población celular de cada cepa a partir de datos de DO_{730} .

Se observó que, en ambas cianobacterias las curvas presentaron una correlación aceptable ($R^2 = 0.92$) entre la concentración celular y la DO_{730} . Sin embargo, al tener un comportamiento similar, resultó fundamental determinar si las diferencias estadísticas eran estadísticamente significativas.

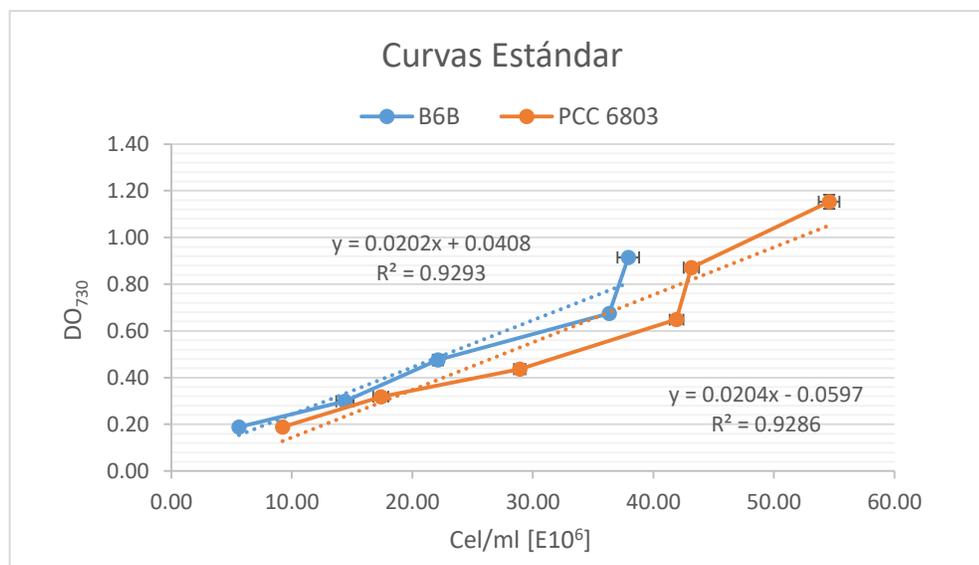


Figura 22 Curva estándar y ecuación de regresión lineal de PCC 6803 y B6B obtenida de mediciones DO_{730} y conteo celular ($n=3$).

A pesar de que cada curva estándar fue representada por una ecuación y un coeficiente de correlación diferente, se realizó la comparación estadística entre ellas con el objetivo de verificar si había una diferencia significativa. Los resultados mostraron una varianza homogénea entre las curvas ($p > 0.05$), lo que indica que no hay diferencias significativas en el ajuste de datos obtenidos de las dos cepas. Así mismo, las pendientes entre ellas fueron similares ($p > 0.05$), por lo que en ambas curvas se conserva una razón de cambio entre la variable de DO_{730} con respecto al número de células/ml. Sin embargo, esto no significa que tengan el mismo número de células aun en las mismas condiciones de cultivo.

A partir de los parámetros cinéticos entre DO_{730} y células/ml se determinó el factor de proporcionalidad en cada curva hasta DO_{730} de ~ 1 , con ello indicamos un número aproximado de células/ml por cada unidad de DO_{730} . En la cepa PCC 6803 para una DO_{730} de 0.2 = $10.86 E10^6 \pm 0.003$ células/ml y en B6B DO_{730} 0.2 = $7.94 E10^6 \pm 0.006$ células/ml.

3.3 Crecimiento y producción de PHB en diferentes condiciones de cultivo

A partir de muestras de biomasa de B6B cultivada en medio BG11, se realizó la cuantificación de PHB. Como se puede observar en la Figura 23, los resultados confirmaron que la cepa B6B es productora natural de poli- β -hidroxibutirato. En los resultados de producción del biopolímero por ambas cianobacterias se encontró una distribución normal y no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en los días de muestreos. La producción disminuyó con respecto al tiempo para ambas cepas.

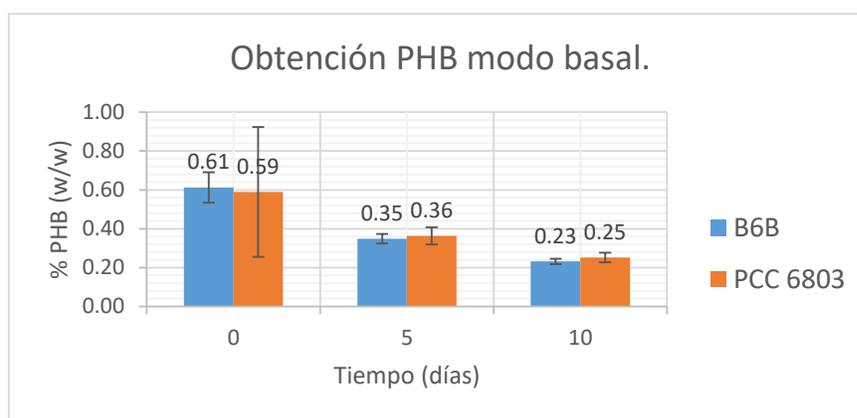


Figura 23 Producción de PHB por B6B y PCC 6803 en modo basal. Media \pm SD, n=3.

3.3.1 Curvas de crecimiento de las cepas B6B y PCC 6803 en diferentes condiciones de cultivo

Para obtener la curva de crecimiento de la cepa B6B, los cultivos de las seis condiciones iniciaron con una DO_{730} de 1.3 ($\sim 62.33 \times 10^6$ células/ml). En las condiciones de limitación de nitrógeno (N-) se observó un comportamiento característico, ya que su coloración cambió de verde-azul a un amarillo ocre (Figura 24) aun cuando se encontraba en combinación con glucosa (BG11 N- G+) o acetato (BG11 N- A+), como fuentes de carbono alternas. Por otro lado, los medios sin limitación y suplementados mostraron un color verde intenso conforme avanzó el cultivo debido al aumento en el número de células (Anexo 9). Lamentablemente, la condición de suplemento con glucosa presentó contaminación al día 6 después del inóculo, por lo cual se suspendieron sus muestreos.

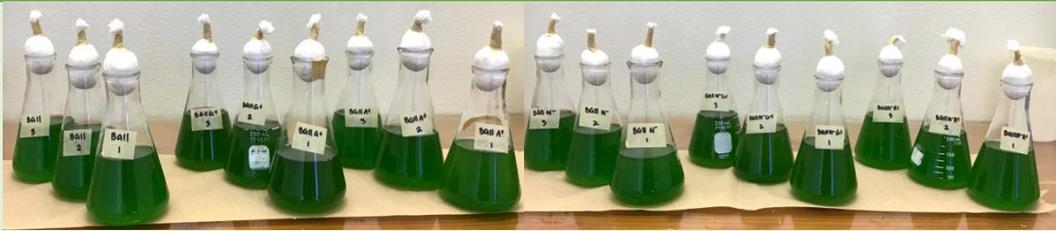
Cepa B6B		Día
<i>De izquierda a derecha: BG11, BG11 G+, BG11 A+, BG11 N-, BG11 N- G+ y BG11 N- A+.</i>		
		0
		5
		10
		15
		20

Figura 24 Evolución en coloración de la cianobacteria B6B bajo condiciones de cultivo durante 20 días de experimentación. De izquierda a derecha (condiciones; n=3): BG11 (Medio de crecimiento utilizado generalmente; control), BG11 G+ (BG11 con glucosa anhidra), BG11 A+ (BG11 con acetato de sodio), BG11 N- (BG11 sin nitrógeno), BG11 N-G+ (BG11 sin nitrógeno con adición de glucosa anhidra) y BG11 N- A+ (BG11 sin nitrógeno con adición de acetato de sodio).

Resultados similares fueron obtenidos con la cepa PCC 6803 (Figura 25), en donde los cultivos en las seis condiciones partieron de una alta DO_{730} 1.24 ($\sim 67.33 \text{ E}10^6$ células/ml), para poder evaluar los efectos de las condiciones de cultivo en la producción de PHB.

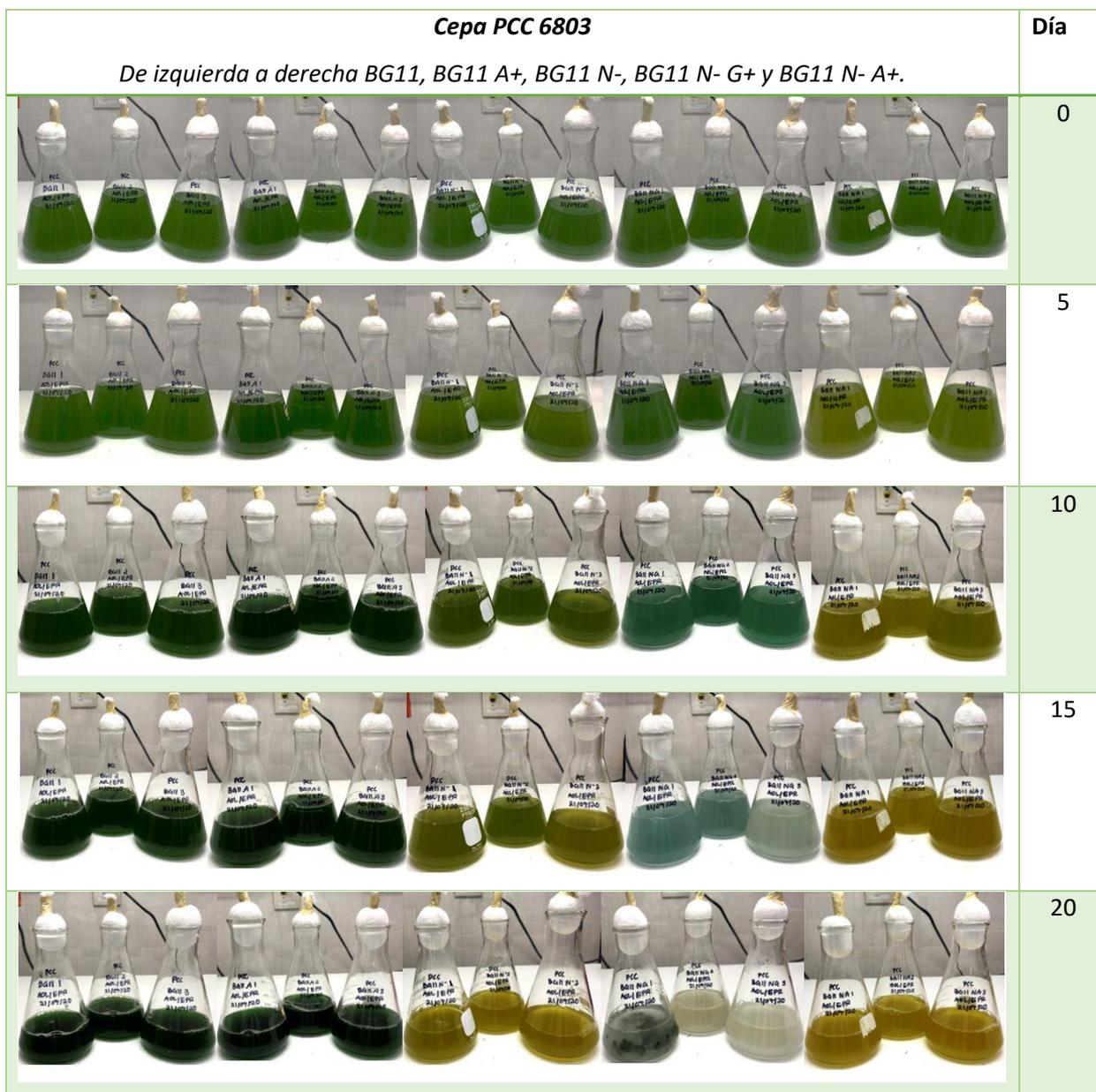


Figura 25 Evolución en coloración de la cianobacteria PCC 6803 bajo condiciones de cultivo durante 20 días de experimentación. De izquierda a derecha (condiciones; n=3): BG11 (Medio de crecimiento utilizado generalmente; control), BG11 A+ (BG11 con acetato de sodio), BG11 N- (BG11 sin nitrógeno), BG11 N- G+ (BG11 sin nitrógeno con adición de glucosa anhidra) y BG11 N- A (BG11 sin nitrógeno con adición de acetato de sodio).

A partir del día 5 se observaron las diferencias características en coloración en los diferentes cultivos, BG11 N- G+ tomó un color azul grisáceo y BG11 N- A+ un color verde amarillo que se fue intensificando con el

tiempo, respectivamente. Al igual que en la cepa B6B, en los cultivos de PCC 6803 suplementados (BG11 A+, en este caso) se observó un color verde intenso a partir del día 10, el cual fue mayor al observado en la condición control BG11, sugiriendo un aumento en el número de células (Anexo 9). Cabe señalar que en el día 20, una réplica de la condición BG11 N- G+, mostró aglomeración de células que más tarde se confirmaría como contaminación.

Las curvas de crecimiento en los medios de cultivo con limitación de nitrógeno y adición de fuentes de carbono mostraron comportamiento diferente entre las cepas B6B y PCC 6803 (Figura 26). Aunque la biomasa de la cepa B6B mostró más fluctuaciones en la DO_{730} a lo largo del cultivo que la PCC 6803, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ambas cepas.

En los cultivos de la cepa B6B las mediciones de DO_{730} mostraron diferencias significativas entre las condiciones de crecimiento ($p < 0.05$), desde los primeros 5 días (Figura 26 A). Los medios de cultivo de BG11 A+ y BG11 fueron los que promovieron una mayor formación de biomasa al día 20 del experimento con una DO_{730} de 2.28 ± 0.040 ($\sim 110.85 \text{ E}10^6$ células/ml) y 2.13 ± 0.021 ($\sim 103 \text{ E}10^6$ células/ml), respectivamente. En el caso del cultivo BG11 A+ al día 20 se observó la entrada a la fase estacionaria, mientras que a ese mismo tiempo el cultivo BG11 aún estaba en crecimiento.

En las condiciones de limitación (N-) no se observó un incremento de densidad celular e incluso al analizar la cinética de crecimiento de esta cepa se observó que las tasas de crecimiento fueron negativas $\mu < 0$ (Anexo 9), lo que sugiere que el crecimiento celular se detuvo. Sin embargo, en el caso de BG11 N- y BG11 N- A+, a partir del día 15 se observó nuevamente crecimiento. Esto no fue el caso para la condición BG11 N- G+ en donde la mayor tasa de crecimiento fue del día 0-5 con $\mu = 0.05$ ($\sim 64.15 \text{ E}10^6$ células/ml).

Por otro lado, todos los cultivos de las cepas PCC 6803 (Figura 26B) crecieron de manera muy similar en todas las condiciones, por lo que no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ellas. La adición de una fuente de carbono como el acetato (BG11 A+) permitió un mayor desarrollo de biomasa, por lo que durante el experimento mostró un crecimiento exponencial, llegando al día 20 con una DO_{730} 2.14 ($\sim 107.67 \text{ E}10^6$ células/ml). El crecimiento de la condición BG11 fue más lento en comparación con la BG11 A+ pero al día 20 alcanzó la misma biomasa. Por otro lado, en las condiciones con limitación de nitrógeno como BG11 N- G+ obtuvieron tasas de crecimiento menores a cero en los días 10 (-0.15) con $\sim 69.43 \text{ E}10^6$ células/ml y al día 15 (-0.18) con $\sim 61.26 \text{ E}10^6$ células/ml, (Anexo 9), indicando que no hubo crecimiento celular en esos tiempos.

El contenido de peso seco total (PST; $\mu\text{g/ml}$) de las células en las diferentes condiciones de cultivo presentó una distribución normal (Figura 27) y no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) en entre la biomasa obtenida en ambas cepas durante todo el experimento, a excepción de la condición BG11 A+.

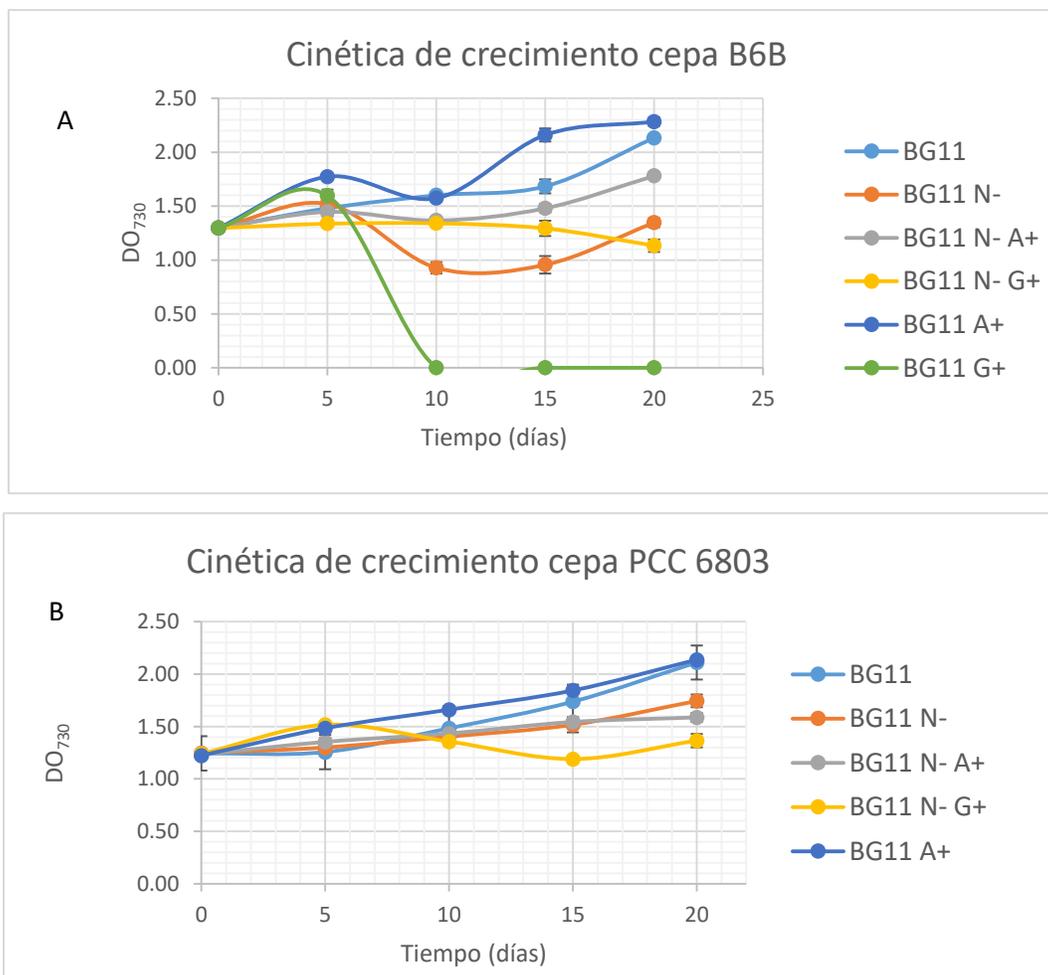


Figura 26 Cinética de crecimiento de B6B y PCC 6803 bajo condiciones de cultivo durante el periodo de 20 días. **A:** Gráfico de la cepa B6B. **B:** Gráfico de la cepa PCC 6803. Donde BG11: Medio de crecimiento utilizado generalmente; control. BG11 N- A+: BG11 sin nitrógeno con adición de acetato de sodio. BG11 A+: BG11 con acetato de sodio. BG11 G+: BG11 con adición de glucosa anhidra. BG11 N- G+: BG11 sin nitrógeno con adición de glucosa anhidra. BG11 N-: BG11 sin nitrógeno. Media \pm SD, $n=3$.

Concordando con los comportamientos obtenidos en las curvas de crecimiento por DO_{730} (Figura 26), ya que se conservaron las disminuciones e incrementos de la biomasa durante los 20 días del ensayo en las condiciones de cultivo. Sin embargo, la condición BG11 A+ favoreció el desarrollo de biomasa para ambas cepas, encontrándose al día 15 con $1040.2 \mu\text{g/ml}$ de PST por la cepa B6B, 50% más producción de biomasa que la cepa PCC 6803 ($699.6 \mu\text{g/ml}$). Seguido de la condición óptima BG11, con tan solo una diferencia superior del 7.7% por la cepa B6B ($506.83 \mu\text{g/ml}$) con respecto a la modelo ($470.27 \mu\text{g/ml}$).

Con estos resultados se observó que el crecimiento de la cepa B6B es afectado en condiciones de limitación de nutrientes e incluso si están adicionadas con fuentes alternas de carbono.

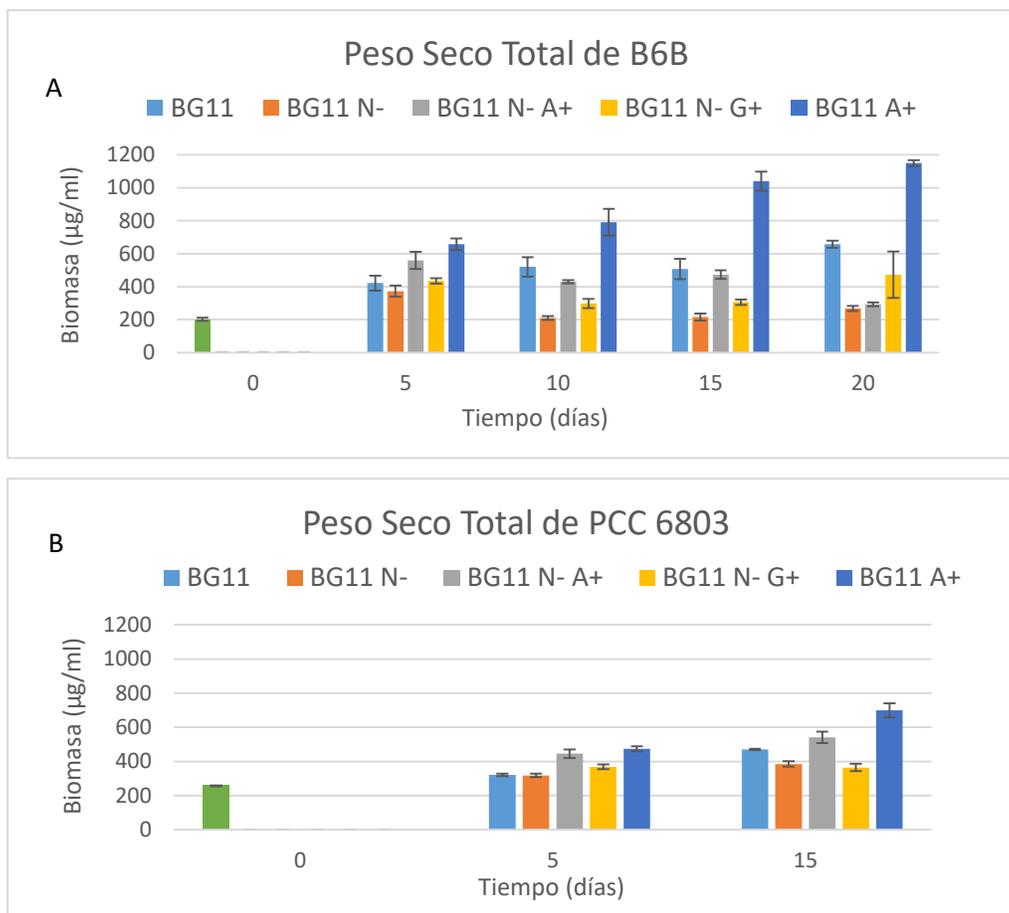


Figura 27 Contenido peso seco total de B6B y PCC 6803 en condiciones de crecimiento. **A:** Gráfico de la cepa B6B. **B:** Gráfico de la cepa PCC 6803. La barra color verde indica los valores iniciales por cada cepa en todas las condiciones de cultivo. Donde BG11: Medio de crecimiento utilizado generalmente; control. BG11 N- A+: BG11 sin nitrógeno con adición de acetato de sodio. BG11 A+: BG11 con acetato de sodio. BG11 G+: BG11 con adición de glucosa anhidra. BG11 N- G+: BG11 sin nitrógeno con adición de glucosa anhidra. BG11 N-: BG11 sin nitrógeno. La barra color verde indica los valores iniciales por la cepa en todas las condiciones de cultivo. Media \pm SD, n=3

3.3.2 Obtención de PHB por condiciones mixotróficas en B6B y PCC 6803

Dado que la cepa B6B produjo de forma natural PHB en el medio BG11 (Figura 23), se esperaba que al cultivo en diferentes medios con limitación de nutrientes y adición de fuentes de carbono aumentara los niveles de producción del biopolímero, como se ha documentado con la cepa PCC 6803.

Los datos obtenidos en gráficas de producción de PHB mostraron una distribución normal.

Los experimentos realizados en las diferentes condiciones iniciaron con una DO_{730} 1.24 (62.17×10^6 células/ml para B6B y 63.58×10^6 células/ml para PCC 6803), los cuales provenían de cultivos en fase exponencial tardía en medio BG11. Esto hizo que la producción inicial de PHB fuera alta: $1.62\% \pm 0.04$ PHB (w/w) para B6B y $7.7\% \pm 0.46$ PHB (w/w) para PCC 6803 (Figura 28).

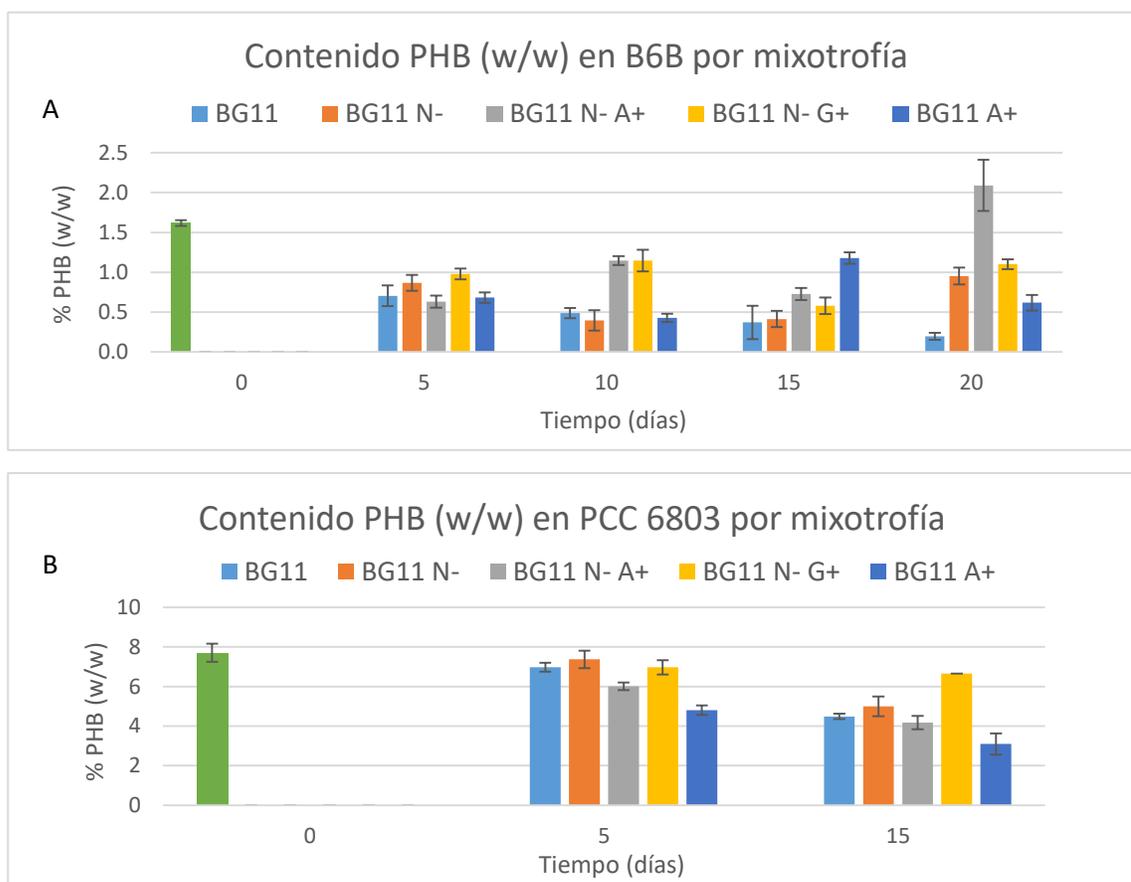


Figura 28 Producción de PHB por B6B y PCC 6803 por mixotrofia **A:** Gráfico de la cepa B6B. **B:** Gráfico de la cepa PCC 6803. La barra color verde indica los valores iniciales por cada cepa en todas las condiciones de cultivo. Donde BG11: Medio de crecimiento utilizado generalmente; control. BG11 N- A+: BG11 sin nitrógeno con adición de acetato de sodio. BG11 A+: BG11 con acetato de sodio. BG11 G+: BG11 con adición de glucosa anhidra. BG11 N- G+: BG11 sin nitrógeno con adición de glucosa anhidra. BG11 N-: BG11 sin nitrógeno. La barra color verde indica los valores iniciales por la cepa en todas las condiciones de cultivo. Media \pm SD, n=3

La producción de PHB en los diferentes cultivos de la cepa PCC 6803 disminuyeron a lo largo del cultivo, mientras que en la cepa B6B se observaron valores más fluctuantes, ambos mostraron una distribución normal. Sin embargo, los porcentajes de PHB encontrados en la cepa PCC 6803 fueron en promedio hasta 8.6 veces mayor que los niveles obtenidos por la cepa B6B, encontrándose diferencias significativas ($p < 0.05$) en la producción de PHB entre cepas. Cabe señalar que los resultados de la producción de PHB por la cepa B6B no mostraron diferencias significativas en las condiciones de cultivo ($p > 0.05$), a excepción de la condición BG11 N- A+.

En el día 5, la producción más alta de PHB en la cepa B6B (Figura 28 A) se obtuvo en la condición BG11 N-G+ con un $0.98\% \pm 0.07$ PHB (w/w), seguido de BG11 N- con $0.87\% \pm 0.10$ PHB (w/w) y la condición en la que se obtuvo una menor producción de PHB fue en BG11 ($0.70\% \pm 0.13$ PHB (w/w)) y BG11 N- A+ ($0.63\% \pm 0.08$ PHB (w/w)). Las condiciones de limitación de nitrógeno con suplementación de fuentes de carbono fueron las que promovieron los niveles más altos de PHB en el día 10: $1.15\% \pm 0.14$ para BG11 N- G+ y $1.15\% \pm 0.06$ en BG11 N- A+, mientras que BG11 N- mostró una reducción del 54% de PHB con respecto al día 5. Cabe mencionar que en el día 15 los mayores porcentajes de PHB se obtuvieron en la condición de BG11 A+ ($1.18\% \pm 0.07$ PHB (w/w)), lo cual representa más del doble de lo obtenido en la condición BG11 N- G+ ($0.58\% \pm 0.1$ PHB (w/w)), condición que en los 10 días anteriores había sido la mayor producción de PHB. Por otro lado, en la condición BG11 se observó una reducción del 22.83%, con respecto al muestreo anterior.

Al día 20 es donde se obtuvo la mayor producción de PHB por la cepa B6B en la condición BG11 N- A+, al producir $2.1\% \pm 0.32$ PHB (w/w), que representa aproximadamente 3 veces más PHB obtenido con respecto al día 15 del experimento, en el mismo medio de cultivo. La siguiente condición fue BG11 N- G+ con $1.10\% \pm 0.06$ PHB (w/w) y BG11 N- con $0.95\% \pm 0.11$ PHB (w/w), los cuales aumentaron aproximadamente el doble con respecto al tiempo anterior.

La producción de PHB obtenido con la cepa control PCC 6803 (Figura 28 B) mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) en la condición BG11 A+. Al día 5, la producción de PHB se mantuvo alta en la condición BG11 N- con $7.37\% \pm 0.44$ PHB (w/w). Le siguen en producción la condición BG11 y BG11 N- G+ con $6.97\% \pm 0.23$ PHB (w/w) y $6.97\% \pm 0.19$ PHB (w/w), respectivamente. En la condición BG11 A+ la producción de PHB disminuyó cerca del 60% (4.79% PHB (w/w)) en los primeros 5 días del experimento. Posteriormente, los niveles de PHB bajaron cerca del 50% más en dicha condición (3.09% PHB (w/w)) identificándose a BG11 A+ como una condición no favorecedora para la producción de PHB en la cepa modelo. Sin embargo, al comparar estos niveles bajos con lo obtenido por la cepa B6B (0.61% PHB (w/w)) durante el mismo periodo de tiempo, encontramos que es superior en un 500%.

En general, la producción de PHB al día 15 disminuyó cerca del 50% con respecto al día 5 en todas las condiciones de cultivo con excepción de la condición BG11 N- G+ que se mantuvo con $6.64\% \pm 0.0$ PHB (w/w), 4% menos que al día 5. Por lo que BG11 N- G+ es la condición que mantuvo constante la producción de PHB a lo largo del experimento.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Caracterización molecular: región ribosomal 16S y región espaciadora ribosomal intergénica (ITS)

En el presente trabajo se utilizaron herramientas moleculares para avanzar en la identificación de la cianobacteria B6B, así como en su clasificación. Cepa colectada del Valle de los Cirios en Baja California y seleccionada como una potencial cepa productora de PHB. Las cianobacterias son el grupo de procariontes más complejo a nivel taxonómico y su clasificación representa un desafío ya que es difícil identificarlas solo por su morfología (Komárek et al., 2014). En este sentido, el uso de secuencias del gen 16S y secuencias ITS permanecen como herramientas importantes para la identificación y clasificación de cianobacterias (Iteman et al., 2000; Rocop et al., 2002). El alto porcentaje de identidad obtenido en las regiones ITS de la cepa B6B y la cepa modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803 anotada en la base de datos de NCBI (94.48%) corroboró su alta similitud con esta especie y en general con cianobacterias del género *Synechocystis*, donde se encontraron coberturas de hasta el 100%, valores E (e-value) de cero y porcentajes de identidad no menores de 83.01%. Esto coincide con lo reportado por Juteršek et al., (2017) donde los porcentajes de similitud entre cepas *Synechocystis* fueron a partir del 77%.

A través de los análisis moleculares se comprobó que la cepa B6B contiene una región ITS de 466 pb para la B6B, mientras que la cepa PCC 6803 tiene una ITS de 465 pb. Estos resultados coinciden con lo encontrado por Juteršek et al. (2017) quienes encontraron que el tamaño del fragmento ITS varía entre las especies del género *Synechocystis*. De las 10 especies de cepas *Synechocystis* analizadas por estos autores, solo la PCC 6803 y PCC 6714 tuvieron una ITS de 465 pb. Otras especies con tamaños similares fueron *Synechocystis salina* y *Synechocystis* sp. CCAP 1480/4 con 466 pb y 467 pb, respectivamente.

La región ITS es utilizada para diferenciar cepas entre géneros o especies en cianobacterias, a través del tRNA que codifican en dicha región (Lu et al., 1997; Berrendero, 2008). Korelusová et al. (2009) señalan que la cianobacteria PCC 6803 es la cepa de referencia para el género *Synechocystis*, por lo que los análisis realizados en este proyecto fueron basados en este organismo modelo. Las especies del género *Synechocystis* se caracterizan por poseer un tRNA de Isoleucina en la región inter-espaciadora ribosomal 16S-23S (Iteman et al, 2000). Al analizar dicha región de la cepa B6B y la cepa control PCC 6803 se encontró que ambas contienen una secuencia que codifica para el tRNA^{Ile}, lo cual concuerda con el tRNA^{Ile} identificado por Kaneko et al. (1996) en la región ITS de la cepa modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803. Esto nos indica que la cepa B6B podría ser una especie muy relacionada con la cepa PCC 6803. Además, coincide

con la cianobacteria *Spirulina* sp. PCC 6313 y 47 especies de *Microcystis* en codificar para el mismo RNA de transferencia (Sarma, 2012), sin embargo, presentan una morfología diferente a *Synechocystis*.

Debido a la variedad existente en las regiones ITS, la técnica de RFLP puede ser empleada para el análisis de patrones de digestión de secuencias específicas, permitiendo encontrar diferencias entre especies cercanas (Segura et al., 2010) sin tener que secuenciar los fragmentos. A través de los resultados mostrados en ensayos de electroforesis, los productos obtenidos por RFLP realizados previamente a la secuenciación de los fragmentos ITS de las cepas B6B y PCC 6803, mostraron que las cianobacterias cuentan con diferencias nucleotídicas dentro de esta región conservada, las cuales fueron visualizadas principalmente con la enzima *DdeI*. Estos resultados explican la diferencia en 31 bases entre los fragmentos ITS de la cepa B6B y la PCC 6803, evidenciado por la secuenciación de los fragmentos ITS amplificados y analizados en este trabajo.

Algunas características moleculares encontradas en este trabajo señalan la similitud entre la cepa B6B y PCC 6803, entre ellas son el hecho de que comparten un alto contenido de GC en su región ITS: 42.9% para B6B y 44.7% para PCC 6803 de la ATCC al igual que *Synechocystis* sp. PCC 6803 registrada en la base de datos de NCBI. Rippka et al. (1979) mencionan que las cianobacterias de este género suelen dividirse en dos grupos. El grupo de bajo porcentaje de GC (35% a 37%), las cuales presentan ciertas capacidades como el metabolismo fotoautótrofo como es el caso de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6308 (ahora *Geminocystis herdmanii* PCC 6308). Mientras que el grupo de las de alto porcentaje de GC (42% a 48%) son organismo fotoheterótrofos facultativos, entre otras características como la división celular y la morfología que presentan, por ejemplo, *Synechocystis* sp. PCC 6714. Korelusová et al. (2009) mencionan que la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 pertenece a la agrupación de % GC alto e indican que presentan división celular por fusión binaria perpendicular, como la mayoría de las cianobacterias pertenecientes al género *Synechocystis* (Rippka et al., 1979), coincidiendo con lo observado en este trabajo por la cepa B6B. Estas características moleculares presentes en las regiones ITS de B6B y PCC 6803 junto con las características morfológicas son evidencias que sugieren que la cepa B6B pertenece al género *Synechocystis*.

En el árbol filogenético de la región ITS que incluye a B6B con cianobacterias de diferentes géneros y especies (18 secuencias), se obtuvo un clado definido con porcentajes superiores al 90% para cianobacterias del género *Synechocystis*, donde la rama que las agrupa contó con un valor de soporte del 99%, confiriéndole certeza a la construcción. Por otro lado, se observaron porcentajes de identidad inferiores al 66.27% entre la B6B con cepas de otros géneros. Esto concuerda con lo reportado por Juteršek

et al. (2017), donde el clado de *Synechocystis* agrupó a las mismas cepas que este estudio: *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechocystis* sp. PCC 6714, *Synechocystis* salina CCALA 192, *Synechocystis* sp. CCAP 1480/4 y *Synechocystis* minúscula SAG 258.80, donde se mostró un valor de soporte del 100%. Dado que las especies del género *Synechocystis* forman un clúster único en los árboles filogenéticos (Korelusová et al, 2009), la cepa B6B muestra claramente una relación estrecha con las cianobacterias de este género.

Por otro lado, Rocap et al. (2002) y Korelusová et al. (2009), mencionan que en la región ITS se encuentran sitios importantes que permiten la diferenciación entre diferentes géneros como: dominios conservados (D1-D5, Caja B, Caja A), regiones variables (V1-V3), la estructura primaria y secundaria del RNA (Iteman et al., 2000), entre otros. Al momento de la transcripción, la región ITS le confiere características de maduración al RNA por las secuencias anti terminadoras Caja A y Caja B (Iteman et al., 2000), a su vez se sabe que estos sitios son muy conservados en ciertos organismos lográndose identificar las estructuras secundarias como un método de clasificación previa. Por lo que el análisis a futuro de las secuencias de estas regiones en la cepa B6B, completarán la caracterización como una cepa del género *Synechocystis*.

Al analizar los productos de secuenciación de la región 16S se encontró que la cepa B6B y PCC 6803 de la ATCC son idénticas en esta región ribosomal. Kim y Chun (2014) mencionan que la región 16S está altamente conservada entre cepas de la misma especie y puede ser utilizada para formar clados entre cianobacterias, ayudando a la clasificación de especies. Los resultados mostraron que la cepa B6B tuvo alto porcentaje de similitud con cianobacterias del género *Synechocystis* encontradas en la base de datos del NCBI, donde el valor más bajo fue con *Synechocystis* sp. IPPAS B-1207 (98.13%) mientras el más alto reconocido por la base de datos para la región 16S utilizada fue con *Synechocystis* sp. PCC 6803 clona b (99.69%) y 100% con la cepa PCC 6803 de la ATCC. Un aspecto importante a considerar es que incluso la cepa modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803 a la fecha solo ha sido identificada taxonómicamente hasta nivel de género (Juteršek et al., 2017), por lo que se requiere analizar más cepas y profundizar dichos análisis en las regiones variables dentro del 16S.

La construcción de un árbol filogenético con las regiones 16S de cianobacterias de diferentes especies y géneros (45 secuencias), confirmó que la cepa B6B se agrupa exclusivamente con el clado de *Synechocystis*. Los resultados mostraron altos porcentajes de identidad desde 100% (*Synechocystis* sp. PCC 6803 de ATCC), 99.68% (*Synechocystis* sp. PCC 6805, *Synechocystis* sp. PCC 6714 y *Synechocystis* sp. 6702) y 96.63% (*Synechocystis minuscula*) siendo el menor del clado. Con base en lo reportado por Sarma (2012), quien menciona que los valores aceptables de similitud en secuencias 16S van de 96-97%, por lo tanto, los resultados obtenidos son confiables para la agrupación de la cepa B6B.

Con base a los resultados obtenidos por la cepa B6B en ambas regiones ribosomales podemos establecer similitudes moleculares y capacidad de crecimiento fotoautótrofo con otras especies del género *Synechocystis*. Estos resultados junto con futuros análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM) sobre el arreglo de los tilacoides y otras estructuras celulares podrían contribuir a su identificación y clasificación a nivel de especie.

4.2 Curvas de crecimiento de las cianobacterias B6B y PCC 6803

El trabajo con cianobacterias que no se han identificado ni caracterizado anteriormente, implica que se deben realizar análisis para conocer y establecer parámetros que los describan, como son las curvas de crecimiento. Las curvas de crecimiento permiten identificar características del desarrollo celular a través de fases: adaptación, exponencial, lineal y estacionaria con respecto al tiempo y proporcionar información necesaria para su cultivo (Angermayr et al., 2015). En este caso llevar a cabo una curva de crecimiento a través de mediciones de DO_{730} y conteo celular, permitió obtener un mayor número de datos para la elaboración de las cinéticas de crecimiento de la cepa de estudio B6B y compararla con la cepa modelo PCC 6803.

Las curvas obtenidas por conteo celular permitieron identificar con mayor claridad las fases de crecimiento en medio BG11 en comparación con las curvas elaboradas por medición de densidad óptica. Al graficarlas en escala logarítmica se pudieron observar de manera definida la fase exponencial, lineal y estacionaria en ambas cianobacterias. Los resultados obtenidos indicaron que tanto la cepa B6B como la PCC 6803 comenzaron en una fase exponencial μ_2 de 1.36 para la cepa B6B y μ_2 de 0.91 sin tener una fase de adaptación previa, la coloración presentada fue de verde-azul característica de estas cianobacterias, la cual fue intensificándose con respecto al tiempo. Resultados similares se encontraron por Schuurmans et al. (2017), donde al estudiar los cambios fisiológicos presentados por la cepa *Synechocystis* sp. PCC 6803 al cambiar de fase exponencial a lineal, mencionan que la fase exponencial presentada por la cepa duró hasta el día 2 del cultivo con una DO_{730} de ~ 0.4 . Estos resultados fueron similares a lo encontrado en este estudio para la cepa PCC 6803, además de que no se encontraron diferencias significativas entre la cepa B6B y PCC 6803 (DO_{730} 0.32 de PCC 6803 y DO_{730} 0.30 de B6B, al día 2).

En cianobacterias fotótrofas es muy común observar el paso de la fase exponencial a lineal, ya que los fotones disponibles no pueden ser absorbidos de la misma manera, debido a la aglomeración de células, lo que retrasa su crecimiento (Sutherland et al., 1979; Du et al., 2016). Para el día 14 al 16 las tasas de crecimiento indicaron la entrada a la fase estacionaria con una μ_{14} de 0.02 para la cepa PCC 6803 (día 14) y μ_{16} de 0.07 (día 16) para B6B. Estos resultados son similares a lo encontrado por Esteves (2018), donde al estudiar la división celular de *Synechocystis* sp. PCC 6803, menciona que esta cepa llega a su fase estacionaria a partir de los días 8 – 14 en medio BG11, donde obtuvo tasas de crecimiento del 0.005, indicando disminución del desarrollo celular. Este autor menciona como posibles causas asociadas a este fenómeno: la falta de nutrientes, reducción de la disponibilidad de luz e incluso a la comunicación celular o “quorum sensing”, donde las células comparten información sobre la densidad celular llevando a cabo un ajuste en la expresión génica. Asimismo, Maruyama et al. (2012) encontraron que la cepa modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultivada en medio BG11 en condiciones de temperatura y pH iguales a las de este estudio, no pasó por una fase de adaptación y alcanzó la fase lineal aproximadamente hasta el día 10 del experimento.

Los resultados obtenidos en este trabajo también concuerdan con lo reportado por Villagómez (2017) realizado en condiciones similares de cultivo, temperatura y fotoperiodo donde *Synechocystis* sp. PCC 6803, terminó su fase lineal al día 14 con una tasa de crecimiento de 0.0098.

Por lo tanto, la fase de crecimiento lineal obtenida en este estudio tanto para las cepas B6B como para la PCC 6803 se explica por el aumento de biomasa que impide el aprovechamiento de la luz como fuente de energía, causando un retraso en su crecimiento (Schuurmans et al., 2017). Asimismo, se sabe que en estas condiciones se produce un ajuste del metabolismo del carbono para mantener el equilibrio entre generación y consumo de moléculas esenciales como el ATP y NADPH (Zhang y Song, 2018) involucradas en la fotosíntesis y respiración con TCA, dependientes de la luz (Xiong et al., 2017). Foster et al. (2006) analizaron la transcripción genética en la cepa modelo PCC 6803 durante la fase exponencial y lineal de su crecimiento. Los resultados mostraron que cerca de 328 genes son regulados durante la fase exponencial, mientras que en la fase lineal fueron alrededor de 156, donde las principales vías interrumpidas son la biosíntesis de cofactores involucrados en la transcripción genética, fotosíntesis y funciones regulatorias en general.

Las curvas de crecimiento fueron similares entre la cepa B6B y PCC 6803, sin embargo, al finalizar la fase exponencial-lineal el número total de células fue diferente ($66.44 \pm 0.95 [E10^6]$ células/ml para PCC 6803 y $70.15 \pm 0.16 [E10^6]$ células/ml para B6B) a pesar de iniciar teóricamente en DO_{730} iguales, por lo que se

sugiere que las diferencias de tamaño celular influyen en mediciones y cálculos de células/ml. Será importante realizar análisis con microscopía electrónica para comprobar tamaños y estructuras de las dos cianobacterias.

La construcción de curvas estándar a partir de mediciones de DO_{730} y conteo celular, permitieron realizar un ajuste lineal a los datos obtenidos. A partir de eso, la interpretación del comportamiento celular de la cianobacteria B6B con respecto a la cepa PCC 6803 pudo describirse mejor. Ambas curvas estándar mostraron varianzas homogéneas y las pendientes fueron estadísticamente similares, lo cual nos indicó que el agrupamiento de datos no mostró diferencias significativas entre las dos cepas, es decir, existe homocedasticidad entre la variable dependiente (mediciones DO_{730}) con respecto a la independiente (número de células/ml) (López y Fachelli, 2016). Sin embargo, al realizar los cálculos para el factor de proporcionalidad para estimar la producción de biomasa a partir de datos de DO_{730} específicos de cada curva, los resultados revelaron que cada cepa mantiene un factor individual, es decir, por cada DO_{730} de 0.2: la cepa PCC 6803 tiene $\sim 10.86 \text{ E}10^6 \pm 0.003$ células/ml, y la cepa B6B tiene $\sim 7.94 \text{ E}10^6 \pm 0.006$ células/ml. Lo anterior sugiere que ambas cianobacterias pudieran diferir en el tamaño celular, ya que el cultivo BG11 inició con la misma DO_{730} (0.188) y al ser cuantificadas por conteo se obtuvieron densidades celulares diferentes. Por otro lado, se sabe que *Synechocystis* sp. PCC 6803 puede variar su tamaño celular de acuerdo a las condiciones de cultivo y en consecuencia variar su velocidad de crecimiento y volumen de biomasa, es decir, entre más grandes son las células más rápido es su crecimiento y viceversa (Du et al., 2016). Esto se debe al mecanismo que controla proporcionalmente el tamaño celular con respecto a la cantidad proteínas/enzimas que la célula está produciendo (Amir, 2014; Zhang y Song, 2018), y dado que las condiciones de cultivo de las cianobacterias B6B y PCC 6803 fueron iguales, podríamos sugerir que cada cepa mantiene un tamaño celular diferente y, por lo tanto, las velocidades de crecimiento fueron diferentes.

4.3 Desarrollo celular de las cianobacterias B6B y PCC 6803 en respuesta a condiciones mixotróficas

A partir de los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento en condiciones mixotróficas, la cepa B6B reflejó ser más susceptible a las modificaciones del medio de cultivo con respecto a la cianobacteria PCC 6803. A pesar que ambas cepas comenzaron en DO_{730} similar ($DO_{730} = 1.3$, $\sim 62.33 \text{ E}10^6$ células/ml para la

cepa B6B y $DO_{730} = 1.24$, $\sim 67.33 \text{ E}10^6$ células/ml para PCC 6803) y estuvieron expuestas a las mismas condiciones de temperatura, luz y pH, las coloraciones de ambas cianobacterias se mostraron diferentes.

En los cultivos con limitación de nitrógeno y suplemento con fuentes de carbono (BG11 N- G+), se pudo observar que la cepa modelo PCC 6803 se mostraba con una coloración pálida, mientras que B6B se mostró de un café ocre, siendo un ejemplo de diferencias en la coloración a partir del día 5 hasta el 20. Sin embargo, en la condición de BG11 A+ ambas cepas coincidieron en mostrar una coloración verde intensa a partir del día 10 hasta el final del experimento, sugiriendo un aumento en la biomasa. Concordando con lo obtenido por Villagómez (2017), donde la cepa modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803 obtuvo una coloración verde-azul intensa en el medio BG11 suplementado con acetato, además coincidiendo en la coloración en condiciones de limitación de nitrógeno e incluso en combinación con acetato. Mock et al. (2019) mencionan que el blanqueamiento o palidez en la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 se debe a la falta de nitrógeno en el medio de cultivo, lo cual está relacionado con los niveles de α -cetoglutarato, empleada en el ciclo TCA en la cepa PCC 6803. Además, la limitación influye en la degradación de ficobilisomas, antenas recolectoras de luz encontradas en la superficie de la membrana tilacoidal, auxiliares en la fotosíntesis, las cuales son proteínas solubles y ricas en nitrógeno (Krasikov et al., 2012).

Mientras las cianobacterias se encuentren en limitación de nitrógeno, la degradación de ficobilisomas y los niveles de la enzima α -cetoglutarato aumentan simultáneamente. El aumento considerable provoca la formación del complejo PipX y NtcA (factores de transcripción), uniéndose a promotores que contengan genes como *amt1*, que promueven la absorción de nitrógeno, a su vez inhibiendo la expresión de genes como *gifB* y *gifA*, utilizados en el procesamiento del nitrógeno en la cepa PCC 6803 (García-Domínguez et al., 2000; Klähn et al., 2015). Además, Giner-Lamia et al. (2017) reportaron que NtcA está involucrado en la regulación de 79 diferentes genes encargados de la biosíntesis de aminoácidos en cianobacterias como *Synechocystis* sp. PCC 6803, y que pueden ser identificados desde una fase temprana en el crecimiento celular, por lo tanto, manipular el nitrógeno en medios de cultivo implica que procesos metabólicos primordiales se verán interrumpidos (Arisaka et al., 2019). Asimismo, Wobsese et al. (2011) mencionan en que la limitación de nitrógeno y luz en la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803, que ocasiona disminución de pigmentos como la clorofila *a*, carotenoides y ficocianina (Krasikov et al., 2012), esta última rica en nitrógeno. En este caso, la ficocianina tiende a ser degradada y utilizada como reserva de nitrógeno. Gracias a que posee una coloración azul intenso, la degradación de este pigmento causa la pérdida de la coloración verde-azul característica de las cianobacterias, volviéndose amarilla-café reflejando principalmente la presencia de carotenoides en las cianobacterias como: β -caroteno, xantofila, zeaxantina y equinenona (Takaichi et al., 2001). Esta respuesta colorimétrica al estrés por limitación de nitrógeno

prevé la sensibilidad de las células a la luz, causada por la degradación de los ficobilisomas, permitiendo que lleven a cabo actividades foto oxidativas (Miller et al., 2002).

Por lo tanto, el encontrar diferencias de coloración en la cepa B6B en comparación a la PCC 6803 en respuesta al estrés por limitación de nitrógeno solo o adicionando fuentes de carbono, sugiere que en ambas cepas ocurren procesos metabólicos diferentes para contender con la falta de nutrientes en el medio de cultivo. Será importante que a futuro se realicen análisis de pigmentos en cultivos con limitación de nitrógeno, así como análisis transcriptómicos para identificar los grupos de genes que se activan o silencian en comparación con la cepa modelo y con ello iniciar la caracterización de las vías metabólicas de la cepa B6B, en condiciones óptimas y mixotróficas.

Por otro lado, los cultivos que mostraron coincidencias en el desarrollo de biomasa en las cianobacterias B6B y la PCC 6803 fue en BG11 A+ con DO_{730} de 2.28 para B6B y DO_{730} 2.14 para PCC 6803 ambas al día 20, sin embargo, las tasas de duplicación señalaron que B6B comenzó su fase estacionaria ($t_d = 12.25 \text{ día}^{-1}$) mientras que la cepa PCC 6803 ($t_d = 4.83 \text{ día}^{-1}$) continuaba en un crecimiento lineal, diferenciándose ligeramente en la concentración celular. Por otro lado, la segunda condición mejor aprovechada fue BG11 donde ambas cepas se mostraban en fase exponencial debido a que sus tasas de crecimiento fueron mayores de cero ($\mu = 0.35$ para B6B y 0.27 para PCC 6803). Resultados similares se encontraron por Villagómez (2017), donde menciona que la obtención de biomasa por medio de la cepa *Synechocystis* sp. PCC 6803 en condiciones mixotróficas fue mejor en el medio BG11 A+ y BG11, con DO_{730} al día 20 de 2.7, en ambas condiciones, y sus tasas de duplicación fueron de 4.95 día^{-1} y 5.03 día^{-1} ($\mu = \sim 0.19$), respectivamente. Se sabe que fuentes de carbono como el acetato son bien aprovechados por las cianobacterias, ya que promueve la formación de compuestos como el Acetil-CoA aumentando la disponibilidad de piruvato (Zhou et al., 2014), que es uno de los precursores importantes en el metabolismo de las cianobacterias. El catabolismo del acetato hasta acetil-CoA ocurre en el TCA dentro de la cianobacteria PCC 6803, por medio de la enzima acetil-CoA sintetasa expresada por el gen *acs* o de manera alternativa la combinación de acetato quinasa (*ackA*) y fosfotransacetilasa (*pta*) (Thiel et al., 2017; Zhang y Song, 2018). Por lo que su uso se verá reflejado en el crecimiento celular, síntesis de aminoácidos, síntesis de glucógeno, metabolismo de ácidos grasos y reservas energéticas como el PHB, entre otras (Carpine et al., 2017; Xiong et al., 2017; Esteves, 2018).

Por otro lado, la condición menos aprovechada en este estudio fue BG11 N- G+ donde la cepa B6B mostró una curva descendente a lo largo del experimento con DO_{730} de 1.29 (día 15) a DO_{730} 1.13 (día 20), mientras que para la cepa PCC 6803 su crecimiento fue aumentando ligeramente en los últimos 5 días del

experimento: de DO_{730} 1.19 a DO_{730} 1.37, observándose claramente que esta condición no favoreció el desarrollo de biomasa para la cepa B6B. No obstante, los valores de las tasas de crecimiento señalaban que ambas cepas se encontraban en la fase estacionaria, con valores de $\mu_{20} < 0$, por lo que se asumía que la glucosa disponible se estaba aprovechando como reserva de energía. Sin embargo, al analizar los datos encontrados en la condición BG11 N-, los valores de crecimiento celular se vieron comprometidos para la cepa B6B (DO_{730} de 0.95 con $\mu_{15} = 0.05$), mientras que fue favorecedor para la cepa modelo PCC 6803 (DO_{730} de 1.52 con $\mu_{15} = 0.10$). Por lo tanto, el efecto de la limitación de nitrógeno compromete el crecimiento celular significativamente en la cepa B6B. Sin embargo, la condición con mayor producción de PHB en la cepa B6B fue en el medio BG11 con limitación de nitrógeno y adicionada con acetato (BG11 N-A+). Wu et al. (2001) reportaron un comportamiento similar por parte de la cepa modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803, donde su análisis en condiciones mixotróficas (BG11 N- G+) mostraron fluctuaciones en el desarrollo de biomasa, indicando que la glucosa disponible era aprovechada para sintetizar reservas de carbono como glucógeno, PHB, etc. (Xiong et al., 2017).

Se sabe que los efectos en el crecimiento de las cianobacterias se ven comprometido al estar en un medio limitante de nitrógeno, sin embargo, este efecto también se refleja en el metabolismo del carbono. El carbono es naturalmente fijado durante la fase oscura por el Ciclo de Calvin, sin embargo, al disponer de una fuente directa de carbono: la glucosa, vías como Embden Meyerhoff Parnas y la vía oxidativa de las pentosas fosfato, se encargan de metabolizarla hasta obtener piruvato con el cual se produce: ATP y NADH, moléculas esenciales para el funcionamiento celular (Chen et al., 2016; Kanno et al., 2017). Sin embargo, Osanai et al. (2007) al analizar el transcriptoma de la cepa modelo *Synechocystis* en condiciones BG11 N-, mencionan que los RNAm de genes de la glucólisis (*gap1* y *pyk1*), de la vía pentosas fosfatos (*zwf*, *opcA* y *tal*) y del catabolismo del glucógeno (*glgX* y *glgP*) incrementaron su expresión al doble comparado con lo obtenido en la condición de BG11. Incluso se sabe que de los nueve factores sigma que conforman a la RNA polimerasa en la cepa modelo, *sigE* (regulado por NtcA) controla el ritmo circadiano de las cianobacterias, dependientes de las señales de luz/oscuridad. A su vez, regula positivamente la expresión de genes catabólicos del azúcar (Osanai et al. 2006).

Por lo que los resultados de crecimiento y coloración en las condiciones de limitación de nitrógeno solas o en adición con glucosa o acetato por parte de la cepa B6B, revelan que las fuentes de carbono disponibles en el medio de cultivo son principalmente utilizadas para reponer la demanda energética que las células presentan al estar limitadas de nitrógeno, donde posiblemente los tiempos de oscuridad en la cepa B6B no fueron suficientes para satisfacer la fijación de carbono y en consecuencia el crecimiento celular no fue favorecido, sino aprovechados como metabolitos precursores como el acetyl-CoA (Xiong et al., 2017).

Por lo tanto, aunque las condiciones de cultivo hayan mostrado similitud en la coloración o tendencias en las cinéticas de crecimiento, analizar los procesos de transcripción, mediciones de pigmentos, entre otras, complementarán el estudio del aprovechamiento de fuentes de carbono y en general, la respuesta metabólica por parte de la cepa B6B.

4.4 Producción de PHB por las cepas B6B y PCC 6803 en condiciones mixotróficas

La producción de PHB en medio BG11 no mostró diferencias significativas entre lo obtenido por la cepa PCC 6803 con respecto a B6B. De antemano se sabe que la producción de PHB es promovida por la ausencia de elementos como el nitrógeno, fósforo e incluso oxígeno (Panda y Mallick, 2006; Anfelt y et al., 2015; Carpine et al., 2018). Los resultados obtenidos al cultivar a las cianobacterias B6B y PCC 6803 en condiciones mixotróficas mostraron que los niveles de PHB obtenidos en los 20 días de experimentación fueron significativamente diferentes.

Partiendo de cultivos en fase exponencial tardía en medio BG11, la cepa B6B produjo menos del 25% de lo obtenido por PCC 6803 (7.7% PHB (w/w)) al inicio del experimento, por lo que asumimos que la cepa B6B no produce altas concentraciones de PHB debido que se encontraba en fase exponencial-lineal ($\mu = 0.21$). Schuurmans et al. (2017) mencionan que los efectos del crecimiento en fase exponencial-lineal de la cepa *Synechocystis* sp. PCC 6803 se ve afectado por la limitación de luz, no obstante, al realizar pruebas en donde aumentaban el nivel de luz, se encontraron con que la cepa prologa su fase lineal (Foster et al., 2007). Sin embargo, al limitar de CO₂ la atmósfera de los cultivos, rápidamente notaron que la cepa entra en fase estacionaria. Por lo que de acuerdo a lo obtenido por la cepa B6B, se sugiere que al estar en una fase de crecimiento lineal la fijación de carbono fue utilizaba principalmente para continuar realizando procesos de desarrollo celular y no principalmente de almacenamiento. Sugerimos que en un futuro se realicen pruebas de extracción de PHB cuando la cepa se encuentre en fase estacionaria, para así comparar los estados celulares en donde se pueda obtener mayor producción del biopolímero.

Los cálculos de producción de PHB presentados en este trabajo para la cepa B6B y PCC 683 fueron con base al peso seco total, debido a que el material orgánico de las muestras fue calcinado en su totalidad por ser una cianobacteria de agua dulce y no poseer muchas sales. Esto impidió comparar la producción de PHB de la cepa B6B directamente con literatura y en cambio se realizó una comparación indirecta a

través de los niveles obtenidos por la cepa PCC 6803 y lo reportado en literatura en las condiciones estudiadas.

Así, al analizar la producción de PHB por la cepa B6B en medio BG11, se encontró que sintetizó menos del 10% en comparación con la cepa modelo PCC 6803 4.49% PHB (w/w) al día 15. Resultados similares fueron encontrados por Panda et al. (2006) para la cepa *Synechocystis* sp. PCC 6803, ya que reportaron que la obtención de PHB en se da mayormente en la fase estacionaria en medio BG11 aproximadamente a partir del día 20, con una producción de 4.5% PHB (w/w).

Con el transcurso del tiempo, la biosíntesis de PHB por la cepa B6B varió entre condiciones de cultivo a partir del día 10, pero no fue significativa. Sin embargo, los medios de cultivo en los cuales se encontraron con mejores resultados fueron en: BG11 N- A+ y BG11 N- G+, ambos con un 1.15 %PHB (w/w). En estas condiciones la producción de biomasa disminuyó significativamente, mientras que las condiciones en las que aumentó (BG11 A+ y BG11) la producción de PHB decreció. Este comportamiento donde la producción de biomasa es inversamente proporcional a la producción de PHB se pudo observar también en la cepa modelo PCC 6803, donde al día 15 del ensayo las condiciones en las que se obtuvo mayor %PHB fue en BG11 N- (5.0% PHB (w/w)) y BG11 N- G+ (6.64% PHB (w/w)). Resultados similares fueron encontrados por Villagómez (2017) donde la producción de PHB por la cepa PCC 6803 fue promovida en BG11 por la limitación de nitrógeno con 7.62% PHB (w/w), mientras que en combinación con suplemento de glucosa se obtuvo 7.93% PHB (w/w), y en ambas condiciones de cultivo la biomasa se observaron valores bajos.

Se sabe que el crecimiento celular se deteriora al entrar en condiciones de estrés, ya que, al no contar con los nutrientes necesarios como el nitrógeno, el medio de cultivo afecta el equilibrio biológico de la cepa llevándola a un estado de producción de reservas de carbono, crecimiento lento o incluso provocando la muerte prematura (Hondo et al., 2015), lo que podría explicar la postura que mostraron las cianobacterias de este trabajo.

Además, se conoce que tanto el acetato como la glucosa promueven la acumulación de PHB en la cianobacteria modelo *Synechocystis* durante la fase oscura (Panda y Mallick, 2006). Resultados obtenidos por Wu et al. (2002) comprueban dicho comportamiento. Ellos mencionan que la cepa PCC 6803 produjo mayor contenido de PHB en medio BG11 N- A+ con respecto a BG11 N- G+, 15.2% PHB (w/w) y 2.2% PHB (w/w) durante los primeros 5 días de cultivo, respectivamente. Aclarando que la glucosa beneficia a la cepa en el desarrollo de biomasa, pero no en el acumulamiento significativo de PHB. Mientras que el

acetato beneficia la acumulación del biopolímero con o sin limitante de nitrógeno (Sudesh et al., 2002), como lo observamos en la cepa B6B.

Por lo tanto, las condiciones de cultivo utilizadas en este estudio nos permitieron observar que el nivel de producción por la cepa B6B fue totalmente diferente en comparado con la modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803. No obstante, la cianobacteria B6B presentó las características de blanqueo, disminución de biomasa y bioacumulación de reservas de carbono que se sabe son utilizadas como fuente principal para el desarrollo de biomasa (Yu et al., 2013). Como lo mencionan Carpine et al. (2017) y Abrantes (2018): los mecanismos encontrados en las cianobacterias son encargados de asignar los recursos disponibles a las vías metabólicas para controlar el crecimiento y acumulación de reservas de carbono, y con ello asegurar la subsistencia celular. No se descarta que en otras condiciones no examinadas en este trabajo pudieran promover una mayor producción del biopolímero en la cepa B6B.

Capítulo 5. Conclusiones

Los análisis moleculares realizados mostraron que las cepas B6B y PCC 6803 contienen una región ITS de 466 pb y 465 pb, respectivamente y se diferencian en 21 nucleótidos. El ensayo de RFLP de esta región permitió diferenciar a las dos cepas con base en los tamaños de los fragmentos obtenidos con la enzima *DdeI* sin necesidad de secuenciar la región.

Los análisis bioinformáticos de la región ITS mostraron que la cianobacteria B6B comparte una identidad del 94.48% con la cepa modelo PCC 6803 y otras cepas del mismo género, además de codificar para un tRNA^{lle} y presentar un alto porcentaje de GC (42.9%) lo que la ubica en el género *Synechocystis*. Por otro lado, la región rRNA 16S de B6B mostró ser 100% idéntica con la cepa modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803 por lo que el árbol filogenético realizado con 45 secuencias de rRNA16S agrupó a la cepa B6B con el clado de *Synechocystis*. Estos datos junto con el parecido morfológico de ambas cepas al ser unicelulares, fotótrofas y presentar división celular por fusión binaria perpendicular confirmó la pertenencia de la cepa B6B con cianobacterias de este género, así como su cercanía a la cepa PCC 6803.

El comportamiento de la curva de crecimiento de la cepa B6B fue similar al de la cepa PCC 6803, sin embargo, presentaron diferencias en las cinéticas de crecimiento obtenidas de la fase exponencial ($\mu_{\max} = 1.36$ para B6B y $\mu_{\max} = 0.91$ para PCC 6803). Los factores de proporción obtenidos par ambas cepas permitirán calcular en ensayos futuros el número de células/ml a partir de datos de DO_{730} ($DO_{730} 0.2 = 7.94 E10^6 \pm 0.006$ células/ml para B6B y DO_{730} de 0.2 = $10.86 E10^6 \pm 0.003$ células/ml para PCC 6803).

La cepa *Synechocystis* B6B produjo de manera natural el biopolímero PHB aun en medio BG11, lo que realza la importancia de la bioprospección de cianobacterias en ambientes regionales de Baja California para encontrar otras opciones de cepas productoras de biopolímeros con nuevas propiedades y sin las restricciones de uso de las cepas modelo.

Los cultivos con limitación de nitrógeno solo o adicionado con glucosa o acetato en las cepas B6B y PCC 6803 presentaron bajo crecimiento y blanqueamiento. Esto sugiere ajustes metabólicos para la obtención de nitrógeno a partir de componentes relacionados con los pigmentos, como se ha observado en la cepa modelo PCC 6803.

La producción de biomasa mostró ser inversamente proporcional a la producción de PHB en ambas cepas.

El medio BG11 suplementado con acetato fue la condición óptima para el desarrollo de biomasa en la cepa B6B, donde se obtuvo un peso seco total de 1040.24 $\mu\text{g/ml}$ que corresponde a un 50% más del peso seco obtenido por la cepa PCC 6803, durante la fase exponencial.

Las condiciones de cultivo mixotróficas que promovieron los mayores niveles de PHB en la cepa B6B fueron BG11 N- G+ con 1.10% PHB (w/w) y BG11 N- A+ con 2.09% PHB (w/w). Sin embargo, los niveles obtenidos por la cepa B6B fueron alrededor del 25% menores a los obtenidos en la cepa PCC 6803. Estos resultados sugieren la activación de vías metabólicas para el uso de las fuentes de carbono adicionales para la producción de reserva de carbono, como el PHB.

Literatura citada

- Abed, R.M.M., Dobretsov, S., Sudesh, K., 2009. Applications of cyanobacteria in biotechnology R.M.M. Abed¹, S. Dobretsov² and K. Sudesh³ 1. *Journal of Applied Microbiology* 106. (1), 1-12.
- Abrantes, E. F. A., 2018. Identification of growth limiting factors in *Synechocystis* sp. PCC 6803. National University of Ireland, Galway: <http://hdl.handle.net/10379/7139>.
- Alam, O., Billah, M., Yajie, D., 2018. Characteristics of plastic bags and their potential environmental hazards. *Resources, Conservation and Recycling*. 132,121-129. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2018.01.037>.
- Amir, A., 2014. Cell Size Regulation in Bacteria. *Physical review letters*. 112, 208102. DOI: 10.1103/PhysRevLett.112.208102.
- Angermayr, S.A., Gorchs, R. A., Hellingwerf, K. J., 2015. Metabolic engineering of cyanobacteria for the synthesis of commodity products. *Trends in Biotechnology*. 33 (6), 352-361. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.03.009>
- Arisaka, S., Terahara, N., Oikawa, A., Osanai, T., 2019. Increased polyhydroxybutyrate levels by *ntcA* overexpression in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Algal Research*. 41, 101565. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101565>.
- Arredondo-Vega, B. O., Voltolina, D., 2007. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. 2, 21-29.
- Arredondo-Vega B. O., Voltolina D., 2007. Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. 22–26.
- Balaji, S., Gopi, K., Muthuvelan, B., 2013. A review on production of poly β hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. *Algal Research*. 2 (3), 278-285. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2013.03.002>
- Berrendero, G. E., 2008. Caracterización morfológica, genética y fisiológica de cianobacterias dominantes en sistemas fluviales. Tesis de doctorado en ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. 220-246.
- Bhati, R., Samantaray, S., Sharma, L., Mallick, N., 2010. Poly- β -hydroxybutyrate accumulation in cyanobacteria under photoautotrophy. *Biotechnology Journal*. 5 (11), 1181-1185. DOI 10.1002/biot.201000252
- Brito, A., Ramos, V., Mota, R., Lima, S., Santos, A., Vieira, J., Vieira, C. P., Kaštrovský, J., Vasconcelos, V. M., Tamagnini, P., 2017. Description of new genera and species of marine cyanobacteria from the Portuguese Atlantic coast. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 111, 18-34. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2017.03.006>.

- Carpine, R., Du, W., Olivieri, G., Pollio, A., Hellingwerf, K. J., Marzocchella, A., Dos Santos, F. B., 2017. Genetic engineering of *Synechocystis* sp. PCC6803 for poly- β -hydroxybutyrate overproduction. *Algal Research*. 25, 117-127. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.013>
- Carpine, R., Raganati, F., Olivieri, G., Hellingwerf, K. J., Pollio, A., Salatino, P., Marzocchella, A., 2018. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by *Synechocystis* PCC6803 from CO₂: Model development. *Algal Research*. 29, 29-60. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.011>
- Castenholz, R. W., Wilмотte, A., Herdman, M., Rippka, R., Waterbury, J. B., Itean, I., Hoffmann, L., 2001. Phylum BX. Cyanobacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 473-599. DOI: https://doi.org/10.1007/978-0-387-21609-6_27.
- Chen, G. Q., Jiang, X. R., 2018. Engineering microorganisms for improving polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*. 53, 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.10.008>
- Chen, X., Schreiber, K., Appel, J., Makowka, A., Fähnrich, B., Roettger, M., Hajirezaei, M. R., Sönnichsen, F. D., Schönheit, P., Martin, W. F., Gutekunst, K., 2016. The Entner–Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 113 (19), 5441-5446. www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1521916113/-/DCSupplemental.
- Chiaromonte, S., Giacometti, G. M., Bergantino, E., 1999. Construction and characterization of a functional mutant of *Synechocystis* 6803 harbouring a eukaryotic PSII-H subunit. *European Journal of Biochemistry*. 260 (3): 833-843. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00226.x.
- Cirés, G. S., Quesada de Corral, Antonio., 2011. Catálogo de cianobacterias planctónicas potencialmente tóxicas de las aguas continentales españolas. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. España.
- Demoulin, C. F., Lara, Y. J., Corneta, L., François, C., Baurain, D., Wilмотte, A., Javauxa, E. J., 2019. Cyanobacteria evolution: Insight from the fossil record. *Free Radical Biology and Medicine*. 140, 206-223. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.007>.
- Dennis, K., 2019. Cyanobacteria endospores (*Dermocarpa* sp.), TEM. Science Photo Library.
- Du, W., Jongbloets, J. A., Pineda, H. H., Bruggeman, F. J., Hellingwerf, K. J., Branco dos Santos, F., 2016. Photonfluxostat: A method for light-limited batch cultivation of cyanobacteria at different, yet constant, growth rates. *Algal Research*. 118–125: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.10.004>.
- Dutt, V., Srivastava, S., 2018. Novel quantitative insights into carbon sources for synthesis of polyhydroxybutyrate in *Synechocystis* PCC 6803. *Photosynthesis Research*. 136 (3), 303-314. DOI 10.1007/s11120-017-0464-x
- Esteves, A. A., 2018. Identification of growth limiting factors in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Tesis de Doctorado en Filosofía. Plant and AgriBiosciences Research Centre. 142 pp.

- Evans, K., 2015. Cell Division: Z Marks the Spot. Microbiology. University of New Hampshire.
- Foster, J. S., Singh, A. K., Rothschild, L. J., Sherman, L. A., 2006. Growth-phase dependent differential gene expression in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and regulation by a group 2 sigma factor. Archives of Microbiology. 187, 265-279. DOI 10.1007/s00203-006-0193-6.
- García-Domínguez, M., Reyes, J. C., Florencio, F. J., 2000. NtcA represses transcription of *gifA* and *gifB*, genes that encode inhibitors of glutamine synthetase type I from *Synechocystis* sp. PCC 6803. Molecular Microbiology. 35(5), 1192-1201. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.01789.x.
- Giner-Lamia, J., Robles-Rengel, R., Hernández-Prieto, M. A., Muro-Pastor, M. I., Florencio, F. J., Futschik, M. E., 2017. Identification of the direct regulon of NtcA during early acclimation to nitrogen starvation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Nucleic Acids Research. 45 (20), 11800–11820. doi: 10.1093/nar/gkx860.
- González, G. Y., Meza, C. J. C., González, R. O., Córdova, L. J. A., 2013. Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. Revista internacional de contaminación ambiental 29(1), 77-115.
- Hondo, S., Takahashi, M., Osanai, T., Matsuda, M., Hasunuma, T., Tazuke, A., Nakahira, Y., Chohnan, S., Hasegawa, M., Asayama, M., 2015. Genetic engineering and metabolite profiling for overproduction of polyhydroxybutyrate in cyanobacteria. Bioscience and Bioengineering. 120 (5), 510-517. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.03.004>
- Iteman, I., Rippka, R., De-Marsac, N. T., Herdman, M., 2000. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA–23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. Microbiology. 146, 1275–1286. DOI: 10.1099/00221287-146-6-1275
- Juhling, F., Mori, M., Hartmann, Roland K., Sprinzi, M., Sradler, P. F., Putz, J., 2008. tRNADB 2009: compilation of tRNA sequences and tRNA genes. Nucleic Acids Research. 37, 159-162. DOI:10.1093/nar/gkn772.
- Juteršek, M., Klemenčič, M., Dolinar, M., 2017. Discrimination between *Synechocystis* members (Cyanobacteria) based on heterogeneity of their 16S rRNA and ITS regions. Acta Chimica Slovenica. 64 (4), 804-817. DOI: <https://doi.org/10.17344/acsi.2017.3262>
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Suguira, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., Tabata, S., 1996. Sequence Analysis of the Genome of the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. II. Sequence Determination of the Entire Genome and Assignment of Potential Protein-coding Regions. DNA Research 3 (3), 109-136.
- Kanno, M., Carroll, A. L., Atsumi, S., 2017. Global metabolic rewiring for improved CO₂ fixation and chemical production in cyanobacteria. Nature Communications. 8, 1-11. DOI: 10.1038/ncomms14724

- Khanna, S., Srivastavam A. K., 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*. 40 (2), 607-619. doi:10.1016/j.procbio.2004.01.053
- Khetkorn, W., Incharoensakdi, A., Lindblad, P., Jantaro, S., 2016. Enhancement of poly-3-hydroxybutyrate production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 by overexpression of its native biosynthetic genes. *Bioresource Technology*. 214, 761–768. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.014>
- Kim, M., Chun, J., 2014. 16S rRNA Gene-Based Identification of Bacteria and *Archaea* using the EzTaxon Server. *Methods in Microbiology* 41 (4), 61-74. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mim.2014.08.001>
- Klähn, S., Schaal, C., Georg, J., Baumgartner, D., Knippen, G., Hagemann, M., Muro-Pastor, A. M., Hess, W. R., 2015. The sRNA NsiR4 is involved in nitrogen assimilation control in cyanobacteria by targeting glutamine synthetase inactivating factor IF7. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 112 (45). <https://doi.org/10.1073/pnas.1508412112>.
- Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J., Johansen, J. R., 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 86, 295-335.
- Korelusová, J., Kastovský, J., 2009. Heterogeneity of the cyanobacterial Genus *Synechocystis* and description of a new Genus, *Geminocystis*. *Phycological Society of America*. 45, 928–937. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2009.00701.x
- Krasikov, V., Wobeser, E. A., Dekker, H. L., Huisman, J. Y Matthijs, H. C. P., 2012. Time-series resolution of gradual nitrogen starvation and its impact on photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Physiologia Plantarum*. 145 (3), 426-439. doi:10.1111/j.1399-3054.2012.01585.x.
- López, C. A., 2010. Cyanobacterial diversity in extreme environments in Baja California, Mexico: a polyphasic study. *International Microbiology*. 4, 227-236. DOI 10.1007/s10123-001-0042-z
- López, R. P., Fachelli, S., 2016. Metodología de la Investigación Social Cuantitativa. Universidad Autónoma de Barcelona: <https://ddd.uab.cat/record/163568>.
- Lu, W., Evans, E. H., McColl, S. M., Saunders, V. A., 1997. Identification of cyanobacteria by polymorphisms of PCR-amplified ribosomal DNA spacer region. *FEMS Microbiology Letters*. 153 (1), 141–149. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10475.x>
- Martínez-Gutiérrez, C. A., Latisnere-Barragán, H., García-Maldonado, J. Q., López-Cortés, A., 2018. Screening of polyhydroxyalkanoate producing bacteria and PhaC-encoding genes in two hypersaline microbial mats from Guerrero Negro, Baja California Sur, Mexico. *Peer J-Life and Environment*. 2-19. DOI:10.7717/peerj.4780.
- Maruyama, M., Nishiguchi, H., Toyoshima, M., Okahashi, N., Matsuda, F., Shimizu, H., 2019. Time-resolved analysis of short-term metabolic adaptation at dark transition in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 128 (4), 424-428. doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.03.016.

- Miller, S. R., Martin, M., Touchton, J., Castenholz, R.W., 2002. Effects of nitrogen availability on pigmentation and carbon assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain SH-94–5. *Archives of Microbiology*. 177, 392-400. DOI 10.1007/s00203-002-0404-8
- Mo, H., Xie, X., Zhu, T., Lu, X., 2017. Effects of global transcription factor NtcA on photosynthetic production of ethylene in recombinant *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnology for Biofuels*. 10, 145. DOI 10.1186/s13068-017-0832-y
- Mock, M., Schmid, A., Bühler, K., 2019. Photoautotrophic production of succinate via the oxidative branch of the tricarboxylic acid cycle influences glycogen accumulation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Algal Research*. 43, 101645. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101645>.
- Osanai, T., Azuma, M., Tanaka, K., 2007. Sugar catabolism regulated by light- and nitrogen-status in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 6, 508-514. DOI: 10.1039/b616219n.
- Osanai, T., Imamura, S., Asayama, M., Shirai, M., Suzuki, I., Murata, N., Tanaka, K., 2006. Nitrogen Induction of Sugar Catabolic Gene Expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Research*: 13, 185-195. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsl010>.
- Namakoshi, K., Nakajima, T., Yoshikawa, K., Toya, Y., Shimizu, H., 2016. Combinatorial deletions of *glgC* and *phaCE* enhance ethanol production in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Biotechnology*. 239, 13-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.09.016> 0168-1656
- Panda, B., Mallick, N., 2006. Enhanced poly-β-hydroxybutyrate accumulation in a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Letters in Applied Microbiology*. 44 (2), 194-198. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.02048.x
- Panda, B., Jain, P., Sharma, L., Mallick, N., 2006. Optimization of cultural and nutritional conditions for accumulation of poly-β-hydroxybutyrate in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Bioresource Technology*. 97 (11), 1296-1301. doi:10.1016/j.biortech.2005.05.013
- Pérez-Rivero, C., López-Gómez, J. P., Roy, I., 2019. A sustainable approach for the downstream processing of bacterial polyhydroxyalkanoates: State-of-the-art and latest developments. *Biochemical Engineering Journal*. 150, 107-283. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107283>.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., Stanier, R. Y., 1979. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General MicrobioZogy*. 111, 1-61.
- Rocap, D., Distel, D. L., Waterbury, J. B., Chisholm, S. W., 2002. Resolution of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* Ecotypes by Using 16S-23S Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Sequences. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (3), 1180–1191. DOI: 10.1128/AEM.68.3.1180–1191.2002.

- Sambrook, J., Russell, D. W., 2006. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. Cold Spring Harb Protoc. DOI:10.1101/pdb.prot4455.
- Sánchez-Baracaldo, P., 2015. Origin of marine planktonic cyanobacteria. Nature. <https://doi.org/10.1038/srep17418>
- Sagong, H-Y., Francis, S. H., Young, C. S., Yup, L. S., Kim, K.-J., 2018. Structural Insights into Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis. Trends in Biochemical Sciences. 43 (10), 790-805. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.08.005>
- Sarma, T. A., 2012. Handbook of Cyanobacteria. Patiala (Punjab), India. CRC Press.
- Schuurmans, R. M., Matthijs, J. C. P., Hellingwerf, K. J., 2017. Transition from exponential to linear photoautotrophic growth changes the physiology of *Synechocystis* sp. PCC 6803. Photosynth Research. 132, 69–82. DOI 10.1007/s11120-016-0329-8.
- Shih, P. M., Wu, D., Latifi, A., Axen, S. D., Fewer, D. P., Talla, E., Calteau, A., Cai, F., Tandeau de Marsac, N., Rippka, R., Herdman, M., Sivonen, K., Coursin, T., Laurent, T., Goodwin, L., Nolan, M., Davenport, K. W., Han, C. S., Rubin, E. M., Eisen, J. A., Woyke, T., Gugger, M., Kerfeld, C. A., 2013. Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. Proceedings of the National Academy of Sciences. 110 (3), 1053-1058 DOI: 10.1073/pnas.1217107110.
- Singh, A. K., Mallick, N., 2017. Advances in cyanobacterial polyhydroxyalkanoates production. FEMS Microbiology Letters. 364, (40) 1-13. DOI: 10.1093/femsle/fnx189
- Singh, S. P., Rastogi, R. P., Haider, D-P., Sinha, R. P., 2011. An improved method for genomic DNA extraction from cyanobacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 27:1225–1230. DOI 10.1007/s11274-010-0571-8.
- Stanier, R. Y., Sistrom, W. R., Hansen, T. A., Whitton, B. A., Castenholz, R. W., Pfennig, N., Gorlenk, V. N., Kondratieva, E. N., Eimhjellen, K. E., Whittenbury, R., Gherna, R. L., Truper, H. G., 1978. Proposal to Place the Nomenclature of The Cyanobacteria (Blue-Green Algae) Under the Rules of The International Code of Nomenclature of Bacteria. International Journal of Systematic Bacteriology. 28 (2), 335-336. <https://doi.org/10.1099/00207713-28-2-335>
- Stein, J. R., Hellebust, J. A., Craigie, J. S., 1973. Handbook of Phycological Methods: Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press. Estados Unidos.
- Stettner, A. I., Segrè, D., 2013. The cost of efficiency in energy metabolism. Proceedings of the National Academy of Sciences. 110 (24), 9629-9630. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1307485110
- Sudesh, K., Tagachi, Z., Doi, Y., 2002. Effect of increased PHA synthase activity on polyhydroxyalkanoates biosynthesis in *Synechocystis* sp. PCC6803. International Journal Biological Macromolecules Structural, Function and Interactions. 30, 97-104. DOI: 10.1016/s0141-8130(02)00010-7.

- Sutherland, J. M., Herdman, M., Stewart, W. D. P., 1979. Akinetes of the Cyanobacterium *Nostoc* PCC 7524: Macromolecular Composition, Structure and Control of Differentiation. *Journal of General Microbiology*. 115, 273-287.
- Takaichi, S., Maoka, T., Masamoto, K., 2001. Myxoxanthophyll in *Synechocystis* sp. PCC 6803 is Myxol 2'-Dimethyl-Fucoside, (3R,2'S)-Myxol 2'-(2,4-di-O-Methyl- α -L-Fucoside), not Rhamnoside. *Plant and Cell Physiology*: 42 (7), 756–762. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce098>.
- Takeya, M., Iijima, H., Sukigara, H., Osanai, T., 2017. Cluster-Level Relationships of Genes Involved in Carbon Metabolism in *Synechocystis* sp. PCC 6803: Development of a Novel Succinate-Producing Strain. *Plant Cell Physiol*. 59 (1), 72-81. doi:10.1093/pcp/pcx162
- Teh, A-H., Chiam, N-C., Furusawa, G., Sudesh, K., 2018. Modelling of polyhydroxyalkanoate synthase from *Aquitalea* sp. USM4 suggests a novel mechanism for polymer elongation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 119, 438-445. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.147>
- Thiel, K., Vuorio, E., Aro, E., Kallio, P. 2017. The effect of enhanced acetate influx on *Synechocystis* sp. PCC 6803 metabolism. *Microbial Cell Factories*. 16, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0640-x>.
- Tidgewell, K., Clark, B. R., Gerwick, W. H., 2010. The Natural Products Chemistry of Cyanobacteria. *Chemistry, Molecular Science and Chemical Engineering*. 2, 141-188.
- Troschl, C., Meixner, K., Fritz, I., Leitner, K., Palacios, R. A., Kovalcik, A., Sedlacek, P., Drosig, B., 2018. Pilot-scale production of poly- β -hydroxybutyrate with the cyanobacterium *Synechocystis* sp. CCALA192 in a non-sterile tubular photobioreactor. *Algal Research*. 34, 116-125. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.07.011>
- Urtuvia, V., Villegas, P., González, M., Seeger, M., 2014. Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*. 70, 208-213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.001>
- Villagómez, A. A. L., 2017. Expresión de los genes piruvato cinasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y su relación con la producción de PHB. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 94 pp.
- Wang, H-L., Postier, B. L., Burnap, R., 2004. Alterations in Global Patterns of Gene Expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in Response to Inorganic Carbon Limitation and the Inactivation of *ndhR*, a LysR Family Regulator. *The Journal Of Biological Chemistry*. 279 (7), 5739–5751. DOI 10.1074/jbc.M311336200
- Wang, J., Tanb, Z., Peng, J., Qiu, Q., Li, M., 2016. The behaviors of microplastics in the marine environment. *Marine Environmental Research*. 113, 7-17. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.10.014>
- Wilmotte, A., Herdman, M., 2015. Phylogenetic Relationships Among the Cyanobacteria Based on 16S rRNA Sequences. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. DOI: 10.1002/9781118960608.cbm00021.

- Wobese, E. A., Ibeling, B. W., Bok, J., Krasikov, V., Huisman, J., Matthijs, H. C. P., 2011. Concerted Changes in Gene Expression and Cell Physiology of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 during Transitions between Nitrogen and Light-Limited Growth. *Plant Physiology*. 155, 1445-1457. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.110.165837>.
- Wu, G., Bao, T., Shen, Z., Wu, Q., 2002. Sodium Acetate Stimulates PHB Biosynthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Tsinghua Science & Technology*. 7 (4), 435-438.
- Wu, G. F., Wu, Q. Y., Shen, Z. Y., 2001. Accumulation of poly-b-hydroxybutyrate in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6 803. *Bioresource Technology*. 76 (2), 85-90. doi: 10.1016/s0960-8524(00)00099-7.
- Xiong, W., Cano, M., Wang, B., Douchi, D., Yu, J., 2017. The plasticity of cyanobacterial carbon metabolism. *Current Opinion in Chemical Biology*. 41, 12-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.09.004>
- Xue, Y., Zhang, Y., Cheng, D., Daddy, S., He, Q., 2014. Genetically engineering *Synechocystis* sp. Pasteur Culture Collection 6803 for the sustainable production of the plant secondary metabolite p-coumaric acid. *Proceedings of the National Academy of Science*. 111 (26), 9449–9454. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1323725111>.
- Yu, Y., You, L., Liu, D., Hollinshead, W., Tang, Y. J., Zhang, F., 2013. Development of *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a Phototrophic Cell Factory. *Marine Drugs*. 11, 2894-291. doi:10.3390/md11082894.
- Zhang, C-C., Zhou, C-Z., Burnap, R. L., Peng, L., 2018. Carbon/Nitrogen Metabolic Balance: Lessons from Cyanobacteria. *Trends in Plant Science*. 23 (12), 1116-1130. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.09.008>
- Zhang, W., Song, X., 2018. Synthetic Biology of Cyanobacteria. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 155-164. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-0854-3>
- Zhou, J., Zhang, H., Meng, H., Zhang, Y., Lia, Y., 2014. Production of optically pure d-lactate from CO₂ by blocking the PHB and acetate pathways and expressing d-lactate dehydrogenase in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Process Biochemistry*. 49 (12), 2071-2077. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.09.007>

Anexo 1.

Reactivos para preparación de medio BG-11 1x para cianobacterias.

Todas las soluciones se esterilizan en autoclave a 15 psi a 121°C por 15 min.

Tabla 7 Reactivos para medio BG-11 100x sin Fe+

Reactivo	g/1000 ml	g/100 ml
NaNO ₃	149.6	14.96
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.49	0.746
CaCl ₂ · 2H ₂ O	3.6	0.36
Ácido cítrico · H ₂ O	0.6	0.06
0.25 M Na ₂ EDTA, pH 8.0	1.12 ml	0.112 ml
Minerales traza	100 ml	10 ml
Agua desionizada	-	-

Para stock minerales traza:

Tabla 8 Reactivos para minerales traza

Reactivo	g/1000 ml	g/100 ml	Sol.
H ₃ BO ₃	2.86	0.286	A
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.81	0.181	A
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.222	0.022	A
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.39	0.039	B
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.079	0.008	C
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.0494	0.005	B
Agua desionizada	1000 ml	100 ml	

*Las soluciones marcadas como A, B y C se preparan y esterilizan por separado para evitar la precipitación de los reactivos.

Para Citrato de amonio férrico (1000x): disolver 600 mg por 100 ml H₂O y esterilizar.

Na₂CO₃ (1000x): disolver 2 g Na₂CO₃ por 100 ml dH₂O y se esteriliza.

K₂HPO₄ (1000x): disolver 3.05 g K₂HPO₄ por 100 ml dH₂O y se esteriliza.

Para la preparación de medio BG-11 líquido se agregarán las siguientes cantidades de stocks descritos previamente:

Tabla 9 Volúmenes para la preparación de medio líquido BG-11 1x sin Fe+

Stock o componente	1x BG-11	
	Líquido	
	ml/1000 ml	ml/500 ml
100x BG-11	10.0	5.0
1000x Ammonium iron	1.0	0.5
1000x Na ₂ CO ₃	1.0	0.5
1000x K ₂ HPO ₄	1.0	0.5
Agua desionizada	1000.0	500.0

Tabla 10 Reactivos para elaboración de medio BG-11 1x sólido.

Stock o componente	1x BG-11	
	Agar	
	ml/100 ml	ml/ 50 ml
100x BG-11	1.0	0.5
1000x Ammonium iron	0.1	0.05
1000x Na ₂ CO ₃	0.1	0.05
1000x K ₂ HPO ₄	0.1	0.05
Agar (A)	1.5 g	0.75 g
Tiosulfato de sodio (153)	0.3 g	0.15 g
10 mM TES	1.0	0.5
Agua desionizada	100.0	50.0

Anexo 2.

Sembrados de cepa *Synechocystis* sp. B6B bajo tratamiento con antibióticos.



Figura 29 Crecimiento bacteriano en medio de cultivo BG11 solido con B6B. (Izquierda medio con cloranfenicol; Derecha medio con kanamicina).

Anexo 3.

Regiones secuenciadas de PCC 6803 y B6B con oligonucleótidos para región ITS ribosomal

>PCC 6803

```
AACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTAAGGGAGACCTTTACCCCTTCATCTTGAAAGC
AAAGTGCAAATAGAGAGAAGTTGGTCAACCAAAAGGTTCGAGCAAGGGATTAACCGAGAGGTTAAAGAGTAGAAG
TCTTTCAAACCTATTGCCTAGGCGAGGTAAAAGGCAAGGGCTATTAGCTCAGCTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAG
GGTGAGGTCTCTGGTTCAAGTCCAGAATGGCCACCTAACCAAAAAAGCCAAAGAGAAGGATAAACCCCTCAGCA
TCCTGTCTGATGAGAGTCAGAGGGAATGCTGGATGTAAGTCCAGTAAGGACCTTGAAAAGTGCATAAAGAAAAGA
GAAAGCAGGGAAAATCTTGCTCTTCTAACCGTTTTGATGTTAACCACAAGGCTTTTGGCTGAGTGTGAGACTGAA
GGGCGGTGAAGGTAGGGGGAAAGATGATCCTAGTTAGCAAAAAGAAGATCTTAAAAAGGTCAAGCTACAAAGGG
CTAACGGTGGATAC
```

>B6B

```
AACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTAAGGGAGACCTTTACCCCTTCATCTTGAAAGC
AAAGTGCAAATAGAGAGAAGTTGGTCAACCAAAAGGTTCGAGCAAGGGATTAGCCGAGAGGTTAAAGAGTAGAAG
TCTTTCAAACCTATTGCCTAGGCGAGGTAAAAGGCAAGGGCTATTAGCTCAGCTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAG
GGTGAGGTCTCTGGTTCAAGTCCAGAATGGCCACCTAACCAAAAAAGCCAAAGAGAAGGATAAACCCCTCAGCA
TCCTGTCTGGTGAGAATCAGAAGGAATGCTGGATGTAAGTCCAGTAAGAACCTTGAAAAGTGCATAAAGAAAAGA
GAAAGCAGGGAAAATCTTAATCCCCCTAGCTGTTTTTAAATTAACCACAAGGCTTCTGGCTGAAGTGTGAGATTA
AAAGATAGCAAAGGTGAGGAGGAAGATAATCCTAGTTAGCAAAAAGAAGATCTTAAAAAGGTCAAGCTACAAAGG
GCTAACGGTGGATAC
```

Anexo 4.

Regiones secuenciadas de PCC6803 y B6B con oligonucleótidos para la región 16S ribosomal.

>PCC6803

```
CGCGTGAGAACCTACCTTCAGAATGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCCAATGTGCCGAAAGGTGAA
AGATTTATCGTCTGAAGATGGGCTCGCGTCTGATTAGCTAGATGGTGGGGTAAGAGCCTACCATGGCAACGATCA
GTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGTCCTTGATTGTTAAAC
CTCTTTTATCAGGGAAGAAGTTCTGACGGTACCTGATGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTA
ATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTTATGCAAGTCTGCCGTTA
AAGAATGGAGCTTAACTCCATAGGAGCGGTGGAAACTGCAAGACTAGAGTACAGTAGGGGTAGCAGGAATTCCC
AGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACATCGGTGGCGAAAGCGTGCTACTGGGCTGAAACTGACA
CTGAGGGACGAAAGCTAGGGTAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTACCCCTACTCACCCCTCCCCCCCC
```

>B6B

```
CGCGTGAGAACCTACCTTCAGAATGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCCAATGTGCCGAAAGGTGAA
AGATTTATCGTCTGAAGATGGGCTCGCGTCTGATTAGCTAGATGGTGGGGTAAGAGCCTACCATGGCAACGATCA
GTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGTCCTTGATTGTTAAAC
CTCTTTTATCAGGGAAGAAGTTCTGACGGTACCTGATGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTA
ATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTTATGCAAGTCTGCCGTTA
AAGAATGGAGCTTAACTCCATAGGAGCGGTGGAAACTGCAAGACTAGAGTACAGTAGGGGTAGCAGGAATTCCC
AGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACATCGGTGGCGAAAGCGTGCTACTGGGCTGAAACTGACA
CTGAGGGACGAAAGCTAGGGTAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTA
```

Anexo 5.

Lista de secuencias 16S utilizadas para análisis filogenéticos de B6B.

Tabla 11 Lista de cianobacterias con regiones 16S utilizadas para los análisis filogenéticos. Tomadas de la base de datos de NCBI.

Nombre	ID
<i>Chondrocystis</i> sp. ANT.L59B.1	AY493599.1
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. PCC 6712	AB039004.1
<i>Chroococcus submarinus kopara-BM</i>	AJ621832.1
<i>Chroococcus turgidus</i> HUW 799	DQ460703.1
<i>Cyanobacterium</i> sp. PCC 8806 (<i>Synechococcus</i> sp. PCC 8806)	AF448077.1
<i>Cyanobacterium aponinum</i> PCC 10605	NR_102443.1
<i>Cyanobacterium stanieri</i> PCC 7202	NR_102450.1
<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7424	AF132932.1
<i>Cyanothece</i> sp. PCC 8801	AF296873.1
<i>Cyanothece</i> sp. SKTU126	AB067581.1
<i>Cyanothece</i> sp. WH 8902	AY620238.1
<i>Cyanothece</i> sp. WH 8904	AY620239.1
<i>Geminocystis herdmanii</i> PCC 6308 (<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6308)	AB039001.1
<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	NR_074282.1
<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 8105	AF132791.1
<i>Gloeocapsa</i> sp. KO20B5	AB067578.1
<i>Gloeocapsa</i> sp. KO30D1	AB067579.1
<i>Gloeocapsa</i> sp. PCC 73106	AB039000.1
<i>Gloeothece</i> sp. PCC 6909 (<i>Synechocystis</i> sp. CCAP 1480/4)	KT354207.1
<i>Gloeothece</i> sp. KO11DG	AB067577.1
<i>Gloeothece</i> sp. SK40	AB067576.1
<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843	NR_074314.1
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	MH892877.1
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7941	U40340.2
<i>Pleurocapsa</i> sp. PCC 7319	AB039006.1
<i>Pleurocapsa</i> sp. PCC 7327	AB039007.1
<i>Snowella litoralis</i> OTU35S07	AJ781039.1
<i>Snowella litoralis</i> OTU37S04	AJ781040.1

<i>Snowella litoralis</i> 1LT47S05	AJ781041.1
<i>Snowella rosea</i> 1LM40S01	AJ781042.1
<i>Stanieria cyanosphaera</i> PCC 7437	NR_112109.1
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	AJ000716.1
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 8807	AF448076.1
<i>Synechocystis aquatilis</i> SAG 90.79	KT354181.1
<i>Synechocystis minuscula</i> SAG 258.80	KT354193.1
<i>Synechocystis nigrescens</i> str. CarolinaBiologicalSupply 151910	KT354198.1
<i>Synechocystis pevalekii</i> SAG 91.79	KT354200.1
<i>Synechocystis salina</i> CCALA 192	KT354209.1
<i>Synechocystis</i> sp. PAK12	EF555570.1
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6702	AB041936.1
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6714	AB041937.1
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	KT371498.1
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6805	AB041938.1
<i>Synechocystis</i> sp. B6B	De este estudio
<i>Woronichinia naegeliana</i> OLE35S01	AJ781043.1

Anexo 6.

Lista de secuencias ITS utilizadas para análisis filogenéticos de B6B.

Tabla 12 Lista de cianobacterias con regiones ITS utilizadas para los análisis filogenéticos. Tomadas de la base de datos de NCBI.

Nombre	ID
<i>Crocospaera watsonii</i> WH 0002	EU934820.1
<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8504	EU934819.1
<i>Cyanobacterium</i> sp. PCC 8806 (<i>Synechococcus</i> sp. PCC 8806)	AM258982.1
<i>Cyanobacterium stanieri</i> PCC 7202	AM258980.1
<i>Cyanothece</i> sp. SKTU126	AB067581.1
<i>Geminocystis herdmanii</i> PCC 6308 (<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6308)	AM258983.1
<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	AY768373.1
<i>Gloeocapsa</i> sp. KO20B5	AB067578.1
<i>Gloeocapsa</i> sp. KO30D1	AB067579.1
<i>Gleothece</i> sp. KO11DG	AB067577.1
<i>Gleothece</i> sp. PCC 6909 (<i>Synechocystis</i> sp. CCAP 1480/4)	KT354208.1
<i>Gleothece</i> sp. SK40	AB067576.1
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	AM773520.1
<i>Synechocystis aquatilis</i> SAG 90.79	KT354186.1
<i>Synechocystis minuscula</i> SAG 258.80	KT354197.1
<i>Synechocystis salina</i> CCALA 192	KT354212.1
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6714	KT371494.1
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	KT371493.1
<i>Synechocystis</i> sp. B6B	De este estudio

Anexo 7.

Valores de DO y conteo celular de las cepas B6B y PCC6803 de curvas de crecimiento.

Tabla 13 Datos DO₇₃₀ en cepas B6B y PCC 6803 utilizados en la construcción de curvas de crecimiento

Días	DO PCC 6803	Desv. Est. PCC 6803	DO B6B	Desv. Est. B6B
0	0.188	0.002	0.188	0.002
2	0.318	0.008	0.299	0.005
4	0.436	0.016	0.475	0.022
6	0.648	0.005	0.674	0.003
8	0.871	0.006	0.915	0.004
10	1.153	0.030	1.433	0.033
12	1.340	0.024	1.651	0.027
14	1.617	0.019	2.053	0.027
16	1.959	0.024	2.375	0.023
18	2.403	0.025	2.843	0.026
20	2.537	0.019	3.226	0.026
22	2.522	0.025	3.442	0.024
24	2.943	0.020	3.975	0.038
26	3.163	0.023	4.361	0.025
28	3.466	0.027	4.647	0.024
30	3.577	0.031	4.956	0.020

Tabla 14 Datos de conteo celular de B6B y PCC 6803 utilizados para la construcción de curvas de crecimiento

Día	PCC 6803 células/ml [E10 ⁶]	Desv. Est. PCC 6803	B6B células/ml [E10 ⁶]	Desv. Est. B6B
0	9.23	0.12	5.61	0.24
2	17.38	0.62	14.40	0.71
4	28.91	0.47	22.13	0.39
6	41.93	0.57	36.34	0.24
8	43.15	0.64	37.93	0.90
10	54.59	0.86	43.90	0.58
12	65.40	0.65	44.63	0.45
14	66.44	0.95	70.15	0.16
16	67.67	0.89	73.63	0.53
18	73.58	0.89	81.25	0.85
20	90.96	0.63	90.30	0.43

Anexo 8.

Tasas de crecimiento y duplicación de B6B y PCC 6803 de curvas de crecimiento.

Tabla 15 Cálculo de tasas de crecimiento y tasas de duplicación de PCC 6803

Día	Células/ml (E10 ⁶)	LOG Natural	μ	Tasa duplicación
0	9.2	0.97		
2	17.4	1.24	0.91	1.09
4	28.9	1.46	0.73	1.36
6	41.9	1.62	0.54	1.87
8	43.2	1.63	0.04	24.07
10	54.6	1.74	0.34	2.95
12	65.4	1.82	0.26	3.84
14	66.4	1.82	0.02	43.86
16	67.7	1.83	0.03	37.94
18	73.6	1.87	0.12	8.27
20	91.0	1.96	0.31	3.27

Tabla 16 Cálculo de tasas de crecimiento y tasa de duplicación de B6B

Día	Células/ml (E10 ⁶)	LOG Natural	μ	Tasa duplicación
0	5.61	0.75		
2	14.40	1.16	1.36	0.73
4	22.13	1.34	0.62	1.61
6	36.34	1.56	0.72	1.40
8	37.93	1.58	0.06	16.21
10	43.90	1.64	0.21	4.74
12	44.63	1.65	0.02	42.07
14	70.15	1.85	0.65	1.53
16	73.63	1.87	0.07	14.30
18	81.25	1.91	0.14	7.04
20	90.30	1.96	0.15	6.56

Anexo 9.

DO₇₃₀, tasas de crecimiento y duplicación de las cianobacterias B6B y PCC 6803 bajo condiciones de cultivo.

Tabla 17 DO₇₃₀ de la cepa PCC 6803 en condiciones de cultivo

	PCC 6803														
	DO ₇₃₀ día 0			DO ₇₃₀ día 5			DO ₇₃₀ día 10			DO ₇₃₀ día 15			DO ₇₃₀ día 20		
BG11	1.24	±	0.01	1.26	±	0.01	1.48	±	0.01	1.74	±	0.01	2.11	±	0.04
BG11 N- A+				1.35	±	0.04	1.43	±	0.04	1.54	±	0.01	1.59	±	0.04
BG11 A+				1.48	±	0.04	1.66	±	0.03	1.84	±	0.03	2.14	±	0.02
BG11 N- G+				1.52	±	0.02	1.36	±	0.02	1.18	±	0.01	1.22	±	0.04
BG11 N-				1.30	±	0.01	1.40	±	0.03	1.52	±	0.07	1.74	±	0.06

Tabla 18 DO₇₃₀ de la cepa B6B bajo condiciones de cultivo

	B6B														
	DO ₇₃₀ día 0			DO ₇₃₀ día 5			DO ₇₃₀ día 10			DO ₇₃₀ día 15			DO ₇₃₀ día 20		
BG11	1.30	±	0.02	1.48	±	0.03	1.60	±	0.02	1.68	±	0.07	2.13	±	0.02
BG11 N- A+				1.45	±	0.04	1.37	±	0.02	1.48	±	0.04	1.78	±	0.02
BG11 A+				1.77	±	0.03	1.57	±	0.03	2.16	±	0.06	2.28	±	0.04
BG11 N- G+				1.34	±	0.02	1.34	±	0.03	1.29	±	0.07	1.13	±	0.06
BG11 N-				1.52	±	0.01	0.93	±	0.05	0.96	±	0.08	1.35	±	0.04

Tabla 19 Tasa de crecimiento y duplicación de B6B bajo condiciones de cultivo

BG11	Día	Células/ml (E10⁶)	LOG	μ	Td
	0	62.17	1.79		
	5	71.25	1.85	0.20	5.09
	10	77.19	1.89	0.12	8.65
	15	81.31	1.91	0.08	13.31
	20	103.59	2.02	0.35	2.86
BG11 N- G+	Día	Células/ml (E10⁶)	LOG	μ	Td
	0	62.17	1.79		
	5	64.15	1.81	0.05	22.11
	10	64.32	1.81	0.00	269.81
	15	62.01	1.79	-0.05	-18.95
	20	54.09	1.73	-0.20	-5.07
BG11 N- A+	Día	Células/ml (E10⁶)	LOG	μ	Td
	0	62.17	1.79		
	5	69.60	1.84	0.16	6.14
	10	65.64	1.82	-0.08	-11.83
	15	71.25	1.85	0.12	8.45
	20	86.10	1.93	0.27	3.66
BG11 N-	Día	Células/ml (E10⁶)	LOG	μ	Td
	0	62.17	1.79		
	5	73.23	1.86	0.24	4.23
	10	43.90	1.64	-0.74	-1.35
	15	45.31	1.66	0.05	22.04
	20	64.65	1.81	0.51	1.95
BG11 A+	Día	Células/ml (E10⁶)	LOG	μ	Td
	0	62.17	1.79		
	5	85.77	1.93	0.46	2.15
	10	75.87	1.88	-0.18	-5.65
	15	104.91	2.02	0.47	2.14
	20	111.02	2.05	0.08	12.25
BG11 G+	Día	Células/ml (E10⁶)	LOG	μ	Td
	0	62.17	1.79		
	5	77.02	1.89	0.31	3.24
	10	0.00	0	0	

Tabla 20 Tasa de crecimiento y duplicación de PCC 6803 bajo condiciones de cultivo.

BG11	Día	Células/ml (E10⁶)	LOG	μ	Td
	0	63.58	1.80		
	5	64.52	1.80	0.02	46.84
	10	75.63	1.87	0.22	4.36
	15	88.05	1.94	0.21	4.55
	20	106.35	2.02	0.27	3.67
BG11 N- G+	Día	Células/ml (E10⁶)	LOG	μ	Td
	0	63.58	1.80		
	5	77.27	1.88	0.28	3.55
	10	69.42	1.84	-0.15	-6.47
	15	61.25	1.78	-0.18	-5.53
	20	69.83	1.84	0.18	5.28
BG11 N- A+	Día	Células/ml (E10⁶)	LOG	μ	Td
	0	63.58	1.80		
	5	69.26	1.84	0.12	8.09
	10	73.18	1.86	0.07	12.58
	15	78.58	1.89	0.10	9.75
	20	80.70	1.90	0.03	25.98
BG11 N-	Día	Células/ml (E10⁶)	LOG	μ	Td
	0	63.58	1.80		
	5	66.65	1.82	0.06	14.68
	10	71.71	1.85	0.10	9.46
	15	77.27	1.88	0.10	9.28
	20	88.38	1.94	0.19	5.15
BG11 A+	Día	Células/ml (E10⁶)	LOG	μ	Td
	0	63.58	1.80		
	5	75.63	1.87	0.25	3.99
	10	84.29	1.92	0.15	6.39
	15	93.28	1.96	0.14	6.84
	20	107.66	2.03	0.20	4.83

Anexo 10.

Peso seco total (PST) y producción PHB de las cianobacterias B6B y PCC 6803 bajo condiciones de cultivo.

Tabla 21 Peso seco total de la cepa B6B bajo condiciones de cultivo

		B6B														
		PST día 0 (µg/ml)			PST día 5 (µg/ml)			PST día 10 (µg/ml)			PST día 15 (µg/ml)			PST día 20 (µg/ml)		
BG11	201.83	±	9.66	421.56	±	44.98	520.22	±	58.80	506.83	±	62.25	658.44	±	21.15	
BG11 N- A+				559.28	±	51.88	429.50	±	9.80	473.06	±	26.57	293.67	±	11.44	
BG11 A+				657.11	±	35.29	791.06	±	82.00	1040.25	±	58.58	1150.22	±	18.31	
BG11 N- G+				435.17	±	16.83	298.26	±	27.75	305.67	±	16.64	472.72	±	141.55	
BG11 N-				372.50	±	33.64	209.94	±	12.41	216.27	±	21.06	267.17	±	15.17	

Tabla 22 Peso seco total de la cepa PCC 6803 bajo condiciones de cultivo

		PCC 6803								
		PST día 0 (µg/ml)			PST día 5 (µg/ml)			PST día 15 (µg/ml)		
BG11	256.56	±	3.56	320.44	±	7.24	470.28	±	4.08	
BG11 N- A+				445.03	±	25.34	540.28	±	33.06	
BG11 A+				473.33	±	14.92	699.61	±	40.99	
BG11 N- G+				367.78	±	14.20	364.33	±	20.82	
BG11 N-				317.94	±	9.76	384.67	±	16.28	

Tabla 23 Porcentaje de PHB obtenido por B6B bajo condiciones de cultivo

		B6B														
		%PHB (w/w) día 0			%PHB (w/w) día 5			%PHB (w/w) día 10			%PHB (w/w) día 15			%PHB (w/w) día 20		
BG11	1.62	±	0.04	0.70	±	0.13	0.49	±	0.07	0.37	±	0.21	0.20	±	0.04	
BG11 N- A+				0.63	±	0.08	1.15	±	0.06	0.73	±	0.08	2.09	±	0.32	
BG11 A+				0.68	±	0.07	0.43	±	0.05	1.18	±	0.07	0.62	±	0.10	
BG11 N- G+				0.98	±	0.07	1.15	±	0.14	0.58	±	0.10	1.10	±	0.06	
BG11 N-				0.87	±	0.10	0.40	±	0.13	0.41	±	0.10	0.95	±	0.11	

Tabla 24 Porcentaje de PHB obtenido por PCC 6803 bajo condiciones de cultivo

PCC 6803									
	%PHB (w/w) día 0			%PHB (w/w) día 5			%PHB (w/w) día 15		
BG11	7.70	±	0.46	6.97	±	0.23	4.49	±	0.13
BG11 N- A+				6.01	±	0.19	4.18	±	0.34
BG11 A+				4.80	±	0.24	3.09	±	0.53
BG11 N- G+				6.97	±	0.36	6.64	±	0.00
BG11 N-				7.37	±	0.44	5.00	±	0.50