

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2023. Todos los derechos reservados

**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**

---

**Producción de polihidroxicanoatos en dos cepas de la  
cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 en cultivos  
adicionados con agua del proceso de producción de aceite de  
oliva**

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

Presenta:

**Carolina Serrano Torres**

Ensenada, Baja California, México  
2023

Tesis defendida por  
**Carolina Serrano Torres**

y aprobada por el siguiente Comité

---

Dra. Elizabeth Ponce Rivas  
Directora de tesis

Dra. Edna Sánchez Castrejón

Dra. Beatriz Cordero Esquivel

Dra. Ernestina Castro Longoria



---

**Dra. Denisse Re Araujo**  
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

---

**Dr. Pedro Negrete Regagnon**  
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta Carolina Serrano Torres como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

**Producción de polihidroxicanoatos en dos cepas de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 en cultivos adicionados con agua del proceso de producción de aceite de oliva**

Resumen aprobado por:

---

Dra. Elizabeth Ponce Rivas  
Directora de tesis

Las cianobacterias, como la cepa modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803, son procariontes capaces de llevar a cabo fotosíntesis oxigénica y de producir compuestos de importancia biotecnológica como los polihidroxicanoatos (PHAs), los cuales representan una alternativa para el reemplazo biodegradable y sustentable de los plásticos derivados del petróleo. En el presente proyecto se planteó el aumentar la producción de PHA mediante la adición de agua del proceso de producción del aceite de oliva (APPAO) a los medios de cultivo tanto de la cepa silvestre como en una cepa mutante inactivada en el gen que codifica para la fosfotransacetilasa (*pta*). *PTA* cataliza la síntesis de acetato a partir de Acetil-CoA, metabolito precursor del poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), principal tipo de PHA. Para evaluar la cinética de crecimiento de la cepa silvestre se realizaron cultivos con baja biomasa inicial (0.1) en medio BG-11 adicionado con 1, 5 o 10% de APPAO Manzanilla-Misión y con ambas cepas en alta biomasa inicial (4.0). El análisis metabolómico del APPAO mostró que los compuestos más abundantes son los ácidos carboxílicos y derivados (27.4%) y mostró la presencia de fenoles. El crecimiento fue evaluado utilizando un espectrofotómetro (DO 730 nm), así como por peso seco, y la formación de PHA se evaluó mediante extracción, microscopía confocal de gránulos teñidos con azul Nilo y microscopía electrónica de transmisión. Los resultados mostraron que a mayor concentración de APPAO se dio un menor crecimiento de los cultivos, pero una mayor producción del polímero. El mayor peso seco y mayores niveles de PHA se obtuvieron en la cepa silvestre adicionada con APPAO 1% (1.36 g/L) y con APPAO 5% (0.94 g/L), respectivamente. La mayor área granular en la microscopía confocal se observó en el día 9 en la mutante en *pta* en APPAO 10% (4.95  $\mu\text{m}^3$ ). Las micrografías de TEM mostraron un mayor promedio de volumen granular en la cepa silvestre (0.075  $\mu\text{m}^3$ ) así como un mayor número de gránulos de PHA por célula (1-6) en comparación con la mutante (1-3). En los días avanzados de cultivo de la mutante en *pta* se observó un aumento del espacio inter-membranal celular sugiriendo la retención aminoácidos.

**Palabras clave: Polihidroxicanoatos, APPAO, Cianobacterias, Microscopía Confocal, TEM**

Abstract of the thesis presented by Carolina Serrano Torres as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Science of life with orientation in Marine Biotechnology.

**Production of polyhydroxyalkanoates in two strains of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 in cultures added to water from the olive oil production process.**

Abstract approved by:

---

Dra. Elizabeth Ponce Rivas  
Thesis Director

Cyanobacteria, such as the model strain *Synechocystis* sp. PCC 6803, are prokaryotes capable of carrying out oxygenic photosynthesis and producing compounds of biotechnological importance, such as polyhydroxyalkanoates (PHAs), which represent an alternative for the biodegradable and sustainable replacement of petroleum-derived plastics. In the current project, it was proposed to increase the production of PHA by adding water from the olive oil production process (APPAO) to the culture media of the wild strain and a mutant strain inactivated in the gene that encodes for phosphotransacetylase (*pta*). The *PTA* catalyzes the acetate synthesis from Acetyl-CoA, a precursor metabolite of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB), the main type of PHA. Therefore, to evaluate the growth kinetics of the wild strain, cultures were carried out with low initial biomass (0.1) in BG-11 medium added with 1, 5, or 10% of APPAO Manzanilla-Misión and with both strains in high initial biomass (4.0). The metabolomic analysis of APPAO showed that the most abundant compounds are carboxylic acids and derivatives (27.4%). Also, the presence of phenols was found. Growth was evaluated using a spectrophotometer (OD 730 nm) and by dry weight. PHA formation was assessed by extraction, confocal microscopy of Nile blue-stained granules, and transmission electron microscopy. The results showed that a higher concentration of APPAO gave the cultures a lower growth but higher polymer production. The highest dry weight and PHA levels were obtained in the wild strain added with APPAO 1% (1.36 mg/mL) and APPAO 5% (0.94 g/L), respectively. The largest granular area observed in confocal microscopy was on day 9 in *pta* mutant in APPAO 10% (4.95  $\mu\text{m}^3$ ). TEM micrographs showed a higher mean granule volume in the wild strain (0.075  $\mu\text{m}^3$ ) as well as a higher number of PHA granules per cell (1-6) compared to the mutant (1-3). In the advanced days of culture of the *pta* mutant, an increase in the cell intermembrane space was observed, suggesting the retention of amino acids.

**Keywords: Polyhydroxybutyrate, APPAO, Cyanobacteria, Confocal Microscopy, TEM**

## Dedicatoria

### **Amistad; Admiración; Amor**

A mi Directora de Tesis Elizabeth Ponce, por ser una gran mujer, sin su apoyo y paciencia este sueño no hubiera sido posible, aunque siempre estaba ocupada siempre tuvo tiempo para mí. ¡Gracias!

A mi mejor y más polelosa amiga Aisha, por los mensajes, las pijamadas, las tardes de café que me devuelven la vida, espero y deseo seguir creciendo juntas.

A Isela por siempre darme ánimos y escuchar mis dramas.

A Brenda y Vicky por empujarme a hacer cosas nuevas, las admiro muchísimo tanto como profesionales como amigas, son la combinación perfecta.

A mi pareja Eduardo, por cuidarme y consentirme tanto, te dedico cada punto y cada coma contenida en este trabajo. La admiración y amor que me inspiras no se puede escribir con palabras.

Nya

A mamá.

Finalmente, a mí. A aquella karo de 15 años que descubrió su pasión por el laboratorio. A la caro de 24 años que decidió ser valiente ¡Les agradezco!

Ya no somos los mismos, pero eso lo sabemos . . .

## Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), al Posgrado en Ciencias de la Vida, por darme el espacio y el apoyo para la realización de la presente tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindar el apoyo financiero para la realización de este trabajo.

A mi directora de tesis la Dra. Elizabeth Ponce Rivas, por su infinita paciencia, sus consejos, apoyo y todo lo brindado desde mi servicio social universitario, hasta el presente trabajo.

A mis sinodales, la Dra. Edna Sánchez, Dra. Beatriz Cordero y Dra. Ernestina Castro. Un especial agradecimiento a Edna por su guía en los aspectos técnicos y no tan técnicos de laboratorio.

Al Ing. Ricardo Rodríguez encargado de la planta de producción de oliva de L.A. CETTO, por brindar el agua de producción del aceite de oliva.

Al Dr. Alejandro Sánchez Gonzáles por compartirme sus técnicas y consejos con cianos.

Al Dr. Diego Delgado por su apoyo en la microscopía confocal. A Dra. Gaby Guzmán, por permitirme estar mientras trabajaba en el TEM y resolver todas mis dudas. Ambos del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada del CICESE (LNMA-CICESE).

Al Dr. Enrique Martínez por su ayuda en el análisis de las imágenes de microscopía y su disposición a ayudar siempre. Al Dr. Fernando Díaz por su invaluable ayuda en el análisis estadístico.

A Dra. Lorena Durán y sus alumnos, por su completa disposición a ayudar y compartir sus reactivos conmigo. ¡La ciencia será colaborativa y no competitiva o no será!

A mis compañeras de laboratorio Fernanda, Jess y Diana, amenizando siempre el tiempo de laboratorio, espero haberles enseñado bien.

Mis más sinceros agradecimientos.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas .....	xi
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes .....	4
1.1.1 Vía de síntesis del PHB .....	6
1.1.2 Metabolismo de <i>Synechocystis</i> .....	7
1.1.3 Sobreproducción de Polihidroxialcanoatos.....	10
1.2 Justificación .....	13
1.3 Hipótesis.....	13
1.4 Objetivos .....	14
1.4.1 Objetivo general.....	14
1.4.2 Objetivos específicos.....	14
<b>Capítulo 2. Metodología.....</b>	<b>15</b>
2.1 Agua de proceso de producción del aceite de oliva.....	15
2.2 Organismo y condiciones de cultivo.....	15
2.3 Crecimiento de <i>Synechocystis</i> .....	16
2.4 Determinación de peso seco.....	17
2.5 Extracción de PHA .....	18

2.6	Determinación de pH .....	18
2.7	Microscopía .....	18
2.7.1	Confocal.....	18
2.7.2	Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	19
2.8	Análisis estadístico .....	20
<b>Capítulo 3.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>21</b>
3.1	Agua de proceso de producción de aceite de oliva .....	21
3.2	Curvas de crecimiento de la cepa silvestre en baja densidad inicial .....	22
3.2.1	Curvas en medio BG11 .....	22
3.2.2	Curvas en medio BG11 adicionados con APPAO Misión .....	24
3.3	Experimentos inducción silvestre y mutante en <i>pta</i> en alta densidad celular inicial .....	25
3.3.1	Cultivo de la cepa silvestre en alta biomasa inicial .....	26
3.3.1.1	Densidad óptica.....	26
3.3.1.2	Peso seco .....	27
3.3.1.3	PHA .....	28
3.3.1.4	pH .....	30
3.3.1.5	Microscopía confocal .....	30
3.3.1.6	Microscopía electrónica de transmisión en la cepa silvestre.....	37
3.3.2	Cultivo en mutante en <i>pta</i> en alta biomasa inicial.....	38
3.3.2.1	Densidad óptica.....	38
3.3.2.2	Peso seco .....	40
3.3.2.3	PHA .....	40
3.3.2.4	Microscopía confocal .....	42
3.3.2.5	Microscopía electrónica de transmisión en la mutante en la mutante en <i>pta</i> .....	50
3.4	Comparación producción de PHA entre cepas silvestre y mutante en <i>pta</i> .....	51
3.5	Comparación mediciones celulares en TEM entre cepas silvestre y mutante en <i>pta</i> .....	52

<b>Capítulo 4. Discusión.....</b>	<b>54</b>
<b>Capítulo 5. Conclusiones .....</b>	<b>62</b>
5.1 Perspectivas .....	63
<b>Literatura citada .....</b>	<b>64</b>

## Lista de figuras

Figura	Página
1. Vía metabólica producción de PHB .....	7
2. Vías metabólicas principales en <i>Synechocystis</i> sp. PCC 680.....	8
3. Vía metabólica de producción de Acetato. ....	10
4. Análisis Metabolómico de APPAO Manzanilla-Misión por NMR. ....	21
5. Curva de crecimiento en DO de cepa silvestre en medio BG-11.....	22
6. Curva de crecimiento de cepa silvestre convertida a Log (cél/ml) .....	22
7. Tasa de crecimiento de <i>Synechocystis</i> en medio BG-11 .....	23
8. Evolución en coloración del cultivo de la cianobacteria. ....	23
9. Curva de crecimiento en APPAO en DO en 730 nm. ....	24
10. Curva de crecimiento en APPAO en Log (cél/ml) [E106].....	25
11. Tasa de crecimiento ( $\mu$ div/día) de curva de crecimiento en APPAO Misión.....	25
12. Cultivo de la cepa silvestre en alta biomasa inicial. ....	26
13. Curva de inducción silvestre en APPAO Manzanilla-Misión en Log (cél/ml) [E106] .....	27
14. Tasa de crecimiento ( $\mu$ div/día) de curva de inducción silvestre en APPAO Manzanilla-Misión .....	27
15. Valores de peso seco (g/L) con respecto al tiempo (días) en la cepa silvestre. ....	28
16. Valores de PHA (g/L) con respecto al tiempo (días) en la cepa silvestre. ....	29
17. pH del cultivo cepa silvestre inducción APPAO Manzanilla-Misión. ....	30
18. Microscopía confocal del ensayo 0% APPAO en cepa silvestre. ....	31
19. Volumen celular y volumen del gránulo de PHA en el tratamiento 0% APPAO de la cepa silvestre.. ....	32
20. Microscopía confocal del ensayo 1% APPAO en cepa silvestre. ....	33
21. Volumen celular y volumen del gránulo de PHA en el tratamiento con BG-11 con 1% APPAO de la cepa silvestre.. ....	34
22. Microscopía confocal del ensayo 5% APPAO en cepa silvestre. ....	34

23. Volumen celular y volumen del gránulo de PHA en el tratamiento en BG-11 con 5% APPAO de la cepa silvestre.....	35
24. Microscopía electrónica de transmisión de la cepa silvestre. ....	37
25. Cultivo de la cepa mutante en <i>pta</i> en medio BG-11 con diferentes concentraciones de APPAO Manzanilla-Misión (0, 1, 5 y 10%). ....	38
26. Cultivo de <i>Synechocystis</i> mutante en <i>pta</i> en APPAO Manzanilla-Misión en Log cél/ml [E106]. ....	39
27. Tasa de crecimiento ( $\mu$ div/día) de curva de inducción de la cepa mutante en <i>pta</i> en APPAO Manzanilla-Misión. ....	39
28. 28. Valores de peso seco (g/LI) con respecto al tiempo (días) de la cepa mutante en <i>pta</i> .....	40
29. Valores de PHA (g/L) con respecto al tiempo (días) en la cepa mutante en <i>pta</i> .....	41
30. Microscopía confocal del ensayo 0% APPAO en la cepa mutante en <i>pta</i> .....	42
31. Volumen celular y volumen del gránulo de PHA en el tratamiento BG-11 con 0% APPAO en la mutante en <i>pta</i> .....	43
32. Microscopía confocal del ensayo 1% APPAO en la cepa mutante en <i>pta</i> .....	44
33. Volumen celular y volumen del gránulo de PHA en el tratamiento en BG-11 con 1% APPAO en la mutante en <i>pta</i> . ....	45
34. Microscopía confocal del ensayo 5% APPAO en la cepa mutante en <i>pta</i> .....	46
35. Volumen celular y volumen del gránulo de PHA en el tratamiento en BG-11 con 5% APPAO en la mutante en <i>pta</i> .....	47
36. Microscopía confocal del ensayo de inducción de la mutante en <i>pta</i> en APPAO Manzanilla-Misión al 10% y tinción con azul de Nilo al 0.5%.....	48
37. Volumen celular y volumen del gránulo de PHA en el tratamiento en BG-11 con 10% APPAO en la mutante en <i>pta</i> .....	49
38. Microscopía electrónica de transmisión de la mutante en <i>pta</i> en APPAO 1% Manzanilla-Misión. ....	50
39. Comparaciones entre PHA obtenida entre cepas. ....	51
40. Comparaciones entre mediciones celulares obtenidas entre cepas en tratamiento 1% APPAO. ....	52
41. Comparaciones entre mediciones granulares obtenidas entre cepas en tratamiento 1% APPAO. ....	53

## Lista de tablas

Tablas	Página
1. Entradas y salidas de la industria del aceite de oliva (Darvishi, 2012) .....	3
2. Estudios sobre la producción de PHB en el organismo <i>Synechocystis</i> y sus diferentes estrategias .....	12
3. Análisis de APPAO Misión del laboratorio industrial SALIP .....	21
4. Células en los diferentes tratamientos y días de la cepa silvestre .....	36
5. Células en los diferentes tratamientos y días de la cepa <i>pta</i> .....	49

## Capítulo 1. Introducción

---

Los plásticos de origen petroquímico representan un grave problema debido a que la mayoría de ellos son usados solo una vez, por lo que se acumulan en el ambiente a una tasa de 25 millones de toneladas al año. Estos compuestos son resistentes a procesos de degradación y la gran mayoría terminan en ambientes marinos creando una problemática mayor (Y. G. García et al., 2013). A la fecha han surgido diferentes estrategias para disminuir el impacto de la contaminación por plásticos. En este sentido, la producción de plásticos biodegradables como los polihidroxialcanoatos (PHAs) es uno de los blancos más importantes para la investigación básica y aplicada (Balaji et al., 2013). El poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) es el PHA más abundante y posee características como maleabilidad, termoplaticidad y biocompatibilidad por lo que representa una excelente alternativa para el reemplazo del plástico de un solo uso Panda y Mallick, (2007).

El PHB es el único homopolímero que ha sido identificado y relativamente bien caracterizado en la mayoría de las cianobacterias productoras (Sudesh et al., 2000). Las cianobacterias constituyen un filo diverso de procariotas las cuales se establecieron como organismos fotosintéticos oxigénicos hace al menos 3 mil millones de años. Estos organismos dependen de la luz como fuente primaria de energía (Taton et al., 2020) y pueden crecer a partir de CO<sub>2</sub>. *Synechocystis* sp. PCC 6803 (de aquí en adelante *Synechocystis*) es una cianobacteria modelo productora natural de PHB. Los niveles de producción de PHAs en cianobacterias son en general más bajos comparados con la cantidad sintetizada por bacterias heterótrofas. Sin embargo, los costos de producción en bacterias continúan siendo el principal obstáculo para propósitos comerciales. En este sentido, la exploración de organismos fotosintéticos, productores naturales o como hospederos modificados genéticamente para la producción de bioplásticos, resulta de gran interés para aumentar el rendimiento y reducir los costos de producción.

La cianobacteria *Synechocystis* puede ser modificada genéticamente para sintetizar una gran cantidad de compuestos de interés biotecnológico como etanol, ácido láctico, hidrógeno y etileno entre otros. Esto debido a que se cuenta con su genoma secuenciado, lo que ha permitido identificar las vías metabólicas centrales en esta cianobacteria y en particular la vía de síntesis de PHB, siendo el Acetil-CoA el metabolito precursor para la síntesis del polímero (Taroncher-Oldenburg et al., 2000; Carpine et al., 2017).

Por otro lado, se sabe que las cianobacterias pueden ser cultivadas exitosamente en aguas residuales tales como efluentes de granjas acuícolas, agrícolas, plantas de tratamiento de aguas, plantas de producción de

aceite de olivo entre otras, debido a su habilidad para utilizar nitrógeno inorgánico y fósforo (Hondo et al., 2015; K. Hirai et al., 2019).

De acuerdo a datos de la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT) en el 2009 se produjeron 2.9 millones de toneladas de aceite de oliva anualmente principalmente en el Mediterráneo: siendo España el primer productor, seguido de Italia y Grecia, donde juntos producen más del 98% de la producción de aceite de oliva del mundo (Darvishi, 2012). De acuerdo a la Oficina Económica y Comercial de la Embajada de España en México, en México la producción del aceite de oliva es una industria en crecimiento. Actualmente la producción local es baja y las importaciones cubren las necesidades del consumidor (ICEX, 2021). Los estados de Baja California y Sonora elaboran en 95% de la producción nacional de aceite de oliva, que se calcula en una producción de 11 mil toneladas anuales. En el Valle de Guadalupe en Baja California se emplean 3 principales especies de olivos: Misión, Manzanilla y Nevadilla.

Pese a su importancia, la industria del aceite de oliva se caracteriza por un alto impacto ambiental debido a la alta cantidad de desechos que produce, los cuales van entre residuos sólidos, agua residual de la maquinaria o líquidos oscuros, en este último se contienen hojas y orujos de olivo. La propuesta de reutilización parcial de estos residuos de la producción como nutrientes es de gran interés como diferentes ácidos orgánicos, hidratos de carbono, proteínas, fibras, y en mayor medida compuestos fenólicos. Todos estos compuestos dependerán mayormente al proceso utilizado en la producción de aceite de oliva, la especie de aceituna utilizada, así como las cantidades utilizadas. La importancia de crear estrategias para el mayor aprovechamiento de los desechos radica principalmente en la alta toxicidad presentada por tales desechos (Abbattista et al., 2021).

El proceso de producción del aceite de oliva puede ser por el proceso de prensado tradicional o procesos en dos o tres fases. El proceso que se utilice dependerá de la disponibilidad del agua en la región en la que se lleve a cabo. En el proceso de dos o tres fases se utiliza centrifugación horizontal y la oliva es triturada completa. En el proceso en dos fases no se le añade agua. Este sistema de dos fases fue introducido en España en 1990 para reducir el consumo de agua durante el proceso (Alburquerque et al., 2004). Las olivas son trituradas y el subproducto obtenido es un desecho semisólido de la molienda en dos fases del olivo llamado TPOMW o alperujo (pasta de oliva húmeda), el cual contiene de 2.5-3.5% de aceite residual y cerca del 60% de agua (Giannoutsou et al., 2004). El agua que se llega a producir durante este proceso es nuevamente ingresada al proceso para extraer aceites. Esta agua será llamada de aquí en adelante como agua del proceso de la producción del aceite de oliva o APPAO. En el proceso en tres fases, se le añade

agua durante la centrifugación por lo que los subproductos mayoritarios son la pasta de oliva llamada orujo y el agua de desecho de la producción del aceite de oliva (OMWW) o alpechín (Abbattista et al., 2021).

Debido a la prolongada sequía que se ha presentado en la región desde hace años, en la planta de producción de la empresa La CETTO, ubicada en el Valle de Guadalupe, Baja California, se utiliza el proceso de dos fases para la producción del aceite de oliva, por lo que se produce alperujo y APPAO. Debido a lo anterior, en este trabajo se llevó a cabo la adición de APPAO a dos cultivos de *Synechocystis* para evaluar su efecto en el crecimiento y producción de PHA.

La cantidad media de OMW producida durante el proceso de molienda es de aproximadamente 1000 kg por tonelada de olivas (Azbar et al., 2008). Como ejemplo de la magnitud del impacto medioambiental de los OMWW, cabe señalar que 10 millones de m<sup>3</sup> al año de efluentes líquidos procedentes de sistemas trifásicos corresponden a una carga equivalente a las aguas residuales generadas por unos 20 millones de personas. Además, el hecho de que la mayor parte del aceite de oliva se produzca en países deficitarios en recursos hídricos y energéticos hace que sea necesario de un tratamiento eficaz y de la reutilización de las OMWW (McNamara et al., 2008). En total, se producen en el mundo unos 30 millones de toneladas de OMWW al año que podrían utilizarse como sustratos de bajo costo.

**Tabla 1:** Entradas y salidas de la industria del aceite de oliva (Darvishi, 2012)

Proceso de producción	Entradas	Salidas
Proceso tradicional (prensado)	Olivas (1 tonelada)	Aceite ~200 kg)
	Agua de lavado (0.1-0.12 m <sup>3</sup> )	Residuos sólidos (~400 kg)
		aguas residuales (600 kg)
	Energía (40-63 kWh)	
Proceso tres fases	Olivas (1 tonelada)	Aceite (200 kg)
	Agua de lavado (0.1-0.12 m <sup>3</sup> )	Residuos sólidos (500-600 kg)
	Agua dulce para el decantador (0.5- 1 m <sup>3</sup> )	Aguas residuales (800-950 kg)
	Agua para limpiar el aceite impuro (10 kg)	
	Energía (90-117kWh)	
Proceso dos fases	Olivas (1 tonelada)	Aceite (~200 kg)
	Agua de lavado (0.1-0.12 m <sup>3</sup> )	Residuos sólidos (~800 kg)
	Energía (90-117kWh)	Aguas residuales (250 kg)

## 1.1 Antecedentes

En las últimas décadas los bioplásticos han sido considerados como una opción de gran interés para reemplazar el plástico derivado del petróleo. Para ser considerado un bioplástico es necesario tener un origen biológico y ser biodegradable y ser obtenidos de manera total o parcial a partir de un componente orgánico renovable. Un material biodegradable es capaz de descomponerse en sustancias naturales con la ayuda de microorganismos (Bartolo et al., 2021).

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son una opción de fuente renovable y biodegradable. Son poliésteres producidos biológicamente que se acumulan en gránulos dentro de células bacterianas. Los PHAs con sus derivados poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) son excelentes alternativas de reemplazo de los plásticos derivados del petróleo como el polietileno y el poliestireno ya que poseen características similares a estos, pero tienen la ventaja de ser completamente biodegradables y no ser tóxicos (Amaro et al., 2019).

Dentro de la clasificación de los PHA están los de cadena corta (PHA-scl), polímeros compuestos por unidades monoméricas de 3 a 5 átomos de carbono; los PHA de cadena media (PHA-MCL) compuestos por monómeros de 6 a 14 átomos de carbono y los PHA mixtos, los cuales contienen monómeros de cadena larga y corta. La diversidad en la composición de estos polímeros es muy diversa ya que se han estudiado más de 150 monómeros (Reddy et al., 2003). El PHB es un homopolímero del ácido 3-hidroxi-butírico o 3HB y es el miembro más abundante y mejor caracterizado de la familia de los PHAs (Bugnicourt et al., 2014). Se ha sugerido que el PHB es la mejor alternativa sostenible y completamente biodegradable (Sayyed et al., 2021). Entre los principales miembros de esta familia están el Poli (3-hidroxipropionato) o 3HP, poli(3-hidroxivalerato) o 3HP, poli(3-hidroxihexanoato) o 3HHx, poli(3-hidroxioctonato) o 3HO y poli (3-hidroxidodecanoato o 3HDD, entre otros (Khanna y Srivastava, 2005).

El PHB es producido naturalmente por varios tipos de microorganismos cuando estos son sometidos a estrés (Hawkins et al., 2021). Entre las bacterias productoras están *Halomonas bluephagenesis* (Ma et al., 2020), *Jeongeupia* sp. USM3 (Zain et al., 2020) y *Wautersia eutropha* (Panda y Mallick, 2007), siendo esta última capaz de acumular PHB hasta casi el 80% del peso seco total. El PHB también puede ser producido mediante la manipulación genética de bacterias como *Escherichia coli* (Meng y Chen, 2017). Algunos de los factores que limitan la producción de biopolímeros en este tipo de bacterias son los altos costos de las materias primas, principalmente las que se utilizan para la producción de PHB por fermentación microbiana, por lo que es fundamental el desarrollo de sistemas de producción sostenibles (Carpine et al., 2017).

Las cianobacterias son una opción para la producción de este tipo de compuestos ya que son capaces de generar biomasa por medio de la fijación de dióxido de carbono como única fuente de carbono utilizando luz solar como fuente de energía. Así mismo algunas especies son capaces de producir PHB de forma natural y de utilizar otras fuentes de carbono (Abed et al., 2009). En presencia de algunas fuentes de carbono como el ácido propiónico algunas cepas puede producir copolímeros como el poli-3-hidroxi butirato co-3-hidroxi valerato (Balaji et al., 2013). Estos microorganismos procariontes llevan a cabo un proceso de fotosíntesis oxigénica, y algunas de ellas pueden cambiar este proceso por fotosíntesis anoxigénica, característica de las bacterias que utiliza sulfuro como donador de electrones (Abed et al., 2009). Las cianobacterias son productores primarios en la mayoría de los ambientes en que habitan y contribuyen a los ciclos de carbono, oxígeno y nitrógeno de los hábitats donde se encuentran. Existen cianobacterias con metabolismo fotoautótrofo, fotoheterótrofo y mixotrófico. Es común encontrarlas en una diversidad de ambientes tales como humedales, lagos y ríos y han sido aisladas de los océanos Pacífico, Atlántico e Índico, tanto en zonas tropicales como subtropicales (Alcántara et al., 2020). Las especies de cianobacterias de vida libre están ampliamente distribuidas y habitan en aguas templadas con cambios de temperatura estacionales, pero de igual forma se han encontrado en aguas termales, bajo el hielo y en zonas desérticas como la meseta de Colorado en Utah (Kim et al., 2021). Presentan diferentes formas tales como las células individuales suspendidas, bentónicas, o en formación agregada, como filamentosas o tricomas (filamentos de células) simples (Abed et al., 2009).

La taxonomía de las cianobacterias aún no se ha definido por completo. Está regida por dos códigos: el código Internacional de Bacterias y el Código Internacional de Nomenclatura Botánica. Las cianobacterias son bacterias gram negativas y de acuerdo a Stanier et al. (1978) y Rippka et al. (1979) pertenecen al Reino Procarionte y con base en criterios morfológicos comprenden cinco subdivisiones que incluyen a los Chroococcales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Nostococcales y Stigonematales.

En las últimas décadas las cianobacterias han sido objeto de interés como fuente renovable de compuestos bioactivos por lo que se han convertido en microorganismos prometedores. Entre los compuestos de mayor interés producidos por cianobacterias se encuentran los plásticos biodegradables (Carpine et al., 2017), así como metabolitos con actividad antibacteriana (Jaki et al., 2000), antifúngica (Li y Guo, 2018), antivirales (Patterson et al., 1994), anticancerígenos (Gerwick et al., 1994), antiplasmodiales (Papendorf et al., 1998), algicidas (Papke et al., 1997), y agentes inmunosupresores (Koehn et al., 1992).

Existe una gran cantidad de especies de cianobacterias productoras naturales de PHB, difiriendo entre ellas la fuente de carbono que utilizan y el contenido de PHA en las células. Entre ellas se encuentran las

especies *Spirulina máxima* con 0-70% de PHB (w/w) (De Philippis et al., 1992); *Gloeothece* sp. con el 6% (w/w) (Stal, 1992); *Synechocystis* sp. PCC 6803 con el 38% (w/w) Panda y Mallick (2007) y *Aulosira fertilissima* con 10% de PHB (w/w) en condiciones de limitación de N o P (K. Hirai et al., 2019). La cianobacteria *Synechococcus* sp. MA19 produce hasta 275 de PHB (w/w). Sin embargo, esta cianobacteria crece a altas temperaturas (50°C) (Nishioka et al., 2001).

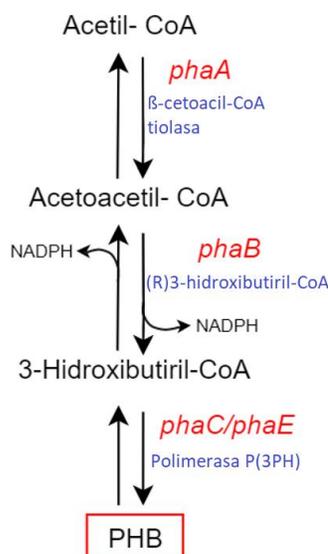
Debido a que el factor central de la obtención de PHB es el rendimiento de producción, su alto costo de producción en bacterias se considera como la principal desventaja, el cual se relaciona de manera directa con los precios de las fuentes de carbono o materia prima y de la energía utilizada para su cultivo (Nath et al., 2008). En cianobacterias se ha probado modificar las condiciones de cultivo en diferentes especies para estimular la producción de PHB. Entre las estrategias para hacer viable la producción de PHB se encuentran la utilización de fuentes de carbono económicas como aguas y compuestos residuales, utilización de condiciones de estrés que promuevan la producción de PHB como las condiciones de limitación de nitrógeno, azufre, fosforo, magnesio y oxígeno (Alcántara et al., 2020; Y. G. García et al., 2013) (Tabla 1). Así mismo se ha visto que algunas cianobacterias pueden producir y acumular PHB a partir de CO<sub>2</sub> y de algunas otras fuentes de carbono (Kamravamanesh et al., 2017).

Por otro lado, la ingeniería genética ha hecho posible que microorganismos fotosintéticos como las cianobacterias puedan convertir el CO<sub>2</sub> y otras fuentes de carbono a compuestos de alto valor agregado (Angermayr et al., 2015). En este sentido la ingeniería de vías metabólicas y la biología sintética han permitido la construcción de cepas de cianobacterias que producen compuestos de interés biotecnológico utilizó la energía generada de la fotosíntesis oxigénica (Ducat et al., 2011). La modificación de condiciones de cultivo en combinación con la utilización de cepas modificadas genéticamente ha mostrado ser una alternativa de interés para aumentar la producción de PHB y otros metabolitos (Hondo et al., 2015; Carpine et al., 2017). Sin embargo, ello requiere contar con herramientas moleculares del organismo de interés, tener el genoma secuenciado, así como con la información de los procesos metabólicos involucrados en la acumulación de este bioplástico (K. Hirai et al., 2019).

### 1.1.1 Vía de síntesis del PHB

Los genes responsables de la síntesis de PHB en el organismo modelo *Synechocystis* incluyen *phaA*, *phaB* y *phaC phaE* (figura 1). El metabolismo del PHB es un proceso determinado por reacciones biosintéticas y degradativas, las cuales son controladas por las condiciones de crecimiento presentes en el

medio. Este proceso consiste fundamentalmente en tres reacciones que parten del acetil-CoA. La primera reacción consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA en acetoacetil-CoA por la enzima  $\beta$ -cetoacil-CoA tiolasa (codificada por el gen *phaA*). Esta enzima difiere en su especificidad de sustrato dependiendo de la longitud de las cadenas de carbono. La siguiente reacción consiste en la reducción de  $\beta$ -3-hidroxiacetil-CoA por la enzima deshidrogenasa acetoacetil-CoA dependiente de NADPH (codificada por el gen *phaB*), el cual es un proceso reversible. Por último, en la tercera reacción los monómeros de 3-hidroxiacetil-CoA son polimerizados para formar poli-3-hidroxiacetato por la enzima P(3HB) polimerasa (codificada en *Synechocystis* por los genes *phaC phaE*), también conocida como PHB polimerasa. Esta enzima es la que determina la composición del polímero resultante (Trotsenko y Belova, 2000).



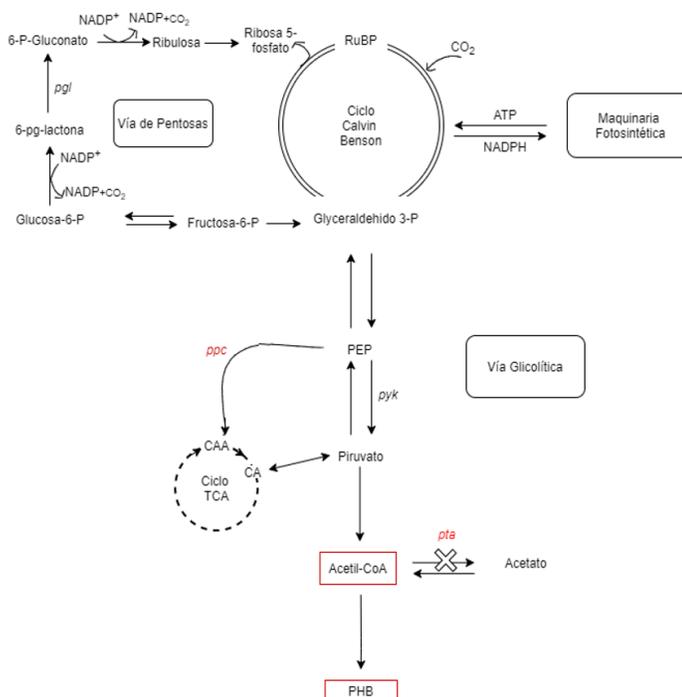
**Figura 1.** Vía metabólica producción de PHB: Reacción llevada a cabo por los catalizadores (en tono azul) y codificadores (en tono rojo) *phaA*, *phaB* y *phaC/phaE*

### 1.1.2 Metabolismo de *Synechocystis*

Una de las especies ampliamente estudiadas es la cianobacteria modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803, la cual se aisló en 1968 de un lago de agua dulce. Pertenece a la subdivisión de los Chroococcales se divide por fisión binaria. Esta especie se caracteriza por ser unicelular fotoautótrofa oxigénica y su genoma ha sido completamente secuenciado, incluyendo a cuatro plásmidos endógenos y más de 3000 genes. La cianobacteria *Synechocystis* crece en medio de cultivo BG-11, con pH de 7.4, a una temperatura de 30°C con una atmosfera aeróbica, con fotoperiodo y una irradiancia de entre 2000-3000 Lux (Angermayr et al., 2016; Carpine et al., 2017). Su metabolismo a base de carbono permite su crecimiento en condiciones

fotoautótrofas, heterótrofas y mixotróficas ya que es capaz de utilizar fuentes de carbono adicionales como la glucosa. El crecimiento de esta cianobacteria depende tanto de la disponibilidad de nutrientes (principalmente CO<sub>2</sub>, nitrógeno y fósforo) como de las condiciones de cultivo (Ciebiada et al., 2020).

El metabolismo de la cepa PCC 6803 incluye el ciclo de Calvin-Benson-Basshan (CBB), la vía glicolítica de Embden Meyerhoff Parnas (EMP), la vía oxidativa de las pentosas de fosfato (OPP), la vía Entner Doudoroff (ED) y la vía de la fosfoacetolasa, así como el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) (figura 2) (Zhou et al., 2014; Yu et al., 2013; Carpine et al., 2017). Estas vías proporcionan diversos precursores intermediarios como el fosfoenolpiruvato, piruvato y acetil coenzima-A (Co-A), requeridos para la síntesis de PHB.



**Figura 2.** Vías metabólicas principales en *Synechocystis* sp. PCC 680. Vía glicolítica y TCA. Vías heterólogas: vía anaplerótica de relleno de PEP llevada a cabo por la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*) y vía de síntesis de producción de acetato donde participa la enzima fosfotransacetilasa (*pta*). Vía de las pentosas llevada a cabo por enzimas como la enzima *Pgl* (6-fosfogluconolactonasa).

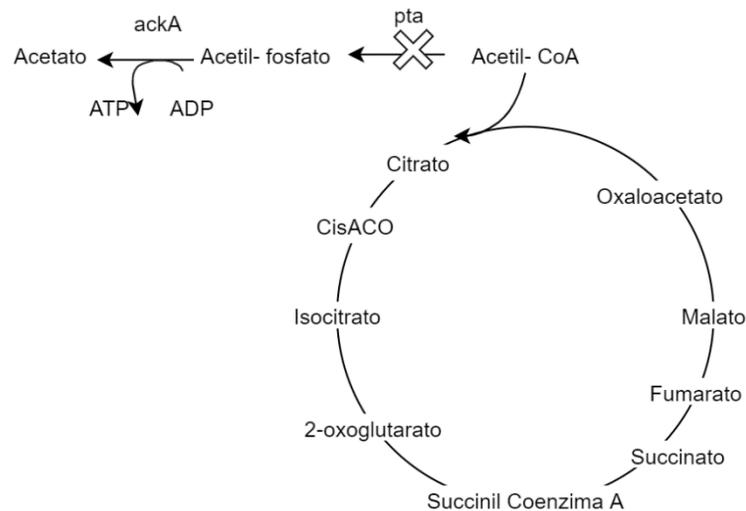
La productividad de *Synechocystis* y de las cianobacterias en general depende de los niveles de metabolitos presentes y/o de la regulación del metabolismo. El ritmo del metabolismo está sujeto a los cambios provocados por las transiciones día-noche, debido a la luz recibida con lo que es afectado el reloj circadiano. El conocimiento y manipulación de estos y otros factores son de gran importancia para avanzar en la optimización de sistemas industriales de producción de metabolitos de interés biotecnológico (Angermayr et al., 2016). La capacidad de *Synechocystis* de generar diversos metabolitos de interés se

debe a que el  $\text{CO}_2$  es un metabolito primario que puede dirigirse a diferentes rutas metabólicas. Adicionalmente la glucosa metabolizada por esta cianobacteria representa una fuente alterna de carbono para la formación de intermediarios metabólicos y energía como el PHB, butanol, etanol, terpenos y ácido láctico entre otros (Carpine et al. 2017).

La glucosa es doblemente fosforilada para formar bifostato de fructosa, genera dos gliceraldehídos trifosfatos (3-GAP) así como dihidroxiacetona fosfato, las cuales producen ATP, NADH y  $\text{FDH}_2$ . En *Synechocystis* hay dos vías que se traslapan durante el catabolismo de la glucosa, estas son las vías EMP y ED. En la vía ED la glucosa es fosforilada a 6-fosfogluconato y 2-ceto-3-desoxi-6-fosfo-gluconato (KDPG), el cual es catabolizado a 3-GAP, genera dos moléculas de ATP y dos de piruvato, mientras que en la vía EMP la glucosa es doblemente fosforilada formando dos moléculas 3-GAP de las cuales se obtienen cuatro moléculas de ATP y dos piruvatos. Estos pasos requieren energía, por lo tanto, de la producción de ATP quedan las vías EMP y de ED con dos moléculas y una molécula de ATP, respectivamente (Stettner y Segrè, 2013). La fijación de  $\text{CO}_2$  en presencia de luz se lleva a cabo por medio del Ciclo de Calvin-Benson mediante la enzima RuBisCo para dar lugar a dos moléculas de 3-GAP (Zhang et al., 2018).

Las diferentes vías forman moléculas intermediarias importantes, siendo sus derivaciones conocidas como reacciones anapleróticas (o de relleno), las cuales llevan a cabo la síntesis de intermediarios del ciclo con la finalidad de tenerlos disponibles como precursores de otras vías como los ciclos Calvin-Benson-Bassham, TCA, vías para la síntesis de hidratos de carbono o aminoácidos. En la vía anaplerótica de relleno del TCA la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (codificada por el gen *ppc*) incorpora oxalacetato a TCA a partir del PEP, formado en la vía glucolítica, con lo que queda menos disponibilidad de PEP para la formación de piruvato por la acción de las enzimas piruvato cinasas 1 y 2. El piruvato es el producto de la última parte de la vía glucolítica, el cual es convertido a acetil-CoA, uno de los metabolitos intermediarios claves para la síntesis de PHB (Andreas Angermayr et al., 2016). El Acetil-Co-A actúa como el último punto de ramificación entre la síntesis de PHB y otras vías metabólicas competidoras incluyendo la vía de producción de acetato (figura 3). El acetil-Co-A puede ser metabolizado en múltiples formas a acetato, incluyendo la vía de la fosfotransacetilasa (codificada por el gen *pta*) y por el acetato cinasa (codificada por la *ackA*), genera ATP en el último paso o directamente catabolizado por una acetil-Co-A hidrolasa (codificada por el gen *arch*). El acetil Co-A sintasa (codificada por el gen *acs*), en contraste puede recuperar acetato para reconvertirlo en acetil-CoA. La introducción de vías heterólogas, delección de genes o sobreexpresión de

enzimas nativas específicas puede redirigir el flujo de carbono hacia la producción del producto de interés como el PHB (Carpine et al, 2017).



**Figura 3.** Vía metabólica de producción de Acetato. Llevado a cabo por la enzima fosfotransacetilasa (PTA) y participa la enzima codificante de acetato quinasa (AckA)

### 1.1.3 Sobreproducción de Polihidroxialcanoatos

Por medio de estudios del metabolismo de síntesis de PHB se ha encontrado que el mecanismo de acumulación de PHB inducida por la limitación de  $N_2$  comprende también la regulación positiva de niveles de transcripción y de proteínas traducidas por los genes de síntesis de PHB (K. Hirai et al., 2019).

Este mecanismo metabólico es similar y podría funcionar para inducir a la acumulación de PHB en *Synechocystis* donde se ha promovido la producción del biopolímero al someterlo a condiciones de estrés, como lo es la limitación de  $N_2$  (M. Hirai et al., 2019). En este sentido, Panda y Mallick (2007) combinaron el efecto de la limitación de fósforo con la limitación del intercambio de gases obteniéndose un 38% de PHB (w/w) en *Synechocystis* en presencia de fructosa y acetato (Tabla 1). En otro estudio se pudo recuperar con éxito 7% de PHB (w/w) a partir de un medio limitante de nitrógeno sin suplemento de azúcar (Hondo et al., 2015). En la tabla 2 se muestran diversos ejemplos de estudios con estrategias utilizadas.

Por otro lado, mediante ingeniería genética de la cepa 6803 se ha obtenido un incremento en los niveles de PHB del 1.8% hasta un 12.4% (w/w) mediante la combinación de la delección de los genes *pta* y *arch* y la expresión heteróloga de una fosfocetolasa, lo que aumentó la tasa de producción a partir dióxido de

carbono (Carpine et al., 2017) (Tabla 2). La sobreexpresión de genes biosintéticos nativos *phaA* y *phaB* de *Synechocystis* permitió aumentar la producción el contenido máximo de PHB a 26% (w/w) (Khetkorn et al., 2016). Kamravamanesh et al. (2018) obtuvieron mutantes de la cepa *Synechocystis* sp. PCC 6714 usando luz ultravioleta y CO<sub>2</sub> como fuente de carbono, alcanzando valores de 34 ± 4% de PHB (w/w), lo que representa una productividad de 2.5 veces mayor que en la cepa *Synechocystis* sp. PCC 6803. Wu et al. (2002) eliminó el gen que codifica para la DNA-glucosa pirofosforilasa (*agp*) de la cepa PCC 6803 y utilizaron diferentes fuentes de carbono, aumentando la producción de PHB hasta en un 14.9% (w/w) (Wu et al., 2002).

Aparte de la mejora de las cepas por ingeniería genética, existe un interés considerable en el uso de sustratos de carbono que sean de bajo costo y que aumenten la producción de PHB. Por ejemplo, en la bacteria *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599 se utilizó almidón residual de patata como fuente de carbono (Haas et al., 2008), en la bacteria marina *Pseudodonghila xiamenensis* se utilizó jarabe de dátiles (Mostafa et al., 2020), y en la bacteria *Cupriavidus necator* se utilizaron extractos de aceite de semilla de dátiles (Yousuf y Winterburn, 2017). Por otro lado, existe un interés creciente por utilizar nuevas fuentes de carbono, principalmente provenientes de aguas residuales de procesos industriales, debido a que estas contienen una alta concentración de subproductos que pueden ser utilizados. Con la adición de fuentes de carbono alternativas a medios de cultivo para el aprovechamiento de nutrientes, se tiene el propósito de biorremediar y aprovechar algunos componentes útiles, al usarlos como nutrientes para el cultivo de cianobacterias, de esta manera se aprovechan los azúcares y sales que contienen.

El agua que se produce a partir del agua de desecho de la producción del aceite de oliva se ha utilizado en estudios previos, para producir biomasa y reducir el efecto contaminante de este residuo (Sánchez Villasclaras et al., 1996). Esta agua contiene carbohidratos simples y complejos, disponibles para los procesos de fermentación, así como cantidades variables de aceite residual, convirtiéndolo en una opción viable para ser utilizado como sustrato para la síntesis de metabolitos de interés biotecnológico como lo es el PHB (Darvishi, 2012).

En el caso de *Synechocystis* sp. PCC 6803, al ser una productora de excelencia, se han utilizado distintos aditivos en los medios de cultivo para maximizar la producción de PHB con el doble propósito de reducir el costo del tratamiento de las aguas residuales y producir biomasa. Por ejemplo, *Synechocystis* fue cultivada en un fotobiorreactor con aguas residuales de la acuicultura intensiva de camarón, obteniendo un 32.48% de PHB (w/w) (Krasaesueb et al., 2019). En el presente trabajo se utilizó el APPAO como sustrato

para la producción de PHA, tanto en cepa silvestre como cepa mutante en *pta* que codifica la fosfotransacetilasa.

**Tabla 2:** Estudios sobre la producción de PHB en el organismo *Synechocystis* y sus diferentes estrategias

Autores	Estrategias utilizadas	PHB %(w/w) obtenido
Panda y Mallick. (2007)	Limitación de fósforo, limitación del intercambio de gases. Presencia de fructosa y acetato	38%
Hondo et al. (2015)	Limitación de nitrógeno	7%
Carpine et al. (2017)	Deleción de los genes <i>pta</i> y <i>arch</i> y la expresión heteróloga de una fosfocetolasa, aumentó la tasa de producción a partir dióxido de carbono	12%
Khetkorn et al. (2016)	Sobreexpresión de genes biosintéticos nativos <i>phaA</i> y <i>phaB</i>	26%
Kamravamanesh et al. (2018)	Células mutadas, induciendo mediante luz ultravioleta como mutágeno	34 ± 4%
Wu et al. (2002)	Se modificó la distribución del carbono, con diferentes fuentes. Mediante una mutación por deleción del gen DNA-glucosa pirofosforilasa ( <i>agp</i> ),	14.9%
Krasaesueb et al. (2019)	Crecimiento en aguas residuales de la acuicultura intensiva de camarón	32.48%
Utharn et al. (2021)	Limitación de nitrógeno y medio privado de fósforo, adicionado con acetato, mutación $\Delta adc1$ (carece del gen)	36.1% W/dcw PHB
Krasaesueb et al., 2021	Se cultivó por 14 días en medio completo de nitrógeno, cepa $\Delta sphU$ que es la deleción del regulador del fosfato	14,57%
Singhon et al. (2021)	Suministro de 10% de fósforo (alta biomasa; baja producción PHB)	6.3
T. Monshupanee y Incharoensakdi. (2014)	-Crecimiento autotrófico 4% -Privación de nitrógeno 13.5% -Combinación: privación nitrógeno, más adición de glucosa al 0.4%, luz de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ : 1%	1.- 4% 2.- 13.5% 3.- 1%
Hondo et al. (2015)	Medio limitado de nitrógeno sin suplementos de azúcar, Se construyeron transconjugantes con vectores de expresión, gen <i>pha</i> .	7%
Tanakarn Monshupanee et al. (2016)	Medio privado de nitrógeno y acetato al 0.2 y 0.4% (p/v)	5.3 a 11.8%
Singhon et al. (2021)	1.-10% fósforo 2.-20% fósforo	1.-6.3% 2.- 5.1%

## 1.2 Justificación

Las cianobacterias son microorganismos fotoautotróficos capaces de utilizar carbono atmosférico como fuente de carbono y luz como fuente de energía. Una de las cianobacterias de interés es la cepa modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803 que es productora natural de PHB que es utilizado como fuente de reserva. Es una cepa de la cual se conocen sus vías metabólicas y su genoma ha sido completamente secuenciado, por lo que es una cepa de interés para la sobreproducción de diferentes metabolitos, incluyendo el PHB. Este bioplástico, representa una fuente viable, biodegradable y renovable para el reemplazo de los plásticos a base de petróleo. Sin embargo, los costos de producción aún son altos por lo que es necesario desarrollar nuevas estrategias de producción. Una opción es utilizar nuevas alternativas de carbono, principalmente provenientes de aguas residuales de procesos industriales como la producción de aceite de oliva. El APPAO por ejemplo ha sido utilizado en bacterias y en microalgas para producir biomasa y reducir el efecto contaminante de este residuo ya que el agua contiene carbohidratos simples y complejos, disponibles para los procesos de fermentación, así como cantidades variables de aceite residual convirtiéndolo en una opción viable para ser utilizado como sustrato para la síntesis de metabolitos de interés biotecnológico como lo es el PHB.

En este proyecto se siguieron dos estrategias diferentes para tratar de aumentar la producción de PHAs: a) el aumento de la disponibilidad del Acetil-Co-A, metabolito precursor de la síntesis de PHB. Esto se realizará mediante la evaluación de la mutante en *pta*, construida previamente en el laboratorio, para tener una mayor disponibilidad del metabolito precursor para la síntesis de PHB y b) la adición de diferentes concentraciones de APPAO, ya que posee componentes nutritivos como los azúcares y ácidos grasos que podría usar la cianobacteria, sí como compuestos fenólicos que pueden provocar estrés celular e inducir la producción de PHB. Los efectos metabólicos de las mutaciones y su efecto en la producción de PHB serán seguidos tanto por métodos espectrofotométricos como por microscopía óptica.

## 1.3 Hipótesis

La adición de agua del proceso de producción de aceite de oliva a los medios de cultivo de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 y mutante en fosfotransacetilasa (*pta*), promoverá el incremento en la producción de PHAs debido a los compuestos fenólicos y nutrientes que contiene.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

Estudiar el efecto del agua del proceso de producción de aceite de oliva (APPAO) en el crecimiento y producción de polihidroxialcanoatos en las cepas silvestre y mutante en fosfotransacetilasa (*pta*) de *Synechocystis* sp. PCC 6803

### 1.4.2 Objetivos específicos

- 1.- Caracterizar el crecimiento de la cepa silvestre de *Synechocystis* en medios de cultivo adicionados con diferentes concentraciones de APPAO y en baja densidad celular inicial
- 2.- Realizar experimentos de inducción con la cepa silvestre y mutante en *pta* con diferentes concentraciones de APPAO y alta densidad celular inicial
- 3.- Evaluar el efecto de la adición de diferentes concentraciones de APPAO en la producción de polihidroxialcanoatos en las cepas silvestre y mutante en *pta*
- 4.- Evaluar mediante microscopía confocal y microscopía electrónica de transmisión (TEM) la presencia de gránulos de PHA en las células de los cultivos de la cepa silvestre y mutante en *pta* adicionadas con APPAO

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Agua de proceso de producción del aceite de oliva

El APPAO fue proporcionada por la empresa “L.A. Cetto”. Esta es obtenida en el último paso del proceso de extracción del aceite de oliva. La empresa proporcionó agua de diferentes especies de olivos: 1) Misión, 2) Manzanilla-Misión.

Para separar los residuos sólidos del agua de APPAO a utilizar en los cultivos, una porción de agua de cada una de las especies de olivo fue tamizada con una tela de queso o gasa de queso. Posteriormente fueron centrifugadas tres veces a 5,000 rpm durante 10 minutos en tubos falcón de 50 ml. En cada ciclo se recuperó el sobrenadante y el pellet formado fue desechado. Al finalizar los periodos de centrifugación se cuantificó el volumen. Debido a que el APPAO Misión estaba muy densa para poder ser filtrada, se le agregó el mismo volumen de agua destilada, considerándolo APPAO al 50%, mientras que el APPAO Misión-Manzanilla por ser más espesa se diluyó al 25%. Los filtros utilizados fueron de la marca VWR, de material de microfibras de vidrio con porosidad de 1.2  $\mu\text{m}$ . El agua filtrada de los diferentes tipos de APPAO fueron esterilizados a 15 psi a 121°C por 15 minutos y almacenados a 4° C en un envase totalmente cubierto. Una muestra de APPAO Misión fue enviada al laboratorio SALIP para analizar la muestra. Así mismo, muestras liofilizadas de Misión y Manzanilla-Misión, que son los dos tipos de APPAO utilizados en este trabajo, fueron analizadas por espectrometría de masas en el Departamento de Innovación Biomédica.

### 2.2 Organismo y condiciones de cultivo

La cepa *Synechocystis* sp. PCC 6803 fue obtenida de la colección de ATCC y pertenece al cepario del Laboratorio de Biología Celular y Molecular del CICESE. La mutante en *pta* fue obtenida previamente en el laboratorio por medio de la interrupción del gen *pta* por el método de sobrelapamiento de genes por PCR y posterior interrupción del gen *pta* en el genoma de la cepa silvestre de *Synechocystis*. El medio utilizado para el cultivo de las cepas fue el BG-11, el cual fue preparado de acuerdo a Stanier et al. (1971) (ver anexo tabla 1.a). Los cultivos se llevaron a cabo en un agitador orbital (VWR) a 100 rpm, a una temperatura de

30 ± 2°C, con un fotoperiodo de 14 h luz/8 h oscuridad y una intensidad lumínica de 100 μmol fotones/m<sup>2</sup>/s provista por lámparas de luz blanca fría.

### 2.3 Crecimiento de *Synechocystis*

Se realizaron cultivos de la cepa silvestre de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (de ahora en adelante cepa silvestre), para conocer la curva y las cinéticas de crecimiento. Estos fueron llevados a cabo por duplicado en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 75 ml de medio BG-11. Los cultivos fueron inoculados en baja biomasa inicial (DO inicial de 0.1) a partir de un cultivo en fase exponencial de la cepa silvestre de *Synechocystis* que inició a partir de colonias aisladas. El crecimiento de los cultivos fue evaluado cada tercer día mediante densidad óptica a 730 nm (DO<sub>730</sub>) utilizando el espectrofotómetro Multiskan GO UV/Vis (Thermo Scientific™).

Con el objeto de identificar las concentraciones del agua de residual de la producción del aceite de oliva, que permitieran el crecimiento y producción de PHB en la cepa silvestre, se realizaron cultivos por triplicado en matraces de 200 ml de capacidad con 50 ml de medio BG-11 adicionados con diferentes concentraciones de APPAO Misión: 1, 5 y 10% y un control con BG-11. Estos cultivos se realizaron con una DO<sub>730</sub> inicial de 0.1 para poder visualizar las diferentes fases de crecimiento. La biomasa fue cuantificada cada tercer día en el espectrofotómetro a 730 nm y con los datos obtenidos se convirtieron a células/ml mediante el uso del factor  $y=0.0204x-0.0597$ , ecuación obtenida por Ortega Lama (2021). Para los cálculos de la tasa de crecimiento ( $\mu$ : divisiones/día) se utilizó la ecuación indicada en Arredondo-Vega et al. (2017):

$$\mu = \frac{\text{Log } X_2 - \text{Log } X_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

En donde

$\mu$ = Tasa de crecimiento (d<sup>-1</sup>)

X=Concentración celular (cél/mL) en dos tiempos de la fase exponencial de crecimiento

Log= Logaritmo natural de X<sub>2</sub> y X<sub>1</sub>

t= Tiempo en días

Para analizar el efecto de diferentes concentraciones de APPAO en la producción de los polihidroxicanoatos, se realizaron cultivos con una alta biomasa inicial (DO<sub>730</sub> 4.0) tanto con la cepa

silvestre como con la mutante en *pta*. Estos cultivos se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad con un volumen de 200 ml de medio BG-11 adicionados con APPAO Manzanilla-Misión, dado que el lote de APPAO Misión se contaminó. Para realizar esto, primero se realizaron cultivos por triplicado en matraces de 500 ml de capacidad con 200 ml en BG-11 con una biomasa inicial de 0.1 y ya que esta alcanzó una DO de más de 4.0, las células fueron lavadas y re-suspendidas en 200 ml medio BG-11 con la concentración respectiva de APPAO (1, 5 y 10%) y ajustados a una  $DO_{730}$  inicial de 4.0. Para analizar la biomasa producida en ambas cepas se tomaron lecturas de DO cada tercer día en el espectrofotómetro.

Así mismo, los días 0, 9, 14 y 24 se tomaron muestras del cultivo (50µl) para analizar los gránulos de PHB por tinción con azul Nilo A mediante microscopía confocal y otros 10 ml de cultivo fueron colectados en tubos Falcón de 15 ml para obtener el peso seco. Para cuantificar la producción de PHA se tomaron muestras de 40 ml de cada uno de los matraces triplicados los días 0, 9 y 24 y se colocaron en tubos Falcón de 40 ml. Para el análisis en TEM se realizó un cultivo adicional en tratamiento 1% en los días 0 y 14. Las muestras de peso seco y de PHA fueron congeladas a -20°C hasta su utilización.

## 2.4 Determinación de peso seco

Para la determinación de peso seco a partir de los 10 ml de muestra, los tubos Falcón fueron centrifugados por 5 minutos a 7,000 rpm y el sobrenadante decantado. La biomasa fue transferida con una micropipeta a tubos Eppendorf previamente pesados en una balanza OHAUS PA224 y se centrifugaron por 5 minutos a 5,000 rpm. El sobrenadante se decantó y se realizó un lavado con agua destilada. Posteriormente fue centrifugado nuevamente bajo las mismas condiciones y el sobrenadante fue descartado con una micropipeta. Finalmente, los tubos abiertos se colocaron en la incubadora a 60°C por 24 horas y posteriormente fueron pesados. El peso seco se obtuvo restando el peso inicial del tubo Eppendorf.

$$PS (mg/mL) = \frac{pf - pi}{VF} \quad (2)$$

Donde pf: peso final del Eppendorf con la biomasa seca, pi: peso inicial del tubo Eppendorf y VF: volumen de muestra.

## 2.5 Extracción de PHA

Para realizar la extracción de PHA se siguió el protocolo descrito en G. García et al. (2021) con algunas modificaciones. Los tubos falcón con los 40 ml de cultivo fueron centrifugados a 7,000 rpm durante 10 minutos para obtener la biomasa. Posteriormente se les realizó un lavado con agua destilada y se volvieron a centrifugar bajo las mismas condiciones para después ser secados completamente en una estufa a 45°C por 12 horas. Las células fueron lavadas con 10 ml de etanol y centrifugadas a 3,000 g durante 30 minutos a 10°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet re-suspendido en 10 ml de hipoclorito de sodio comercial al 5% e incubados a 37°C por una hora. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 7,000 g por 15 minutos a 10°C y el sobrenadante se descartó. El pellet fue lavado con 10 ml de agua y después con 10 ml de etanol. El sobrenadante fue descartado y el pellet se disolvió en 10 ml de cloroformo mediante vórtex y se puso en baño maría a 100°C durante un minuto. Al finalizar el tiempo se vertió cuidadosamente a un frasco previamente pesado, se dejó en la campana para evaporar el cloroformo. Una vez evaporado los frascos se dejaron en la estufa a 45°C por 12 horas, al terminar se pesaron para calcular el peso del PHA. La determinación de PHA se llevó a cabo mediante los pesos obtenidos. Se dividió el peso del polímero extraído entre el volumen de la muestra empleada. Los datos se expresan en g/L.

## 2.6 Determinación de pH

La medición de pH se realizó con el potenciómetro symphony™ Benchtop Meters de la marca VMR. Para la cepa silvestre. Con 1 mililitro de medio se midió el pH. Se realizó por triplicado.

## 2.7 Microscopía

### 2.7.1 Confocal

El protocolo de tinción de las células de los cultivos con azul Nilo se llevó a cabo con base al protocolo descrito por Ostle y Holt. (1982) con algunas modificaciones. Esta metodología permite visualizar los gránulos de PHB en microscopía confocal. Se preparó una solución de azul Nilo al 0.5% en agua destilada, esta fue filtrada con una membrana 0.2 µm. Se preparó otra solución compuesta de glicerol al 95% con PBS al 5% para el frotis.

Se realizó un frotis de cianobacterias en un portaobjetos, una vez seca la muestra se fijó en el mechero y se colocó sobre una malla para mechero bunsen, la muestra sobre un vaso de precipitado con agua a 95°C para que el frotis estuviera a una temperatura aproximada de 55°C. Posteriormente se añadió la solución azul Nilo al 0.5% recubriendo el frotis en su totalidad y se dejó teñir por 10 minutos. Terminado el tiempo de tinción, se lavó con abundante agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante. Se procedió a agregar ácido acético al 8% cubriendo totalmente la muestra y se dejó reposar por de 3 a 5 minutos. Posteriormente el frotis fue lavado con agua destilada, una vez seco se le adicionó 1 gota de glicerol al 95% con PBS 5% y se cubrió con un portaobjetos marca VWR de grosor No. 1 SUPERSLIP. La tinción se selló con ayuda de esmalte de uñas transparente para ser visualizado en el microscopio confocal Olympus invertido FV1000 que se encuentra en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada del CICESE (LNMA-CICESE) bajo la asesoría de los Dres. Diego Delgado y Ernestina Castro.

Las tinciones realizadas fueron analizadas en el microscopio confocal. Las imágenes fueron obtenidas utilizando el objetivo 60X, transmisividad de laser 1 de 13.0%, longitud de onda laser 1 de 488 nm, mientras el láser 2 con una transmisividad de 64% y una longitud de onda de 635 nm.

En el canal 1 se utilizó tinte Alexa Fluor 488, longitud de onda de excitación 488 nm y longitud de onda de emisión 520 nm. En el canal 2 tinte DRAQ5 longitud de onda de excitación 635 y emisión en 683 nm. Las imágenes de microscopía confocal obtenidas en el LNMA-CICESE fueron analizadas en el software FIJI y posteriormente con el programa Image J, con el apoyo del Dr. Enrique Martínez del Tecnológico de Monterrey. El análisis se llevó a cabo con una muestra de 30 células de cada ensayo y en cada una se determinó el diámetro de las células, el diámetro del gránulo (área de presencia del gránulo) de PHA. Los datos se graficaron con el programa GraphPAD. Así mismo se seleccionaron imágenes para representar el cambio a lo largo de los días y de los tratamientos.

### 2.7.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las muestras para TEM se obtuvieron a partir de un cultivo adicional, con la cepas silvestre y mutante en *pta* en medio BG-11 de 200 ml, adicionado con APPAO Manzanilla-Misión al 1%. Las condiciones de cultivo fueron las mismas mencionadas en el apartado 2.3. Se tomaron 2 ml de cultivo en los días 0 y 14, para ser analizadas en TEM. A partir de una alícuota del cultivo se le realizó un lavado con acetona y se fijó con glutaraldehído al 2%. Se llevó a cabo una post-fijación con tetróxido de osmio al 2% Sigma-Aldrich, se dejó reposar, se retiró y se agregó acetato de uranilo al 0.5%. La deshidratación se llevó a cabo por sucesión de

porcentajes de acetona. La inclusión en resina también se llevó a cabo por gradiente creciente de concentraciones. Los bloques de resina se prepararon con moldes de bloque ted pella no. 10505, los cuales se dejaron polimerizar en horno a 60°C. Los cortes se realizaron con un ultramicrotomo (Leica Ultracurt R) con navaja punta de diamante de tamaño 1.5, ángulo 45° y con una velocidad de 1 mm/s. Se realizaron cortes de 60~50 nm, los cuales fueron visualizados con el microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-7500. A 15.7  $\mu$ A, 80 KV ACC voltaje, con aumentos independientes (de 5,000; 15,000; 20,000). Las imágenes se tomaron con el software Maxim DL5, se visualizaron con el software SIA Micrograph DL5-kx, se le realizaron las mediciones celulares con el software FIJI, se calculó su volumen con la fórmula del volumen de la elipse tomando 80 mediciones de células y gránulos. El protocolo de microscopía electrónica de transmisión se realizó según el artículo Tsang et al. (2013) con algunas modificaciones, se llevó a cabo bajo la supervisión de la Dra. Gabriela Guzmán, técnico responsable del microscopio electrónico de transmisión del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada del CICESE (LNMA-CICESE). Finalmente se obtuvieron micrografías de ambas cepas.

## 2.8 Análisis estadístico

Para comparar las diferencias de los datos de peso seco, PHA, de confocal y TEM obtenido entre las cepas silvestre y mutante en *pta* se realizaron pruebas estadísticas en el programa SigmaPlot, así como una prueba de normalidad de datos. Posteriormente se realizó un análisis con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y se continuó con pruebas a posteriori como test de Dunn y prueba de Tukey, según recomendación del programa.

Los datos de pesos seco de la cepa mutante en *pta* fueron analizados por tratamiento, a los datos que resultaron cumplir con los supuestos de normalidad (tratamiento 0, 1 y 5%) se le aplicó la prueba paramétrica de ANOVA de una vía. Los datos que cumplieron con los supuestos de normalidad, pero no la igualdad de varianzas (tratamiento 10%), se le aplicaron la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. La prueba a posteriori que se utilizó para conocer los grupos con diferencias significativas, fue la prueba de Tukey. En el caso del TEM la prueba a posteriori utilizada fue el ensayo de Dunn. Se realizó conteo de células y gránulos para determinar el valor promedio de gránulos, se dividió el valor de células obtenido sobre el valor de gránulos contados.

## Capítulo 3. Resultados

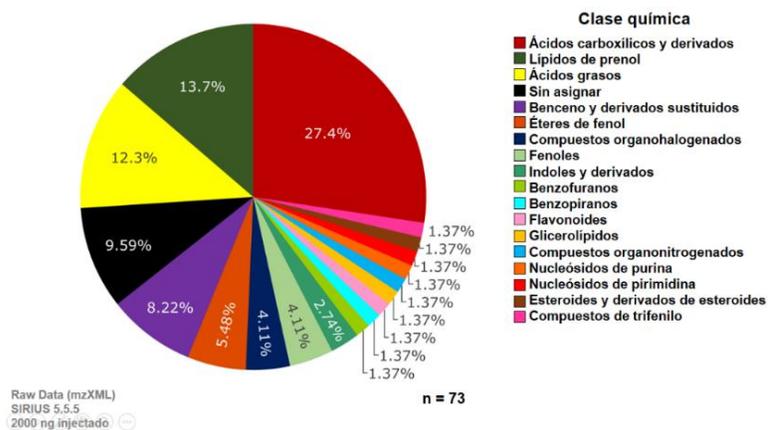
### 3.1 Agua de proceso de producción de aceite de oliva

El APPAO Misión al 50% que se mandó a analizar a un laboratorio industrial mostró que el agua contiene un 0.05% de grasa, 99.45% humedad, 0.11% cenizas, 0% proteínas, 0.339% carbohidratos y 4.41 mg/L de fenoles (en la sección de Anexos se puede consultar el reporte completo).

**Tabla 3:** Análisis de APPAO Misión del laboratorio industrial SALIP

Análisis	Resultado	Metodología
Grasa	0.05%	NOM-086-SSA1-1994
Humedad	99.45%	Gravimétrica
Cenizas	0.11%	Gravimétrica
Proteína	0%	Kjeldahl
Carbohidratos	0.39%	Cálculo
Fenoles	4.41 mg/mL	Espectrofotometría

Así mismo, en el departamento de Innovación biomédica en CICESE se realizó el análisis de una muestra liofilizada de APPAO Manzanilla-Misión (figura 4), mediante Resonancia Magnética Nuclear (NMR). Los resultados mostraron las clases químicas que componen al agua. Los tres compuestos presentes en mayor porcentaje son los ácidos carboxílicos y derivados con 27.4% como 3-acetilaconitina, continuado por lípidos de prenol con 13.7% como oleuropeína y ácidos grasos con 12.3% como el ácido linoleico. El resto se divide en compuestos fenólicos y nitrogenados, entre otros. La composición del APPAO Misión fue muy similar a la de Manzanilla-Misión con un 30.4% de ácidos carboxílicos y un 17.4% de ácidos grasos.

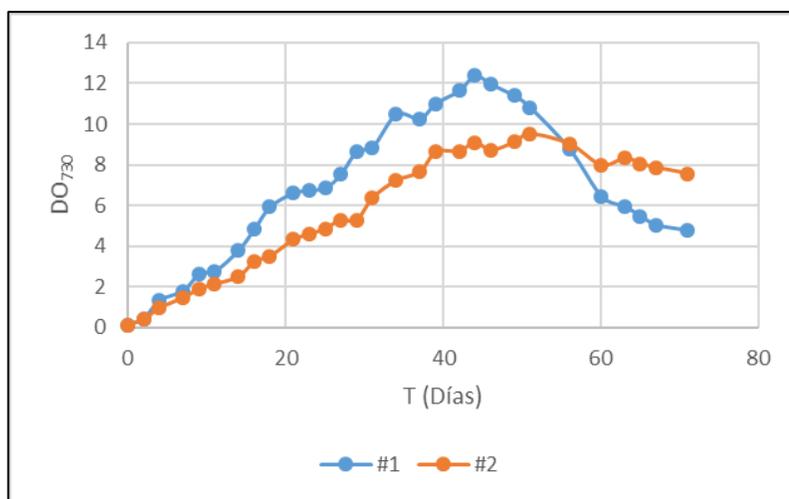


**Figura 4.** Análisis Metabolómico de APPAO Manzanilla-Misión por NMR.

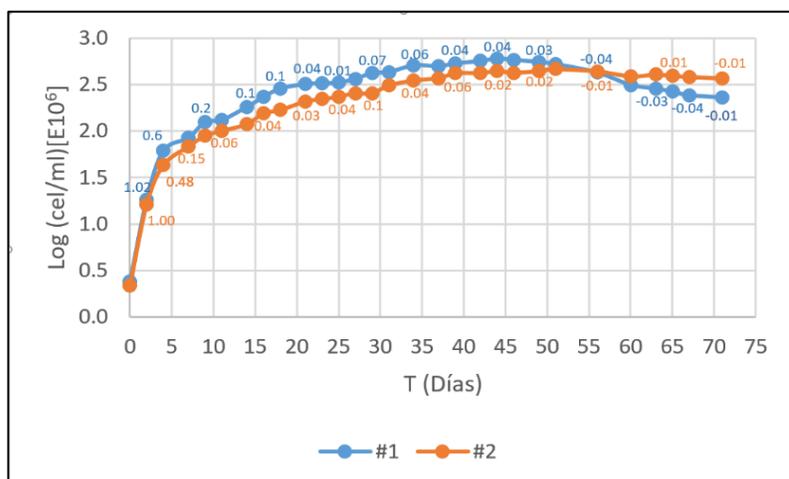
## 3.2 Curvas de crecimiento de la cepa silvestre en baja densidad inicial

### 3.2.1 Curvas en medio BG11

La curva de crecimiento del cultivo de la cepa silvestre en medio BG-11 presentó un comportamiento típico de la especie, en donde se pudieron identificar la fase exponencial, lineal, de crecimiento lento o tardío, estacionaria y muerte celular ya que se decidió llevar el cultivo hasta los 71 días (figura 5). Así mismo se determinó la  $DO_{730}$  máxima alcanzada por la cianobacteria en las condiciones utilizadas que fue de 12 para una de las réplicas y alrededor de 10 para la otra. Se determinó el  $\text{Log}(\text{cél/ml})$  (figura 6), el cual se comparó con la tasa de crecimiento.

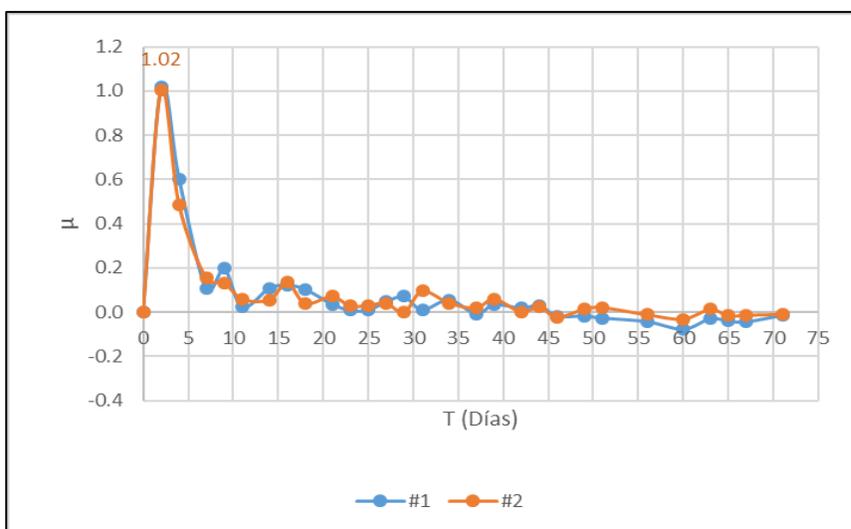


**Figura 5.** Curva de crecimiento en DO de cepa silvestre en medio BG-11. En un periodo de 71 días. Las curvas #1 y #2, representan matraces duplicados



**Figura 6.** Curva de crecimiento de cepa silvestre convertida a  $\text{Log}(\text{cél/ml})$ . El valor sobre las curvas indica la tasa de crecimiento ( $\mu$  div/día).

Como se puede observar en la figura 6 y 7, la tasa máxima alcanzada por la cepa silvestre en medio BG-11 fue de 1.0 (divisiones por día) al día 2 del cultivo, que corresponde a la fase exponencial. A partir del día 4 al 17 se observó la fase de crecimiento lineal donde tuvo una tasa máxima de entre 0.1 y 0.2 y continuó creciendo muy poco durante la fase de crecimiento tardío hasta el día 34 en que entró a la fase estacionaria con tasas de crecimiento entre 0.02 y 0.04. A partir del día 55 de cultivo la cepa entró a fase de muerte celular, ya que las tasas de crecimiento mostraron valores negativos. En las diferentes fases los cultivos presentaron diferentes tonos de coloración según la etapa donde se encontraban (figura 8). Al ser una especie unicelular y permanecer en agitación constante los cultivos se mantuvieron homogéneos. Al inicio del cultivo de la cepa silvestre se observó una coloración verde clara (figura 8a). En la figura 8B se muestran los cultivos al día 44, los cuales presentaron una coloración verde intenso características de la especie cuando presenta una alta biomasa. En este día es donde se registró la DO máxima para ambos cultivos (ver curva de figura 5). A partir de ese día el cultivo fue muriendo, lo que se aprecia en la foto del cultivo el día 71 (figura 8C) que presentó una coloración amarillo-ámbar que coincide con lo observado en la gráfica de crecimiento (figura 5).



**Figura 7.** Tasa de crecimiento de *Synechocystis* en medio BG-11

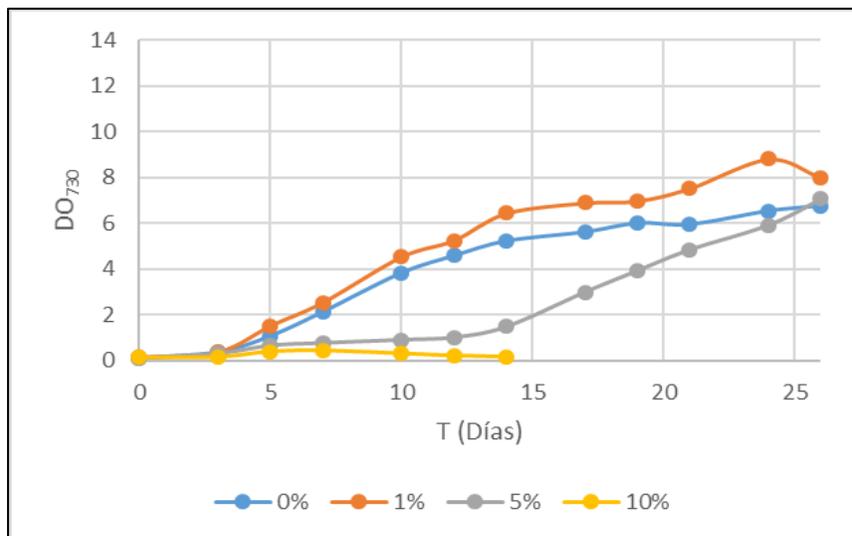


**Figura 8.** Evolución en coloración del cultivo de la cianobacteria. A) Cultivos el día 0; B) Día 44; C) Día 71

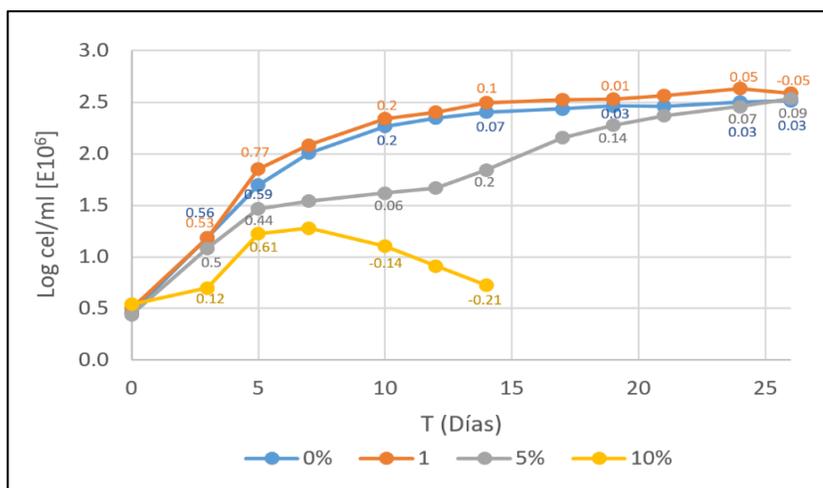
### 3.2.2 Curvas en medio BG11 adicionados con APPAO Misión

Con el objetivo de ver el efecto de las diferentes concentraciones de APPAO (agua del proceso de producción de aceite de oliva) en el crecimiento de cepa silvestre, se realizó la curva de crecimiento en APPAO Misión en medio BG-11 sólo y BG-11 adicionado con 3 diferentes concentraciones de APPAO (1, 5 y 10%). Como se puede observar en las figuras 9 y 10, en el tratamiento en medio BG-11 solo (0%) y en 1% de APPAO, se obtuvo la misma tendencia de crecimiento y valores de DO muy parecidos entre sí, particularmente al inicio de la curva. Para el día 14 la mayor densidad óptica se obtuvo en el tratamiento con 1%, sobre todo en la parte final del cultivo, llegando a su máximo crecimiento al día 24 con una DO de 9 y posteriormente el cultivo entró en fase de muerte.

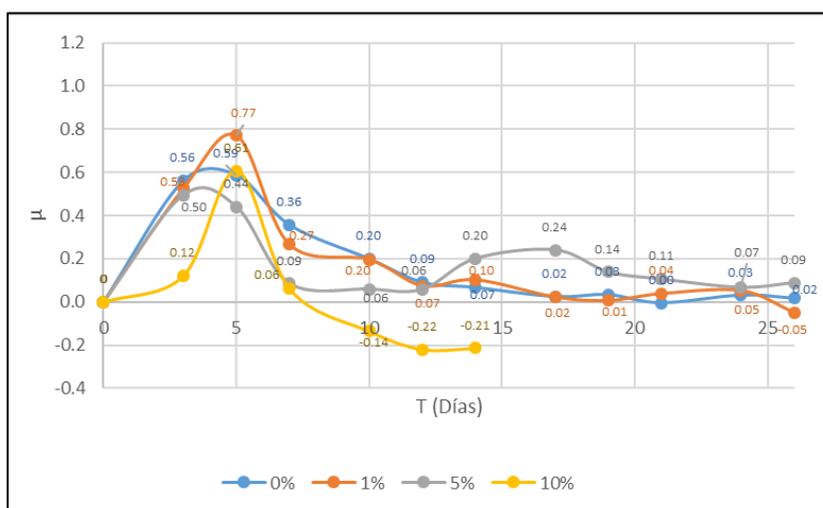
La tasa de crecimiento máxima para los tratamientos de BG-11 solo y BG-11 adicionados con 1% de APPAO se obtuvieron al día 5 de cultivo con 0.59 y 0.77 div/día, respectivamente (figuras 10 y 11). En el tratamiento 5% la fase exponencial duró hasta el día 10, obteniéndose las tasas máximas de crecimiento los días 3 y 5 de cultivo con valores de 0.5 y 0.44, respectivamente (figuras 9 y 10). Posteriormente, del día 5 al 12 se observó una fase con poco crecimiento con tasas de 0.06. Este periodo fue seguido por una fase de crecimiento lento entre los días 13 y 22 con tasas de entre 0.1 y 0.2, para posteriormente entrar a la fase estacionaria el día 23. En cambio, el tratamiento 10% tuvo una fase de adaptación del día 0 al 3, seguido por una fase exponencial de crecimiento que tuvo una tasa de crecimiento máximo de 0.61. A partir de ahí el cultivo entró rápidamente a fase estacionaria y de muerte celular.



**Figura 9.** Curva de crecimiento en APPAO en DO en 730 nm. Cepa silvestre adicionado con diferentes concentraciones de APPAO Misión (0, 1, 5 y 10%)



**Figura 10.** Curva de crecimiento en APPAO en Log (cél/ml) [E10<sup>6</sup>]. Cepa silvestre adicionado con diferentes concentraciones de APPAO Misión (0, 1, 5 y 10%)



**Figura 11.** Tasa de crecimiento ( $\mu$  div/día) de curva de crecimiento en APPAO Misión

### 3.3 Experimentos inducción silvestre y mutante en *pta* en alta densidad celular inicial

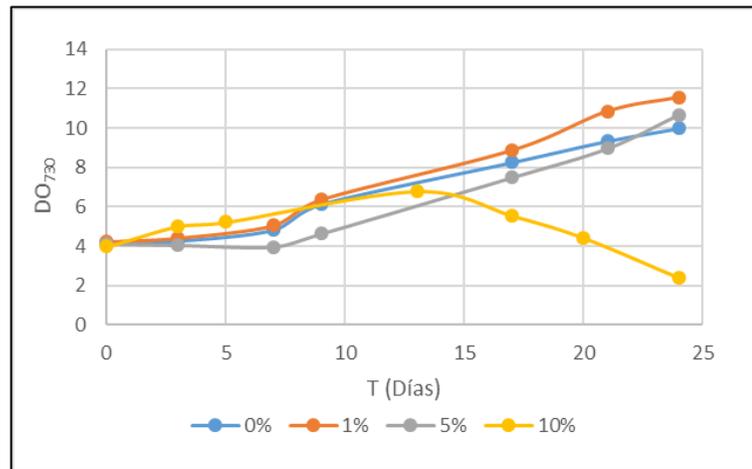
Los ensayos de inducción se realizaron con el objetivo de ver el efecto de las diferentes concentraciones de APPAO en la biomasa, tanto en la DO como en el de peso seco, pero principalmente para ver el efecto inductor de APPAO Manzanilla-Misión en la producción de PHAs de la cepa silvestre y mutante en *pta*. A diferencia de las curvas de crecimiento anteriores de la cepa silvestre que iniciaron con una  $DO_{730}$  de 0.1, en estos ensayos se inició con una  $DO_{730}$  de 4.0, para evitar estresar a las células desde el inicio por la presencia de fenoles del APPAO y en cambio buscar que la inducción a la producción de PHAs se llevara a

cabo cuando el cultivo tuviera una alta biomasa. Se utilizó el APPAO Manzanilla-Misión debido a que se presentó contaminación en APPAO Misión.

### 3.3.1 Cultivo de la cepa silvestre en alta biomasa inicial

#### 3.3.1.1 Densidad óptica

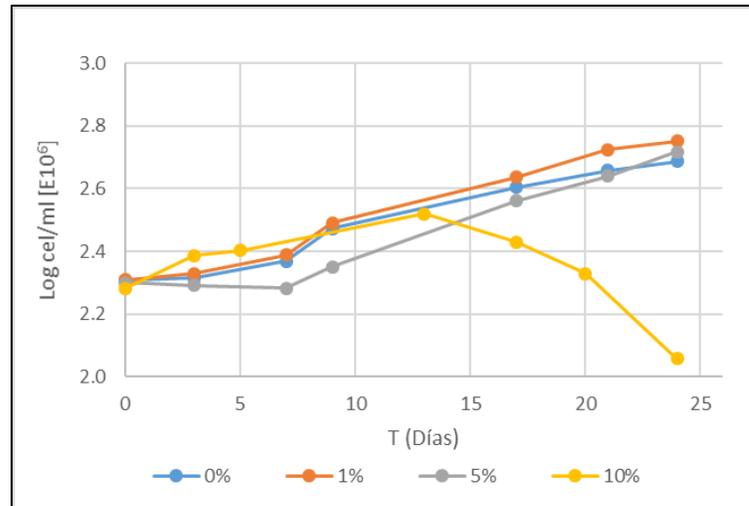
La curva de inducción de la cepa silvestre (figura 12) mostró crecimiento tanto en las condiciones control (BG-11 solo (0%) así como en 1% y 5% de APPAO Manzanilla-Misión, debido a contaminación presente en APPAO Misión.



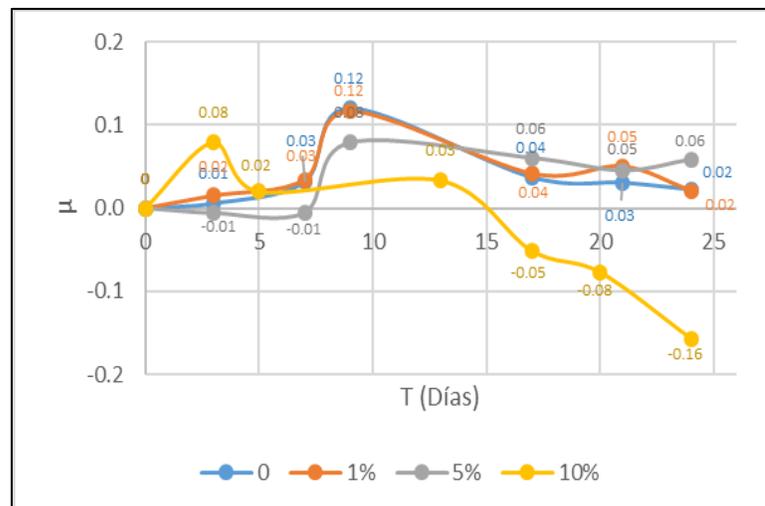
**Figura 12.** Cultivo de la cepa silvestre en alta biomasa inicial. en medio BG-11 y adicionado con diferentes concentraciones de APPAO Manzanilla-Misión

Cada curva es el promedio de tres ensayos. En las gráficas se muestran los valores de desviación estándar. Sin embargo, no se aprecian debido a que los valores fueron muy pequeños (0.001 ~ 0.004). En todas las condiciones probadas se observó entre 2.5 y 3 veces más biomasa, en el día 24, en comparación con la inicial (DO<sub>730</sub> 4) con excepción del tratamiento del 10%. Las curvas obtenidas en las condiciones de 0 y 1% mostraron un comportamiento muy similar hasta el día 17. A partir de ahí hubo un aumento de DO en el tratamiento de 1% en comparación con el tratamiento de BG-11 sin APPAO. Al incrementarse la concentración de APPAO a 5% el cultivo se mantuvo con la misma DO hasta el día 7 y a partir del día 9 aumentó hasta valores similares al cultivo en BG-11 y 1% de APPAO. En cambio, en el tratamiento 10%, se observó un incremento de DO lento pero constante hasta el día 13 y posteriormente decayó, mostrando

al final del cultivo solamente la mitad de la DO inicial. El efecto de la concentración de 10% se hizo evidente cuando se graficó en cél/ml (figura 13). Las mayores tasas de crecimiento se presentaron el día 7 para las condiciones 0 y 1% con 0.12 para ambas, para el tratamiento 5% fue en el día 9 y para 10% en el día 3, ambos con  $\mu=0.08$  div/día (figura 14).



**Figura 13.** Curva de inducción silvestre en APPAO Manzanilla-Misión en Log (cél/ml) [E106]



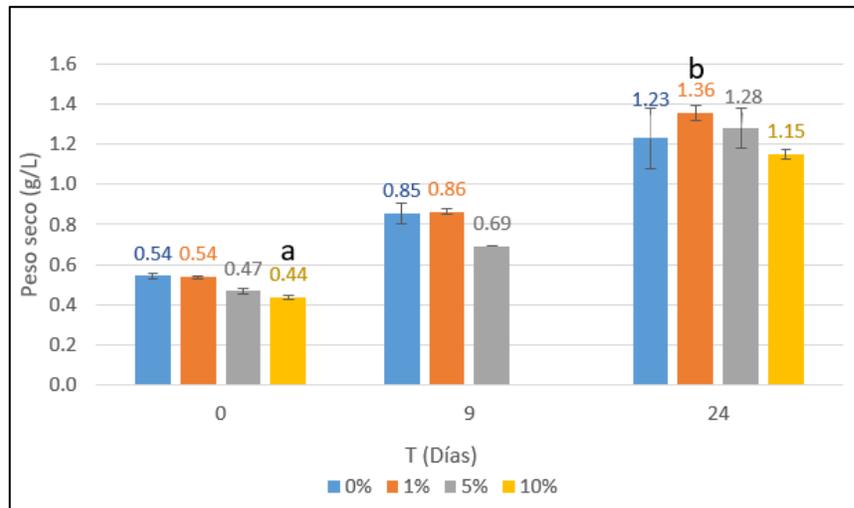
**Figura 14.** Tasa de crecimiento ( $\mu$  div/día) de curva de inducción silvestre en APPAO Manzanilla-Misión

### 3.3.1.2 Peso seco

Los datos de pesos seco de la cepa silvestre (figura 15) fueron analizados por tratamiento. Los datos obtenidos cumplieron con los supuestos de normalidad (tratamiento 0%, 1% y 10%). Los resultados solo

mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la biomasa medida como peso seco entre el tratamiento 1% del día 24 (1.36 g/L) y el tratamiento 10% del día 0 (0.44 g/L).

Comparando los datos, el peso seco en el día 24 del tratamiento 1% aumento un 67% con respecto al día 0 del tratamiento 10%. De esta manera el mayor nivel de peso seco en g/L se obtuvo en día 24 del el tratamiento 1%.



**Figura 15.** Valores de peso seco (g/L) con respecto al tiempo (días) en la cepa silvestre cultivada en medio BG-11 adicionada con diferentes concentraciones de APPAO Manzanilla-Misión (0, 1, 5 y 10%). En las barras se muestran los valores de la Medía  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ),  $n=3$ .

### 3.3.1.3 PHA

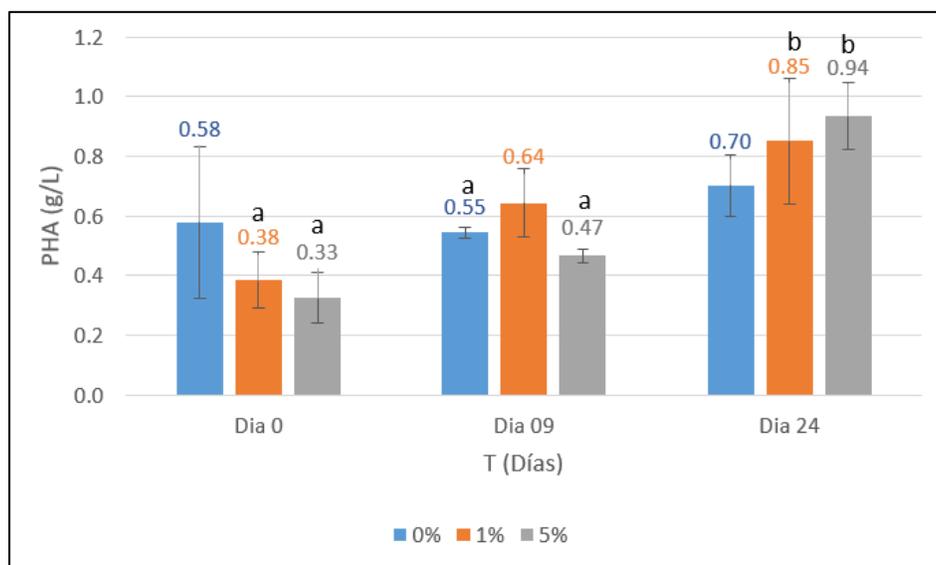
El PHA fue medido de las muestras obtenidas de los cultivos con alta biomasa inicial, llamados inducción silvestre o inducción en cepa mutante en *pta*. Los datos del polímero extraído se presentan como PHA y no como PHB debido a que si bien *Synechocystis* sp. PCC 6803 es una cepa productora natural de PHB, el hecho de crecerla en un medio adicionado con APPAO podría promover la síntesis otro tipo de PHA o la formación de copolímeros. Por otro lado, los resultados se presentan como gramos de polímero recuperado por el volumen de la muestra y no como % de PHA debido a que el peso del polímero extraído fue mayor al peso seco de la biomasa. Esto pudo deberse a la presencia de aceites en la muestra que no pudieron ser eliminados durante el proceso de extracción. Por otro lado, no se presentan datos de la extracción de PHA en la cepa silvestre en el tratamiento 10% debido a la contaminación de los cultivos.

En el cultivo inducción en cepa silvestre (figura 16), el mayor valor promedio obtenido en el día 0 fue de 0.58 g/L en medio BG-11 con 0% APPAO, seguido de las condiciones 1% y 5% APPAO que presentaron

valores muy similares entre sí (0.38 g/L y 0.33 g/L, respectivamente). En el día 9, donde los cultivos ya se encontraban en fase estacionaria, el mayor valor promedio de PHA obtenido fue en el tratamiento 1% con 0.64 g/L, seguido de 0% con 0.55 g/L, y el 5% presentó 0.47 g/L de polímero. En el día 24 el mayor valor obtenido fue en el tratamiento 5% con 0.94 g/L, después 1% con 0.85 y finalmente 0% con 0.70 g/L.

Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas solamente en la producción de PHA entre los tratamientos de APPAO 1 y 5% del día 24 con respecto a otros tratamientos. El tratamiento 1% del día 24 mostró diferencias significativas en la producción de PHA con respecto a otros tratamientos como el día 0 del tratamiento 5% APPAO ( $P=0.004$ ) y con el día 0 del tratamiento 1% APPAO ( $P=0.011$ ).

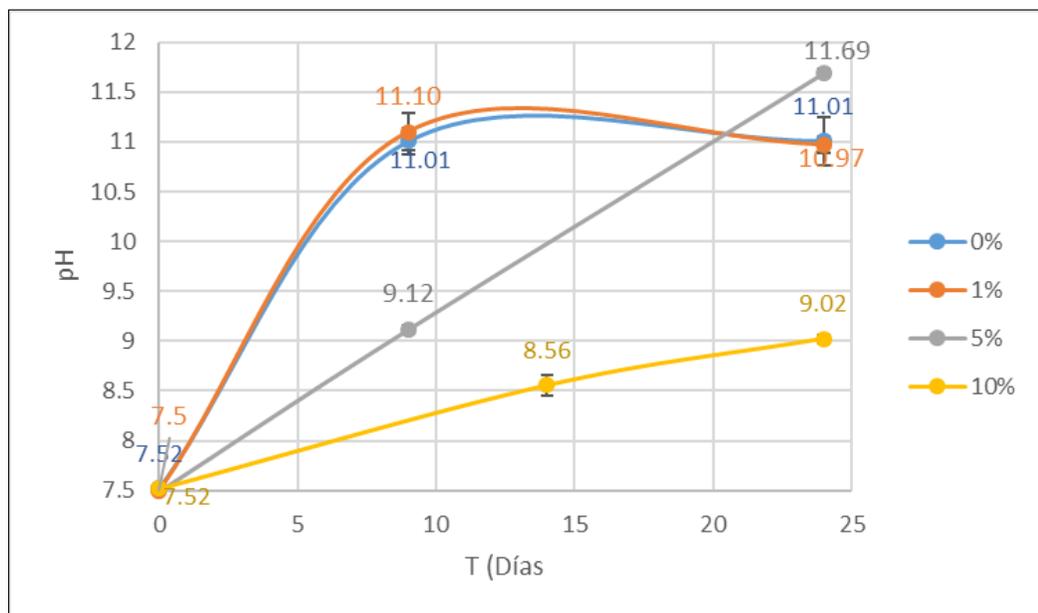
El tratamiento 5% APPAO del día 24 mostró un aumento altamente significativo ( $P<0.001$ ) en la producción de PHA con respecto al día 0 del tratamiento 5%. Este mismo tratamiento tuvo una  $P=0.002$  con respecto al día 0 del tratamiento 1%; un  $P=0.011$  con respecto al día 9 del tratamiento 5% y un  $P=0.045$  comparado con el día 9 del tratamiento 0%. Las diferencias entre los valores de PHA de los tratamientos se calcularon como porcentaje. De esta manera se puede evidenciar que en el día 24 de APPAO 5% el PHA aumento 64.8% con respecto al día 0 del mismo tratamiento, 59.5% con respecto al día 0 del tratamiento 1%; 50% con respecto al día 9 del tratamiento 5% y un 41.4% comparado con el día 9 del tratamiento 0%. De esta manera, los mayores niveles acumulados de PHA en g/L se obtuvieron en el día 24 de los tratamientos de APPAO 1 y 5%.



**Figura 16.** Valores de PHA (g/L) con respecto al tiempo (días) en la cepa silvestre. Cultivada en medio BG-11 adicionada con diferentes concentraciones de APPAO Manzanilla-Misión (0, 1 y 5%). En las barras se muestran los valores de la Media  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencia significativa (Intervalo de  $P<0.01$  a  $P=0.045$ )  $n=3$ .

### 3.3.1.4 pH

Con el pH se obtuvieron resultados interesantes (figura 17) ya que aun cuando todos los cultivos fueron ajustados a un pH inicial de 7.5, este fue incrementando progresivamente a lo largo del tiempo. El pH aumentó considerablemente en las condiciones 0 y 1% con valores muy similares entre sí, hasta llegar a un valor de 11 en el día 9 donde se mantuvo hasta el día 24. En el tratamiento de 5% y 10% en el día 9 se observó un pH de 9.1 y de 8.1, respectivamente. Sin embargo, la alcalinidad del cultivo al 5% siguió aumentando progresivamente y al día 24 mostró un pH muy similar al de los cultivos con 0 y 1%, mientras que el cultivo con 10% de APPAO aumentó solamente a pH de 9. En este sentido, aunque la adición de APPAO al 5 y 10% modificaron la cinética de pH en comparación con la del medio BG11 sólo, en APPAO 10% el pH al final de la curva fue además 20% menor al alcanzado en los otros tratamientos.

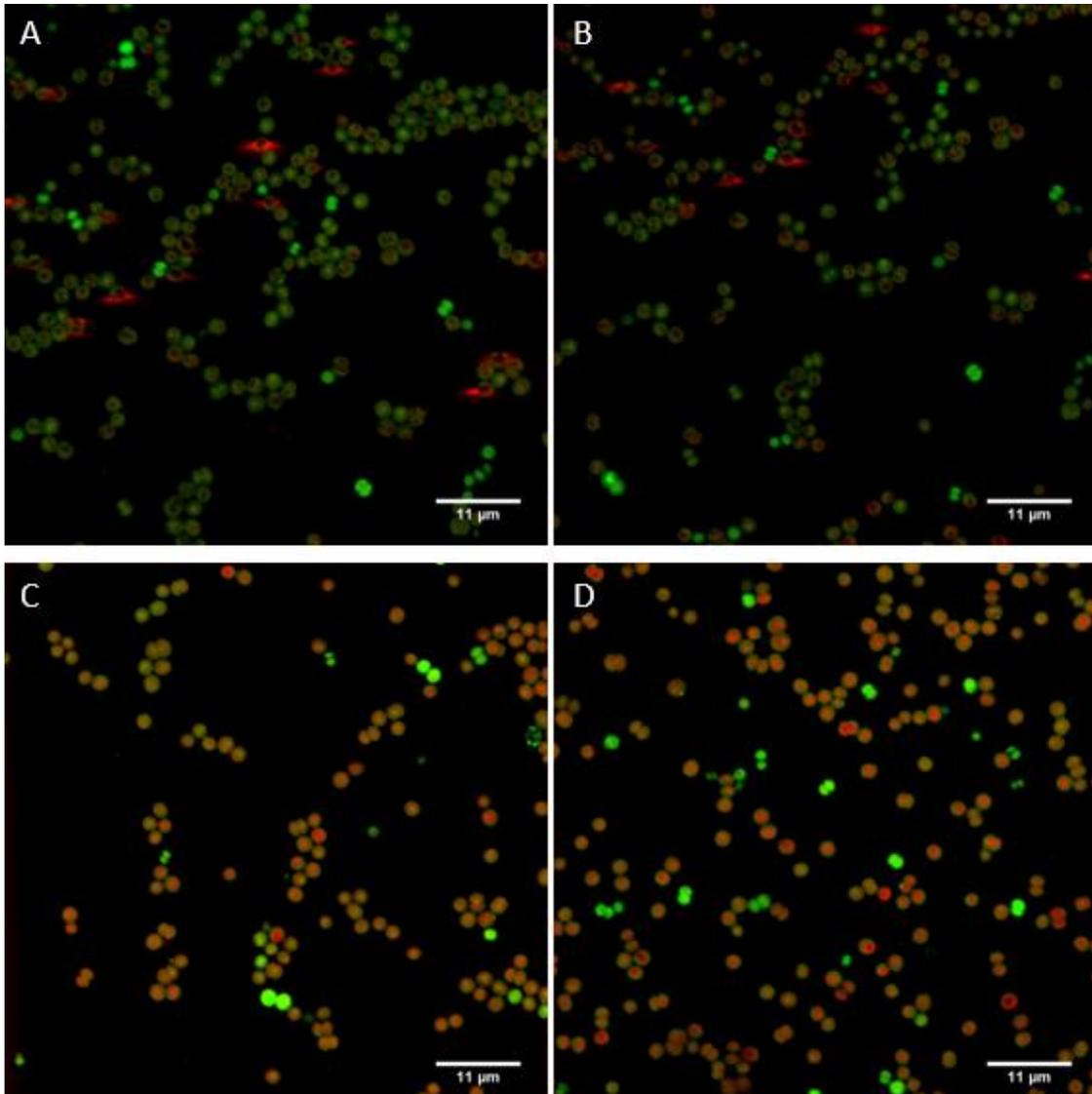


**Figura 17.** pH del cultivo cepa silvestre inducción APPAO Manzanilla-Misión. Medido los días 0, 9 y 24 para las condiciones control (0%), 1% y 5%. Los días 0, 14 y 24 para el tratamiento 10%.

### 3.3.1.5 Microscopía confocal

Las células de las diferentes condiciones fueron teñidas con azul Nilo y analizadas en el microscopio confocal para evaluar la presencia de gránulos de PHA, los cuales presentan una coloración roja. Las células de la cepa silvestre tienen forma circular, con un diámetro de alrededor de 1.4  $\mu\text{m}$  y en todos los días del tratamiento BG-11 0% APPAO se observaron células dividiéndose por fisión binaria. En los primeros días del cultivo el polímero se empezó a detectar en la periferia de algunas células (figura 18A) y para el día 18

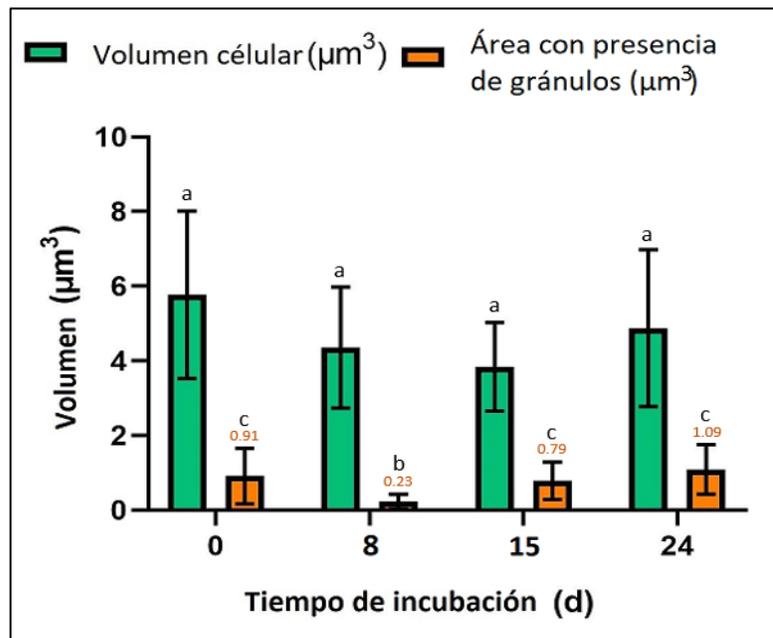
el gránulo ya estaba completamente formado y ocupando más superficie de la célula (figura 18C). En el día final del experimento se puede ver que los gránulos están presentes en la mayoría de las células de la muestra, además de presentar un tamaño y color de la tinción más uniforme (figura 18D).



**Figura 18.** Microscopía confocal del ensayo 0% APPAO en cepa silvestre. En medio BG-11. Tinción con azul Nilo al 0.5%. A) Día 0, B) Día 08, C) Día 18 y D) Día 24 de cultivo

En la figura 19 se presentan los datos de las mediciones promedio de los volúmenes celulares y de los gránulos de PHA de la cepa silvestre en medio BG11 sin APPAO en los diferentes días de cultivo. El análisis estadístico mostró que no existe una diferencia significativa entre el volumen de las células de los diferentes tratamientos, pero si entre el volumen del gránulo de día 8 con respecto a los días 0, 15 y 24, ( $P < 0.05$ ). Estos resultados evidenciaron una disminución de 71-79% en el área con presencia de gránulos

del día 8 con respecto a los otros tiempos de incubación. De este modo, la mayor área con presencia de gránulos en  $\mu\text{m}^3$  se obtuvo en el día 24

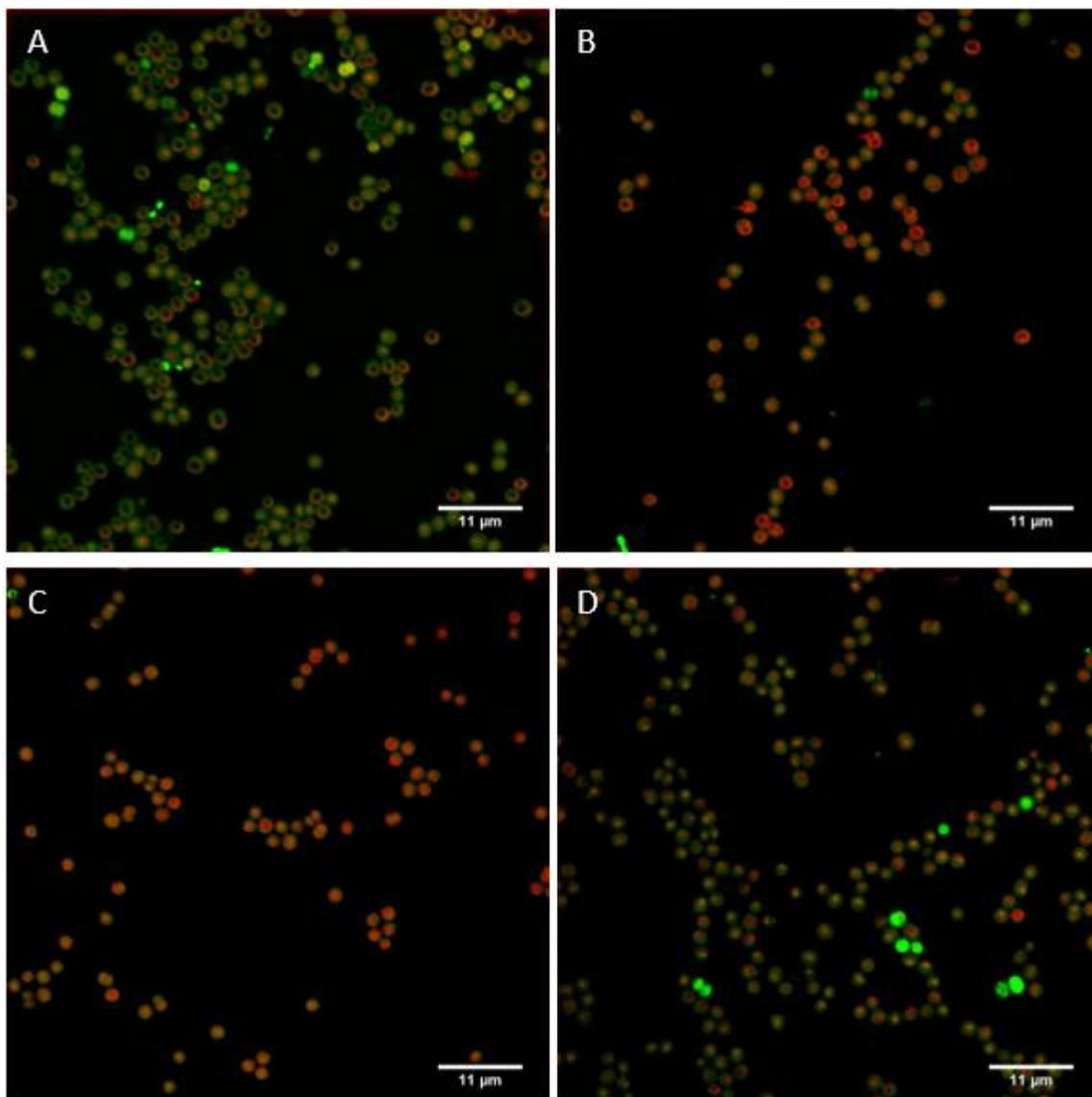


**Figura 19.** Volumen celular y volumen del gránulo de PHA en el tratamiento 0% APPAO de la cepa silvestre. En verde se presenta el volumen celular medido en  $\mu\text{m}^3$ , en naranja el volumen del gránulo en  $\mu\text{m}^3$ . Letras distintas indican diferencia significativa ( $P=0.483$ ),  $n=30$ .

En el tratamiento de la cepa silvestre con 1% de APPAO, en el día 0 de inducción (figura 20A) se observaron células con el centro obscuro y la periferia interna teñidas de rojo, evidenciado el inicio de la formación del gránulo de PHA desde la periferia. Para el día 8 del cultivo (figura 20B) el polímero cubrió una mayor parte de la célula quedando un centro hueco de menor tamaño que el observado en el tiempo 0. En el día 18 se observó que todas las células estaban teñidas y que el gránulo ocupó todavía una mayor porción de la célula de manera uniforme (figura 20C).

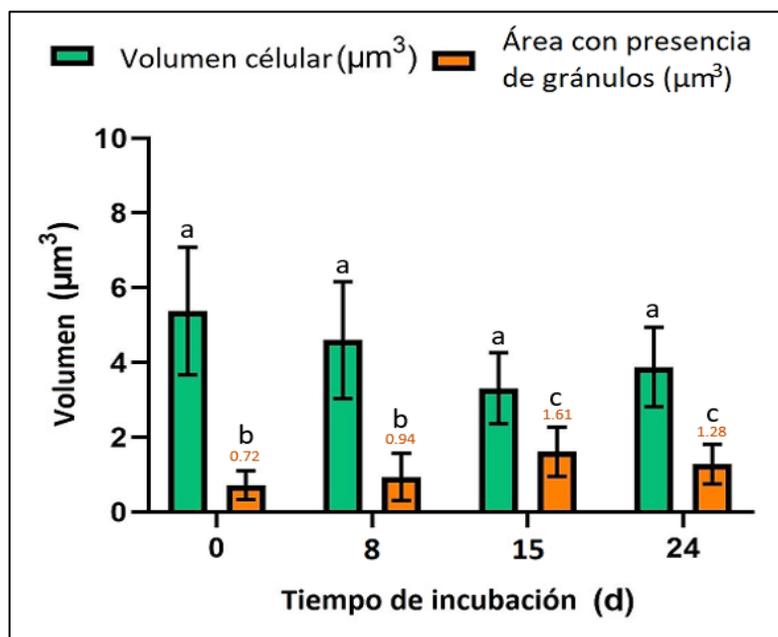
En la figura 21 se presentan graficados las mediciones promedio de los volúmenes celulares y del gránulo de la cepa silvestre en medio BG11 con 1% APPAO a lo largo de los diferentes días de cultivo. La mayor área promedio con presencia de gránulos de PHA se obtuvo en el día 15 con  $1.61 \mu\text{m}^3$ . El análisis estadístico mostró que no existe una diferencia significativa entre el volumen de las células de los diferentes tratamientos, pero sí entre el volumen de los gránulos de PHA de los días 0 y 24, así como, en el día 15 con respecto a los días 0 y 8 ( $P<0.05$ ). Estos resultados evidencian un aumento del área con presencia de gránulos del 43.7% en el día 24 con respecto al día 0, mientras que en el día 15 se observaron

aumentos del 55 y 41.6% en comparación con los días 0 y 8, respectivamente. De esta manera, la mayor área con presencia de gránulos en  $\mu\text{m}^3$  se obtuvo en el día 18.

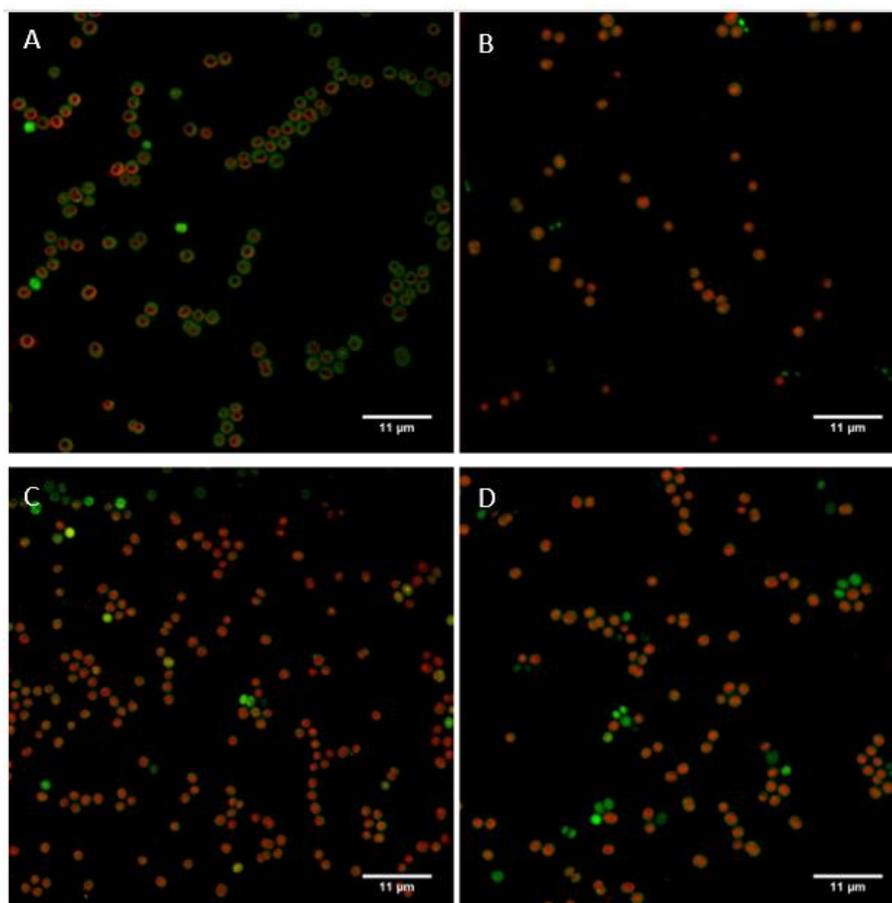


**Figura 20.** Microscopía confocal del ensayo 1% APPAO en cepa silvestre. Ensayo de inducción. Tinción con azul Nilo al 0.5%. A) Día 0, B) Día 08, C) Día 18 y D) Día 24 de cultivo

En el día 0 del tratamiento de la cepa silvestre con BG-11 adicionado con 5% APPAO, las células presentaron el polímero en la periferia de la célula, dejando el centro hueco (figura 22A). En el día 8 las células presentan gránulos que abarcaron la mayor parte de área celular (figura 22B), así como en los días posteriores donde se observaron con un solo gránulo grande en la mayoría de las células (figura 22C). Específicamente en el día 24 la mayoría de las células presentaron gránulos a excepción de algunas que se observaron completamente verdes, evidenciando la ausencia de gránulos.

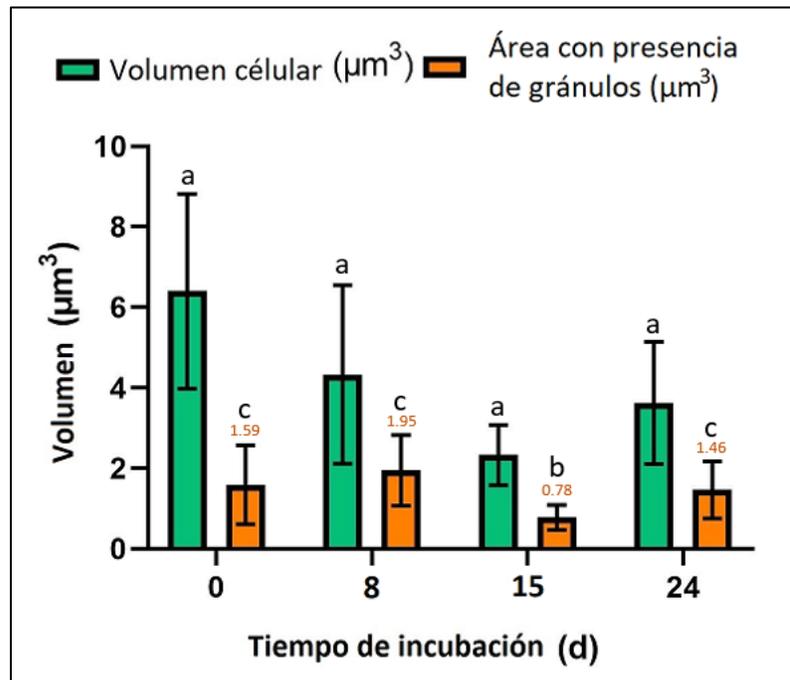


**Figura 21.** Volumen celular y volumen del gránulo de PHA en el tratamiento con BG-11 con 1% APPAO de la cepa silvestre. En verde se presenta el volumen celular medido en  $\mu\text{m}^3$ , en naranja el volumen del gránulo en  $\mu\text{m}^3$ . Letras distintas indican diferencia significativa significativos ( $P < 0.05$ ),  $n = 30$ .



**Figura 22.** Microscopía confocal del ensayo 5% APPAO en cepa silvestre. Ensayo de inducción. Tinción con azul Nilo al 0.5%. A) Día 0, B) Día 08, C) Día 18 y D) Día 24 de cultivo

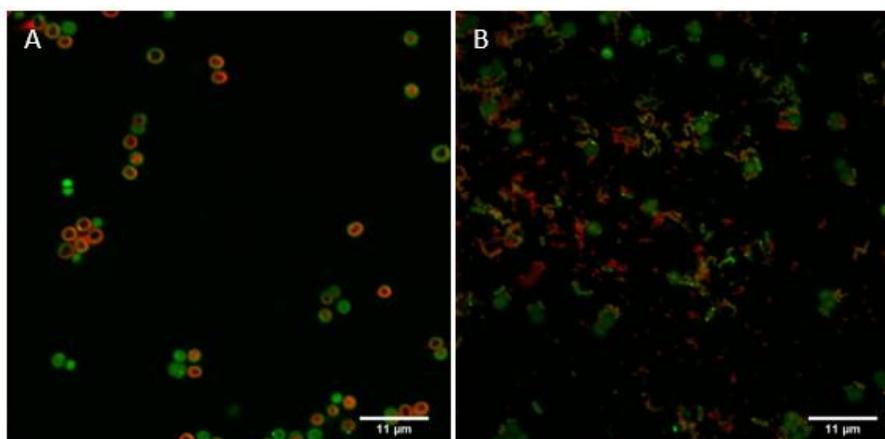
El análisis estadístico de los volúmenes celulares y de los gránulos de PHA en la condición de BG-11 con 5% APPAO (figura 23) mostró que no existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el volumen celular a lo largo del cultivo, pero si en el tamaño de los gránulos de PHA entre el día 15 con respecto a los días 0, 8 y 24, ( $P < 0.05$ ). Estos resultados evidencian un aumento del 50.9, 60 y 46.5% en los días 0, 8 y 24, respectivamente, en comparación con el día 15. De este modo, la mayor área con presencia de gránulos en  $\mu\text{m}^3$  se obtuvo en el día 8



**Figura 23.** Volumen celular y volumen del gránulo de PHA en el tratamiento en BG-11 con 5% APPAO de la cepa silvestre. En verde se presenta el volumen celular medido en  $\mu\text{m}^3$ , en naranja el volumen del gránulo en  $\mu\text{m}^3$ . Letras distintas indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ),  $n=30$ .

En el tratamiento de la cepa silvestre con BG-11 adicionado con 10% APPAO (figura 24), en el día 0 los gránulos de PHA aparecieron sólo en las periferias de la célula, dejando el centro hueco. Para el día 14 no hubo crecimiento de gránulos en la célula por la contaminación presente. Debido a la alta contaminación no se continuó con las tinciones.

En la tabla 4 se presenta un resumen comparativo de las fotos obtenidas en los diferentes tratamientos para la cepa silvestre a lo largo de los días de cultivo. En general todas las condiciones en el día 0 se observó la formación del gránulo a partir de la periferia y conforme avanzaron los días el gránulo se observó más definido en la parte central de la célula y con una coloración roja más intensa. Por lo tanto, con base en las mediciones realizadas las mayores áreas con presencia de gránulos en la cepa silvestre se obtuvieron en el día 24 del tratamiento BG11 ( $1.09 \mu\text{m}^3$ ), el día 18 del tratamiento con APPAO 1% ( $1.61 \mu\text{m}^3$ ) y el día 8 en APPAO 5% ( $1.95 \mu\text{m}^3$ ).



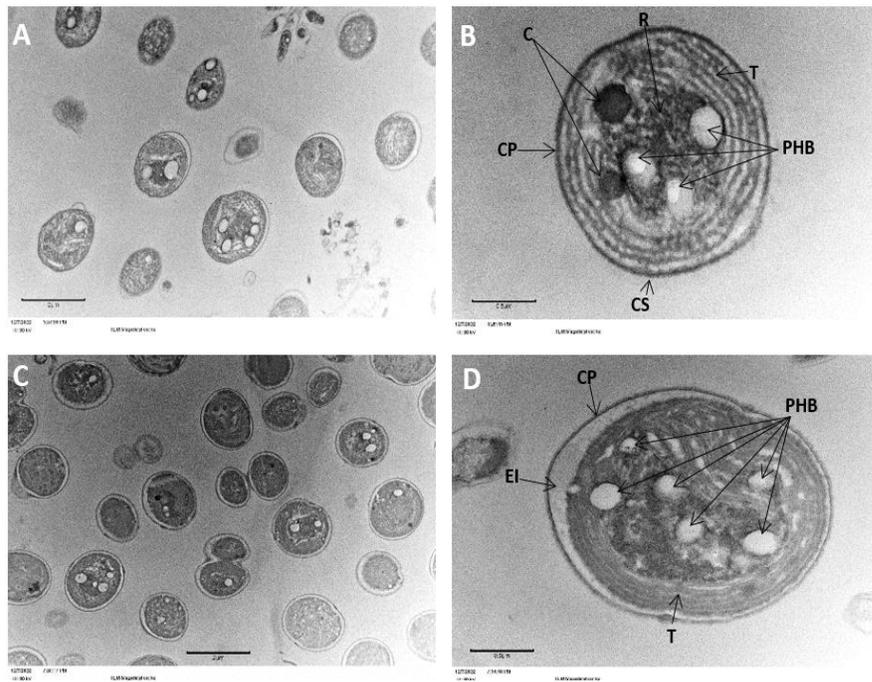
**Figura 24.** Microscopía confocal del ensayo 10% APPAO en cepa silvestre. Ensayo de inducción. Tinción azul Nilo al 0.5%. A) Día 0, B) Día 14 de cultivo

**Tabla 4:** Células en los diferentes tratamientos y días de la cepa silvestre

		Tratamiento		
		0%	1%	5%
T(días)	0			
	8			
	18			
	24			

### 3.3.2 Microscopía electrónica de transmisión en la cepa silvestre

Los análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la cepa silvestre (figura 25) mostraron células con forma ovoide-circular. En la muestra del día 0 (figuras 25A y 25B) se pueden distinguir diferentes cuerpos de inclusión de la célula como la capa S, tilacoides, carboxisomas y ribosomas, así como componentes sub-celulares. Se pueden notar tres gránulos de PHA cerca de los tilacoides. Las mediciones de las células en el día 0 mostraron un volumen promedio de  $11.8 \mu\text{m}^3 \pm 3.61$ , mientras que el gránulo de forma ovoide tuvo un volumen de  $0.075 \mu\text{m}^3 \pm 0.065$ , lo que representa el 0.63% del volumen total de la célula. El valor promedio de gránulos fue de 1.45 gránulos por célula.



**Figura 25.** Microscopía electrónica de transmisión de la cepa silvestre. En APPAO 1% Manzanilla-Misión (A y B) día 0, (C y D) día 14. (A y C) imagen con 20,000 aumentos y barra de escala de  $2\mu\text{m}$ ; (B y D) imágenes con 5,000 aumentos barra de escala  $0.5 \mu\text{m}$ . C: Carbonosomas; R: Ribosomas; T: Tilacoides; CP: Capa de Peptidoglicano; CS: Capa S; PHA: Gránulo de PHA; EI: Espacio Inter-membranal.

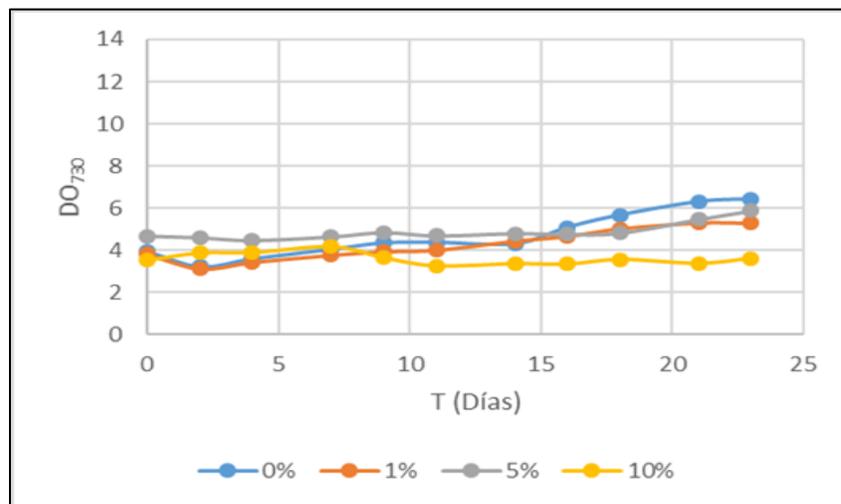
En cambio, en el día 14 (figuras 25C y 25D), la célula mostró una forma más ovalada, en comparación del día 0. Sin embargo, no se pudieron apreciar la capa S ni los carboxisomas. Las células mostraron un espacio inter-membranal amplio en un solo polo de la célula y la presencia del doble de gránulos de PHA en comparación con el tiempo 0 (hasta 6 gránulos por célula). Las mediciones celulares en el día 14 dieron un volumen promedio de  $10.72 \pm 3.76$  mientras que en los gránulos  $0.023 \pm 0.017$  representando el 0.21% del volumen total de la célula. El valor promedio de gránulos es de 1.54 gránulos por célula. De este modo,

la mayor área con presencia de gránulos en  $\mu\text{m}^3$  se obtuvo en el día 24. De esta manera, los mayores volúmenes celulares y granulares en  $\mu\text{m}^3$  se obtuvieron en el día 0.

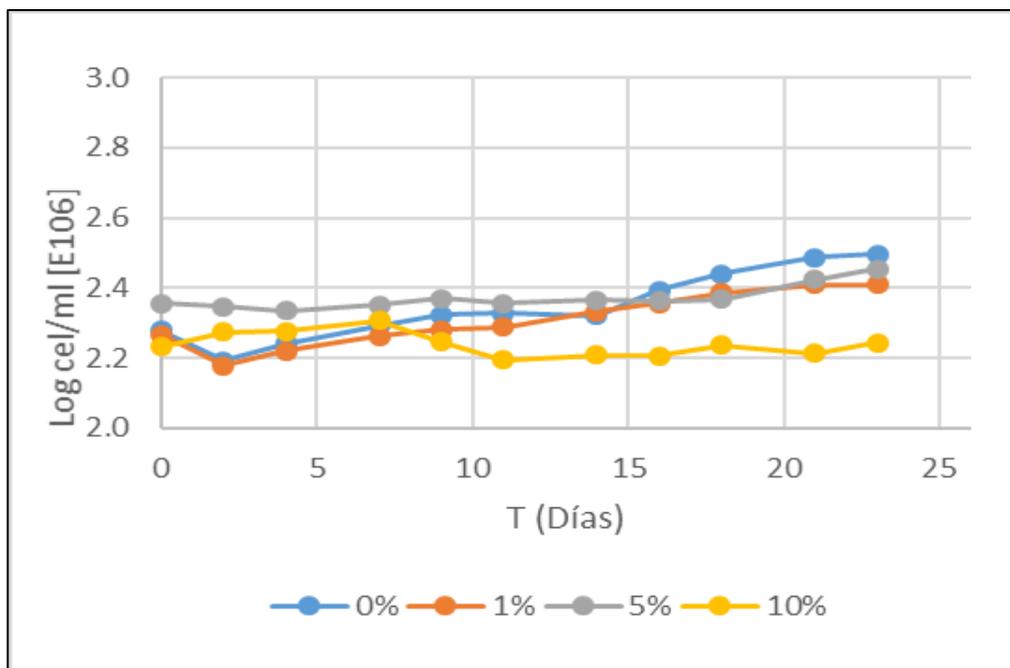
### 3.3.3 Cultivo en mutante en *pta* en alta biomasa inicial

#### 3.3.3.1 Densidad óptica

La inducción en la mutante en *pta*, en general mantuvo la densidad óptica inicial (figuras 26 y 27). En el tratamiento con BG-11 sin APPAO, la biomasa, medida como  $\text{DO}_{730}$  se incrementó de 4 a 6.44 al día 23 de cultivo. En el tratamiento 1% inicio con una densidad óptica de 3.8 y al igual que el tratamiento sin APPAO bajó un poco la  $\text{DO}_{730}$  al día 3, para aumentar nuevamente en forma lenta y progresiva hasta alcanzar una  $\text{DO}_{730}$  final de 5.29 en el día 24. En las condiciones 5% sólo se observó un aumento al final del cultivo alcanzando una  $\text{DO}_{730}$  de 5.88, muy similar al de la condición de 1%. En el tratamiento 10%, sólo se observó un pequeño aumento en la biomasa al inicio del cultivo (días 3-7) y posteriormente volvió a bajar a valores de  $\text{DO}_{730}$  similares a los mostrados al inicio del cultivo ( $\text{DO}_{730}$  3.53). Este mismo comportamiento fue observado cuando los datos fueron convertidos a  $\text{cél/ml}$  (figura 27) y al observarse los cambios en las tasas de crecimiento (figura 28), evidenciándose el bajo incremento en número de células a lo largo del cultivo y el efecto negativo que tuvo la alta concentración de APPAO (10%) en un mayor incremento de biomasa celular.

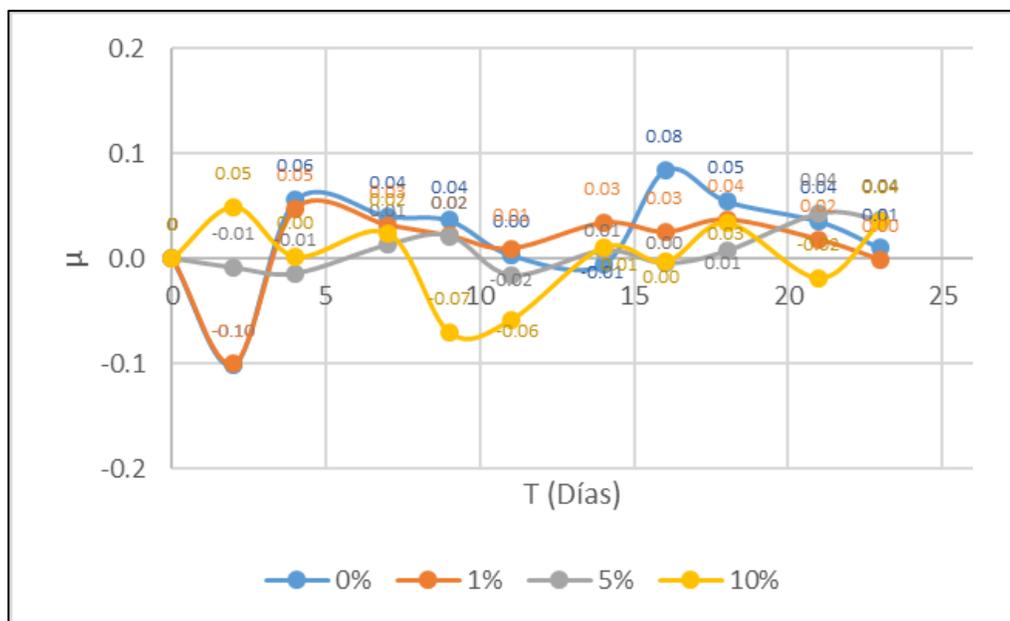


**Figura 26.** Cultivo de la cepa mutante en *pta* en medio BG-11 con diferentes concentraciones de APPAO Manzaniilla-Misión (0, 1, 5 y 10%).



**Figura 27.** Cultivo de *Synechocystis* mutante en *pta* en APPAO Manzanilla-Misión en Log cél/ml [E106].

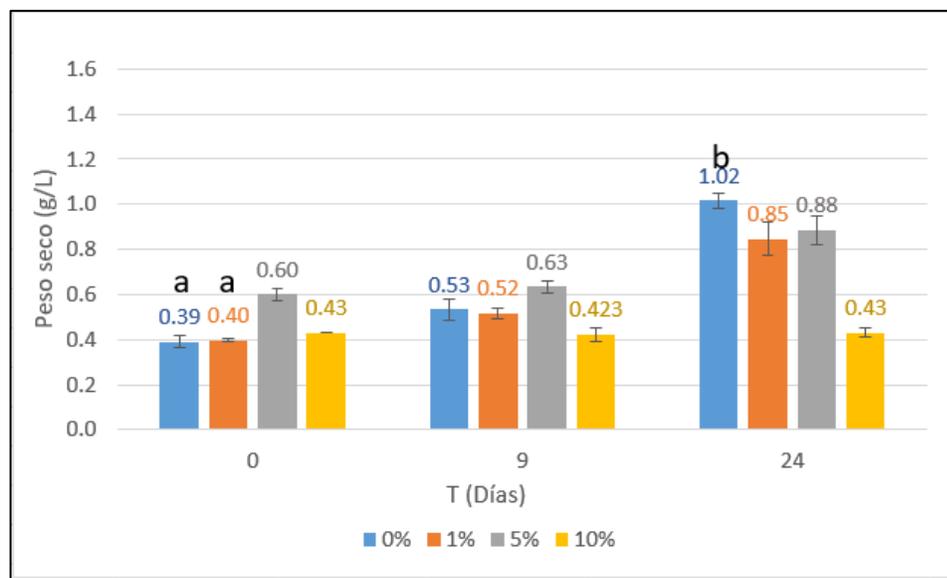
La tasa máxima de crecimiento en el tratamiento 0% APPAO se obtuvo al día 16 ( $\mu=0.08$ ) (figura 28). Para el tratamiento de 1% se obtuvo el día 4 ( $\mu=0.05$ ), en 5% fue en los días 21 y 23 ( $\mu=0.04$ ), y en el tratamiento de 10% fue en el día 2 ( $\mu=0.05$ ).



**Figura 28.** Tasa de crecimiento ( $\mu$  div/día) de curva de inducción de la cepa mutante en *pta* en APPAO Manzanilla-Misión.

### 3.3.3.2 Peso seco

En el análisis estadístico se compararon los pesos secos obtenidos entre días y tratamientos en la misma cepa (figura 29). En la mutante en *pta* se encontró que el tratamiento 0% en el día 24 con 1.02 g/L se encontraron diferencias significativas con el día 0 del mismo tratamiento ( $P < 0.05$ ). Así como, tiene una diferencia significativa con el día 0 del tratamiento 1%, con un valor de 0.4 g/L ( $P < 0.05$ ). Estos resultados evidencian un aumento del 61.7% en el día 24 del tratamiento 0% con respecto al día 0 del mismo tratamiento y un aumento del 60.7% con referencia al en el día 0 del tratamiento con APPAO 1%. De este modo, el mayor nivel de peso seco en g/L se obtuvieron en el día 24 del tratamiento 0%.



**Figura 29.** Valores de peso seco (g/L) con respecto al tiempo (días) de la cepa mutante en *pta* cultivada en medio BG-11 adicionada con diferentes concentraciones de APPAO Manzanilla-Misión (0, 1,5 y 10%). Arriba de las barras se muestran los valores de la Medía  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencia significativa

### 3.3.3.3 PHA

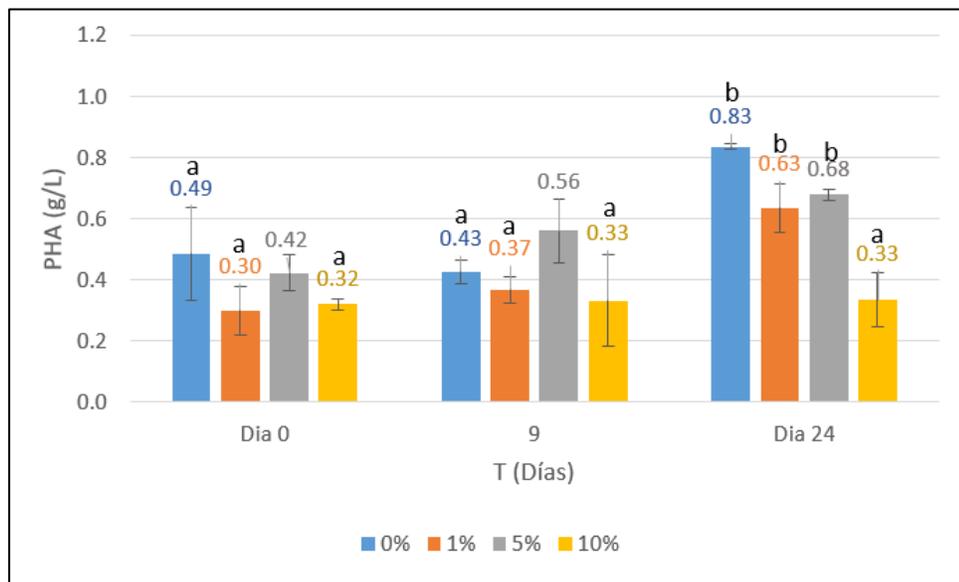
Los datos de PHA de la cepa mutante en *pta* fueron analizados por tratamiento (figura 30), todos los datos cumplieron con los supuestos de normalidad. La prueba a posteriori que se utilizó para conocer los grupos con diferencias significativas, fue la prueba de Tukey.

Los análisis mostraron diferencias altamente significativas entre los niveles de PHA del día 24 del tratamiento 0% (0.83 g/L) con varios días y tiempos: con el tratamiento 0% en el día 0 con 0.49 g/L, ( $P = 0.03$ ); con el día 9 con 0.43g/L del mismo tratamiento ( $P = 0.007$ ); con el tratamiento 1% en el día 0 con

0.30 g/L, ( $P < 0.001$ ) y el día 9 con 0.37 g/L ( $P = 0.002$ ). Con el tratamiento 5% en el día 0 con 0.42 g/L ( $P = 0.006$ ). Así mismo se encontraron diferencias significativas con el tratamiento 10% en los días 0, 9 y 24 con un promedio de 0.32-0.33 g/L ( $P < 0.001$ ). Estos resultados evidencian un aumento de 40.9 y 48.1% en el día 24 del tratamiento 0% con respecto al mismo tratamiento en los días 0 y 9, respectivamente; un aumento del 63.8 y 55.42% con el tratamiento 1% en los días 0 y 9, respectivamente; aumento del 49.3% con el tratamiento 5% en el día 0; y un aumento del 60.5% con respecto a los días 0, 9 y 24 del tratamiento 10%.

En el día 24 del tratamiento 1% de APPAO con 0.63 g/L se observaron diferencias significativas con el tratamiento 1% en el día 0 con 0.30 g/L ( $P = 0.016$ ); Así como diferencias entre los días 0, 9 y 24 del tratamiento 10% ( $P = 0.028$ ). Estos resultados indican un aumento del 49.2% de producción de PHA en relación con el día 0 del mismo tratamiento; y un aumento promedio de 51.9% con respecto a todos los días analizados del tratamiento 10%.

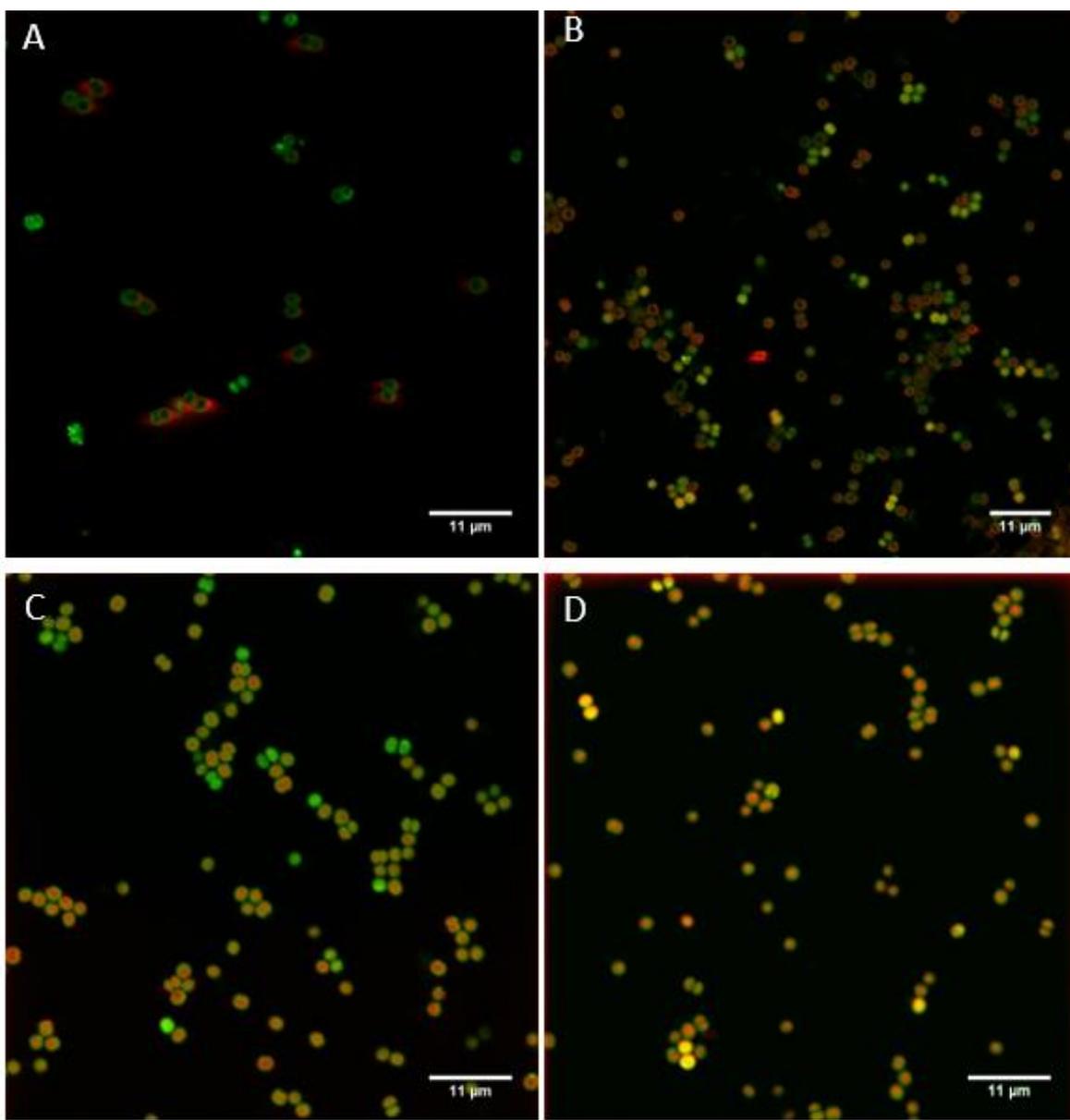
En el día 24 del tratamiento 5% APPAO se observaron diferencias significativas con respecto a los días 0 y 9 (0.30 y 0.37 g/L, respectivamente) del tratamiento con 1%, ( $P = 0.005$  y  $P = 0.031$ ), y también con los días 0, 9 y 24 (0.32-0.33 g/L) del tratamiento 10% ( $P = 0.008$ ;  $P = 0.011$ ;  $P = 0.012$ ). Estos resultados indican que hubo un aumento de producción de PHA del 55.8% en el tratamiento 5% en día 24 con respecto al tratamiento 1% en el día 0 y en el día 9 con 45.5%; y un promedio de 51.7% con los días analizados en el tratamiento 10%. De esta manera, el mayor nivel acumulado de PHA en g/L se obtuvo en el día 24 del tratamiento 0%.



**Figura 30.** Valores de PHA (g/L) con respecto al tiempo (días) en la cepa mutante en *pta* cultivada en medio BG-11 adicionada con diferentes concentraciones de APPAO Manzanilla-Misión (0, 1, 5% y 10%). En las barras muestran los valores de la Medía  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencia significativa ( $P = 0.03$  a  $< 0.001$ ),  $n = 12$ .

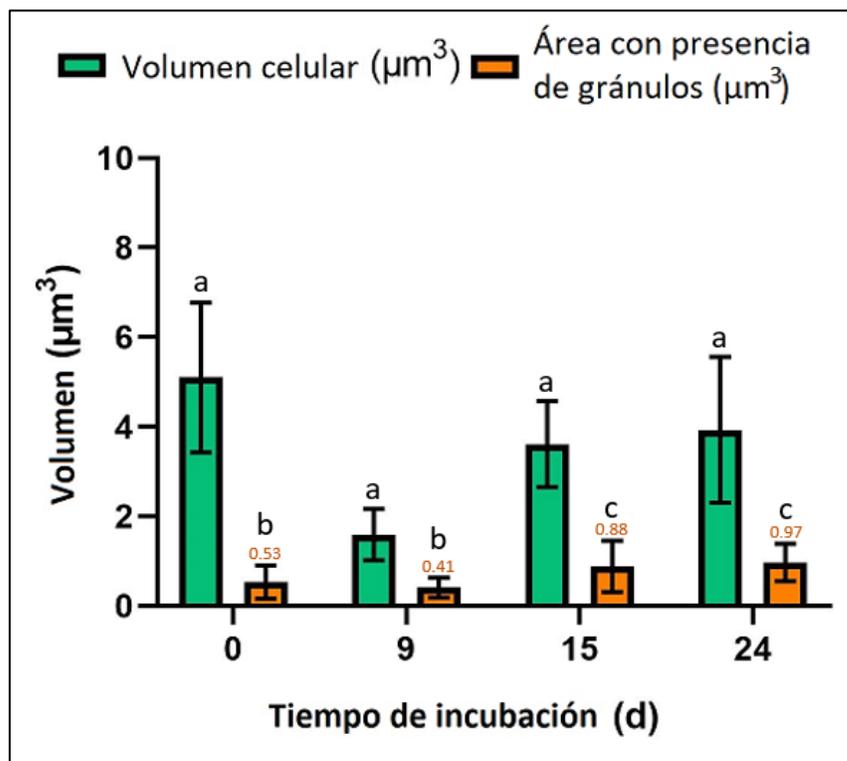
### 3.3.3.4 Microscopía confocal

Como se puede observar en la figura 31, en el día 0 del cultivo de la mutante en *pta* en BG-11 en APPAO 0% no se observaron gránulos de PHA y más bien se observaron residuos del colorante en la muestra. En el día 8 también se observaron restos del colorante fuera de la célula y sólo algunas células con gránulos (figura 31B). En cambio, en los días 15 y 24 se muestran gránulos bien definidos que abarcan un mayor volumen de la célula. Estos gránulos estuvieron presentes en todas las células, con excepción de las células con un color verde fluorescente.



**Figura 31.** Microscopía confocal del ensayo 0% APPAO en la cepa mutante en *pta*. En medio BG-11. Tinción con azul Nilo al 0.5%. A) Día 0, B) Día 09, C) Día 15 y D) Día 24 de cultivo

En la figura 32 se pueden observar los promedios de las mediciones de los gránulos, en la cual el análisis estadístico mostró que no existen diferencias significativas en el volumen de las células a lo largo del cultivo, pero si en el volumen del gránulo de PHA con respecto al tiempo de cultivo. Las diferencias significativas fueron entre el día 24 con los días 0 y 9 ( $P < 0.05$ ), respectivamente. Así mismo, también se observó una diferencia significativa entre los días 15 y el 9 ( $P < 0.05$ ). El mayor valor promedio de volumen del gránulo de PHA en esta condición fue en el día 24 con  $0.94 \mu\text{m}^3$ . Estos resultados indican un aumento del área con presencia de granulos del 45.3% en el día 24 con respecto al día 0 y un 57.7% con respecto al día 9. El día 9 aumentó un 53.4% con respecto al día 15. De este modo, la mayor área con presencia de gránulos en  $\mu\text{m}^3$  se obtuvo en el día 24.

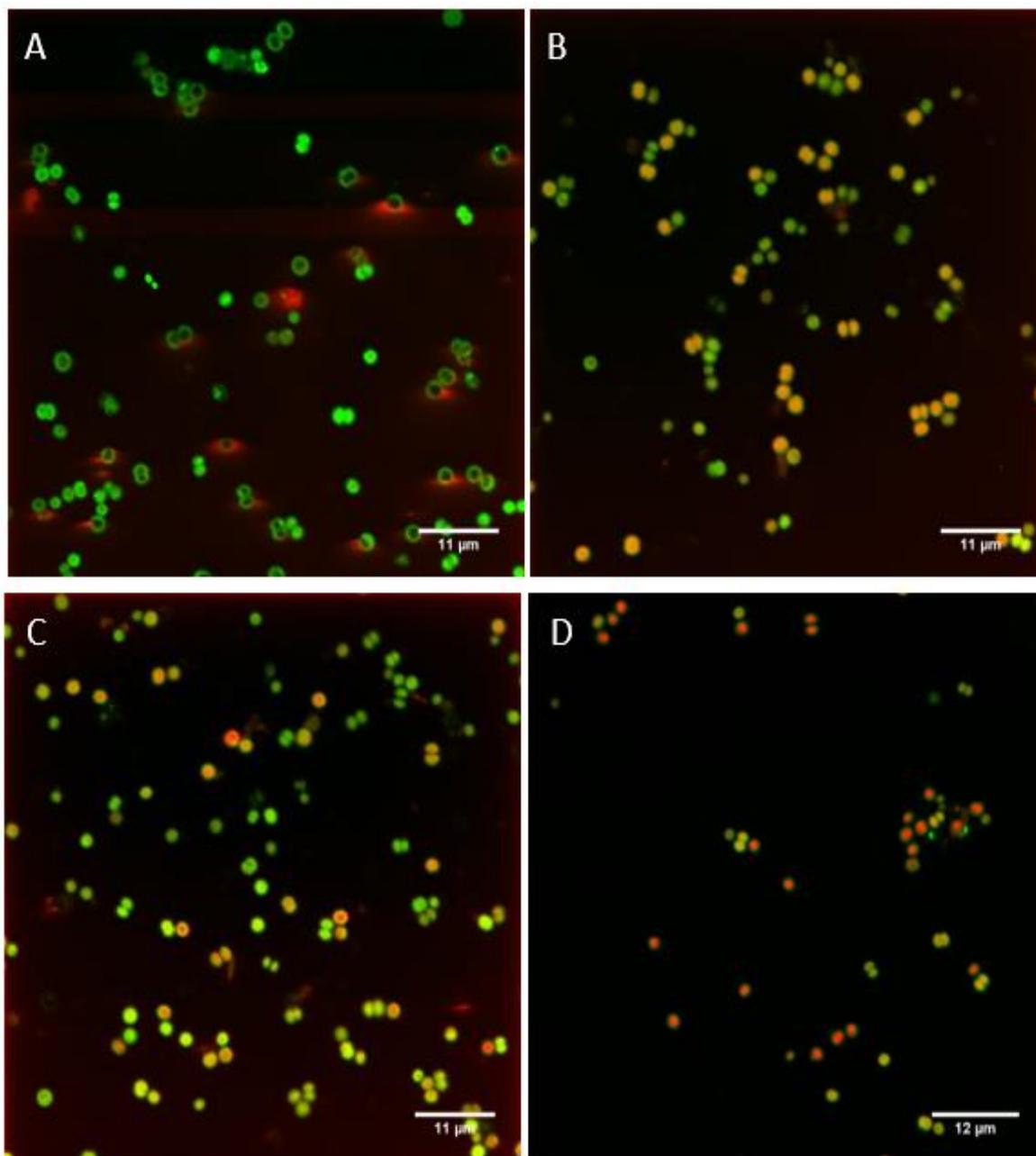


**Figura 32.** Volumen celular y volumen del gránulo de PHA en el tratamiento BG-11 con 0% APPAO en la mutante en *pta*. En verde el volumen celular medido en  $\mu\text{m}^3$ , en naranja el volumen del gránulo en  $\mu\text{m}^3$ . Letras distintas indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ),  $n=30$ .

En el día 0 de cultivo del tratamiento 1% APPAO en ninguna de las células de la mutante en *pta* se presentaron gránulos rojos indicativos del biopolímero (figura 33A). En cambio, en el día 9 los gránulos comenzaron a distinguirse en cerca del 60% de las células observadas, ocupando un mayor volumen de la célula. En el día 15 se observaron gránulos centrales bien definidos, pero no en muchas de las células de

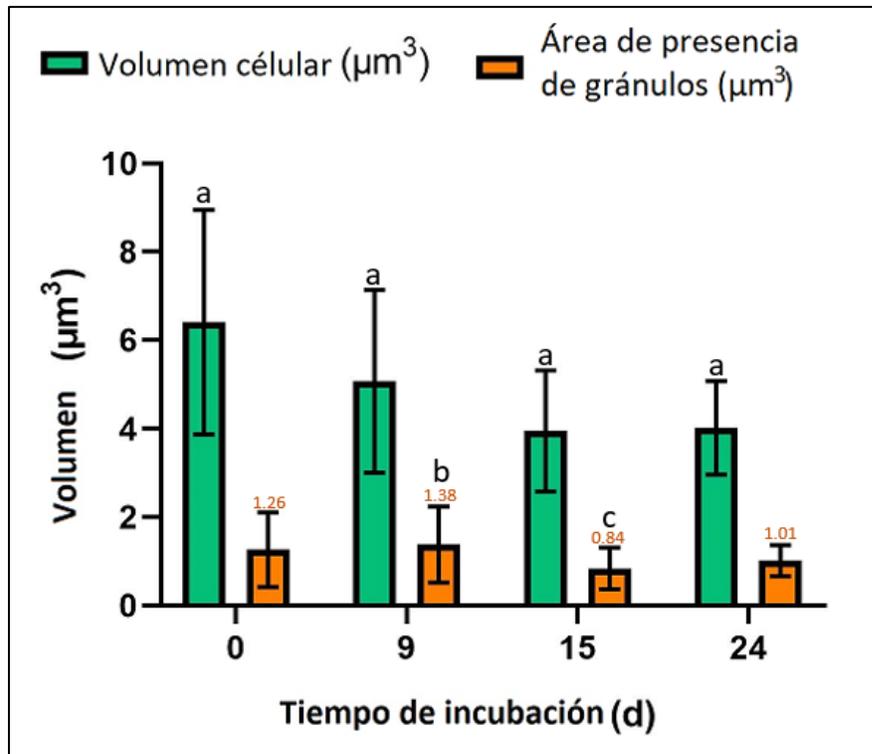
menor tamaño o en división. En el día 24 el cultivo, las células que se observaron fueron de menor tamaño, pero presentaron un gránulo de color rojo intenso.

En el tratamiento BG-11 con APPAO al 1% (figura 34) no se observaron diferencias significativas en el volumen celular a lo largo del cultivo. Así mismo se observó una cantidad similar de volumen de gránulos a lo largo del cultivo, obteniéndose el mayor valor promedio del gránulo el día 9 con  $1.38 \mu\text{m}^3$ .



**Figura 33.** Microscopía confocal del ensayo 1% APPAO en la cepa mutante en *pta*. Ensayo de inducción. Tinción azul Nilo al 0.5%. A) Día 0, B) Día 09, C) Día 15 y D) Día 24 de cultivo

La prueba Tukey mostró una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los gránulos del día 9 con respecto al día 15. Estos resultados evidenciaron un área con presencia de gránulos 39.1% mayor en el día 9 con respecto al día 15. De esta manera, la mayor área con presencia de gránulos en  $\mu\text{m}^3$  se obtuvo en el día 9.



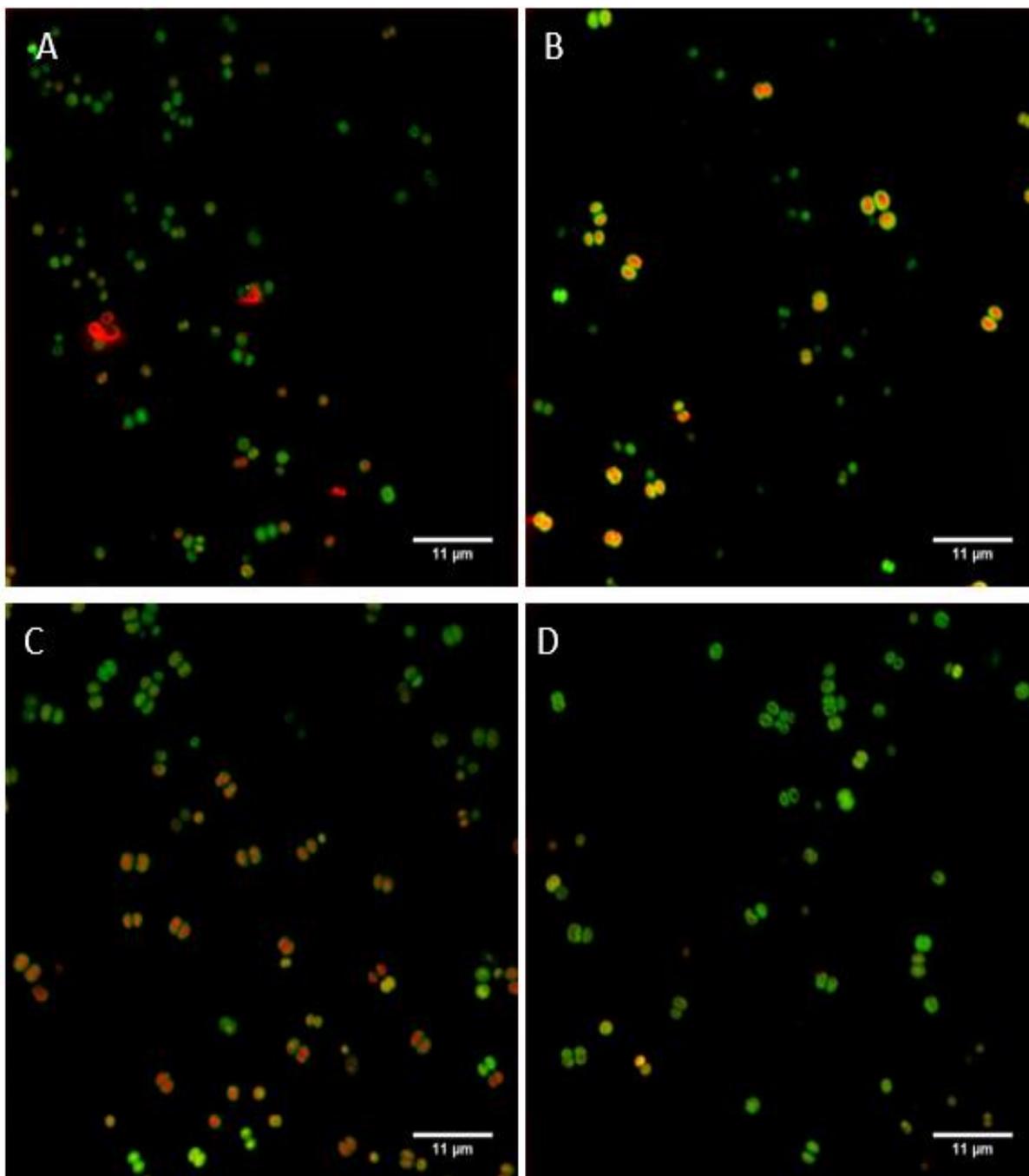
**Figura 34.** Volumen celular y volumen del gránulo de PHA en el tratamiento en BG-11 con 1% APPAO en la mutante en *pta*. En verde el volumen celular medido en  $\mu\text{m}^3$ , en naranja el volumen del gránulo en  $\mu\text{m}^3$ . Letras distintas indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ),  $n=30$ .

En el cultivo de la mutante en *pta* adicionado con APPAO al 5%, en el día 0 se observaron muy pocas células con gránulo y el tamaño del gránulo fue pequeño. En el día 9 se observaron células con gránulo definido y otras de tamaño pequeño sin gránulo (figura 35B).

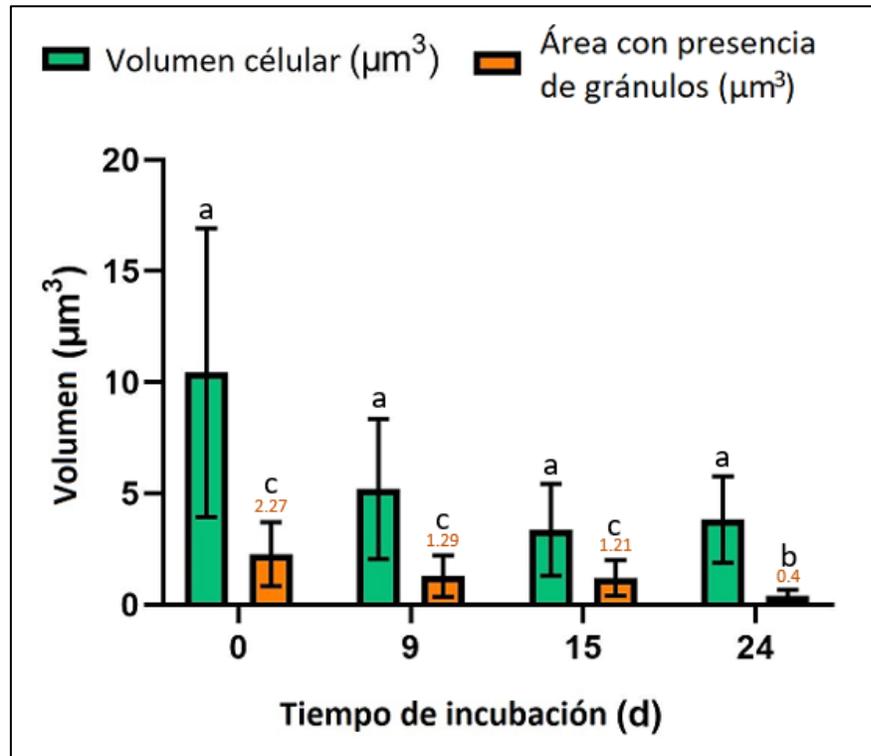
Tanto en el día 9 como en el 15 se observaron algunas células en división con la presencia de gránulos. En el día 15, además se observaron células pequeñas con un gránulo en el centro y para el día 24 se observaron gránulos muy pequeños en la parte central de las células o sin gránulos.

Como se observa en la figura 36, se obtuvo una disminución progresiva del área con presencia de gránulos de los cultivos de la mutante en *pta* en BG11 adicionado con APPAO 5%. El mayor valor promedio de volumen del gránulo de PHA en esta condición fue en el día 0 con  $2.27 \mu\text{m}^3$ .

Mediante la prueba a posteriori de Dunn se establecieron diferencias significativas en los días 0, 9 y 15 con respecto al día 24, ya que a este tiempo se observó una disminución del área de gránulos de hasta un 82.3% con respecto a los primeros días del cultivo. De este modo, la mayor área con presencia de gránulos en  $\mu\text{m}^3$  se obtuvo en el día 0.



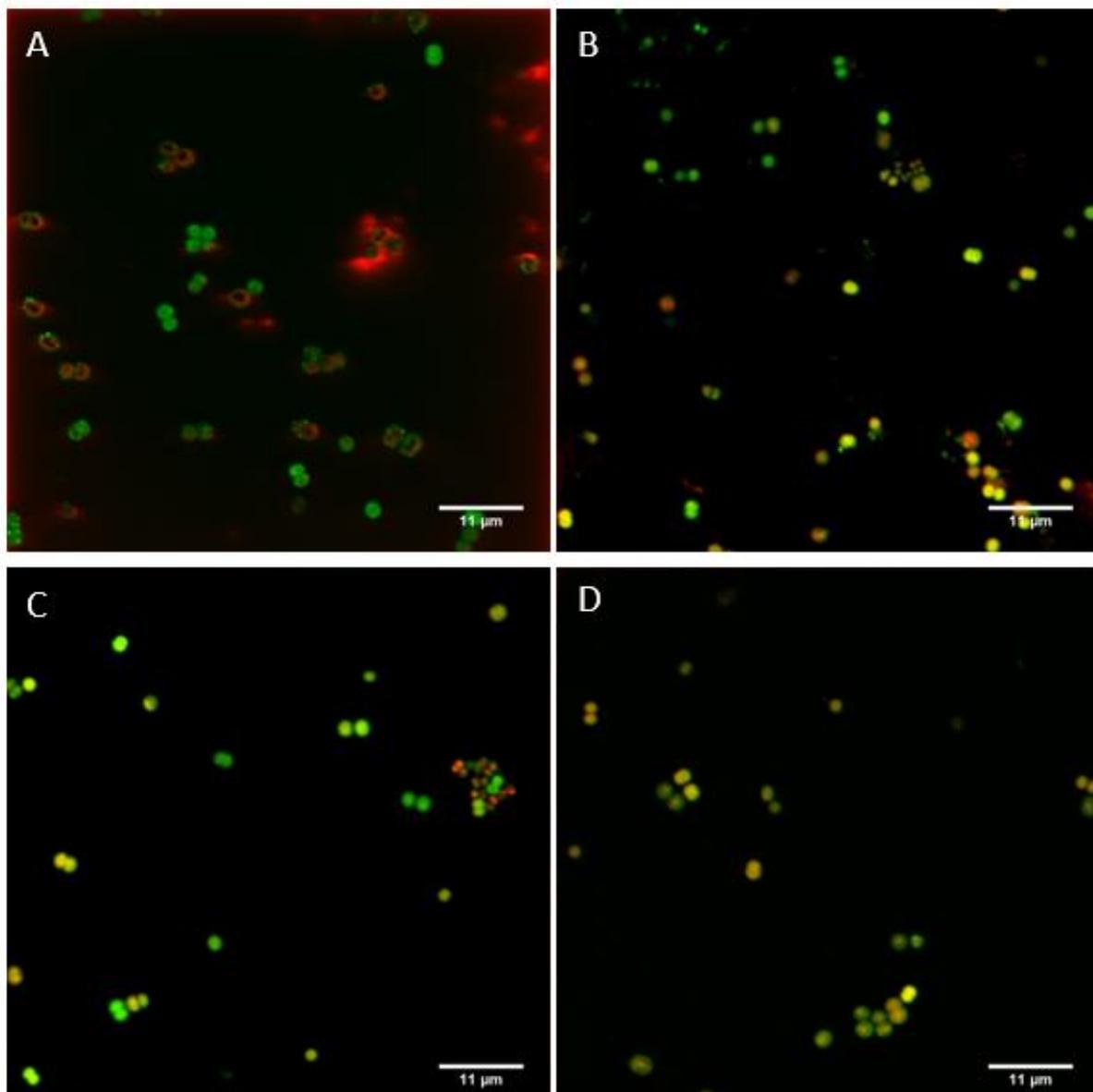
**Figura 35.** Microscopía confocal del ensayo 5% APPAO en la cepa mutante en *pta*. Ensayo de inducción. Tinción con azul Nilo al 0.5%. A) Día 0, B) Día 09, C) Día 15 y D) Día 24 de cultivo



**Figura 36.** Volumen celular y volumen del gránulo de PHA en el tratamiento en BG-11 con 5% APPAO en la mutante en *pta*. En verde el volumen celular medido en  $\mu\text{m}^3$ , en naranja el volumen del gránulo en  $\mu\text{m}^3$ . Letras distintas indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ),  $n=30$

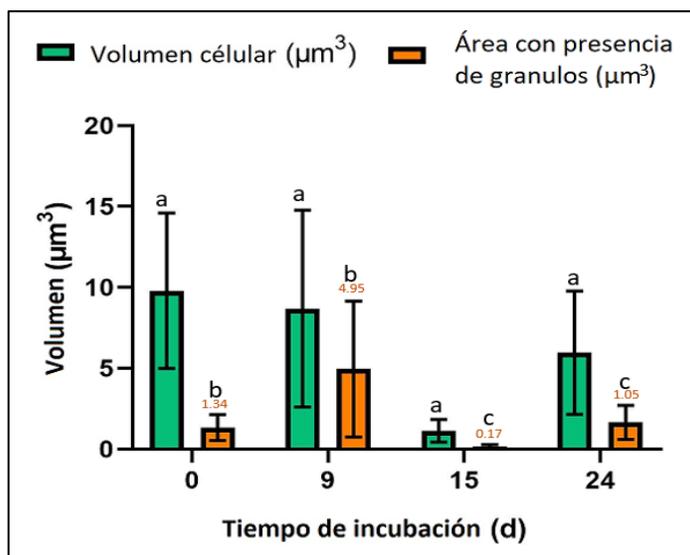
En el cultivo adicionado con APPAO al 10% (figura 37), se puede observar que en el día 0 no todas las células presentaron gránulo, y las que si lo presentaron mostraron un tamaño pequeño. En el día 9 disminuyó el número de células con gránulos, y las células pequeñas fueron las que mostraron un gránulo definido. En el día 15 se observó la misma tendencia que el día 9, con algunos gránulos pequeños en las células más grandes, pero en general las células observadas mostraron un menor tamaño que en los primeros tiempos del cultivo, mientras que en el día 24 predominaron células de mayor tamaño con gránulos en el centro.

El análisis estadístico de Tukey realizado para el tratamiento de la mutante en *pta* en BG11 adicionado con APPAO al 10% (figura 38) mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el área con presencia de gránulos del día 9 ( $4.95 \mu\text{m}^3$ ) con respecto los días 15 y 24 ( $0.17$  y  $1.05 \mu\text{m}^3$ ); y el día 0 ( $1.34 \mu\text{m}^3$ ) con respecto al día 15. Estos resultados indican que el día 9 el área con presencia de gránulos fue 96.5 y de 78.7% mayor con respecto a los días 15 y 24, respectivamente. Así mismo, el día 0 se obtuvo un área de gránulos 87.3% mayor con el respecto al día 15. Por otro lado, aunque el día 15 se observó un valor promedio menor de volumen celular no hubo diferencias significativas con respecto a los otros días del cultivo ( $P < 0.05$ ).



**Figura 37.** Microscopía confocal del ensayo de inducción de la mutante en *pta* en APPAO Manzanilla-Misión al 10% y tinción con azul Nilo al 0.5%. A) Día 0, B) Día 09, C) Día 15 y D) Día 24 de cultivo

En la tabla 5 se comparan las imágenes de volumen celular en comparación con el área con presencia de gránulos de la cepa mutante en *pta* con las diferentes concentraciones de APPAO. Estas imágenes permiten evidenciar incremento en el tamaño del gránulo en el tratamiento sin APPAO conforme avanzó el cultivo, hasta llegar a  $0.97 \mu\text{m}^3$ . Sin embargo, en los cultivos adicionados con 1 y 5% APPAO a medida que avanzaron los días el volumen del gránulo fue disminuyendo de tener  $1.26$  y  $2.27 \mu\text{m}^3$  en el día 0 hasta  $1.01$  y  $0.4 \mu\text{m}^3$  en el día 24, respectivamente. En 10% APPAO el mayor volumen de gránulo se obtuvo en el día 9 con  $4.95 \mu\text{m}^3$  y el menor valor al día 15 con  $0.17 \mu\text{m}^3$ .



**Figura 38.** Volumen celular y volumen del gránulo de PHA en el tratamiento en BG-11 con 10% APPAO en la mutante en *pta*. En verde el volumen celular medido en  $\mu\text{m}^3$ , en naranja el volumen del gránulo en  $\mu\text{m}^3$ . Letras distintas indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ),  $n = 30$

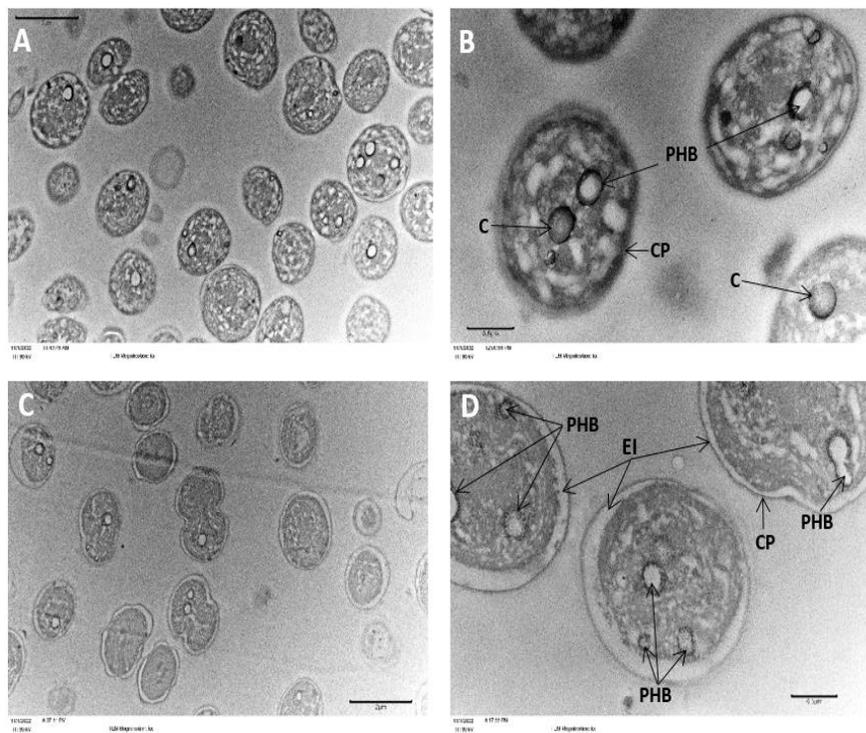
**Tabla 5:** Células en los diferentes tratamientos y días de la cepa *pta*

		Tratamiento			
		0%	1%	5%	10%
T(días)	0				
	9				
	15				
	24				

### 3.3.3.5 Microscopía electrónica de transmisión en la mutante en la mutante en *pta*

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la cepa mutante en *pta* (figura 39) en el día 0 mostró células no uniformes, tenían forma un tanto ovalada. No se logró ver claramente la estructura de los componentes celulares como membranas tilacoidales, como se observó en la cepa silvestre. Sin embargo, si se apreció bien la capa de peptidoglicano, así como un par de carboxisomas y un solo gránulo de PHA por célula. Las mediciones celulares en el día 0 dieron un volumen promedio de  $8.59 \mu\text{m}^3 \pm 3.57$ , mientras que el gránulo  $0.04 \mu\text{m}^3 \pm 0.026$ , también de forma ovoide representando el 0.47% del volumen total de la célula (figura 39A y B). El valor promedio de gránulos fue de 1.12 gránulos por célula.

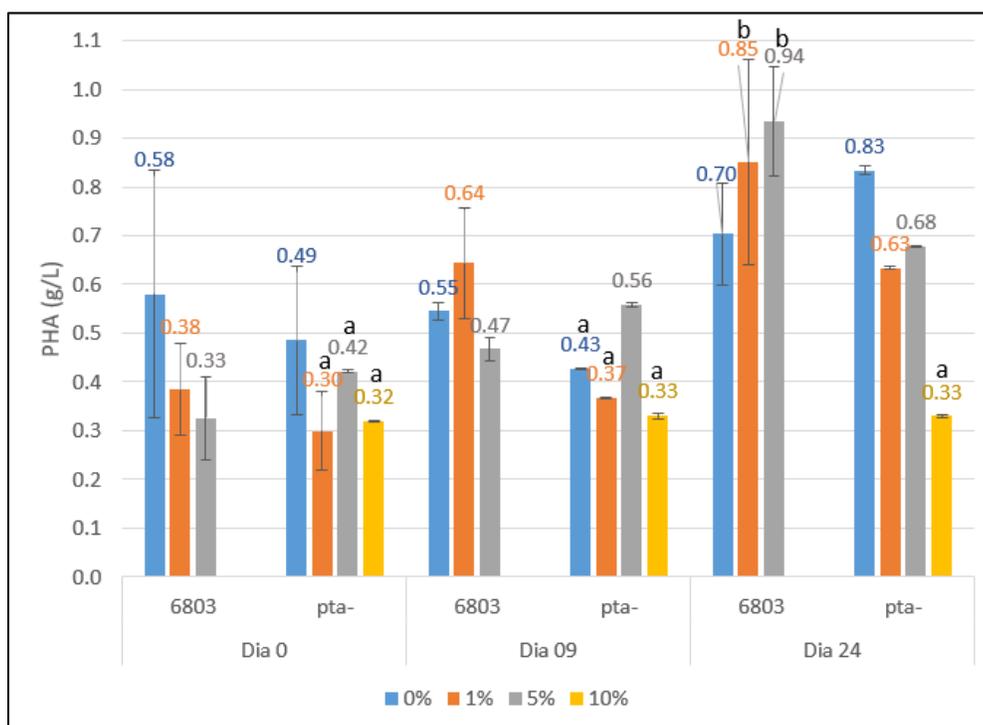
En el día 14 las células se observaron más ovaladas con la membrana citoplasmática más amplia, con respecto al día 0 y no fue posible distinguir los carboxisomas, pero sí la capa de peptidoglicano. Se observaron más gránulos de PHA por célula en comparación con el tiempo 0 (1 a 3 gránulos por célula). Las mediciones celulares dieron un promedio de  $9.97 \mu\text{m}^3 \pm 3.56$ , mientras que el gránulo  $0.042 \mu\text{m}^3 \pm 0.029$ , representando el 0.42% del volumen total de la célula. Las mediciones celulares indicaron que no hubo un cambio considerable entre el volumen de los días 0 y 14 de la cepa *pta* (figura 39C y D), pero sí en la cantidad de gránulos de PHA. El valor promedio de gránulos fue de 1.06 gránulos por célula. De esta manera, la mayor área de volumen celular y granular en  $\mu\text{m}^3$  se obtuvo en el día 14.



**Figura 39.** Microscopía electrónica de transmisión de la mutante en *pta* en APPAO 1% Manzanilla-Misión. (A y B) día 0, (C y D) día 14. (A y C) imagen con 20,000 aumentos y barra de escala de  $2\mu\text{m}$ ; (B y D) imágenes con 5,000 aumentos barra de escala  $0.5\mu\text{m}$ . Flechas indican carbonosomas. CP: Capa de Peptidoglicano; PHA: Gránulo de PHA; EI: Espacio Inter-membranal.

### 3.4 Comparación producción de PHA entre cepas silvestre y mutante en *pta*

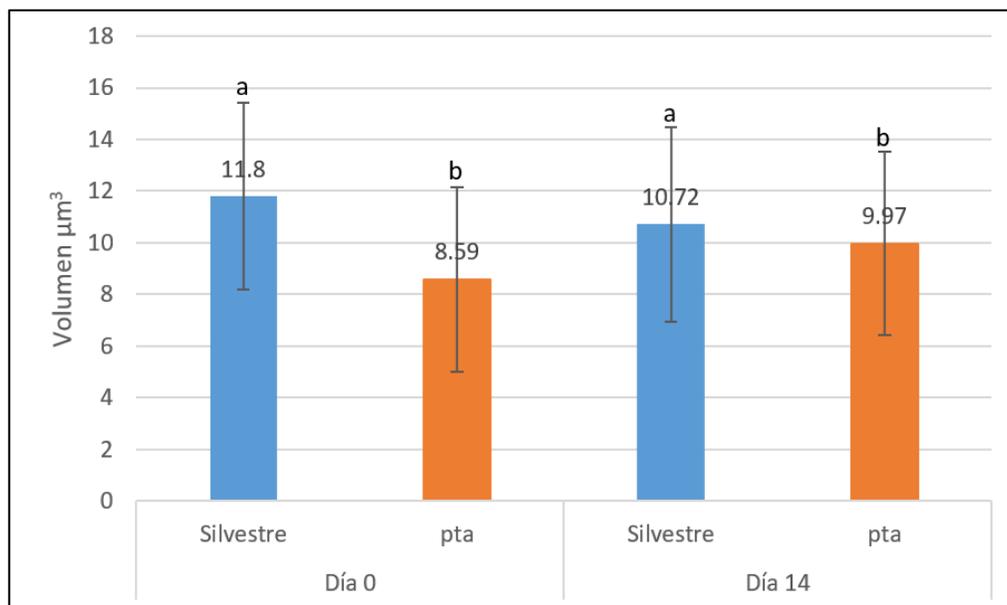
En la figura 40 se comparan los niveles obtenidos de PHA en g/L entre las cepas silvestre y mutante en *pta* en las diferentes concentraciones de APPAO, a lo largo de los tres días analizados. Como se puede observar, los mayores promedios de PHA para ambas cepas se obtuvieron al día 24 de cultivo. Al realizar el análisis estadístico para comparar los niveles de PHA entre ambas cepas se obtuvo que el día 24 del tratamiento 5% de cepa silvestre hubo diferencias altamente significativas ( $P < 0.001$ ) con respecto a los diferentes tratamientos de la mutante *pta*. Por ejemplo, diferencia entre los niveles de PHA de la cepa silvestre al día 24 con APPAO al 5% en comparación con el día 9 de la mutante en *pta* en 0% APPAO; diferencia en el mismo tratamiento de la silvestre con los días 0 y 9 de la mutante en *pta*, respectivamente, con APPAO 1%; diferencia con el día 0 de la mutante en *pta* con APPAO 5% y diferencia entre la silvestre y los días 0, 9, 24 de la mutante en APPAO 10%. También en la cepa silvestre en el día 24 del tratamiento 1% tuvo diferencias altamente significativas con la mutante en *pta* en el día 0 del tratamiento al 1%, con el tratamiento 10% en los días 0, 9 y 24.



**Figura 40.** Comparaciones entre PHA obtenida entre cepas. Las comparaciones se presentan con base a los días de cultivo. Comparando entre los días 0, 9 y 24, entre de cada cepa y tratamiento de APPAO. Los números sobre las barras representan el valor promedio de PHA. Letras distintas indican diferencia significativa ( $P < 0.001$ )

El tratamiento 5% en el día 24 de la cepa silvestre tuvo diferencias significativas con diferentes condiciones: con el tratamiento 0% en el día 9 de mutante en *pta*; con respecto al tratamiento 1% de la mutante en *pta* en los días 0 y 9, respectivamente; con el tratamiento 5% de la mutante en *pta* en el día 0; y con respecto al tratamiento 10% de la mutante en *pta* en los tres días analizados. El tratamiento 1% en el día 24 de la cepa silvestre tuvo diferencias significativas con respecto al tratamiento 1% del día 0 en la mutante en *pta*; y también con respecto a los tres días analizados de 10% de la mutante en *pta*. Estos resultados indican un aumento en la producción de PHA en el tratamiento 5% en el día 24 de la cepa silvestre con respecto a diversos tratamientos y días de la cepa mutante en *pta*; un aumento del 54% con respecto al tratamiento 0% día 9; un aumento del 68% y 60.6% con el tratamiento 1% de los días 0 y 9, respectivamente; 55.3% con el tratamiento 5% en el día 0; y un promedio de 67.2% con respecto a los días analizados del tratamiento 10% en mutante en *pta*. Así mismo, el tratamiento 1% en el día 24 de la cepa silvestre aumento un 64.7% con respecto al tratamiento 1% del día 0 de la mutante *pta*, y aumento un promedio de 61.5% con respecto a la cepa mutante en *pta* en los diferentes días analizados del tratamiento 10%.

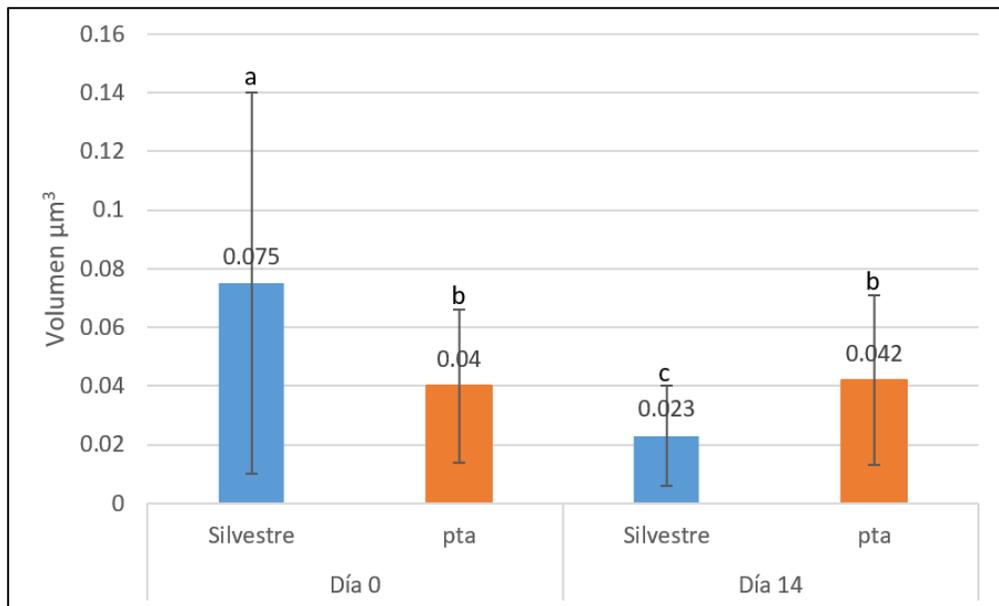
### 3.5 Comparación mediciones celulares en TEM entre cepas silvestre y mutante en *pta*



**Figura 41.** Comparaciones entre mediciones celulares obtenidas entre cepas cultivadas en BG11 con APPAO 1%. Las comparaciones se presentan con base a mediciones. Comparando entre los días 0, y 14. Los números sobre las barras representan el valor promedio del volumen. Letras distintas indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ),  $n = 80$

El análisis estadístico mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las medidas celulares de la cepa silvestre con respecto a la mutante en *pta* en APPAO 1%, pero no entre el día 0 y 14 de las mismas cepas (figura 41). Las diferencias significativas fueron entre el día 0 de la cepa silvestre ( $11.8 \mu\text{m}^3$ ) con respecto los días 0 y 14 de la cepa mutante en *pta* ( $8.59$  y  $9.97 \mu\text{m}^3$ ), respectivamente. El día 14 de la cepa silvestre ( $10.72 \mu\text{m}^3$ ) mostró diferencias significativas con el día 0 de la cepa mutante en *pta* ( $8.59 \mu\text{m}^3$ ). Estos resultados evidencian una diferencia del 27.2% en el volumen celular, en el día 0 de la cepa silvestre con respecto al día 0 de la mutante en *pta*, y 15% con el día 14 de la mutante en *pta*.

Por otro lado, el análisis estadístico mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el volumen de gránulos de PHA de las dos cepas (figura 42). El día 0 de la cepa silvestre con un volumen granular de  $0.075 \mu\text{m}^3$  mostró una diferencia significativa con el día 14 de la misma cepa silvestre y una diferencia significativa con los días 0 y 14 ( $0.042 \mu\text{m}^3$ ) y 0 ( $0.04 \mu\text{m}^3$ ) de la mutante en *pta*. El día 14 de la mutante en *pta* ( $0.042 \mu\text{m}^3$ ) mostró diferencias significativas con el día 14 de la cepa silvestre ( $0.023 \mu\text{m}^3$ ). Estos resultados evidencian un 69.3% más de volumen granular de PHA promedio en la cepa silvestre en el día 0 con respecto al día 14 de la misma cepa y un 45% más de volumen granular con respecto a los días 0 y 14 de la cepa mutante en *pta*. La cepa mutante en *pta* en el día 14 mostró un 45% más de volumen granular que la cepa silvestre en el mismo día.



**Figura 42.** Comparaciones entre mediciones del volumen granular de PHA obtenidas entre cepas cultivadas en BG11 con APPAO 1%. Las comparaciones se presentan con base a mediciones. Comparando entre los días 0, y 14. Los números sobre las barras representan el valor promedio del volumen. Letras distintas indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ),  $n=80$

## Capítulo 4. Discusión

---

Las cianobacterias como *Synechocystis* sp. PCC 6803 son capaces de acumular PHAs de forma natural por fotosíntesis oxigénica. Sin embargo, también pueden ser cultivadas exitosamente en aguas de desecho u otras fuentes alternativas debido a su habilidad de utilizar nitrógeno, fósforo y otras fuentes de carbono (Hondo et al., 2015; K. Hirai et al., 2019). El papel inductor de la limitación de nutrientes ha sido evaluado anteriormente en la producción de PHB, así como el efecto de la incubación en oscuridad, en luz continua o con la adición de fuentes de carbono o la limitación de nitrógeno o fósforo (Nishioka et al., 2001; García et al., 2013). Actualmente, el tipo de materia prima varía en función del grado del producto deseado, y el microorganismo utilizado. Las clásicas fuentes de carbono para producción de PHA actualmente son carbohidratos: glucosa, fructosa, sacarosa; alcoholes: metanol, glicerol; alcanos: hexano, dodecano; ácidos orgánicos: precursores de butirato (Shen et al., 2009). En el presente trabajo se analizó el efecto de diferentes concentraciones del agua del proceso de producción del aceite de oliva (APPAO) y de los días de cultivo sobre la acumulación de PHAs.

Las curvas de crecimiento obtenidas con la cepa silvestre de *Synechocystis* tanto en BG-11 sólo como en las adicionadas con diferentes concentraciones de APPAO Misión (1, 5 y 10%) se realizaron con baja biomasa inicial ( $OD_{730}$  0.1). Estos ensayos permitieron identificar las fases de crecimiento de la cepa silvestre y el establecimiento de las condiciones a utilizar para evaluar la producción de PHA. Las curvas de crecimiento en medio BG-11 permitieron llegar a una DO de entre 10 y 12 al día 40 de cultivo e identificar las diferentes fases propias de la especie PCC 6803 descritas por Schuurmans et al. (2017): exponencial, lineal, de crecimiento tardío y estacionaria. La mayor tasa obtenida en la condición 1% fue de  $0.77 \mu$  (div/día), esta es alta en comparación a otras reportadas en artículos como Carpine et al. (2017), en donde la cepa silvestre *Synechocystis* sp. PCC 6803, crecida en medio BG-11, obtuvo una  $\mu$  de  $0.036 \mu$  (div/día) en la fase exponencial de la cepa control silvestre, pasando posteriormente a la lineal debido a una limitación de energía, en vez de una limitación de nutrientes. Cuando la transición se presenta abruptamente de una fase a otra, esto es determinado por la forma y densidad celular, según como varía el camino de la luz a través de la intensidad de la iluminación y del cultivo (Schuurmans et al., 2017).

Con lo que respecta a los cultivos de la cepa silvestre realizados en medio BG-11 adicionados con diferentes concentraciones de APPAO, e iniciados en baja biomasa ( $DO_{30}$  0.1), el hecho de que en el cultivo 1% de APPAO Misión se obtuviera una mayor DO final presumiblemente por los nutrientes aportados por el APPAO y que la tasa de crecimiento máxima no se viera afectada en comparación con la cepa crecida en

BG-11 (ambas con  $\mu_0 = 5.42$ ), sugirió que 1% era una buena opción para realizar los ensayos en alta biomasa y evaluar la producción de PHA's. Sin embargo, aunque el tratamiento en 5% de APPAO tuvo un crecimiento muy bajo en los primeros 13 días de cultivo y en 10% el crecimiento fue casi nulo (DO 0.5) se decidió incluirlas en los ensayos de inducción para evaluar la producción de PHA ya que se hipotetizó que algunos de compuestos presentes en el APPAO como los fenoles, pudieran actuar como inductores de la producción de PHA, aunque no se promoviera el crecimiento. Debido a esto se decidió llevar a cabo ensayos en alta biomasa inicial (DO 4.0) con diferentes concentraciones de APPAO Manzanilla-Misión. Los cultivos de la cepa silvestre de *Synechocystis* con 0, 1 y 5% APPAO lograron crecer hasta una DO final cercana a 10, mientras que en los ensayos de inducción de la mutante en *pta* la DO final fue cercana a 6. Al igual que lo obtenido en los cultivos en APPAO Misión al 10% en baja biomasa inicial, en los cultivos de inducción con APPAO Manzanilla-Misión ninguna de las dos cepas mostró crecimiento en APPAO 10%. La biomasa medida como peso seco corroboró los resultados obtenidos por densidad óptica, ya que el mayor valor de peso seco para la cepa silvestre el APPAO correspondió con el tratamiento 1% con 1.36 g/L comparado con el mayor valor de la cepa mutante en *pta*, que fue 1.02 g/mL en el tratamiento 0%, ambas en el día 24.

El efecto en el crecimiento puede ser explicado por un lado por la composición del APPAO y por otro por la variación del pH de los cultivos. En las curvas de crecimiento con una DO inicial de 0.1, no se reajustó el pH del cultivo después de adicionar el APPAO Misión. Sin embargo, esto sí fue realizado en las curvas en alta biomasa inicial de la cepa silvestre (DO<sub>730</sub> 4.0), donde el pH se reajustó a 7.5 después de la adición de APPAO Manzanilla-Misión. Las curvas de pH obtenidas en estas condiciones mostraron que el pH del cultivo de la cepa silvestre llegó hasta 11 en medio BG-11 con 0 y 1% APPAO, y a 11.7 en 5% APPAO. En cambio, con 10% APPAO sólo llegó a un pH final de 9. Estos cambios de pH sugieren la formación gradual de compuestos que fueron alcalinizando el medio de cultivo conforme fueron metabolizados por la cianobacteria. Estos resultados coinciden con el trabajo de Touloupakis et al. (2016) en donde el pH aumentó en cultivos de *Synechocystis* sp. PCC 6803, realizados en BG-11 a medida que los carbohidratos estaban presentes en el medio de cultivo, siendo este un factor clave ya que el carbono inorgánico está presente como carbonato, como respuesta al crecimiento fotosintético, lo que alcaliniza el medio de cultivo.

El reporte de APPAO Misión por los laboratorios SALIP mostraron que esta agua posee una cantidad de carbohidratos de 0.39% y 4.41 mg/mL de fenoles, entre otros parámetros. Y más específicamente, los análisis espectrofotométricos obtenidos para el APPAO Misión, mostraron que los compuestos más abundantes son los ácidos carboxílicos (30.4%), tal como diacetato de ludaconitina y ácidos grasos (17.4%),

un 8.7% de bencenos y compuestos organitrogenados y sólo un 4.35% de lípidos de prenol. Esto a diferencia del APPAO Manzanilla Misión que presentó un menor porcentaje de ácidos carboxílicos (27.4%), pero un mayor porcentaje de lípidos prefenoles (13.7%), tal como gelomulida y un menor porcentaje de ácidos grasos (12.3%) y 4.1% compuestos fenólicos. Los carbohidratos pueden ser aprovechados a través de las diferentes vías metabólicas que presenta *Synechocystis* tales como la EMP y la vía de Entner-Doudoroff, las cuales producen piruvato y acetil Co-A que pueden entrar a la vía de TCA y sirven también como metabolitos precursores para la vía de producción de PHB. Los ácidos carboxílicos son metabolizados a través del ciclo TCA bajo incubación en oscuridad en donde el 2-oxoglutarato se metaboliza en succinato a través del semialdehído succínico como intermediario (Iijima et al., 2021). Al tener los ácidos carboxílicos disponibles en el medio se dirige hacia la producción de acetil-CoA, principal precursor de acetato, lactato y PHB. La vía de EMP es la vía de carbono más importante para la producción de PHB en *Synechocystis*, donde cataboliza glucosa a piruvato (Lippi et al., 2018). El piruvato da lugar a Acetil-Co-A que es el metabolito precursor de la síntesis de PHB en *Synechocystis*. Otra ruta que puede tomar el carbono disponible es la del ácido cítrico, en donde el acetil-CoA se convierte en citrato, pasa por el ciclo TCA, en donde uno de los productos es el piruvato se dirige hacia la gluconeogenesis. Como se puede observar, existen diversos compuestos que se pueden formar a partir de los precursores disponibles (Trotsenko y Belova, 2000; Ciebiada et al., 2020).

Los compuestos fenólicos observados en los análisis por NMR del APPAO Manzanilla-Misión representaron el 4.11%. Entre los compuestos presentes están los ácidos fenilacéticos y los ácidos cinámicos que fueron encontrados así mismo en el OMWW por Fiorentino et al. (2003). Estos compuestos pudieron ser los responsables de inhibir el crecimiento de *Synechocystis* en altas concentraciones. En el trabajo de Fiorentino y colaboradores se observó que particularmente los fenoles con un peso molecular inferior a 350 Da fueron los que inhibieron el crecimiento de microalgas, adjudicándose la mayor toxicidad al catecol y la hidroxitiroso, fenoles abundantes en el OMWW. Se sabe que el alto contenido de moléculas orgánicas, especialmente por mezclas poli-fenólicas (1-10 g/L) puede inhibir el crecimiento celular (Agustín Martínez et al., 2015). Esta inhibición del crecimiento fue observada en cepa silvestre y más evidentemente en la mutante en *pta* en altas concentraciones de APPAO (10%) como una disminución de los valores de DO y peso seco.

Aunque no existen estudios en la literatura con el APPAO, existe mucha información con el OMWW. Se sabe que además de las diversas características fisicoquímicas del OMWW, estas dependen del clima, la especie del cultivo de olivos, el grado de maduración del fruto, el tiempo de almacenamiento y el proceso utilizado de extracción del aceite (Abbattista et al., 2021), por lo que variarán en cada cosecha. A medida

que el olivo madura los compuestos fenólicos se acumulan, compuestos como la desleuropeína y el 3,4-dihidroxifeniletanol. Otros fenoles se han identificado en olivas como el flavonol, la quercetina 3-rutinoside (rutina) y la luteolina 7-glucósido, estos se encuentran en cantidades variables depende de la madurez, tipo y el proceso de extracción del aceite (Esti et al., 1998; Abbattista et al., 2021). Estos fenoles en particular no fueron detectados en los análisis de NMR realizados con el APPAO Misión y Manzanilla-Misión, pero se identificaron fenoles como el siringaldehído. Si se quiere utilizar un porcentaje igual o mayor a 10% se sugiere dar un tratamiento previo al APPAO para eliminar fenoles, siempre y cuando el tiempo y el costo no comprometa la viabilidad del tratamiento. Una estrategia para poder utilizar altas concentraciones de APPAO es someterlo a procesos de reducción de fenoles con el propósito de disminuir la toxicidad. Fiorentino et al. (2004) usaron dos métodos para la oxidación del OMWW, uno químico con  $\text{FeCl}_3$  y otro biológico a partir de inóculo de microorganismos seleccionados para la degradación de fenoles, aceites y lípidos del OMWW. Como lo indican Fiorentino et al. (2003) los rotíferos y algas se ven especialmente afectados por la presencia de los fenoles catecol e hidroxitiroso, presentes en los OMWW, pero estos no se detectaron en el APPAO utilizado en el presente estudio.

En Panda y Mallick (2007), se establece una correlación positiva entre el peso seco y la acumulación de PHB, sugiriendo que la máxima acumulación de PHA está en la fase estacionaria bajo limitaciones de intercambio gaseoso y fosfato, en presencia de carbonos exógenos. Estos resultados coinciden con lo obtenido en el presente trabajo ya que se puede ver que en el día 24 se obtuvo la mayor biomasa en peso seco en la cepa silvestre, particularmente en el tratamiento 1% con 1.36 g/L, mientras que la mayor cantidad de PHA fue obtenida al día 24 en las concentraciones de 5 y 10% con valores promedio de 0.85-0.94 g/L. Por otro lado, en la cepa mutante en *pta* la mayor cantidad de peso seco (1.02 g/L) y de PHA (0.83 g/L) se obtuvieron en último día de cultivo en 0% APPAO. Esta tendencia, junto con la observación de aumento de DO en la cepa silvestre, en las concentraciones bajas de APPAO (1 y 5%), sugiere que la cepa silvestre pudo aprovechar mejor los nutrientes presentes en APPAO que la cepa mutante, resultando un mayor peso seco y producción de PHA en la etapa final de los cultivos.

Tanto el crecimiento como el pH son fundamentales para la formación del polímero de interés, ya que en este mismo estudio de Panda y Mallick (2007) la acumulación máxima ocurrió en un pH de entre 7.5 y 8.5. Estos autores sugirieron que los pH alcalinos favorecen la acumulación del polímero. En la cepa silvestre, sin embargo, no se observó una relación clara entre el pH y la producción de PHA ya que el pH se mantuvo igual en la cepa silvestre con 0 y 1% de APPAO. El pH mostró un aumento gradual con APPAO al 5% y una disminución con 10%. Sin embargo, los mayores niveles de PHA se obtuvieron a las 24 horas de cultivo en

las concentraciones de 1 y 5% en comparación con el 0%, lo que sugiere que los compuestos presentes en APPAO promovieron la producción de PHA.

Comparando los resultados de microscopía confocal y denotando que la medición realizada se tomó con base en el área con presencia de tinción, no se lograron observar gránulos individuales sino como área, para efectos prácticos se le denomina área granular. En la cepa silvestre fue mayor en los últimos días, como el día 24 en el 0% con  $1.09 \mu\text{m}^3$  y en el tratamiento 1% en el día 18 con un área de  $1.61 \mu\text{m}^3$ . Sin embargo, el valor más alto de área con presencia de gránulos en la cepa silvestre fue de  $1.95 \mu\text{m}^3$  y se obtuvo en el tratamiento 5% en el día 8, lo que representó el 45% del volumen celular promedio en esas condiciones y un aumento de 88% con respecto a la silvestre en BG-11 sin APPAO en el día 8 ( $0.23 \mu\text{m}^3$ ). Mientras que en la cepa mutante en *pta* las mayores áreas con presencia de gránulos fueron en los primeros días de los tratamientos, por ejemplo, en el día 9 en los tratamientos 1% con un área de  $1.38 \mu\text{m}^3$  y en el día 0 tratamiento 5% con un área de  $2.27 \mu\text{m}^3$ . El mayor valor se presentó en la cepa mutante en *pta* en el tratamiento 10% en el día 9 con un promedio de gránulo de  $4.95 \mu\text{m}^3$ , lo que representó un área de más del 50% del volumen celular en esas condiciones y un aumento de más de 91.7% del valor del área con presencia de gránulos en el día 9 de medio sin APPAO ( $0.41 \mu\text{m}^3$ ).

La diferencia en los resultados entre los niveles de PHA y las mediciones del área de gránulos puede deberse a que en los niveles de PHA en g/L no se considera el ajuste por la biomasa obtenida en cada tiempo, ya que como se mencionó anteriormente esto no fue posible por los aceites residuales que quedaron en el extracto, lo que daba valores de peso más altos que la biomasa celular inicial. Pudiera haberse dado por ejemplo una co-polimerización del PHA con los restos del APPAO, ya que contienen lípidos de prenol y ácidos grasos. En este trabajo lo que se hizo fue realizar un lavado previo de las muestras con agua destilada antes de proceder con las extracciones. Sin embargo, en estudios donde se han utilizado aceites de plantas para promover el crecimiento y producción de PHAs de bacterias como *Cupriavidus necator*, se menciona que fue necesario dar un lavado previo a las células con hexano para remover los aceites no utilizados de las muestras antes de realizar la extracción de PHA (Volova et al., 2020).

En el artículo Agustín Martínez et al. (2015) se utilizó la cepa *Cupriavidus necator* y un OMWW desfenolizado y fermentado rico en ácidos grasos volátiles, observando que existen efectos inhibitorios significativos cuando la concentración de OMWW fue de 75% y 100%, los autores demostraron, con una solución preparada en laboratorio, que los polifenoles contribuyeron a la inhibición observada. En los cultivos en menor porcentaje (25 y 50%), se observó un crecimiento atribuido a la producción y

almacenamiento de PHA. En ese mismo trabajo los cultivos en altas concentraciones no permitieron la acumulación de PHA, en consecuencia, las mediciones de absorbancia y pH permanecieron constantes en la fase de acumulación. Estos resultados difieren del presente estudio ya que los cultivos en alta biomasa inicial la DO final de la cepa silvestre en 0, 1 y 5% APPAO llegó a 6.7, 7.9 y 7.05, respectivamente y el pH se incrementó considerable a lo largo del cultivo, mientras que en la mutante en *pta* la DO final de los cultivos fue menor que en la silvestre con 6.4, 5.2 y 5.8, respectivamente. No obstante, los resultados obtenidos permitieron ver que las altas concentraciones de APPAO (5 y 10%) promovieron la producción de PHA.

En general, la cepa silvestre obtuvo mayores tasas de crecimiento, peso seco y PHA, con excepción de las mediciones granulares, en el que la cepa mutante en *pta* tuvo un mayor valor. La delección de mutante se realizó en el gen *pta* que codifica para la enzima fosfotransacetilasa y es a nivel del genoma, lo que evita una posible reversión de la mutación. La interrupción en el gen *pta* evita que acetil Co-A que se forma en la parte final de la vía de EMP se dirija a la formación de lactato por lo que queda disponible para la formación de otros metabolitos que requieren este sustrato, como lo es el PHB (Carpine et al., 2017).

Para mejorar aún más la producción de PHB en esta cepa mutante en *pta* sería interesante llevar a cabo otras modificaciones genéticas como la sobreexpresión de los genes de la vía de síntesis de PHB de *Synechocystis* para tratar de redirigir el flujo metabólico hacia esta vía. Esta estrategia ha sido utilizada en Utharn et al. (2021) en donde se aumentó la producción de PHB en una cepa de *Synechocystis*, se interrumpió el gen *adc1* (que codifica para la arginina descarboxilasa) y se sobreexpresaron genes nativos de PHB, *phaA* (que codifica la beta-cetotiolasa), *phaB* (que codifica la acetoacetil-CoA reductasa), *phaEC* (que codifica la PHA sintasa), en particular la cepa que sobreexpresa *phaAB*, obteniéndose un aumento de 26% de PHB con base a peso seco con respecto a la cepa silvestre crecida en BG-11 y de hasta el 35% de PHB después de añadir 0.4% (p/v) de acetato.

Los gránulos observados en las tinciones coinciden con la descripción de PHA en diversos artículos, como el de Dutt y Srivastava (2018) en donde se utilizó la técnica de microscopía confocal para la visualización e identificación de gránulos de PHB. Obruca et al. (2018) menciona que el PHA se almacena en forma de inclusión esférica citoplasmática y que estos gránulos pueden representar una fracción dominante de materia seca celular superior al 90%. Las bacterias son capaces de regular sus dimensiones celulares, con el propósito de controlar el volumen con respecto a los gránulos de PHA para que este no rebase el valor de aproximadamente 40% del volumen celular total. La presencia de los gránulos de PHA tienen numerosas consecuencias biológicas y físicas que mejoran la resistencia general al estrés de las células que contienen PHA, por lo que se deduce que el PHA es una ventaja para que las bacterias se asienten en

nuevos nichos ecológicos ambientales estresantes, logrando que sean bien *adaptados* a los cultivos adicionados con APPAO (Obruca et al., 2018). Estos datos puntualizan la importancia del uso de la técnica de microscopía confocal, para la corroboración de la presencia de gránulos, así como su cuantificación. Se ha hipotetizado que el polímero sirve como una reserva de energía y carbono, similar al glicógeno, lo que le podría ayudar a sobrevivir a los organismos bajo condiciones de estrés ambiental. Sin embargo, el PHB también puede servir como poza intracelular de electrones bajo condiciones de exceso de equivalentes reductores como el NADPH (Koch et al., 2020). En ese sentido, el aumento de PHA producido en este trabajo por la adición de APPAO pudiera explicarse como la manera de reservar carbono y energía por parte de la célula a partir de los compuestos presentes en el APPAO como los ácidos carboxílicos, pero también podría ser un intento de la célula de regular el estado redox intracelular por la presencia de fenoles y otros compuestos presentes en el APPAO que pudieran provocar estrés celular. Sin embargo, esto tendría que ser estudiado en un futuro.

Con respecto a la producción biotecnológica del PHA, el alto costo de su producción sigue siendo un obstáculo, ya sea por la materia prima de carbono y/o el costo del procesamiento posterior al utilizar residuos de biomasa procedentes de la agroindustria, resultan ser una buena fuente de carbono alternativa y rentable, sin comprometer cultivos alimentarios. A la fecha el único trabajo realizado con OMWW en organismos fotosintéticos ha sido con las microalgas *Chlorella pyrenoidosa* y *Scenedesmus obliquus* (Sánchez Villasclaras et al., 1996), en donde se evaluó la composición de biomasa en términos de proteínas y lípidos. Esto deja un campo abierto para la evaluación y utilización del APPAO, OMWW u otros componentes del proceso de utilización del aceite de oliva para la producción de PHAs y otros compuestos de interés biotecnológico en cianobacterias.

Las micrografías electrónicas de transmisión de las cepas, tanto la silvestre como la mutante en *pta* coinciden en morfología descrita en diversos artículos. En ambas cepas se observa la capa de peptidoglicano, la cual es de un grosor variable y está en el espacio periplásmico (Demoulin et al., 2019). En la cepa silvestre se puede notar un mayor volumen de 11.8 a 10.72  $\mu\text{m}^3$  en comparación de las células de la cepa mutante en *pta* de 8.59 a 9.97  $\mu\text{m}^3$ , este mayor volumen permite una mejor identificación de los componentes sub-celulares, como lo indican Mareš et al. (2019). El tamaño de la célula determina la aparición de los tilacoides, en lugar de factores genéticos, lo que puede ser indicativo de una estrategia de *adaptación* a entornos con nutrientes limitados y condiciones de estrés, resultando en mayores proporciones de superficie a volumen, así como tasas de sedimentación más bajas. Esto coincide con la aparición de estructuras más definidas en la cepa silvestre, donde se observaron los tilacoides, mientras que en la cepa mutante en *pta* se identifican estos como fascículos enrollados irregularmente distribuidos

por toda la célula. En la cepa silvestre se presentaron de uno a seis gránulos de PHB por célula, mientras que en la cepa mutante en *pta* fueron de uno o tres gránulos. Así mismo, la condición donde se encontraron los gránulos con mayor volumen fue en la cepa silvestre en el día 0 ( $0.075 \mu\text{m}^3$ ).

Los gránulos fueron identificados con referencia al trabajo de Tsang et al. (2013), ya que cumplen con las características que definen e identifican a los gránulos de PHB, esta característica es una zona de menor densidad a los electrones dentro de las células. En otros trabajos, como Hondo et al. (2015) concluyen que los gránulos de PHB se sitúan cerca de las membranas tilacoidales y no entre las membranas tilacoidales. De hecho, en el presente trabajo no se observaron diferencias significativas en la ubicación de los gránulos de PHB en los días analizados lo cual corresponde con las observaciones por Dutt y Srivastava (2018).

Las células de la cepa silvestre se observaron con menos afectaciones de la estructura celular, los organelos fueron fácilmente distinguibles y claros, la notoriedad de la membrana plasmática coincide con Iijima et al. (2021) quienes también observaron un crecimiento de este componente sub-celular. En la cepa mutante en *pta* el cambio más evidente fue en el espacio inter-membranal, el cual en el día 14 fue más prominente. Esta diferencia concuerda con Dutt y Srivastava (2018) quienes describen un aumento en la separación debido a la limitación por  $\text{N}_2$ .

El espacio Inter-membranal compuesto por la capa de peptidoglicano y el periplasma poseen funciones primordiales para la célula. El periplasma tiene como función de ser un conducto de comunicación utilizado para transferencia de compuestos, una función esencial de las cianobacterias. El periplasma comprende de macromoléculas, las cuales son proteínas, elementos de sistemas de transporte de captación y exportación de transportadores (tipo ABC), actividad importante para la retención de aminoácidos y el transporte de complejos de membrana (Flores et al., 2006; Baers et al., 2019). Estos resultados sugieren que la mutación en *pta* no solo afecta la síntesis de metabolitos precursores de la vía glicolítica y la síntesis de PHAs sino también afecta a las estructuras celulares, posiblemente reteniendo aminoácidos en el espacio inter-membranal en los días avanzados de cultivo.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

Los cultivos de la cepa silvestre en baja biomasa inicial (DO 0.1), adicionados con diferentes concentraciones de APPAO, permitieron evaluar la cinética de crecimiento de la cepa de estudio. La adición de APPAO por arriba de 1% mostró un efecto inhibitorio del crecimiento lo que llevó a realizar cultivos con mayor biomasa inicial (DO 4.0) para evaluar la producción de PHA. Las metodologías empleadas tanto para la extracción de PHA, la microscopía confocal y la utilizada en TEM permitieron comparar valores de producción del PHA con el efecto en la estructura morfológica de las células.

La evaluación de las distintas concentraciones de APPAO indicaron que a mayor concentración se dio un menor crecimiento en los cultivos, lo cual se puede deber a los compuestos fenólicos presentes en el APPAO. Sin embargo, a mayor concentración de APPAO se obtuvo una mayor producción del polímero. La cepa y la condición de mayor producción de PHA fue la cepa silvestre en el día 24 del tratamiento con APPAO 5% (0.94 g/L). Estos resultados evidenciaron la importancia de utilizar cultivos con alta biomasa inicial.

La mayor biomasa en peso seco en la cepa silvestre se obtuvo en el tratamiento 1% (1.36 g/L), mientras que la mayor cantidad de PHA fue obtenida al día 24 en 5 y 10% APPAO con valores promedio de 0.85-0.94 g/L. Esto, a diferencia de la mutante en *pta*, que mostró la mayor cantidad de peso seco (1.02 g/L) y de PHA (0.83 g/L) en el día 24 sin APPAO. Esta tendencia, junto con la observación de aumento de DO en la cepa silvestre en las concentraciones bajas de APPAO (1 y 5%), sugieren que la cepa silvestre pudo aprovechar mejor los carbohidratos y otros nutrientes presentes en APPAO en bajas concentraciones (1-5%) para formación de biomasa y formación de PHA en comparación con la cepa mutante.

El análisis metabólico mostró que los compuestos más abundantes del APPAO Manzanilla-Misión son los ácidos carboxílicos y derivados (27.4%), los cuales pueden ser metabolizados por *Synechocystis* a través de las vías TCA y glicólisis que pueden dar lugar a precursores de la vía de síntesis de PHB. Estos resultados sugieren la importancia de obtener mutantes que sobre expresen genes de la vía de síntesis de PHB para redirigir el flujo del carbono hacia la vía de interés.

Las altas concentraciones de APPAO Manzanilla-Misión probadas en este estudio (10%) provocaron inhibición del crecimiento en cepa silvestre y más evidentemente en la mutante en *pta* observadas como una disminución de los valores de DO, peso seco y pH lo que pudo deberse al aumento de los niveles de fenol presentes en el APPAO tales como siringaldehído.

En la cepa silvestre las condiciones en donde se obtuvo una mayor área de gránulos por microscopía confocal fue en el día 8 con APPAO 5% ( $1.95 \mu\text{m}^3$ ), a diferencia de la mutante en *pta* donde el mayor volumen de gránulos se obtuvo en el día 9 de 10% APPAO con  $4.95 \mu\text{m}^3$ . Estos resultados sugieren que las formaciones de gránulos con mayor volumen se dieron en la mutante en *pta* en presencia de altas concentraciones de APPAO.

Las micrografías de TEM en el tratamiento 1% permitieron la corroboración de los gránulos, la cepa silvestre mostró un mayor promedio de volumen granular con  $0.075 \mu\text{m}^3$  también en volumen celular con  $11.8 \mu\text{m}^3$  en comparación con la mutante. Así mismo en la cepa silvestre se encontraron células con 1 a 6 gránulos de PHA, mientras que en la cepa mutante en *pta* solamente de 1 a 3 gránulos por célula. Esto sugiere que se están aprovechando de distinta manera los nutrientes proporcionados por el APPAO para la producción de metabolitos de reserva como el PHA.

El aumento en el espacio inter-membranal celular, evidenciado principalmente en la mutante en *pta*, en cultivos adicionados con APPAO, sugieren que la mutación no solo afecta la síntesis de metabolitos precursores de la vía glicolítica y la síntesis de sustancias de reserva como el PHA, sino también estructuras celulares posiblemente reteniendo aminoácidos en los días avanzados de cultivo.

## 5.1 Perspectivas

Se sugiere lavar la biomasa inicial con solventes como el hexano previa extracción del polímero para la eliminación de lípidos residuales que interfieren con la extracción y el cálculo de los rendimientos de PHA. Por lo tanto, para ensayos futuros se sugiere realizar lavados adicionales de la biomasa con hexano, previa extracción de PHA.

Se requiere reforzar la estrategia para la mutante con ingeniería genética para obtener cepas que sobre expresen los genes de la vía de síntesis de PHB con el propósito de redirigir el flujo de precursores como el acetil-CoA y piruvato hacia la producción de bioplásticos.

Caracterizar el tipo y propiedades de PHAs que se están produciendo para poder evaluar el tipo de aplicaciones biotecnológicas y/o biomédicas que puedan tener.

Estudiar el estado redox intracelular por la presencia de fenoles y otros compuestos presentes en el APPAO.

## Literatura citada

---

- Abbattista, R., Ventura, G., Calvano, C. D., Cataldi, T. R. I., Losito, I. (2021). Bioactive Compounds in Waste By-Products from Olive Oil Production: Applications and Structural Characterization by Mass Spectrometry Techniques. *Foods*, 10(1), 1-28, 1236. doi:10.3390/FOODS10061236
- Abed, R. M. M., Dobretsov, S., Sudesh, K. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 106(1), 1-12. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03918.x
- Agustín Martínez, G., Bertin, L., Scoma, A., Rebecchi, S., Braunegg, G., Fava, F. (2015). Production of polyhydroxyalkanoates from dephenolised and fermented olive mill wastewaters by employing a pure culture of *Cupriavidus necator*. *Biochemical Engineering Journal*, 97, 92–100. doi:10.1016/J.BEJ.2015.02.015
- Alburquerque, J. A., González, J., García, D., Cegarra, J. (2004). Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology*, 91(2), 195–200. doi:10.1016/S0960-8524(03)00177-9
- Alcántara, M. G. C., Jiménez, J. C., Úrizar, E. P. (2020). Ecological, taxonomic and distributional aspects of benthic cyanobacteria in five streams of central Mexico. *Acta Botanica Mexicana*, (127). doi:10.21829/ABM127.2020.1639
- Amaro, T. M. M., Rosa, D., Comi, G., Iacumin, L. (2019). Prospects for the use of whey for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 10. doi:10.3389/fmicb.2019.00992
- Andreas Angermayr, S., van Alphen, P., Hasdemir, D., Kramer, G., Iqbal, M., van Grondelle, W., Hoefsloot, H. C., Choi, Y. H., Hellingwerf, K. J. (2016). Culturing *Synechocystis* sp. Strain pcc 6803 with N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> in a diel regime reveals multiphase glycogen dynamics with low maintenance costs. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(14), 4180–4189. doi:10.1128/AEM.00256-16
- Angermayr, S. A., Gorchs Rovira, A., Hellingwerf, K. J. (2015). Metabolic engineering of cyanobacteria for the synthesis of commodity products. *Trends in Biotechnology*, 33(6), 352–361. doi:10.1016/J.TIBTECH.2015.03.009
- Azbar, N., Keskin, T., Yuruyen, A. (2008). Enhancement of biogas production from olive mill effluent (OME) by co-digestion. *Biomass and Bioenergy*, 32(12), 1195–1201. doi:10.1016/J.BIOMBIOE.2008.03.002
- Baers, L. L., Breckels, L. M., Mills, L. A., Gatto, L., Deery, M. J., Stevens, T. J., Howe, C. J., Lilley, K. S., Lea-Smith, D. J. (2019). Proteome Mapping of a Cyanobacterium Reveals Distinct Compartment Organization and Cell-Dispersed Metabolism. *Plant Physiology*, 181(4), 1721–1738. doi:10.1104/PP.19.00897
- Balaji, S., Gopi, K., Muthuvelan, B. (2013). A review on production of poly  $\beta$  hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. *Algal Research*, 2(3), 278–285. doi:10.1016/J.ALGAL.2013.03.002
- Bartolo, A. Di, Infurna, G., Dintcheva, N. T. (2021). polymers A Review of Bioplastics and Their Adoption in the Circular Economy. doi:10.3390/polym13081229

- Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., Alvarez, V. (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*, 8(11), 791–808. doi:10.3144/EXPRESSPOLYMLET.2014.82
- Carpine, R., Du, W., Olivieri, G., Pollio, A., Hellingwerf, K. J., Marzocchella, A., Branco dos Santos, F. (2017). Genetic engineering of *Synechocystis* sp. PCC6803 for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate overproduction. *Algal Research*, 25, 117–127. doi:10.1016/j.algal.2017.05.013
- Ciebiada, M., Kubiak, K., Daroch, M. (2020). Modifying the cyanobacterial metabolism as a key to efficient biopolymer production in photosynthetic microorganisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 1–24. doi:10.3390/ijms21197204
- Darvishi, F. (2012). Inputs and outputs from olive oil industry (Adapted from Azbar et al. 2004). In *Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*. doi:10.5772/28263
- De Philippis, R., Ena, A., Guastiini, M., Sili, C., Vincenzini, M. (1992). Factors affecting poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation in cyanobacteria and in purple non-sulfur bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 103(2–4), 187–194. doi:10.1016/0378-1097(92)90309-C
- Demoulin, C. F., Lara, Y. J., Cornet, L., François, C., Baurain, D., Wilmotte, A., Javaux, E. J. (2019). Cyanobacteria evolution: Insight from the fossil record. *Free Radical Biology and Medicine*, 140, 206–223. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2019.05.007
- Ducat, D. C., Way, J. C., Silver, P. A. (2011), February 1. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends in Biotechnology*, Vol. 29. doi:10.1016/j.tibtech.2010.12.003
- Dutt, V., Srivastava, S. (2018). Novel quantitative insights into carbon sources for synthesis of poly hydroxybutyrate in *Synechocystis* PCC 6803. *Photosynthesis Research*, 136(3), 303–314. doi:10.1007/S11120-017-0464-X
- Esti, M., Cinquanta, L., Notte, E. La. (1998). Phenolic Compounds in Different Olive Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 32–35. doi:10.1021/jf970391+
- Fiorentino, A., Gentili, A., Isidori, M., Lavorgna, M., Parrella, A., Temussi, F. (2004). Olive Oil Mill Wastewater Treatment Using a Chemical and Biological Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5151–5154. doi:10.1021/JF049799E
- Fiorentino, A., Gentili, A., Isidori, M., Monaco, P., Nardelli, A., Parrella, A., Temussi, F. (2003). Environmental Effects Caused by Olive Mill Wastewaters: Toxicity Comparison of Low-Molecular-Weight Phenol Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 1005–1009. doi:10.1021/JF020887D
- Flores, E., Herrero, A., Wolk, C. P., Maldener, I. (2006). Is the periplasm continuous in filamentous multicellular cyanobacteria? *Trends in Microbiology*, 14(10), 439–443. doi:10.1016/J.TIM.2006.08.007
- García, G., Sosa-Hernández, J. E., Rodas-Zuluaga, L. I., Castillo-Zacarías, C., Iqbal, H., Parra-Saldívar, R. (2021). Accumulation of PHA in the Microalgae *Scenedesmus* sp. under Nutrient-Deficient Conditions. *Polymers*, 13(1), 1–23. doi:10.3390/POLYM13010131
- García, Y. G., Carlos, J., Contreras, M., Reynoso, G., Antonio, J., López, C. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminación*

Ambiental, 29(1), 77–115.

- Gerwick, W. H., Roberts, M. A., Proteau, P. J., Chen, J. L. (1994). Screening cultured marine microalgae for anticancer-type activity. *Journal of Applied Phycology*, 6(2), 143–149. doi:10.1007/BF02186068
- Giannoutsou, E. P., Meintanis, C., Karagouni, A. D. (2004). Identification of yeast strains isolated from a two-phase decanter system olive oil waste and investigation of their ability for its fermentation. *Bioresource Technology*, 93(3), 301–306. doi:10.1016/J.BIORTECH.2003.10.023
- Haas, R., Jin, B., Zepf, F. T. (2008). Production of poly(3-hydroxybutyrate) from waste potato starch. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72(1), 253–256. doi:10.1271/bbb.70503
- Hawkins, S., Fonseca, I. B. F. de C., Lima Da Silva, R., Quirino, R. L. (2021). Aquaculture Waste: Potential Synthesis of Polyhydroxyalkanoates. *ACS Omega*, 6(4), 2434–2442. doi:10.1021/acsomega.0c05304
- Hirai, K., Nojo, M., Sato, Y., Tsuzuki, M., Sato, N. (2019). Contribution of protein synthesis depression to poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation in *Synechocystis* sp. PCC 6803 under nutrient-starved conditions. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–10. doi:10.1038/s41598-019-56520-w
- Hirai, M., Tanaka, N., Sakai, M., Yamaguchi, S. (2019). Structurally Constrained Boron-, Nitrogen-, Silicon-, and Phosphorus-Centered Polycyclic  $\pi$ -Conjugated Systems. *Chemical Reviews*, 119(14), 8291–8331. doi:10.1021/ACS.CHEMREV.8B00637
- 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. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(5), 510–517. doi:10.1016/J.JBIOSEC.2015.03.004
- Iijima, H., Watanabe, A., Sukigara, H., Iwazumi, K., Shirai, T., Kondo, A., Osanai, T. (2021). Four-carbon dicarboxylic acid production through the reductive branch of the open cyanobacterial tricarboxylic acid cycle in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Metabolic Engineering*, 65, 88–98. doi:10.1016/J.YMBEN.2021.03.007
- Jaki, B., Heilmann, J., Sticher, O. (2000). New antibacterial metabolites from the cyanobacterium *Nostoc commune* (EAWAG 122b). *Journal of Natural Products*, 63(9), 1283–1285. doi:10.1021/np000033s
- Kamravamanesh, D., Kovacs, T., Pflügl, S., Druzhinina, I., Kroll, P., Lackner, M., Herwig, C. (2018). Increased poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production from carbon dioxide in randomly mutated cells of cyanobacterial strain *Synechocystis* sp. PCC 6714: Mutant generation and characterization. *Bioresource Technology*, 266, 34–44. doi:10.1016/j.biortech.2018.06.057
- Kamravamanesh, D., Pflügl, S., Nischkauer, W., Limbeck, A., Lackner, M., Herwig, C. (2017). Photosynthetic poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation in unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6714. *AMB Express*, 7(1), 1–12. doi:10.1186/S13568-017-0443-9/FIGURES/6
- Khanna, S., Srivastava, 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. doi:10.1016/j.biortech.2016.05.014

- Kim, M., Choi, D. H., Park, M. G. (2021). Cyanobiont genetic diversity and host specificity of cyanobiont-bearing dinoflagellate *Ornithocercus* in temperate coastal waters. *Scientific Reports*, 11(1). doi:10.1038/s41598-021-89072-z
- Koch, M., Bruckmoser, J., Scholl, J., Hauf, W., Rieger, B., Forchhammer, K. (2020). Maximizing PHB content in *Synechocystis* sp. PCC 6803: a new metabolic engineering strategy based on the regulator PirC. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1–12. doi:10.1186/S12934-020-01491-1/TABLES/3
- Koehn, F. E., Longley, R. E., Reed, J. K. (1992). Microcolins a and b, new immunosuppressive peptides from the blue-green alga *lyngbya majuscula*. *Journal of Natural Products*, 55(5), 613–619. doi:10.1021/np50083a009
- Krasaesueb, N., Incharoensakdi, A., Khetkorn, W. (2019). Utilization of shrimp wastewater for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production by *Synechocystis* sp. PCC 6803 strain  $\Delta$ SphU cultivated in photobioreactor. *Biotechnology Reports*, 23. doi:10.1016/j.btre.2019.e00345
- Krasaesueb, N., Promariya, A., Raksajit, W., Khetkorn, W. (2021). Inactivation of phosphate regulator (SphU) in cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803 directly induced acetyl phosphate pathway leading to enhanced PHB level under nitrogen-sufficient condition. *Journal of Applied Phycology* 2021 33:4, 33(4), 2135–2144. doi:10.1007/S10811-021-02460-W
- Li, Z., Guo, M. (2018). Healthy efficacy of *Nostoc commune* Vaucher. *Oncotarget*, Vol. 9. doi:10.18632/oncotarget.23620
- Lippi, L., Bähr, L., Wüstenberg, A., Wilde, A., Steuer, R. (2018). Exploring the potential of high-density cultivation of cyanobacteria for the production of cyanophycin. *Algal Research*, 31, 363–366. doi:10.1016/J.ALGAL.2018.02.028
- Ma, H., Zhao, Y., Huang, W., Zhang, L., Wu, F., Ye, J., Chen, G. Q. (2020). Rational flux-tuning of *Halomonas bluephagenesis* for co-production of bioplastic PHB and ectoine. *Nature Communications*, 11(1), 1–12. doi:10.1038/s41467-020-17223-3
- Mareš, J., Strunecký, O., Bučinská, L., Wiedermannová, J. (2019). Evolutionary patterns of thylakoid architecture in Cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB). doi:10.3389/FMICB.2019.00277/FULL
- McNamara, C. J., Anastasiou, C. C., O’Flaherty, V., Mitchell, R. (2008). Bioremediation of olive mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(2), 127–134. doi:10.1016/J.IBIOD.2007.11.003
- Meng, D. C., Chen, G. Q. (2017). Synthetic biology of polyhydroxyalkanoates (PHA). In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Vol. 162). doi:10.1007/10\_2017\_3
- Monshupanee, T., Incharoensakdi, A. (2014). Enhanced accumulation of glycogen, lipids and polyhydroxybutyrate under optimal nutrients and light intensities in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Applied Microbiology*, 116(4), 830–838. doi:10.1111/JAM.12409
- Monshupanee, Tanakarn, Nimdach, P., Incharoensakdi, A. (2016). Two-stage (photoautotrophy and heterotrophy) cultivation enables efficient production of bioplastic poly-3-hydroxybutyrate in auto-sedimenting cyanobacterium. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6(1), 1–9. doi:10.1038/srep37121

- Mostafa, Y. S., Alrumman, S. A., Alamri, S. A., Otaif, K. A., Mostafa, M. S., Alfaify, A. M. (2020). Bioplastic (poly-3-hydroxybutyrate) production by the marine bacterium *Pseudodonghicola xiamenensis* through date syrup valorization and structural assessment of the biopolymer. *Scientific Reports*, 10(1). doi:10.1038/s41598-020-65858-5
- Nath, A., Dixit, M., Bandiya, A., Chavda, S., Desai, A. J. (2008). Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. *Bioresource Technology*, 99(13), 5749–5755. doi:10.1016/j.biortech.2007.10.017
- Nishioka, M., Nakai, K., Miyake, M., Asada, Y., Taya, M. (2001). Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19, under phosphate-limited conditions. *Biotechnology Letters*, 23(14), 1095–1099. doi:10.1023/A:1010551614648
- Obruca, S., Sedlacek, P., Koller, M., Kucera, D., Pernicova, I. (2018). Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances*, 36(3), 856–870. doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2017.12.006
- Ortega Lama, (2021). Caracterización molecular y crecimiento fotomixotrófico de una cianobacteria del género *Synechocystis* productora del biopolímero poli- $\beta$ -hidroxibutirato. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C.,
- Ostle, A. G., Holt, J. G. (1982). Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(1), 238–241. doi:10.1128/AEM.44.1.238-241.1982
- Panda, B., Mallick, N. (2007). Enhanced poly- $\beta$ -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
- Papendorf, O., König, G. M., Wright, A. D. (1998). Hierridin B and 2,4-dimethoxy-6-heptadecyl-phenol, secondary metabolites from the cyanobacterium *Phormidium ectocarpus* with antiplasmodial activity. *Phytochemistry*, 49(8), 2383–2386. doi:10.1016/S0031-9422(98)00440-3
- Papke, U., Gross, E. M., Francke, W. (1997). Isolation, identification and determination of the absolute configuration of fischerella B. A new algicide from the freshwater cyanobacterium *Fischerella muscicola* (Thuret). *Tetrahedron Letters*, 38(3), 379–382. doi:10.1016/S0040-4039(96)02284-8
- Patterson, G. M. L., Larsen, L. K., Moore, R. E. (1994). Bioactive natural products from blue-green algae. *Journal of Applied Phycology*, 6(2), 151–157. doi:10.1007/BF02186069
- Reddy, C. S. K., Ghai, R., Rashmi, Kalia, V. C. (2003), April 1. Polyhydroxyalkanoates: An overview. *Bioresource Technology*, Vol. 87. doi:10.1016/S0960-8524(02)00212-2
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 111(1), 1–61. doi:10.1099/00221287-111-1-1/CITE/REFWORKS
- Sánchez Villasclaras, S., Martínez Sancho, M. E., Espejo Caballero, M. T., Delgado Pérez, A. (1996). Production of Microalgae from Olive Mill Wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 38(3–4), 245–247. doi:10.1016/s0964-8305(96)00057-1
- Sayed, R. Z., Shaikh, S. S., Wani, S. J., Rehman, T., Al Ajmi, M. F., Haque, S., El Enshasy, H. A., Bikiaris, D.

- (2021). molecules Production of Biodegradable Polymer from Agro-Wastes in *Alcaligenes* sp. and *Pseudomonas* sp. Academic Editors: Agnieszka Saeid. doi:10.3390/molecules26092443
- Schuermans, 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. *Photosynthesis Research*, 132(1), 69–82. doi:10.1007/S11120-016-0329-8/FIGURES/7
- Shen, L., Haufe, J., Patel, M. K. (2009). Product overview and market projection of emerging bio-based plastics PRO-BIP 2009 Utrecht The Netherlands. Consultado el día 22 octubre 2022 , de [https://plasticker.de/docs/news/PROBIP2009\\_Final\\_June\\_2009.pdf](https://plasticker.de/docs/news/PROBIP2009_Final_June_2009.pdf)
- Singhon, P., Phoraksa, O., Incharoensakdi, A., Monshupanee, T. (2021). Increased bioproduction of glycogen, lipids, and poly(3-hydroxybutyrate) under partial supply of nitrogen and phosphorus by photoautotrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Applied Phycology*. 33(1), 2833–2843. doi:10.1007/S10811-021-02494-0
- Stal, L. J. (1992). Poly(hydroxyalkanoate) in cyanobacteria: an overview. *FEMS Microbiology Letters*, 103(2–4), 169–180. doi:10.1016/0378-1097(92)90307-A
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, 35(2), 171–205. doi:10.1128/membr.35.2.171-205.1971
- Stanier, R. Y., Siström, W. R., Hansen, T. A., Whitton, B. A., Castenholz, R. W., Pfennig, N., Gorlenko, V. N., Kondratieva, E. N., Eimhjellen, K. E., Whittenbury, R., Gherna, R. L., Trüper, 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 and Evolutionary Microbiology*, 28(2), 335–336. doi:10.1099/00207713-28-2-335
- Stettner, A. I., Segrè, D. (2013), June 11. The cost of efficiency in energy metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 110. doi:10.1073/pnas.1307485110
- Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 25(10), 1503–1555. doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6
- Taroncher-Oldenburg, G., Nishina, K., Stephanopoulos, G. (2000). Identification and analysis of the polyhydroxyalkanoate-specific  $\beta$ -ketothiolase and acetoacetyl coenzyme a reductase genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4440–4448. doi:10.1128/AEM.66.10.4440-4448.2000
- Taton, A., Erikson, C., Yang, Y., Rubin, B. E., Rifkin, S. A., Golden, J. W., Golden, S. S. (2020). The circadian clock and darkness control natural competence in cyanobacteria. *Nature Communications*, 11(1), 1–11. doi:10.1038/s41467-020-15384-9
- Touloupakis, E., Cicchi, B., Benavides, A. M. S., Torzillo, G. (2016). Effect of high pH on growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultures and their contamination by golden algae (*Poteroiochromonas* sp.). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1333–1341. doi:10.1007/S00253-015-7024-0
- Trotsenko, Y. A., Belova, L. L. (2000). Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and its regulation in bacteria. *Microbiology*, 69(6), 635–645.

doi:10.1023/A:1026641821583

- Tsang, T. K., Roberson, R. W., Vermaas, W. F. J. (2013). Polyhydroxybutyrate particles in *Synechocystis* sp. PCC 6803: facts and fiction. *Photosynthesis Research*, 118(1–2), 37–49. doi:10.1007/S11120-013-9923-1
- Utharn, S., Yodsang, P., Incharoensakdi, A., Jantaro, S. (2021). Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 lacking *adc1* gene produces higher polyhydroxybutyrate accumulation under modified nutrients of acetate supplementation and nitrogen-phosphorus starvation. *Biotechnology Reports*, 31, e00661. doi:10.1016/J.BTRE.2021.E00661
- Vega Arredondo, B. O., Cordero Esquivel, B., Voltolina, D. (2017). Determinación de carbohidratos totales por métodos espectrofotométricos. *Métodos y Herramientas Analíticas En La Evaluación de La Biomasa Microalgal*, 2ed., 150.
- Volova, T., Sapozhnikova, K., Zhila, N. (2020). *Cupriavidus necator* B-10646 growth and polyhydroxyalkanoates production on different plant oils. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 121–130. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2020.07.095
- Wu, G. F., Shen, Z. Y., Wu, Q. Y. (2002). Modification of carbon partitioning to enhance PHB production in *Synechocystis* sp. PCC6803. En *Enzyme and Microbial Technology*, May 27, 2002, Elsevier, 30(6), pp. 710–715. doi:10.1016/S0141-0229(02)00044-3
- Yousuf, R. G., Winterburn, J. B. (2017). Waste date seed oil extract as an alternative feedstock for Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis. *Biochemical Engineering Journal*, 127, 68–76. doi:10.1016/j.bej.2017.08.007
- Yu, Y., You, L., Liu, D., Hollinshead, W., Tang, Y. J., Zhang, F. (2013), August 13. Development of *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a phototrophic cell factory. *Marine Drugs*, Vol. 11. doi:10.3390/md11082894
- Zain, N. A. A., Ng, L. M., Foong, C. P., Tai, Y. T., Nanthini, J., Sudesh, K. (2020). Complete Genome Sequence of a Novel Polyhydroxyalkanoate (PHA) Producer, *Jeongeupia* sp. USM3 (JCM 19920) and Characterization of Its PHA Synthases. *Current Microbiology*, 77(3), 500–508. doi:10.1007/s00284-019-01852-z
- 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. doi:10.1016/J.TPLANTS.2018.09.008
- Zhou, J., Zhang, H., Meng, H., Zhang, Y., Li, Y. (2014). Production of optically pure d-lactate from CO<sub>2</sub> by blocking the PHB and acetate pathways and expressing d-lactate dehydrogenase in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Process Biochemistry*, 49(12), 2071–2077. doi:10.1016/j.procbio.2014.09.007

## Anexos

## Preparación de medio BG11

**Tabla 1.a:** Elaboración del medio BG-11.

#	Reactivo	Cantidad (g/L)
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5
2	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.04
3	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.075
4	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.036
5	Ácido cítrico· 2H <sub>2</sub> O	0.006
6	Citrato de Amonio Férrico	0.006
7	Na <sub>2</sub> EDTA· H <sub>2</sub> O	0.001
8	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.02
9	Minerales Traza	1.0
10	Agua desionizada	1000 ml

Para la elaboración del punto 9 Minerales traza, se elaboraron a partir de las siguientes indicaciones:

**Tabla 2.a:** Elaboración de stock minerales traza

Reactivo	g/L	Sol
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86	A
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1.81	A
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.222	A
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.39	B
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.079	C
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.0494	B
Agua desionizada	1000 ml	

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

A continuación, se muestra el análisis del alpechín realizado por un laboratorio industrial.



## REPORTE DE LABORATORIO

**NUMERO DE REPORTE** 022030-G    **FECHA DE ELABORACION DE REPORTE** 2022 FEBRERO 03  
**PROCEDENCIA** CICESE (CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y DE EDUCACION SUPERIOR DE ENSENADA)  
 CARRETERA ENSENADA-TIJUANA 3918 COL. ZONA PLAYITAS  
 ENSENADA B.C. C.P. 22860  
**DESCRIPCION DE LA MUESTRA** 01 MUESTRA DE AGUA DE ALPECHIN  
**FECHA / HORA RECEPCION** 2022 ENERO 31 13:50 HORAS  
**MUESTRA ENVIADA POR** SRTA.CAROLINA SERRANO TORRES  
**RESPONSABLE DEL MUESTREO (NMX-AA-003-1980)**  EL CLIENTE  PERSONAL DEL LABORATORIO  
**ANALISTA(S)** PIB. SILVIA QUIJANO

ANALISIS	RESULTADO	METODOLOGIA
GRASA	0.05 %	NOM-086-SSA1-1994
HUMEDAD	99.45 %	GRAVIMETRICA
CENIZAS	0.11 %	GRAVIMETRICA
PROTEINA	0%	KJELDAHL
CARBOHIDRATOS	0.39 %	CALCULO
FENOLES	4.41 mg/L	ESPECTROFOTOMETRIA UV

*Este reporte no podrá ser alterado, ni reproducido parcialmente sin la previa autorización del laboratorio. El resultado de las pruebas se refiere únicamente a las muestras analizadas.*

*SILVIA QUIJANO*

SALIP, LABORATORIO INDUSTRIAL Y DE CONTROL,  
 S. DE R. L. DE C. V.  
 QFB LAURA BACKHOFF BSCUDERO  
 GERENTE GENERAL  
 RFC: BAEL 431013 MN2  
 CEDULA PROFESIONAL: 147905

Página 1 de 1

Carretera Ensenada-Tecate, Km 103, CP 22760 El Sauzal de Rodríguez,  
 Ensenada, B. C. / +52 646 174 6035 / +52 646 174 6763

 [admon@salip.mx](mailto:admon@salip.mx)  
[www.salip.mx](http://www.salip.mx)