



POLITÉCNICA



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE
MADRID ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE
INGENIERÍA AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y
DE BIOSISTEMAS**

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA-BIOLOGÍA VEGETAL

**Diseño de co-cultivo de *Synechococcus elongatus*
con *Azohydromonas lata* para la producción de
bioplásticos**

TRABAJO FIN DE GRADO

Autora: Belén Fernández de Caleyá Ramiro

**Tutor/a: José Luis García López
Marta Albareda Contreras**

Julio de 2021



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

Escuela Técnica Superior

De Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas

GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

**DISEÑO DE CO-CULTIVO DE *SYNECHOCOCCUS ELONGATUS* CON
AZOHYDROMONAS LATA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOPLÁSTICOS**

TRABAJO FIN DE GRADO

Belén Fernández de Caleyra Ramiro

MADRID, 2021

Tutora: Marta Albareda Contreras (Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal).

Cotutor: José Luis García López (Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas–CIB/CSIC).



TITULO DEL TFG:
DISEÑO DE CO-CULTIVO DE *SYNECHOCOCCUS ELONGATUS* CON
AZOHYDROMONAS LATA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOPLÁSTICOS

Memoria presentada por **Belén Fernández de Caleyá Ramiro** para la obtención del título de Graduado en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Madrid

Fdo: Belén Fernández de Caleyá Ramiro

VºBº Tutor y Director del TFG

D. José Luis García López
Profesor de Investigación CSIC
Dpto de Microbiología Medioambiental
Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CIB)
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

VºBº Tutora

Dña. Marta Albareda Contreras
Dpto de Biotecnología-Biología Vegetal
ETSIAAB-Universidad Politécnica de Madrid

Madrid, 24 junio, 2021

AGRADECIMIENTOS

En este apartado quiero agradecer a todas las personas que me han acompañado durante mi camino de inmersión a la Ciencia. Gracias por su apoyo incondicional.

Gracias a todas las personas del laboratorio 344 del Centro de Investigaciones Biológicas. A su jefe de laboratorio José Luis García, por enseñarme a cuestionar todo lo que nos rodea. A Loreine, María y Gabriel por su ayuda y hacer amenas las tardes de trabajo duro e intenso. Gracias también a Sara Baldanta por su enorme paciencia para responder a todas mis dudas y sus buenos consejos. Y gracias especialmente a Beatriz Galán por sus horas de dedicación a mi trabajo a pesar de tener mil cosas más que atender. Gracias por su esfuerzo y trabajo para ayudarme a aprender y entender la Ciencia.

También quisiera dar las gracias a Marta Albareda, mi tutora académica, por sus buenos consejos y aportaciones para dar continuidad a mi trabajo.

Gracias al Consejo Superior de Investigaciones Científicas y a la Universidad Politécnica de Madrid que han permitido que pudiera realizar mi Trabajo Final de Grado este año. Por darme la oportunidad de poner en práctica todo el conocimiento adquirido durante mi carrera.

Gracias a mi familia por haberme animado y escuchado siempre que lo he necesitado. Especial mención a mis amigos de toda la vida y a mis biotecnólogos favoritos, por haber sabido cómo ayudarme y acompañarme durante este tiempo. A Paloma, por sus tardes conmigo en la biblioteca virtual y a Gon por su infinita paciencia y su don para darme ánimos.

Finalmente, quiero dar las gracias a mis padres por haberme enseñado a no rendirme nunca y siempre mirar hacia delante y porque este también es vuestro trabajo.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.1.1. Consorcios sintéticos.....	1
1.1.2. Los plásticos y el medioambiente	1
1.1.3. Propiedades y estructura de los polihidroxicanoatos.....	2
1.1.4 Rutas metabólicas implicadas en la síntesis de PHAs.....	4
1.1.6 Módulo de alimentación.....	6
1.1.7 Módulo de producción	8
1.2 OBJETIVOS	11
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	12
2.1 Cepas bacterianas	12
2.2 Medios y condiciones de cultivo	12
2.2.1 Medio y condiciones de cultivo empleados para <i>S. elongatus</i>	12
2.2.2 Medio y condiciones de cultivo empleados para <i>A. lata</i> DSM1123 y <i>P. putida</i> KT2440 (pSEVA234cscAB).....	13
2.3 Cuantificación de sacarosa	13
2.4 Cuantificación de clorofila y carotenoides	14
2.5 Cuantificación y caracterización de PHAs	14
2.6 Establecimiento del consorcio <i>S. elongatus</i> - <i>A. lata</i>	15
CAPÍTULO 3. RESULTADOS	16
3.1 Producción de sacarosa de <i>S. elongatus</i> en medio BG11-HP	16
3.2 Crecimiento de <i>P. putida</i> (pSEVA234cscAB) y <i>A. lata</i> en BG11-HP a distintas concentraciones de sacarosa.....	16
3.3 Establecimiento del consorcio sintético <i>S. elongatus</i> SBG363 y <i>A. lata</i> DSM 1123.....	19
3.4 Cuantificación de polihidroxicanoatos	20
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN	22
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	24
CAPÍTULO 6. REFERENCIAS	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas y su respectivo genotipo/fenotipo empleadas en el experimento.

Tabla 2. Componentes del medio BG11-HP.

Tabla 3. Cantidad de PHA contenido en el medio.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructura de la molécula polihidroxialcanoato (**pg.1**).
- Figura 2.** Rutas metabólicas implicadas en la síntesis de scl-PHAs y mcl-PHAs a partir de distintos precursores (**pg.5**).
- Figura 3.** Esquema del consorcio sintético de *S. elongatus*- *P. putida*/ *A. lata* para la producción de PHAs (**pg.6**).
- Figura 4.** Esquema de la construcción de los genes integrados en la cepa *S. elongatus* SBG363 (**pg.7**).
- Figura 5.** Síntesis de sacarosa en *S. elongatus* SBG 363 y enzimas implicadas (**pg.8**).
- Figura 6.** Esquema del plásmido pSEVA234cscAB de la cepa empleada en el ensayo (**pg.9**).
- Figura 7.** A) Células de *P. putida* KT2440 observadas al microscopio electrónico (TEM). B) Esquema del gránulo de PHA en *P. putida*. C) células de *P. putida* KT2440 observadas al microscopio óptico de contraste de fases (**pg.10**).
- Figura 8.** Células de *A. lata* produciendo gránulos intracelulares de PHB al microscopio óptico (**pg.11**).
- Figura 9.** Reacciones enzimáticas que tienen lugar en el kit comercial a partir de la sacarosa del medio (**pg.14**).
- Figura 10.** Crecimiento y producción de sacarosa de *S. elongatus* (aislado C8) (**pg.16**).
- Figura 11.** Crecimiento de *P. putida* a distintas concentraciones de sacarosa (**pg.17**).
- Figura 12.** Crecimiento de *A. lata* a distintas concentraciones de sacarosa (**pg.17**).
- Figura 13.** (A) Células de *P. putida* en medio BG11-HP con $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sacarosa a las 50 horas. (B) Células de *A. lata* en medio BG11-HP con $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sacarosa a las 50 horas (**pg.18**).
- Figura 14.** (A) crecimiento de *A. lata* en medio BG11-HP con $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sacarosa. (B) Imagen al microscopio óptico de células de *A. lata* cultivadas en medio BG11-HP con $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sacarosa a las 25h (**pg.18**).
- Figura 15.** Imágenes al microscopio electrónico (aumento 100X) del consorcio y el control finales (**pg.19**).
- Figura 16.** Crecimiento y consumo de sacarosa de *A. lata* en mono-cultivo (control) y co-cultivo con *S. elongatus* (consorcio). (**pg.20**).
- Figura 17.** PHA (g/L) obtenidos por GC-MS y peso seco del consorcio y el control final (**pg.21**).

LISTA DE ABREVIATURAS

- Polihidroxicanoatos (**PHAs**)
- European Association of Plastics Recycling and Recovery Organisations (**EPRO**)
- Coronavirus-2019 (**COVID-19**)
- 3-hidroxicanoato ((**R**)-**3HA**)
- Polihidroxiacetato (**P(3HB)**)
- 3-hidroxiacetato ((**R**)-**3HB**)
- PHA de cadena corta (**scl-PHAs**)
- PHA de cadena media (**mcl-PHAs**)
- PHA de cadena larga (**lcl-PHAs**)
- Proteína asociada a gránulo (**GAP**)
- Polimerasa C1 (**PhaC1**)
- Polimerasa C2 (**PhaC2**)
- Despolimerasa Z (**PhaZ**)
- Fasina I (**PhaI**)
- Fasina F (**PhaF**)
- Acil-CoA sintetasa 1 (**ACS1**)
- Proteína reguladora A (**PhaA**)
- Proteína reguladora G (**PhaG**)
- Hidroxiacetil-Hidroxiacetil (**HB-HV**)
- Polihidroxiacetato (**PHB**)
- Acetil-coenzima A (**Acetil-CoA**)
- (**R**)-3-hidroxiacetil-Coenzima A ((**R**)-**HA-CoA**)
- β -cetotiolasa (**PhaA**)
- Acetoacetil-Coenzima A reductasa (**PhaB**)
- Poli(3-hidroxiacetato) sintetasa (**PhaC**)
- Acetoacetil-Coenzima A (**Acetoacetil-CoA**)
- (**R**)-3-hidroxiacetil-Coenzima A ((**R**)-**3-hidroxiacetil-CoA**)
- Polimerasa Zkt (**PhaZkt**)
- 6-fosfo-gluconato (**6PG**)
- Glucosa 6 fosfato isomerasa de *E. coli* (**Pgi**)
- Fosfoglucomutasa de *E. coli* (**PgmT**)
- UTP glucosa 1 fosfato uridiltransferasa de *E. coli* (**GalU**)
- Permeasa de sacarosa de *E. coli* (**CscB**)
- Proteína represora del operon lac de *E. coli*. (**LacI**)
- Uridina difosfato (**UTP**)
- Fructosa 1,6-bisfosfatasa (**FBP**)
- Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa (**G6PDH2r**)
- Fosfoglucomutasa (**PGMT**)
- Sacarosa 6-fosfato sintasa (**Sps**)
- Genetically Recognized As Safe (**GRAS**)
- Invertasa (**CscA**)
- Transportador de sacarosa (**CscB**)
- Microscopio electrónico (**TEM**)
- Glucosa oxidasa y peroxidasa (**GODPOD**)
- Columna capilar XXX (**DB-5HT**)
- Figura (**Fig.**)
- Sistema regulatorio “nitrogen-blind” (**NasS/NasT**)

LISTA DE SÍMBOLOS

- **HCl** – Ácido clorhídrico
- **CO₂** – Dióxido de carbono
- **N** – Nitrógeno
- **P** – Fósforo
- **C** - Carbono
- **G** – Gramo
- **L** – Litro
- **Mb** – Megapares de bases
- **D.O** – Densidad óptica
- **Nm** – Nanómetro
- **KHCO₃** – Bicarbonato de potasio
- **K₂CO₃** - Carbonato de potasio
- **NaNO₃** – Nitrato de sodio
- **M**- Molar
- **K₂HPO₄** – Fosfato dipotásico
- **ml** – Mililitro
- **µm** – Micrómetro
- **LB** – Medio *Luria-Bertani*
- **NaCl** – Cloruro sódico
- **°C** – Centígrados
- **NB** – Medio Nutrient Broth
- **λ** – Longitud de onda
- **min** – Minutos
- **h** – Horas
- **µl** – Microlitro
- **Rpm** – Revoluciones por minuto
- **GC-MS** – Cromatografía de gases -
espectrómetro de masas
- **v/v** – Porcentaje volumen/volumen
- **mg** – Miligramo
- **H₂SO₄** – Ácido sulfúrico
- **Na₂SO₄** – Sulfato de sodio
- **Ev** – Electronvoltio
- **mM** – Milimolar
- **IPTG** – Isopropil-β-D-1-
tiogalactopiranosido

RESUMEN

El objetivo de este trabajo ha sido establecer un co-cultivo sintético microbiano entre *Synechococcus elongatus* y *Azohydromonas lata* para la obtención de polihidroxicanoatos (PHAs) a partir de CO₂ y luz. Los PHAs son polímeros biodegradables, también conocidos como bioplásticos, se han planteado como alternativa a los plásticos actuales derivados del petróleo. Su interés radica en el reducido impacto que genera su producción y degradación por microorganismos como *A. lata* y *Pseudomonas putida* en ciertas condiciones de cultivo.

Para formar el consorcio se utilizó una cianobacteria recombinante productora de sacarosa, denominada *S. elongatus* SBG363. Esta cianobacteria sobreexpresa algunos genes implicados en la síntesis y secreción de sacarosa que será secretada para servir como fuente carbono a la bacteria productora de PHAs.

Inicialmente se plantearon dos cepas bacterianas candidatas para la producción de PHAs en el consorcio: *A. lata* DSM1123 y *P. putida* KT2240. Tras analizar su velocidad de crecimiento y la producción de PHAs a partir de sacarosa, se seleccionó *A. lata*, ya que fue capaz de crecer más rápido y presentó una mayor producción de PHA en las condiciones ensayadas.

Ambas cepas, *S. elongatus* SBG363 y *A. lata* se cultivaron en consorcio comprobándose la secreción de sacarosa por parte de la cianobacteria, el crecimiento de *A. lata* a partir de la sacarosa secretada, el consumo de sacarosa y la producción de PHAs a tiempo final de cultivo que fue de 12,2 g/L.

ABSTRACT

The aim of this work has been to establish a synthetic microbial co-culture between *Synechococcus elongatus* and *Azohydromonas lata* to obtain polyhydroxyalkanoates (PHAs) from CO₂ and light. PHAs are biodegradable polymers, also known as bioplastics, and have been proposed as an alternative to current petroleum-based plastics. Their interest lies in the reduced impact of their production and degradation by microorganisms such as *A. lata* and *Pseudomonas putida* under certain culture conditions.

A recombinant sucrose-producing cyanobacterium, *S. elongatus* SBG363, was used to form the consortium. This cyanobacterium overexpresses some genes involved in the synthesis and secretion of sucrose that will be secreted to serve as a carbon source for the PHAs-producing bacteria.

Initially, two candidate bacterial strains for PHAs production in the consortium were considered: *A. lata* DSM1123 and *P. putida* KT2240. After analyzing their growth rate and PHA production from sucrose, *A. lata* was selected as it was able to grow faster and showed a higher PHA production under the tested conditions.

Both strains, *S. elongatus* SBG363 and *A. lata* were grown in a consortium and tested for sucrose secretion by the cyanobacteria, growth of *A. lata* from the secreted sucrose, sucrose consumption and PHA production at the final time of fermentation which was 12,2 g*L⁻¹.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 INTRODUCCIÓN

1.1.1. Consorcios sintéticos

Convencionalmente, la bioproducción de compuestos de interés se ha realizado a través del contexto de una única cepa microbiana, gracias al desarrollo de la ingeniería metabólica. Sin embargo, a pesar de su éxito documentado en el pasado, esta metodología empieza a competir con el diseño de co-cultivos que permiten mejorar la producción y desempeñar mayor número de tareas biosintéticas a la vez (Zhang & Wang, 2016).

Estos co-cultivos o consorcios microbianos son el resultado de asociaciones que se producen de forma natural entre dos o más especies de microorganismos. Como resultado de esta coexistencia espacial y temporal, se crea una comunidad a partir de la cual cada organismo se beneficia de la actividad de los demás (Smith *et al.*, 2013). Frente a los monocultivos, estos consorcios proporcionan grandes ventajas como: (a) la capacidad para desempeñar funciones complicadas que poblaciones individuales no podrían; (b) una mayor resistencia a los factores ambientales y limitación de nutrientes; (c) organización espacio-temporal de las tareas, (d) un aumento de la productividad y (e) síntesis de productos de interés (Ochoa Carreño & Montoya Restrepo, 2010). Estos consorcios se dividen en módulos para el reparto de tareas y carga metabólica. Generalmente se dividen en: el módulo de alimentación, compuesto por una cepa encargada de suministrar el alimento, y el módulo de producción, formado por la cepa que sintetiza el producto de interés.

1.1.2. Los plásticos y el medioambiente

El creciente consumo de plásticos sintéticos convencionales, obtenidos a partir de derivados químicos del petróleo, es uno de los problemas ambientales más serios a los que debemos poner solución. Entre 1950 y 2015 se generaron un total de 6.300 millones de toneladas de plástico, de los cuales solo un 9% se reciclaron, 12% se incineraron y el 79% terminó en vertederos o liberados al medio (Geyer *et al.*, 2017). De acuerdo con el último artículo de PlasticsEurope (Association of Plastics Manufacturers in Europe) y EPRO (European Association of Plastics Recycling and Recovery Organisations) en el año 2018 la producción de plásticos en Europa alcanzó los 61,8 millones de toneladas y los 359 millones de toneladas en el mundo, siendo España el cuarto país europeo con mayor demanda, con un 7,6 % en 2019 (*Publicaciones: PlasticsEurope*, s.f.).

La producción de plásticos convencionales conlleva el uso de fuentes de energía no renovables.

Alrededor del 6% de la producción mundial de petróleo se utiliza para la fabricación de plásticos (Rhodes, 2018), empleándose 150 millones de toneladas de combustibles fósiles para la generación de 140 millones de toneladas de plástico usadas al año (Costa *et al.*, 2019). Para el año 2100 se estima que la demanda de fabricación de plásticos será de 2000 millones de toneladas anuales, para lo cual se requerirá utilizar el 50% del petróleo disponible en ese momento (González García *et-al.*, 2013).

La actual situación de pandemia debido a la COVID-19 es un gran ejemplo que ilustra el impacto de la utilización de los plásticos a nivel mundial. El uso estimado mundial de 129.000 millones de mascarillas y 65.000 millones de guantes está provocando una gran contaminación ambiental cuyo impacto en un futuro a largo plazo se desconoce. Por este motivo es imperativo conseguir progresos en el uso sostenible de los plásticos y tenerlos en cuenta para futuras situaciones en las que se dispare la utilización de estos materiales (Prata *et-al.*, 2020).

Como resultado del impacto negativo por la producción y consumo de plásticos convencionales se están impulsando estrategias para la síntesis de nuevos biopolímeros, como los polihidroxialcanoatos (PHAs), que sirvan de alternativa a los plásticos convencionales (Thorat Gadgil *et al.*, 2017). Sin embargo, los sustratos de carbono precursores de su síntesis son comparativamente más caros que invertir en polímeros derivados del petróleo. Por ello se están diseñando consorcios sintéticos que proporcionen fuentes de carbono baratas para la síntesis de estos biopolímeros (Ashby *et al.*, 2019).

1.1.3. Propiedades y estructura de los polihidroxialcanoatos

Los PHAs son biopolímeros sintetizados y acumulados en forma de gránulos intracelulares por numerosos microorganismos. Han adquirido un gran interés debido a que se obtienen de fuentes renovables, son biodegradables, biocompatibles, y además, presentan características similares a los plásticos derivados del petróleo (Madison & Huisman, 1999). Se sintetizan en condiciones de desequilibrio nutricional debido a una deficiencia de N y P en el medio y un exceso de C. Cuando las condiciones nutricionales cambian los PHAs se despolimerizan y son utilizados como fuente de carbono y energía (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016). Es por ello que se les ha adjudicado un papel vital en la eficacia biológica de los microorganismos ya que están implicados en la adaptación y supervivencia de los mismos (Fernández-Escapa, 2012).

En cuanto a su estructura química los PHAs son poliésteres lineales formados por unidades del monómero 3-hidroxialcanoato ((R)-3HA) unidos mediante un enlace de tipo éster (**fig. 1**) a más

de 150 monómeros diferentes que se pueden combinar para crear materiales con propiedades muy diferentes. El PHA más estudiado es el polihidroxibutirato o P(3HB), que contiene unidades repetidas del monómero 3-hidroxibutirato ((R)-3HB). Pueden estar formados por monómeros de la misma naturaleza (homopolímeros) o distinta naturaleza (heteropolímeros). Dependiendo del número de átomos de carbono en los monómeros, los PHAs se clasifican en tres grupos: scl-PHAs (del inglés *short chain length PHAs*, PHA de cadena corta) de 3 a 5 átomos de carbono, mcl-PHAs (*medium chain length-PHA*, cadena media) de 6 a 14 átomos de carbono y lcl-PHAs (*long chain length-PHA*, cadena larga) de más de 14 átomos.

La concentración de PHA depende del organismo, sin embargo, pueden alcanzar niveles de hasta el 90% del peso seco de la célula. Estos bioplásticos se almacenan en el interior de gránulos intracelulares de naturaleza hidrofóbica. Ancladas a la superficie se encuentran las proteínas asociadas a gránulos (GAP, del inglés *granule associated protein*) (Fernández-Escapa, 2012). Estas son principalmente polimerasas (PhaC1 y PhaC2) y despolimerasas (PhaZ); fasinas (PhaI y PhaF), la acil-CoA sintetasa 1 (ACS1) para la activación de productos de despolimerización y dos proteínas reguladoras (PhaA y PhaG) (Możejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016).

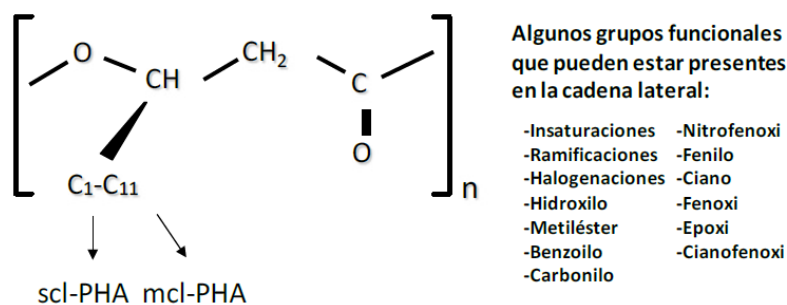


Figura 1. Estructura de la molécula polihidroxialcanoato. Imagen tomada del trabajo de Fernández-Escapa, 2012.

Estos bioplásticos tienen propiedades mecánicas similares a los plásticos convencionales, como el polipropileno y el poliestireno. Son considerados como biomateriales potenciales para futuras aplicaciones dada su biocompatibilidad y biodegradabilidad (Khanna & Srivastava, 2005).

Los scl-PHAs son altamente cristalinos, lo cual los hace relativamente rígidos y quebradizos, con altas temperaturas de fusión (173-180 °C) y bajas temperaturas de transición vítrea (5-9 °C). *A. lata* produce de manera natural este tipo de PHA, más concretamente P(3HB), un poliéster que tiene las propiedades físicas del plástico quebradizo. Se está dedicando mucho esfuerzo a la biosíntesis de polímeros con distintas propiedades físicas y mecánicas, mediante la incorporación de unidades monoméricas distintas del hidroxibutirato. El copolímero HB-HV (hidroxibutiril-

hidroxivaleril) es menos frágil que el P(3HB) y, por tanto, tiene una aplicabilidad más amplia. En concreto, *A. lata* también se explota para producción de HB-HV, ya que el rendimiento de polímero por celda es mayor que con *R. eutrophus* (Batt, 2014).

Por otro lado, los mcl-PHAs actúan como elastómeros dentro de un rango de temperatura muy estrecho debido a su baja temperatura de fusión (39-61 °C) y temperatura de transición vítrea (-43 y -25 °C). Estas características hacen que los mcl-PHA sean materiales más flexibles y elásticos que los scl-PHA (Ciesielski *et al.*, 2015). Destaca *P. putida* como cepa productora de este tipo de bioplásticos en condiciones de estrés nutricional. Gracias a sus propiedades ha mostrado un potencial considerable para diversas aplicaciones en los campos de productos farmacéuticos, agricultura, biocombustibles, medicina, desechables y cromatografía (Costa *et al.*, 2019).

1.1.4 Rutas metabólicas implicadas en la síntesis de PHAs

El metabolismo de los PHA depende del microorganismo y el tipo de PHA sintetizado. De modo general, el acetil-CoA es la molécula intermediaria necesaria para la síntesis de los PHA y se obtiene a partir de la β -oxidación y la síntesis de *novo* de ácidos grasos. La síntesis (PhaC1) y degradación (PhaZ) del polímero se da de manera continua, creando un ciclo dinámico (**fig. 2**). Por otro lado, la acil-CoA sintetasa (ACS1) se encarga de transformar los productos de la despolimerización en (R)-3-hidroxiacil-CoA ((R)-HA-CoA). Estas moléculas intermediarias son sustratos para la propia polimerasa o para las enzimas del metabolismo de ácidos grasos (β -oxidación y síntesis de *novo*).

Para la síntesis de scl-PHAs (**fig. 2**), la molécula precursora de acetil-CoA pasa por una secuencia de tres reacciones catalizadas por la β -cetotiolasa (PhaA), acetoacetil-CoA reductasa (PhaB) y finalmente la poli(3-hidroxi butirato) sintetasa (PhaC). La enzima codificada por el gen *phaA* condensa dos moléculas de acetil-CoA en acetoacetil-CoA. Posteriormente, el enzima PhaB reduce este producto en (R)-3-hidroxi butiril-CoA. Finalmente, el enzima PhaC cataliza la polimerización de esta última molécula en la cadena de PHA (Mato Aguirre & Mato Aguirre, 2019).

A. lata es capaz de acumular hasta un scl-PHAs 50-60% de la masa seca celular, resultando en un tiempo de fermentación relativamente corto (Li *et al.*, 2011).

Para la síntesis de mcl-PHAs es fundamental la participación de las dos polimerasas PhaC1 y PhaC2. El acetil-CoA derivado de la β -oxidación y la síntesis de *novo* de los ácidos grasos será transformado en moléculas de tipo (R)-HA-CoA las cuales son condensadas por estas polimerasas

en cadenas de entre 6 y 14 carbonos (Fernández-Escapa, 2012).

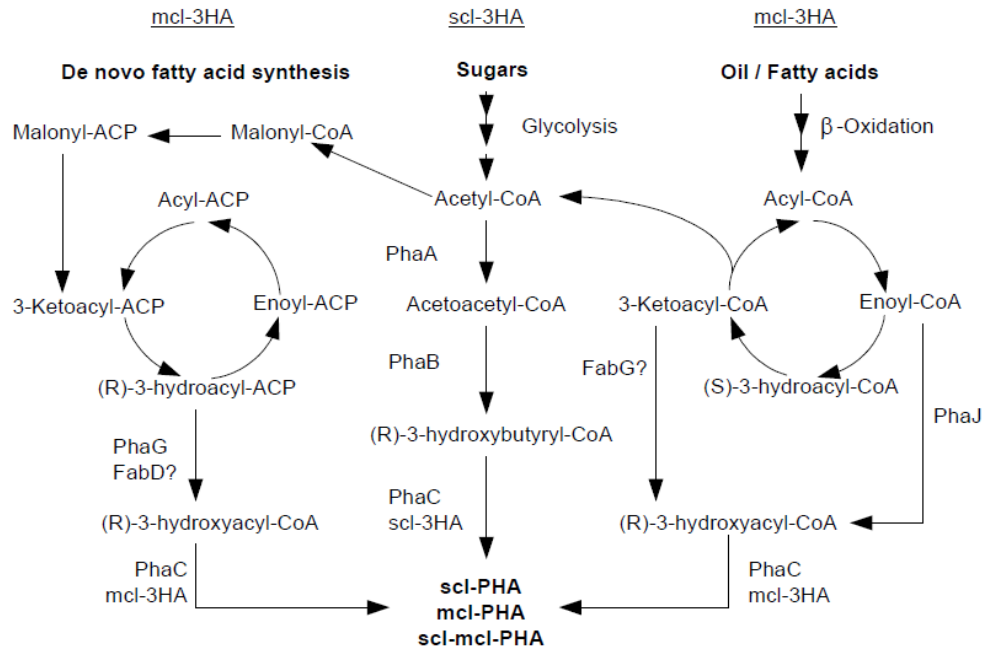


Figura 2. Rutas metabólicas implicadas en la síntesis de scl-PHAs y mcl-PHAs a partir de distintos precursores. Se describen a continuación las rutas derivadas de azúcares (síntesis de scl-PHAs), β-oxidación de ácidos grasos (síntesis de mcl-PHAs) y síntesis de novo de ácidos grasos (síntesis mcl-PHA). Se muestran los genes y las moléculas implicadas en cada ruta. Imagen tomada de Yu, 2007.

La producción de mcl-PHAs en *P. putida* puede ser llevada a cabo a partir de diferentes fuentes de carbono (**fig.2**) (Nogales *et al.*, 2008). Con respecto a su catabolismo, la degradación del PHA depende de despolimerasas que pueden ser extracelulares o intracelulares, dentro de las cuales destaca PhaZkt que actúa intracelularmente en condiciones de estrés nutricional (Prieto *et al.*, 2016). Con respecto a su síntesis, existen cuatro clases de polimerasas (I, II, III, IV) clasificadas en función de su estructura primaria, especificidad de sustrato *in vivo* y los tipos de subunidades. Las polimerasas pertenecientes a la clase II (PhaC1 y PhaC2) se encuentran en *P. putida* y usan preferentemente sustratos de 6 a 14 carbonos (Rehm, 2003). La síntesis de PHA puede comenzar a partir de: sustratos estructuralmente relacionados con los PHAs (ácidos grasos) y sustratos estructuralmente no relacionados (etanol, azúcares, moléculas aromáticas y glicerol). En el caso de partir de sacarosa como sustrato inicial existen tres vías periféricas convergentes capaces de transformar la glucosa en 6-fosfo-gluconato (6PG). Puede ser: (a) fosforilada por la glucosa-6-fosfato, (b) transformada en gluconato y luego fosforilado o (c) continuar el proceso de oxidación hasta 2-cetogluconato, ser fosforilado y reducido intracelularmente. Una vez formada la molécula de 6PG, esta ingresa en la vía de Entner-Doudoroff, a partir de la cual, tras una serie de reacciones generará una molécula de piruvato. Esta molécula se descarboxila a acetil-CoA, molécula a partir

de la cual se sintetizarán los monómeros de PHA (Manoli, 2020).

1.1.2 Consorcios sintéticos aplicados a la producción de PHAs

La aplicación de un consorcio bacteria-cianobacteria para la síntesis de bioplásticos a partir de fuentes de carbono del medio (CO_2 y luz solar), es una estrategia prometedora puesto que permite combinar los distintos metabolismos del consorcio para aprovechar los recursos naturales y obteniendo productos de interés. En este trabajo hemos diseñado un consorcio (**fig. 3**) en el que el módulo de alimentación será la cianobacteria encargada de la producción de alimento (sacarosa) y el módulo de producción será una bacteria que consuma esta sacarosa y sea capaz de producir PHAs. Para ello se elegirá entre dos candidatos: *A. lata* y *P. putida* KT2440 en base a una mayor producción de biomasa y PHA en las condiciones del consorcio.

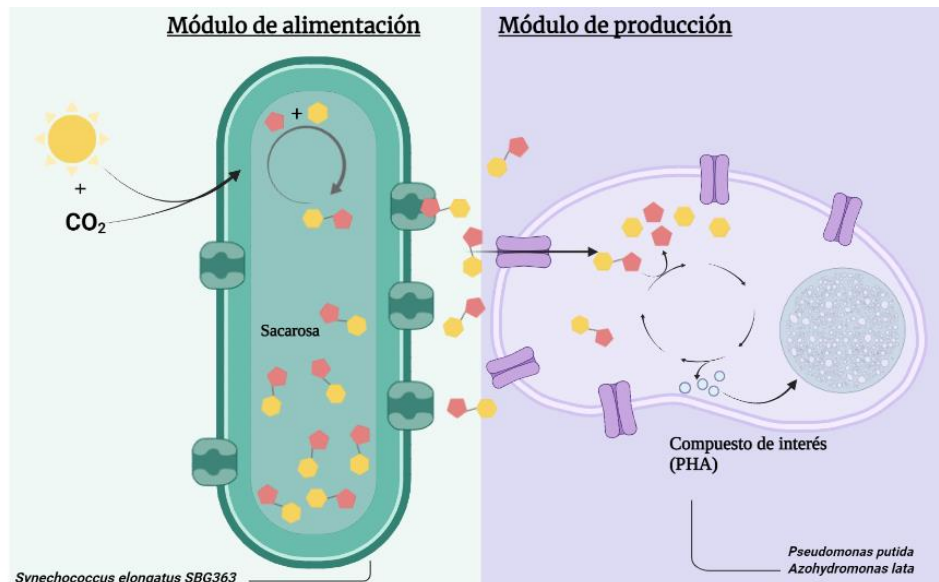


Figura 3. Esquema del consorcio sintético *S. elongatus*- *P.putida*/ *A. lata* para la producción de PHAs.

1.1.6 Módulo de alimentación

En este trabajo se ha utilizado la cianobacteria *S. elongatus* PCC 7942 SBG363 como módulo de alimentación para la producción de sacarosa. La sacarosa secretada será utilizada por *P. putida* o *A. lata* para su crecimiento y producción de compuestos de valor añadido como los PHAs sin necesidad de añadir fuentes de carbono al medio. El empleo de cianobacterias para la producción industrial de compuestos de valor añadido presenta muchas ventajas respecto a las plantas terrestres tradicionales. La eficiencia fotosintética es mayor, no requieren tejidos de soporte que afecten al rendimiento, son genéticamente manejables y presentan requerimientos nutricionales mínimos.

1.1.6.1 *S. elongatus* PCC 7942 SBG363

S. elongatus es una cianobacteria unicelular con forma de coco. Suele habitar en zonas luminosas de aguas superficiales. Estas células, a pesar de no contar con una estructura móvil caracterizada, pueden desplazarse y la gran mayoría de ellas son fotoautótrofos obligados. («Synechococcus», 2021).

S. elongatus PCC 7942 es un organismo oligoploide, con 3 a 4 copias cromosómicas por célula (Barrios, 2013). Se trata de una especie de cianobacteria fotoautótrofa obligada, de agua dulce, bacilar, no tóxica y no diazotrófica. Su genoma se encuentra completamente secuenciado y se ha empleado como organismo modelo en multitud de estudios. En este trabajo hemos utilizado la cepa derivada de *S. elongatus* PCC 7942 SBG363 (cianobacteria recombinante productora de sacarosa. Patente española nº P202030042. (2020)).

S. elongatus SBG363 tiene sobre-expresados los genes heterólogos y homólogos que codifican las siguientes enzimas (**fig. 4 (A, B)**): Pgi, glucosa 6 fosfato isomerasa de *Escherichia coli*; PgmT, fosfoglucomutasa de *E. coli*; GalU, UTP glucosa 1 fosfato uridiltransferasa de *E. coli*; Sps, sacarosa fosfato sintasa de *S. elongatus*; CscB, permeasa de sacarosa de *E. coli* y LacI, proteína represora del operon *lac* de *E. coli*.

La expresión de la permeasa de sacarosa o CscB de *E. coli* es la responsable del simporte de sacarosa y protones hacia el exterior celular. *S. elongatus* basifica naturalmente su entorno. Al ser este transportador funcional en condiciones de pH alcalino, lo convierte en óptimo para su uso particular por *S. elongatus* PCC7942 (Ducat *et al.*, 2012).

A diferencia de otras cepas similares en las que también se sobreexpresó la permeasa de sacarosa (Fedeson *et al.*, 2020), esta cepa es capaz de producir y secretar 4,2 g*L⁻¹ de sacarosa a los 10 días en ausencia de estrés osmótico.

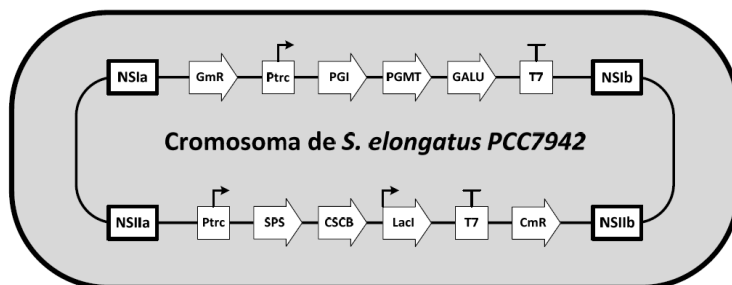


Figura 4. Esquema de la construcción de los genes integrados en la cepa *S. elongatus* SBG36. (Patente española nº P202030042. (2020))

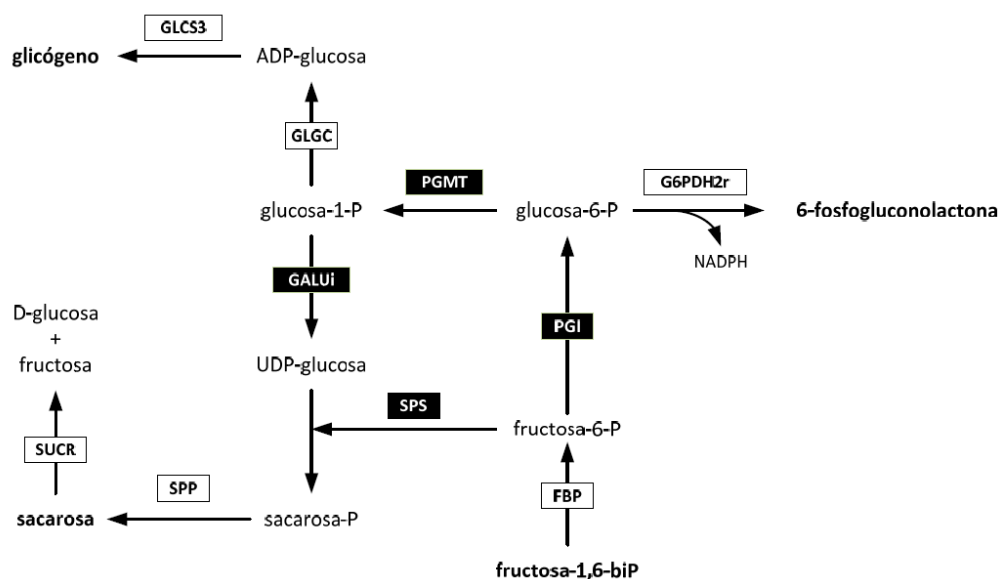


Figura 5. Síntesis de sacarosa en *S. elongatus* SBG 363 y enzimas implicadas. La fructosa-1,6-bisfosfato obtenida tras glucólisis es hidrolizada por la fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBP) a fructosa 6-fosfato. Esta molécula es el sustrato de la glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi) la cual cataliza la reacción reversible de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato. La glucosa-6-fosfato es un intermediario de dos rutas: una catalizada por el enzima glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa (G6PDH2r) para la síntesis de la 6-fosfogluconolactona y otra catalizada por la fosfoglucomutasa (PGMT) que usa la glucosa-6-P para generar glucosa-1-P. La sobreexpresión de este enzima potenciará esta última ruta. La UDP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa retira el fosfato de la molécula de glucosa-1-fosfato y genera una molécula de UDP-glucosa. Al sobreexpresar este enzima reforzamos la ruta de síntesis de la sacarosa, evitando la entrada de la glucosa-1-P hacia la glucogenogénesis. La sacarosa 6-fosfato sintasa (SPS) cataliza la reacción de fructosa 6-fosfato con UDP-glucosa para dar sacarosa 6-fosfato. El fosfato será eliminado por la sacarosa 6-fosfato fosfatasa. (Patente española n° P202030042. (2020))

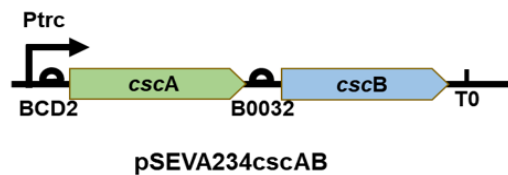
1.1.7 Módulo de producción

Para abordar la producción de bioplásticos a partir de sacarosa se plantearon dos candidatos: *P. putida* KT2440 (modificada genéticamente con el plásmido pSEVA234_cscAcscB) y *A. lata* DSM1123, ya que ambas han sido descritas por su capacidad para producir PHAs y crecer en sacarosa como única fuente de carbono (Löwe, Hobmeier, *et al.*, 2017; Penloglou *et al.*, 2012).

1.1.2.1 *Pseudomonas putida* KT2440 (pSEVA234cscAB)

P. putida KT2440 es una bacteria Gram negativa perteneciente al género *Pseudomonas* y a la clase gamma Proteobacterias. Son bacilos aerobios, quimioorganotróficos, con un metabolismo respiratorio en lugar de fermentativo (Timmis, 2002). Se caracteriza por ser una cepa no patogénica. Es un microorganismo saprófito oportunista de rápido crecimiento, aislado de medios acuáticos, plantas y suelos. Esta bacteria es ampliamente utilizada gracias a una serie de ventajas

como: su rápido crecimiento, el alto rendimiento de biomasa, la baja demanda de mantenimiento y secreción de subproductos, la alta adaptabilidad al entorno y alta tolerancia a distintos tipos de estreses (Weimer *et al.*, 2020). La cepa *P. putida* KT2440 es la cepa mejor caracterizada y fue la primera del género en secuenciarse. Se ha catalogado como organismo GRAS (del inglés: *Genetically Recognized As Safe*), y ha sido ampliamente utilizada para clonación y expresión de genes heterólogos. El tamaño de su genoma es de 6,18 Mb, en el cual se encuentran genes que codifican para enzimas relacionadas con la protección frente a sustancias tóxicas y múltiples rutas de degradación de compuestos xenobióticos presentando una gran versatilidad metabólica (Fernández-Escapa, 2012). Sin embargo, a diferencia de otras bacterias, como *E. coli*, la glucosa no presenta un papel fundamental en el metabolismo central. La fuente de energía y carbono procede principalmente de algunos ácidos orgánicos o aminoácidos (Rojo, 2010). En nuestro ensayo empleamos una cepa derivada de *P. putida* KT2440 modificada genéticamente con el plásmido pSEVA234cscAB (**fig. 6**), el cual contiene los genes *cscA* (invertasa) y *cscB* (transportador de sacarosa) implicados en el metabolismo de la sacarosa.



*Figura 6. Esquema del plásmido pSEVA234cscAB de la cepa empleada en el ensayo. En la parte inferior de la figura está representados los genes *cscA* y *cscB* formado un operó bajo el control del promotor P_{trc} que se integraron en el genoma de la bacteria generando la cepa *P.putida* KT2440 pSEVA234cscAB .*

Además, desde el punto de vista industrial esta cepa resulta interesante por su capacidad para acumular PHA en gránulos (**fig. 7**) durante su crecimiento. A partir de fuentes de carbono estructuralmente no relacionadas con PHAs (glucosa, glicerol y citrato) la síntesis de estos biopolímeros requiere una limitación nutricional de nitrógeno. Sin embargo, esta limitación no es estrictamente necesaria cuando las células se cultivan en presencia de ácidos grasos (Follonier *et al.*, 2011; Wang & Nomura, 2010).

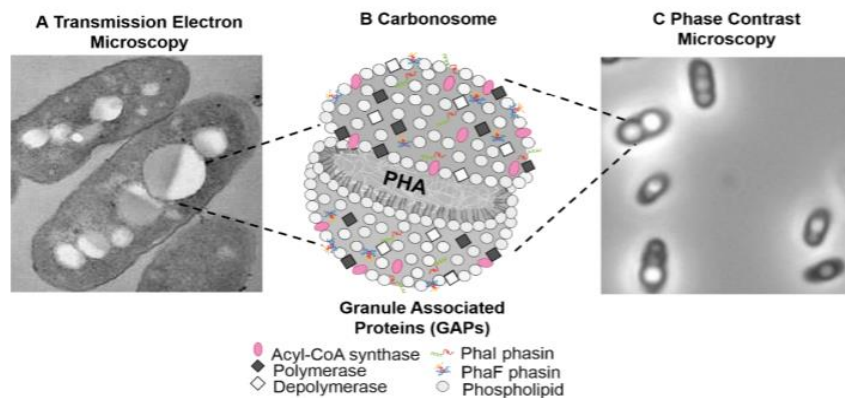


Figura 7. A) Células de P. putida KT2440 observadas al microscopio electrónico (TEM). B) Esquema del gránulo de PHA en P. putida KT2440. C) Células de P. putida KT2440 observadas al microscopio óptico de contraste de fases. Imagen adaptada de Galán et al., 2011.

1.1.7.2 *Azohydromonas lata* DSM 1123

Azohydromonas es un género de bacterias Gram negativas pertenecientes al orden Burkholderiales. *A. lata* (anteriormente conocidas como *Alcaligenes latus*) pertenece al subgrupo β -proteobacterias, el cual engloba también al género *Pseudomonas*. La mayoría son bacilos móviles y presentan un metabolismo aeróbico respiratorio, sin embargo, algunas especies pueden realizar respiración anaeróbica, en presencia de nitrato o nitrito. Han sido aisladas de suelos, aguas dulces, saladas y contaminadas, materiales en descomposición, productos lácteos y del tracto intestinal de vertebrados (Gahlawat & Srivastava, 2017).

A. lata contiene genes implicados en el catabolismo del fenol y catecol, así como en algunos casos, de compuestos aromáticos halogenados. Por este motivo se ha utilizado mucho para la degradación de compuestos aromáticos contaminantes y reconocidos en biorremediación. Además, se emplean también en la producción industrial de aminoácidos no estándares y biopolímeros (Batt, 2014).

A. lata es capaz de acumular hasta un 50-60% de su biomasa total de scl-PHA (**fig. 8**) durante su crecimiento a partir de fuentes de carbono baratas como la sacarosa, la melaza de remolacha, desechos de soja, malta y savia de arce (Gahlawat *et al.*, 2012). Sin embargo, en condiciones de desequilibrio nutricional es capaz de acumular un 80% de su peso (Lee *et al.*, 1999).



Figura. 8. Células de A. lata produciendo gránulos intracelulares de PHB al microscopio óptico de contraste de fases (nuestro ensayo).

1.2 OBJETIVOS

- 1) Evaluación del crecimiento y producción de sacarosa de la cianobacteria *S. elongatus* SBG363 en medio mínimo BG11-HP.
- 2) Evaluación del crecimiento y producción de PHAs de *A. lata* y *P. putida* en medio mínimo BG11-HP suplementado con sacarosa.
- 3) Establecimiento de un consorcio artificial *S. elongatus* SBG363 y *A. lata* para la obtención de PHAs a partir de luz y CO₂.

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas bacterianas

En este trabajo se emplearon las cepas bacterianas presentadas a continuación en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Cepas bacterianas y su respectivo genotipo/fenotipo empleadas en el experimento.

Cepas	Genotipo/ fenotipo
<i>Synechococcus elongatus</i> SBG363	Derivada de <i>S. elongatus</i> PCC 7942, cepa superproductora de sacarosa. (Patente española n° P202030042 (2020))
<i>Azohydromonas lata</i> DSM1123	Cepa productora de PHB (Palleroni & Palleroni, 1978)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (pSEVA234cscAB)	Cepa de <i>P. putida</i> que contiene el plásmido pSEVA234cscAB (contiene los genes <i>cscA</i> (invertasa) y <i>cscB</i> (transportador de sacarosa) implicados en el metabolismo de la sacarosa (Este trabajo).

2.2 Medios y condiciones de cultivo

2.2.1 Medio y condiciones de cultivo empleados para *S. elongatus*

Medio BG11-HP

El medio BG11-HP se ha empleado para el cultivo y mantenimiento de *S. elongatus*. Dicho crecimiento en medio líquido se monitorizó por turbidimetría a 720 nm (D.O₇₂₀) empleando un espectrofotómetro UV Mini-1240 (Shimadzu). Para aumentar el crecimiento y, por lo tanto, la producción de sacarosa de *S. elongatus*, se bombeó CO₂ directamente al cultivo. Dicho gas se produce tras bombear con aire un tampón compuesto por KHCO₃ (2M): K₂CO₃ (2M).

La preparación del medio se lleva a cabo mezclando los componentes listados a continuación en la **Tabla 2**:

Tabla 2. Componentes del medio BG11-HP.

Componentes	Volumen final 1L de BG11-HP
Solución de sales de BG11 (100X) *	10 ml
HEPES 1M (100X)	10 ml
NaNO ₃ 150g/L (100X)	10 ml
K ₂ HPO ₄ 1M (500X)	2 ml
H ₂ O miliQ Estéril	Enrasar a 1L

*Ver ANEXO 1 para la composición de las distintas soluciones.

Una vez mezclados los componentes del medio BG11-HP se filtraron con filtros de 0.22 µm antes de disponerlos en los matraces de cultivo.

2.2.2 Medio y condiciones de cultivo empleados para *A. lata* DSM1123 y *P. putida* KT2440 (pSEVA234cscAB).

El medio de cultivo habitual para *P. putida* es “*Luria-Bertani*” (LB), cuya composición es 10 g*L⁻¹ de NaCl, 10 g*L⁻¹ de Bactotripton y 5 g*L⁻¹ de extracto de levadura. Los preinóculos se prepararon en matraces con medio líquido LB en agitación a 30 °C. Mientras que el recuento de viables y crecimiento en placa se realizó en medio sólido LB con agar (15g*L⁻¹).

El medio de cultivo empleado para *A. lata* fue “*Nutrient Broth*” (NB), cuya composición es 5 g*L⁻¹ de digerido pancreático de gelatina y 3g*L⁻¹ de extracto de carne bovina. Los preinóculos se prepararon en matraces con medio líquido NB en agitación a 30 °C.

Para recuento de viables se plaquearon las diluciones correspondientes de los cultivos líquidos en placas de medio NB (8 g*L⁻¹) con agar (15g*L⁻¹) y medio LB con agar (15g*L⁻¹) para *A. lata* y *P. putida*, respectivamente. Se dejaron secar y posteriormente se incubaron mantuvieron en una estufa a 30°C.

El medio mínimo empleado para ambas cepas fue el medio BG11-HP suplementado con sacarosa. El crecimiento de *A. lata* y *P. putida*, en medio líquido se monitorizó por turbidimetría a 600 nm (DO₆₀₀) empleando un espectrofotómetro UV Mini-1240 (Shimadzu).

En el caso de *A. lata*, también se empleó un lector de microplaca Multiskan Ascent (Thermo Electron Corporaton) para monitorizar el crecimiento a distintas concentraciones de sacarosa. Se obtuvieron densidades ópticas a $\lambda_{630\text{nm}}$, cada 15 min, durante 48 h. En cada punto de la curva de crecimiento se analizaron ambas cepas al microscopio, para garantizar que estuvieran libres de contaminación.

2.3 Cuantificación de sacarosa

Para determinar la presencia y cantidad de sacarosa producida por *S. elongatus* se empleó un método enzimático-colorimétrico utilizando el kit comercial ‘Megazyme Sucrose/D-Glucose Assay Kit’. Dicho kit se basa en las reacciones llevadas a cabo por la *glucosa oxidasa*, *peroxidasa* y β -*fructosidasa*. La *fructosidasa* cataliza la hidrólisis de la sacarosa, liberando glucosa y fructosa. La D-glucosa actúa como sustrato del enzima *glucosa oxidasa* (**fig. 9 (1)**). Este enzima cataliza su oxidación para formar peróxido de hidrógeno y D-glucono- δ -lactona. El indicador colorimétrico es la quinoneimina, la cual se genera a partir de 4-aminoantipirina, fenol y peróxido

de hidrógeno bajo la acción catalítica de la *peroxidasa* (**fig. 9 (2)**). Por lo tanto, la coloración rosácea de la quinoneimina indica la presencia de sacarosa, así como la densidad óptica a 510 nm permite cuantificarla.

En este ensayo cuantificamos la cantidad de sacarosa que había en el sobrenadante de los cultivos en medio BG11-HP. Se cogieron 60µl muestra, 60 µl stock como control positivo y 120 µl H₂O miliQ de agua (como blanco). A cada eppendorf se le añadieron 60 µl *fructosidasa* y se mantuvieron a 50°C, durante 20 min. Durante este tiempo, tuvo lugar la primera reacción (1). Posteriormente añadimos 900µl de reactivo GODPOD (*glucosa oxidasa* y *peroxidasa*) a cada muestra para que tuviera lugar la segunda reacción (2). A continuación, se leyó directamente la absorbancia a 510 nm en el espectrofotómetro UVMMini-1240 (Shimadzu).

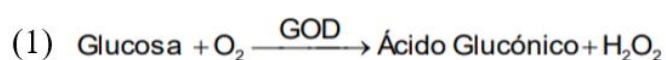


Figura 9. Reacciones enzimáticas que tienen lugar en el kit comercial a partir de la sacarosa del medio. Imagen tomada de "Sucrose/D-Glucose Assay Kit", Megazyme. (Sucrose/D-Glucose Assay Kit, s. f.)

2.4 Cuantificación de clorofila y carotenoides.

Para cuantificar la cantidad de cianobacteria en el consorcio se midió la cantidad de clorofila a y carotenoides de la muestra empleando un protocolo basado en lavados con metanol (99,9%) (Zavřel *et al.*, 2015). Tras varios lavados y centrifugación se recogió el sobrenadante a partir del cual se midió su densidad óptica con el espectrofotómetro a 470, 665 y 720 nm.

2.5 Cuantificación y caracterización de PHAs

Extracción del polímero

La extracción del polímero se realizó siguiendo el protocolo descrito por Liu *et al.* (2011). A partir de 20 ml del cultivo se extrajo el bioplástico con 20 ml de cloroformo y se centrifugó durante 5 minutos a 3,8 rpm. Se incluyó un paso de filtración para eliminar los desechos y recuperar la biomasa celular (a partir de la cual se cuantificaría el PHA intracelular por medio de GC-MS). La fase orgánica se evaporó en la campana de humos hasta que quedaron 5 ml de cloroformo y luego el polímero se purificó por precipitación con 2 ml de metanol frío (-20 °C) y 10 ml de cloroformo. La mezcla se centrifugó a 3,8 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante (disolventes orgánicos). Los disolventes orgánicos residuales de la muestra se evaporaron en la campana de humos durante la noche. Una vez seco el polímero extraído, se pesó en una balanza de precisión.

Cuantificación de PHA por GC-MS

El método más utilizado para la cuantificación de monómeros de PHAs es la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS) (Tan *et al.*, 2014). En nuestro ensayo cuantificamos y caracterizamos la cantidad de PHA producido en masa liofilizada de cultivos de *A. lata* siguiendo el protocolo descrito anteriormente de Escapa *et al.* (2012). Los monómeros de PHA se obtuvieron mediante metanolisis ácida con 2 ml de metanol acidificado (3%) con H₂SO₄ al 15% (v/v) y 2 ml de 0,5 mg/ml de 3-metil benzoato en cloroformo como patrón interno. Esta mezcla se incubó durante 5 h en un baño de aceite a 100 °C. Después de enfriar, se añadió 1 ml de agua destilada a la mezcla y se centrifugó durante 5 min a 3.800 rpm para separar las fases. Se realizó un segundo paso de extracción para eliminar el H₂SO₄ residual. Finalmente, se añadió una pequeña cantidad de polvo de Na₂SO₄ para eliminar el agua residual. La capa orgánica se analizó utilizando un GC Agilent 7890A (Agilent Technologies, EE. UU.) Equipado con una columna capilar DB-5HT (30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno, 0,1 µm de espesor de película), y los datos de masa se adquirieron y procesaron con un dispositivo Agilent. Espectrómetro de masas 5975C (Agilent Technologies, EE. UU.). El programa de temperatura del horno se fijó a una temperatura inicial de 80 °C durante 2 min, luego de 80 °C a 115 °C a una velocidad de 5 °C / min para una separación eficiente de picos. Los espectros se obtuvieron como impactos de electrones con una energía ionizante para el funcionamiento de MS de 70 Ev. El cálculo de biomasa se realizó como se describió anteriormente (de Eugenio *et al.*, 2010a). Se centrifugaron cincuenta mililitros de medio de cultivo durante 30 min a 3.000 x g a 4 ° C y se liofilizaron los sedimentos durante 24 h y se pesaron.

2.6 Establecimiento del consorcio *S. elongatus*-*A. lata*

Partimos de un cultivo de 13 días de *S. elongatus* de 50 ml en BG11-HP que produjo 2 g*L⁻¹ de sacarosa a los 13 días. Se añadió al mismo matraz el volumen de *A. lata* para alcanzar una D.O₆₀₀= 0,1 y se mantuvo en condiciones de crecimiento de *S. elongatus* durante 24 h. En paralelo, se realizó también un control de *A. lata* en 50 ml de medio BG11-HP con 2 g*L⁻¹ de sacarosa y en las mismas condiciones.

El crecimiento se evaluó a través de las lecturas obtenidas a D.O₆₀₀ y D.O₇₂₀ con el espectrofotómetro. Para los mismos tiempos se hizo recuento de viables en placas de medio sólido NB, se midió el pH y se analizó al microscopio su evolución. Además, empleando el kit de cuantificación de sacarosa se determinó la sacarosa total consumida por *A. lata*. Finalmente, para los mismos tiempos se evaluó la cantidad de clorofila a que tenía el consorcio.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

3.1 Producción de sacarosa de *S. elongatus* en medio BG11-HP

El módulo de alimentación está compuesto por *S. elongatus* SBG363. Puesto que su papel es el de alimentar a las bacterias productoras de PHA, el objetivo fue evaluar la producción de sacarosa durante su crecimiento.

Se cultivó en medio BG11-HP bajo condiciones de crecimiento de cianobacterias; luz, agitación y bombeo de CO₂. Cada dos días se añadía agua estéril para suplir el volumen de medio perdido debido al bombeo de aire y la temperatura. Se añadió 2mM de IPTG desde el inicio a los cultivos que partían de una D.O.₇₂₀= 1. A los 15 días, se vio que el crecimiento alcanzaba una D.O.₇₂₀= 7. Tal y como se muestra en la **figura 10** se observó que la fase estacionaria se alcanza entre los 17 y 20 días alcanzando una D.O.₇₂₀ máxima de 8. Sin embargo, la producción de sacarosa se mantuvo con un máximo de 2 g*L⁻¹ a los 20 días.

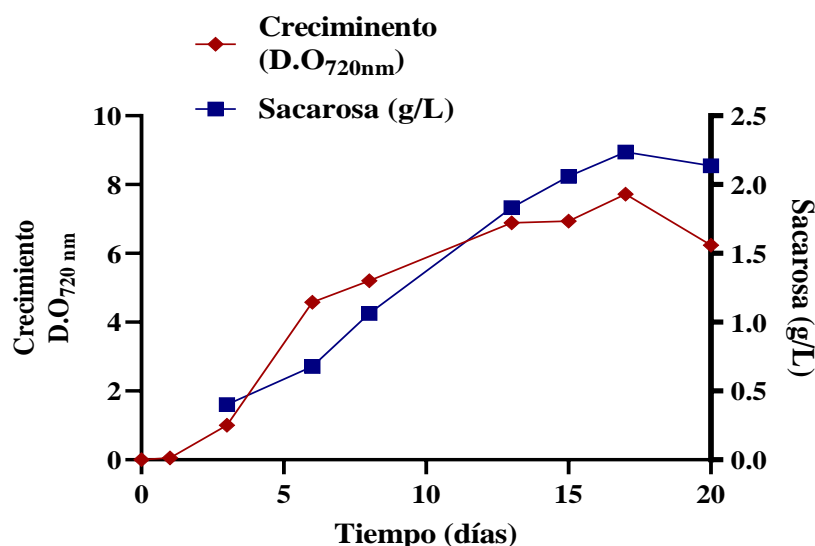


Figura 10. Crecimiento y producción de sacarosa de S. elongatus (aislado C8). Se observó producción de sacarosa a partir del tercer día.

3.2 Crecimiento de *P. putida* (pSEVA234cscAB) y *A. lata* en BG11-HP a distintas concentraciones de sacarosa

Para seleccionar el módulo de producción de PHAs partimos de dos posibles candidatos: *P. putida* y *A. lata*. Para decidir cuál de las dos podía resultar más productivo se realizaron cultivos en medio BG11-HP a distintas concentraciones de sacarosa y se visualizaron los gránulos de PHAs producidos por ambas cepas al microscopio óptico.

Se analizó el crecimiento de *A. lata* y *P. putida* en 50 ml de medio líquido BG11-HP a distintas

concentraciones de sacarosa ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), partiendo de una $D.O_{600}=0,2$. En el caso de *P. putida*, tal y como se observa en la **figura 11**, se monitorizó el crecimiento hasta 140 horas (6 días). Se observó que en presencia de $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa se alcanzó una $D.O_{600}=2,5$. Por otro lado, en la **figura 12** se muestran los resultados del crecimiento de *A. lata*. Esta cepa alcanzó una $D.O_{600}=3,8$ en $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa a las 25 horas de cultivo. La visualización de las células al microscopio mostró que únicamente fueron observables los gránulos de PHA en el cultivo de *A. lata* (**fig. 13**) lo que sugiere una mayor acumulación en esta bacteria.

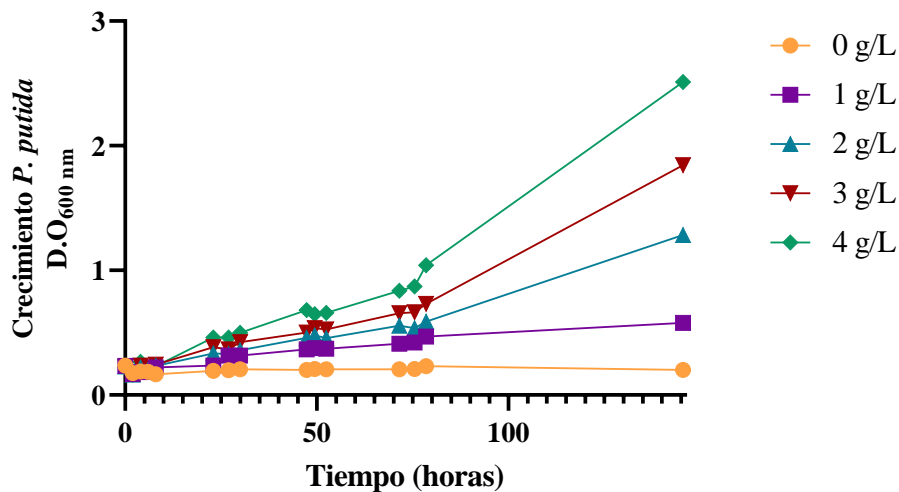


Figura 11. Crecimiento de *P. putida* a distintas concentraciones de sacarosa. En medio líquido BG11-HP con 0, 1, 2, 3 y $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa creció esta cepa durante 145 horas. No hay constancia del momento en el que entra en fase estacionaria.

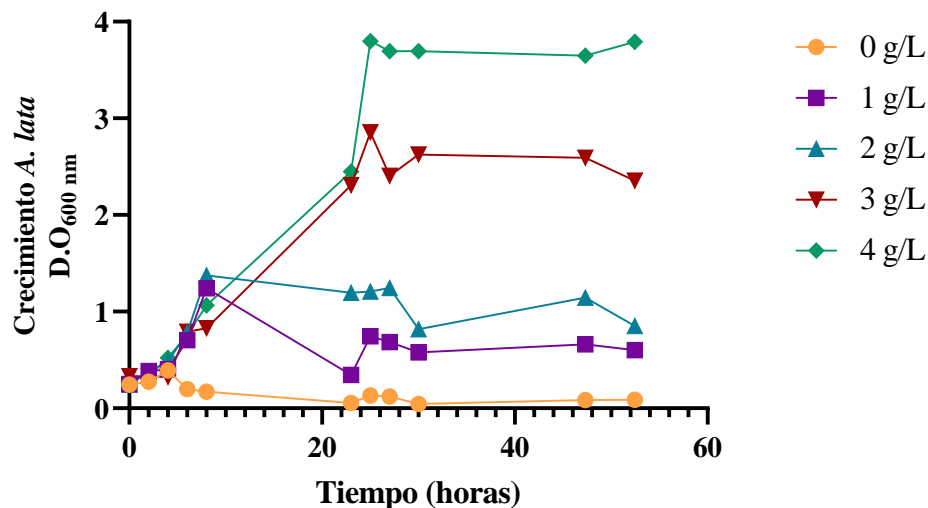


Figura 12. Crecimiento de *A. lata* a distintas concentraciones de sacarosa. Durante 52 horas estuvo creciendo esta cepa en medio líquido BG11-HP con 0, 1, 2, 3 y $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa. Se observa el comienzo de la fase estacionaria a las 25 horas.

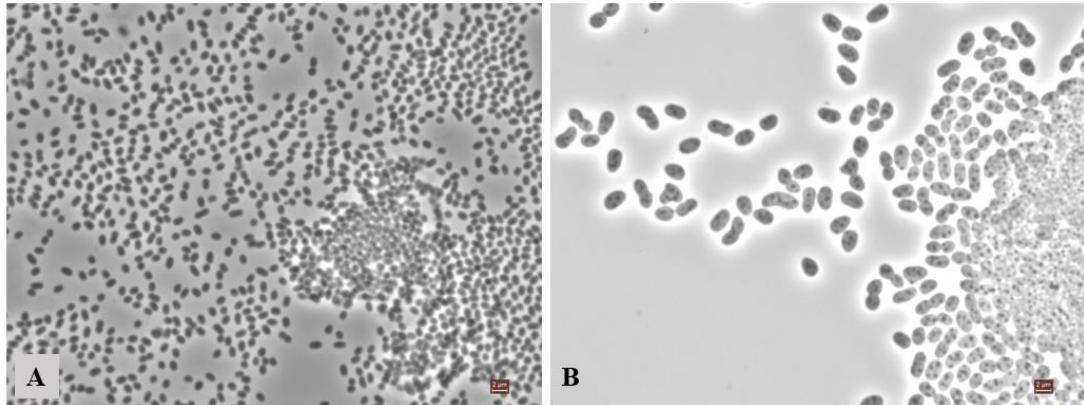


Figura 13. (A) Células de *P. putida* en medio BG11-HP con $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa a las 50 horas. Apenas se observan gránulos en las células. (B) Células de *A. lata* en medio BG11-HP con $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa a las 50 horas. Se observan gránulos de PHA en su interior (nuestro ensayo).

Dada su capacidad para crecer y producir gránulos en el medio BG11-HP (el cual se usaría en el co-cultivo) se escogió *A. lata* como candidata para la producción de bioplásticos en el consorcio. Se realizó un nuevo cultivo en condiciones de co-cultivo (presencia de luz, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, agitación, CO_2) en medio BG11-HP con $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa para corroborar los resultados anteriores (fig. 14). Se observa que a partir de una $\text{D.O.}_{600\text{nm}} = 0,2$, el crecimiento las 24 h aproximadamente alcanzaba una $\text{D.O.}_{600\text{nm}} = 2,5$. En todos los casos en los que se repitió dicha curva de crecimiento se observó que una vez alcanzada la fase estacionaria (20 días) la densidad óptica del cultivo disminuía debido a la lisis celular al final de la fase estacionaria. El análisis en paralelo del consumo de sacarosa permitió comprobar como la bacteria utilizaba dicha fuente de carbono para su crecimiento (fig. 14).

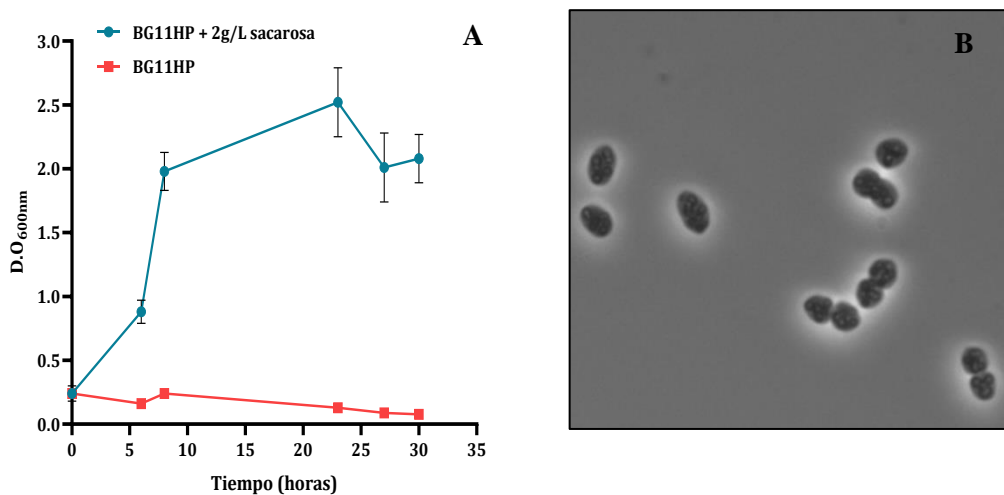


Figura 14. (A) Crecimiento de *A. lata* y consumo de sacarosa en medio BG11-HP con $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa. (B) Imagen al microscopio óptico de células de *A. lata* cultivadas en medio BG11-HP con $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa a las 25 h.

3.3 Establecimiento del consorcio sintético *S. elongatus* SBG363 y *A. lata* DSM 1123.

El principal objetivo de este trabajo era demostrar la capacidad que tiene *A. lata* de aprovechar la sacarosa, secretada por *S. elongatus*, para su crecimiento y la producción de gránulos de PHA. Para ello, una vez comprobada la capacidad de *A. lata* de crecer y producir gránulos de PHAs visibles a microscopio óptico de contraste de fases, se inició un co-cultivo siguiendo las siguientes especificaciones.

S. elongatus se cultivó en medio BG11-HP y 2 mM IPTG durante 20 días. Transcurrido este tiempo se analizó la concentración de sacarosa que fue de $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. En este punto se inoculó *A. lata*, procedente de un preinóculo cultivado en medio líquido NB a una $\text{D.O.}_{600\text{nm}} = 0,1$. En paralelo, y como control se inoculó *A. lata* en medio BG11-HP con $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa.

El crecimiento de *S. elongatus* en medio BG11-HP provoca un incremento de pH que se corrigió añadiendo $20 \mu\text{L}$ de HCl antes de añadir *A. latus* al co-cultivo.

Ambos cultivos se monitorizaron midiendo la densidad óptica a λ 600 nm y 720 nm. En cada punto se evaluó el pH mediante tiras colorimétricas y se hizo recuento de viables. Se evaluó el contenido en sacarosa y el contenido de clorofila a y carotenoides. Cada muestra se analizó al microscopio para evaluar la presencia de ambas bacterias y los gránulos de PHA (**fig. 15**).

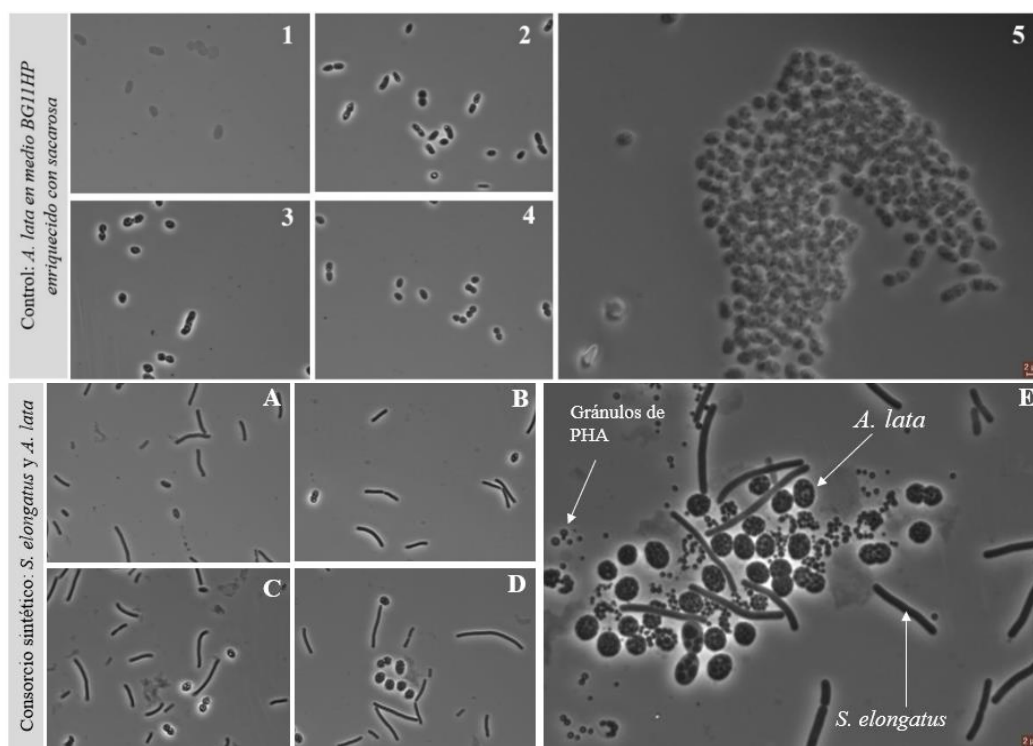


Figura 15. Imágenes al microscopio electrónico (aumento 100X) del consorcio y el control

finales. En las imágenes 1-5 se muestran el crecimiento de A. lata en el control a distintos tiempos (0h, 20h, 24h, 29h, 45h). Se observa un aumento en el número de células y de gránulos intracelulares. En las imágenes que van de la A-E se observa el aumento en el número de células bacterianas en el consorcio para los mismos tiempos. En la imagen E se muestran las células de bacteria lisadas con los gránulos liberados.

En la **figura 16** se observa el crecimiento de *A. lata* y su consumo de sacarosa en el consorcio. Muestra como el crecimiento se mantuvo durante 24 h, tras lo cual, las células comenzaban a lisarse (Reducción de las UFC) y a liberar los gránulos. Este momento coincidía con un nuevo aumento del pH por parte de la cianobacteria (pH 8,15), el cual se midió con el pH-metro.

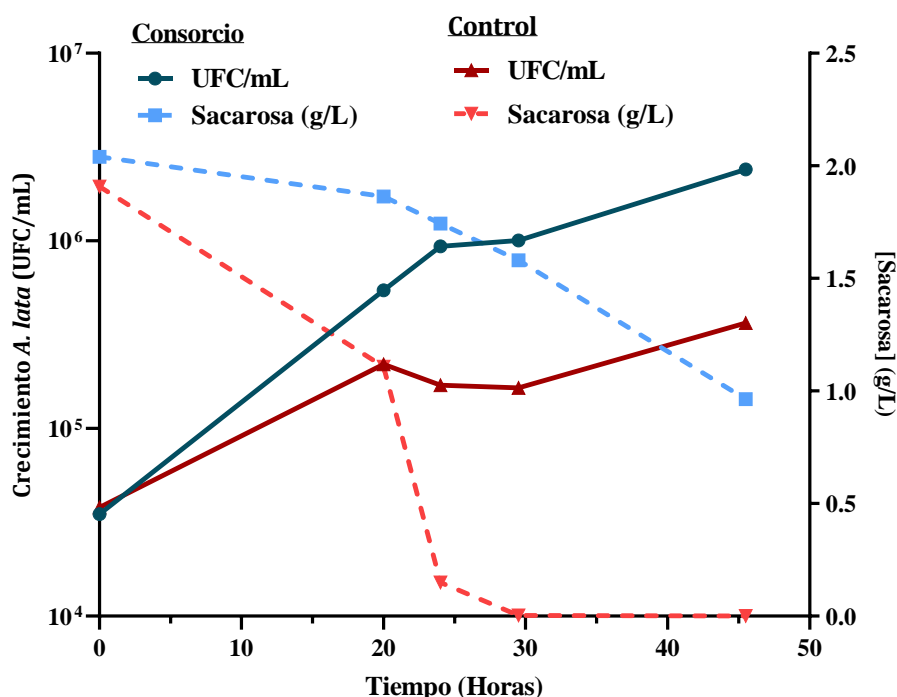


Figura 16. Crecimiento y consumo de sacarosa de A. lata en mono-cultivo (control) y co-cultivo con S. elongatus (consorcio). El crecimiento de S. elongatus se monitorizó midiendo el contenido en clorofila.

3.4 Cuantificación de polihidroxicanoatos

Finalmente, se cuantificó la cantidad de PHA producido por el consorcio y el control. Para ello se empleó GC-MS y peso seco total. Puesto que a tiempo final había un porcentaje de células de *A. lata* que se habían lisado, se cuantificó el bioplástico en las células y en el medio. Inicialmente se partió de un volumen de 20 ml de cultivo, al cual se le añadieron 20 ml de cloroformo para solubilizar el PHA procedente de las células de *A. latus* que se hubieran lisado. Posteriormente se centrifugó a 3,8 rpm durante 5 min. Se eliminó la fase acuosa y se repitió el proceso. Finalmente se separó el sobrenadante (con el PHA disuelto) del pellet (células no lisadas con PHA

intracelular) para proceder a su cuantificación por separado.

Para cuantificar el PHA disuelto en el cloroformo éste se evaporó durante dos días y posteriormente se purificó añadiendo 2 ml de metanol frío y 10 ml de cloroformo. Tras haberse evaporado la fase líquida, precipitó el PHA y se pesaron los tubos conteniendo el PHA previamente tarados. Tal y como se observa en la tabla 3 el peso correspondiente al PHA obtenido en ambas fracciones fue muy similar en el consorcio y en el control.

Tabla 3. Cuantificación de PHA

Muestra		Peso (g)	
PHA extraído en cloroformo	Consortio: <i>S. elongatus</i> y <i>A. lata</i>	0,198	
	Control: <i>A. lata</i>	0,214	
PHA intracelular	Muestra	g*L ⁻¹	PHA (%)
	Consortio: <i>S. elongatus</i> y <i>A. lata</i>	12,2	6,94
	Control: <i>A. lata</i>	13,2	29,75

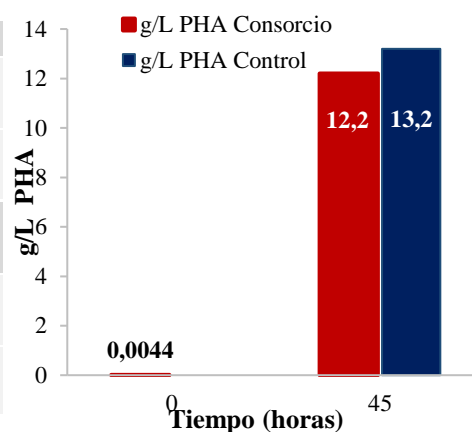


Figura 17. PHA (g/L) obtenidos por GC-MS y peso seco del consorcio y el control final. Se cuantificó la cantidad de PHA disuelto e intracelular obtenido en el preinóculo de *A. lata* a tiempo inicial (para una D.O. 0,1), y a las 45 h en el control y el consorcio.

Por otro lado, se cuantificó mediante GC-MS la cantidad de PHA intracelular en las células que permanecieron sin lisar. Para ello, previamente se liofilizó el pellet resultante de la centrifugación del control y el consorcio. El peso seco total de estos pellets fue de 0,17 y 0,67 g para el control y el co-cultivo respectivamente. El porcentaje de PHA obtenido calculado tras la cuantificación por GC-MS en cada caso fue de 29.75% en el caso de *A. lata* y 6, 94% en el caso del consorcio. A partir del peso del pellet y el porcentaje de PHA se calculó la cantidad de PHA en cada uno de los pellets (tabla 2). Teniendo en cuenta la cantidad de PHA en el sobrenadante y en las células se obtuvieron los resultados representados en la figura 17. En ambos casos la producción de PHA fue muy similar, 13. 2 g*L⁻¹ en el caso del cultivo control *A. lata* y 12.2 g*L⁻¹ para el consorcio.

Nuestros resultados sugieren que la bacteria *A. lata* es capaz de crecer en presencia de *S. elongatus* y producir PHA en una cantidad muy similar a como lo hace en monocultivo en medio BG11-HP.

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

El empleo de consorcios microbianos para la obtención natural de productos de valor añadido es un área de estudio y constituye una aplicación emergente por sus beneficios frente al monocultivo. Esta estrategia permite la coexistencia de dos o más microorganismos, aportando diversidad con sus distintas rutas metabólicas y reduciendo significativamente la dificultad y el tiempo de reconstruir rutas sintéticas largas. Además, permite la división del trabajo (aligerando la carga metabólica de cada cepa), la obtención de varios productos de interés y las interacciones celulares beneficiosas que promueven la productividad celular y su adaptabilidad al entorno (Kong *et al.*, 2018).

En este trabajo hemos diseñado un consorcio modular energizado por la luz, formado por *S. elongatus* y *A. lata* aplicado a la producción de PHAs. Se ha utilizado la cianobacteria recombinante *S. elongatus* PCC 7942 SBG363 (**Tabla 1**) como módulo de alimentación ya que es capaz de producir sacarosa tras la inducción con IPTG y secretarla al medio sin necesidad de proporcionar un choque osmótico en presencia de altas concentraciones de sal. La sacarosa secretada es utilizada como fuente de carbono y energía por el módulo de producción. En el diseño de co-cultivos, es requisito fundamental que los microorganismos implicados sean capaces de crecer en el mismo medio y condiciones. El crecimiento de *S. elongatus* depende tanto de factores bióticos como abióticos (pH (7-9), temperatura (30 °C) y presencia de luz) (Costa *et al.*, 2019). Además, es fundamental la agitación y el bombeo con CO₂ que por un lado aumenta la fuente de carbono y por otro evita la precipitación de nutrientes y células del medio (Razzak *et al.*, 2017). Por ese motivo se optimizó el cultivo de *S. elongatus* en agitación constante, con 24 h de luz y bombeo de CO₂ a 30°C.

La producción de sacarosa por *S. elongatus* SBG363 se analizó a lo largo de la curva de crecimiento en estas condiciones llegando a niveles de 2g*L⁻¹ al final de la fase estacionaria. La sacarosa obtenida fue aproximadamente la mitad de la descrita por los autores de la patente, aunque la curva de crecimiento de la cianobacteria tuvo una D.O final de los cultivos menor en nuestros experimentos.

Una vez definidas las condiciones óptimas para el cultivo y producción de sacarosa de *S. elongatus*, éstas se probaron para el cultivo de las bacterias productoras de PHA *A. lata* y *P. putida* (pSEVA234cscAB). Se observó que, aunque ambas bacterias fueron capaces de crecer en medio BG11-HP (**figs. 11 y 12**) la bacteria *A. lata* lo hizo en menor tiempo alcanzando niveles de

biomasa superiores (**fig. 12**). Cuando se observaron células procedentes de los cultivos de ambas cepas al microscopio óptico únicamente se detectaron gránulos de PHA en el cultivo de *A. lata*. Por este motivo se seleccionó *A. lata* como módulo de producción. En primer lugar, *P. putida* tiene un mayor requerimiento de que exista un desequilibrio nutricional en el medio para poder sintetizar estos polímeros en cantidades detectables. Además, la producción de PHAs en *P. putida* requiere de una fase de acumulación de biomasa previa para empezar a acumularlos (Löwe, Schmauder, *et al.*, 2017).

Aunque en el caso de *A. lata* también se ha descrito un aumento de la producción en condiciones de desequilibrio nutricional, su producción acoplada al crecimiento alcanza niveles más que aceptables en cualquier fuente de carbono *A. lata* DSM1123 puede emplear la sacarosa producida por *S. elongatus* sin necesidad de modificación genética previa y emplear esta fuente de carbono para su crecimiento y la síntesis de PHAs (Gahlawat & Srivastava, 2017).

En este trabajo hemos demostrado que el co-cultivo de *S. elongatus* y *A. lata* es viable y productivo consiguiéndose acumulaciones de bioplástico muy similares al del control en presencia de 2 g*L⁻¹ de sacarosa.

En estudios anteriores como el de Löwe, Hobmeier, *et al.*, (2017), se desarrolló una cepa de *P. putida* capaz de utilizar la sacarosa del medio como fuente de carbono, pero al igual que en nuestro caso, requería bajas concentraciones de nitrógeno y su producción era muy baja, alcanzando 150 mg*L⁻¹ de PHA. En otro estudio posterior (Hobmeier *et al.*, 2020) se desarrolló una nueva cepa que no dependía de este estrés nutricional basada en la delección del sistema regulatorio NasS/NasT, denominada nitrogen-blind y utilizaba la sacarosa secretada por *S. elongatus*. Sin embargo, los niveles de PHAs fueron relativamente bajos, alcanzando una concentración de 25,24 mg*L⁻¹ de PHA finales. En la búsqueda de cepas más eficientes de *P. putida* para trabajar en co-cultivo, se desarrolló una cepa capaz de aprovechar la sacarosa del medio para la síntesis de PHAs y capaz de degradar el 2,4-dinitrotolueno (Fedeson *et al.*, 2020). Esto ofrecía una gran ventaja ya que aumentaba las funciones de la cepa, sin embargo, el rendimiento de la producción de PHAs, seguía siendo muy bajo, alcanzando 23,4 mg*L⁻¹.

Los niveles de producción alcanzados por el co-cultivo *S. elongatus* y *A. lata* fueron de 12,2 g*L⁻¹ en 24 h lo que supone un rendimiento muy superior a los consorcios basados en luz para producir PHA descritos hasta la fecha.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden extraer de este trabajo respecto a la creación de un co-cultivo sintético entre *S. elongatus* SBG363 y *A. lata* DSM 1123 para la producción de bioplásticos, son las siguientes:

1. *S. elongatus* SBG 363 es capaz de crecer y producir sacarosa en medio mínimo BG11-HP.
2. *A. lata* DSM 1123 crece en medio mínimo BG11-HP utilizando sacarosa como fuente de carbono produciendo un 25% de su peso de gránulos de PHB observables al microscopio óptico de contraste de fases. La producción total del cultivo en estas condiciones fue de $13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de PHB
3. El consorcio sintético *S. elongatus* SBG363- *A. lata* fue viable en las condiciones testadas permitiendo el crecimiento de *A. lata* y la producción de $12,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de PHB
4. El consorcio sintético formado por *S. elongatus* SBG363 y *A. lata* constituye una herramienta prometedora para la síntesis de productos de interés a partir de CO_2 y luz.

CAPÍTULO 6. REFERENCIAS

- Ashby, R. D., Solaiman, D. K. Y., & Strahan, G. D. (2019). The Use of *Azohydromonas lata* DSM 1122 to Produce 4-hydroxyvalerate-Containing Polyhydroxyalkanoate Terpolymers, and Unique Polymer Blends from Mixed-Cultures with *Burkholderia sacchari* DSM 17165. *Journal of Polymers and the Environment*, 27(1), 198-209.
<https://doi.org/10.1007/s10924-018-1332-2>
- Barrios, F. M. (2013). *Componentes y mecanismos del sistema NbIS en la cianobacteria Synechococcus elongatus PCC 7942* [Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universitat d'Alacant - Universidad de Alicante].
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=121079>
- Batt, C. A. (2014a). Alcaligenes. En *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 38-41). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00006-9>
- Batt, C. A. (2014b). Alcaligenes. En C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 38-41). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00006-9>
- Ciesielski, S., Mozejko, J., & Pisutpaisal, N. (2015). Plant oils as promising substrates for polyhydroxyalkanoates production. *Journal of Cleaner Production*, 106, 408-421.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.09.040>
- Costa, S. S., Miranda, A. L., de Moraes, M. G., Costa, J. A. V., & Druzian, J. I. (2019). Microalgae as source of polyhydroxyalkanoates (PHAs)—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 536-547.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.099>
- Ducat, D. C., Avelar-Rivas, J. A., Way, J. C., & Silver, P. A. (2012). Rerouting Carbon Flux To Enhance Photosynthetic Productivity. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2660-2668. <https://doi.org/10.1128/AEM.07901-11>
- Escapa, I., García, J., Bühler, B., Blank, L., & Prieto, A. (2012). The polyhydroxyalkanoate

- metabolism controls carbon and energy spillage in *Pseudomonas putida*. *Environmental microbiology*, 14, 1049-1063. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02684.x>
- Fedeson, D. T., Saake, P., Calero, P., Nickel, P. I., & Ducat, D. C. (2020). Biotransformation of 2,4-dinitrotoluene in a phototrophic co-culture of engineered *Synechococcus elongatus* and *Pseudomonas putida*. *Microbial Biotechnology*, 13(4), 997-1011. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13544>
- Fernández-Escapa, I. (2012). *Estudio del metabolismo de polihidroxicanoatos en Pseudomonas putida: Implicaciones fisiológicas y aplicaciones en el desarrollo de bioplásticos funcionalizados*. <https://doi.org/10.13039/501100006280>
- Follonier, S., Panke, S., & Zinn, M. (2011). A reduction in growth rate of *Pseudomonas putida* KT2442 counteracts productivity advances in medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production from gluconate. *Microbial Cell Factories*, 10, 25. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-25>
- Gahlawat, G., Sengupta, B., & Srivastava, A. K. (2012). Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate) in a novel airlift reactor with in situ cell retention using *Azohydromonas australica*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(9), 1377-1384. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1138-5>
- Gahlawat, G., & Srivastava, A. K. (2017). Model-Based Nutrient Feeding Strategies for the Increased Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 183(2), 530-542. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2482-8>
- Galán, B., Dinjaski, N., Maestro, B., de Eugenio, L. I., Escapa, I. F., Sanz, J. M., García, J. L., & Prieto, M. A. (2011). Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442. *Molecular Microbiology*, 79(2), 402-418. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07450.x>
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever

- made. *Science Advances*, 3(7). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>
- González García, Y., Meza Contreras, J. C., González Reynoso, O., & Córdova López, J. A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: Plásticos de origen microbiano. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 29(1), 77-115.
- Hobmeier, K., Löwe, H., Liefeldt, S., Kremling, A., & Pflüger-Grau, K. (2020). A Nitrate-Blind *P. putida* Strain Boosts PHA Production in a Synthetic Mixed Culture. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 486. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00486>
- Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40(2), 607-619. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.053>
- Kong, W., Meldgin, D. R., Collins, J. J., & Lu, T. (2018). Designing microbial consortia with defined social interactions. *Nature Chemical Biology*, 14(8), 821-829. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0091-7>
- Lee, S. Y., Choi, J., & Wong, H. H. (1999). Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: Mini-review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 25(1-3), 31-36. [https://doi.org/10.1016/s0141-8130\(99\)00012-4](https://doi.org/10.1016/s0141-8130(99)00012-4)
- Li, S. Y., Dong, C. L., Wang, S. Y., Ye, H. M., & Chen, G.-Q. (2011). Microbial production of polyhydroxyalkanoate block copolymer by recombinant *Pseudomonas putida*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(2), 659-669. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3069-2>
- Liu, Q., Luo, G., Zhou, X. R., & Chen, G.-Q. (2011). Biosynthesis of poly(3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating polyhydroxyalkanoates by β -oxidation pathway inhibited *Pseudomonas putida*. *Metabolic Engineering*, 13(1), 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.10.004>
- Löwe, H., Hobmeier, K., Moos, M., Kremling, A., & Pflüger-Grau, K. (2017). Photoautotrophic production of polyhydroxyalkanoates in a synthetic mixed culture of *Synechococcus elongatus* cscB and *Pseudomonas putida* cscAB. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 190. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0875-0>

- Löwe, H., Schmauder, L., Hobmeier, K., Kremling, A., & Pflüger-Grau, K. (2017). Metabolic engineering to expand the substrate spectrum of *Pseudomonas putida* toward sucrose. *MicrobiologyOpen*, 6(4). <https://doi.org/10.1002/mbo3.473>
- Madison, L. L., & Huisman, G. W. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 63(1), 21-53.
- Manoli, M.-T. (2020). *Optimización del metabolismo de polihidroxicanoatos de Pseudomonas putida KT2440 mediante abordajes de biología sintética y de sistemas*. <https://digital.csic.es/handle/10261/226479>
- Mato Aguirre, A., & Mato Aguirre, A. (2019, noviembre 25). *Strategies for expanding the functionalization of bacterial polyesters* [Info:eu-repo/semantics/doctoralThesis]. Universidad Complutense de Madrid. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/59499/>
- Możejko-Ciesielska, J., & Kiewisz, R. (2016). Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*, 192, 271-282. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.07.010>
- Nogales, J., Palsson, B. Ø., & Thiele, I. (2008). A genome-scale metabolic reconstruction of *Pseudomonas putida* KT2440: I JN746 as a cell factory. *BMC Systems Biology*, 2(1), 79. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-2-79>
- Ochoa Carreño, D. C., & Montoya Restrepo, A. (2010). Consorcios microbianos: Una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. *Revista Facultad de Ciencias Económicas*, 18(2), 55-74. <https://doi.org/10.18359/rfce.2272>
- Palleroni, N. J., & Palleroni, A. V. (1978). *Alcaligenes latus*, a New Species of Hydrogen-Utilizing Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 28(3), 416-424. <https://doi.org/10.1099/00207713-28-3-416>
- Penloglou, G., Chatzidoukas, C., & Kiparissides, C. (2012). Microbial production of polyhydroxybutyrate with tailor-made properties: An integrated modelling approach and experimental validation. *Biotechnology Advances*, 30(1), 329-337.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.06.021>

Prata, J. C., Silva, A. L. P., Walker, T. R., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2020). COVID-19 Pandemic Repercussions on the Use and Management of Plastics. *Environmental Science & Technology*, *54*(13), 7760-7765. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02178>

Prieto, A., Escapa, I. F., Martínez, V., Dinjaski, N., Herencias, C., de la Peña, F., Tarazona, N., & Revelles, O. (2016). A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, *18*(2), 341-357. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12760>

Publicaciones: PlasticsEurope. (s. f.-a). Recuperado 15 de mayo de 2021, de

<https://www.plasticseurope.org/es/resources/publications/1804-plastics-facts-2019>

Razzak, S. A., Ali, S. A. M., Hossain, M. M., & deLasa, H. (2017). Biological CO₂ fixation with production of microalgae in wastewater – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *76*, 379-390. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.02.038>

Rehm, B. H. A. (2003). Polyester synthases: Natural catalysts for plastics. *The Biochemical Journal*, *376*(Pt 1), 15-33. <https://doi.org/10.1042/BJ20031254>

Rhodes, C. J. (2018). Plastic pollution and potential solutions. *Science Progress*, *101*(3), 207-260. <https://doi.org/10.3184/003685018X15294876706211>

Rojo, F. (2010). Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: Optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiology Reviews*, *34*(5), 658-684. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00218.x>

Smith, R., Tanouchi, Y., & You, L. (2013). Synthetic Microbial Consortia and their Applications. En *Synthetic Biology* (pp. 243-258). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394430-6.00013-3>

Sucrose/D-Glucose Assay Kit. (s. f.). Megazyme. Recuperado 15 de junio de 2021, de <https://www.megazyme.com/sucrose-d-glucose-assay-kit>

Synechococcus. (2021). En *Wikipedia, la enciclopedia libre*.

<https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Synechococcus&oldid=132997672>

- Tan, G.-Y. A., Chen, C.-L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I. M. N., Li, Y., Zhao, L., Mo, Y., & Wang, J.-Y. (2014). Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers*, 6(3), 706-754. <https://doi.org/10.3390/polym6030706>
- Thorat Gadgil, B. S., Killi, N., & Rathna, G. V. N. (2017). Polyhydroxyalkanoates as biomaterials. *MedChemComm*, 8(9), 1774-1787. <https://doi.org/10.1039/C7MD00252A>
- Timmis, K. N. (2002). *Pseudomonas putida*: A cosmopolitan opportunist par excellence. *Environmental Microbiology*, 4(12), 779-781. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00365.x>
- Wang, Q., & Nomura, C. T. (2010). Monitoring differences in gene expression levels and polyhydroxyalkanoate (PHA) production in *Pseudomonas putida* KT2440 grown on different carbon sources. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(6), 653-659. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.08.001>
- Yu, J. (2007). Microbial Production of Bioplastics from Renewable Resources. En *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources* (pp. 585-610). <https://doi.org/10.1016/B978-044452114-9/50024-4>
- Zavřel, T., Sinetova, M. A., & Červený, J. (2015). Measurement of Chlorophyll a and Carotenoids Concentration in Cyanobacteria. *Bio-protocol*, 5(9), e1467-e1467.
- Zhang, H., & Wang, X. (2016). Modular co-culture engineering, a new approach for metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 37, 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.05.007>

ANEXO 1

Composición de la solución de sales de BG11 (100X) empleada para el medio BG11-HP.

Solución salina de BG11 (100X)	
Componentes	g*L ⁻¹
K₂HPO₄	3,48
MgSO₄·7 H₂O	7,5
CaCl₂·2 H₂O	3,6
Ácido cítrico · H₂O	0,65628
Citrato de amonio hierro (III)	0,6
Na₂EDTA · 2 H₂O	0,10383
Na₂CO₃	2
H₃BO₃	0,286
MnCl₂ · 4 H₂O	0,181
ZnSO₄ · 7 H₂O	0,022
Na₂MoO₄ · 2 H₂O	0,039
CuSO₄ · 5 H₂O	0,0079
CoCl₂	0,0022