

SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
TECNOLÓGICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ



SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA

**SEP**

## TRABAJO PROFESIONAL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE:

# INGENIERO BIOQUÍMICO

QUE PRESENTA:

**BETSY ANAID PEÑA OCAÑA**

CON EL TEMA:

**"Desarrollo de un sistema de control de pureza para *Synechococcus elongatus* PCC7942"**

MEDIANTE :

**OPCION I  
(TESIS PROFESIONAL)**

TUXTLA GUTIERREZ, CHIAPAS

OCTUBRE 2013



**“Desarrollo de un sistema de control de pureza para  
*Synechococcus elongatus* PCC7942”**

TESIS  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:  
LICENCIATURA EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA.

**QUE PRESENTA:**

*Roberto Alejandro Pérez Ocaña*

DIRECTOR DE TESIS  
**Dr. Luis R. Herrera Estrella.**

CO-DIRECTOR DE TESIS  
**Dr. Reiner Rincón Rosales.**

**Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.**

**Octubre 2013.**

## Dedicatoria.

Dedico esta tesis a Dios por guiarme hasta el final de este pequeño sendero y demostrarme que aunque algunas veces las cosas no son como yo deseo, siempre son de acuerdo a tu voluntad. Y por su voluntad.

A mi familia, por su apoyo, consejos, comprensión, amor, y ayuda en los momentos difíciles. Porque a pesar de la distancia, siempre me hicieron sentir que estaban cerca de mi. Por enseñarme todo lo que soy como persona.

**Papishi**, gracias por creer en mi y apoyar cada una de mis locuras, por confiar en cada una de mis decisiones, por ser ese hombro para llorar cuando lo necesitaba y por permitirme soñar y enseñarme que cada sueño es una meta a perseguir.

**Mami**, gracias por cuidarme y apoyarme a pesar de que eso significó dolor a tu corazón. Por el enorme sacrificio que significó para ti verme partir para realizar mi sueño, por no cortar mis alas cuando decidí volar, se que fue una decisión difícil, pero tu comprensión fue mi motivación para no fallar y alcanzar mi sueño.

### **A mis hermanos.**

**Hector**, tus oraciones fueron de bendición y apoyo. Pude sentir tu amor hacia mi.

**Wera** desde el principio hasta el día hoy sigues dándome ánimo para continuar, por tus consejos y palabras de aliento iiiiiiinterminables, mil gracias.

**Negrita** gracias por el incondicional apoyo y cariño hacia mi, te amo. Gracias por estar dispuesta a escucharme a cada 2 minutos cuando lo necesitaba.

### **A mis sobrinos.**

Gracias por comprender las ausencias en cumpleaños (**Vale**), graduaciones (**Bere**), nacimientos, primeros pasos, dientes y palabras (**Eliacim**), y demás eventos importantes en sus vidas. Lamento las lagrimas que derramaron por mi ausencia. No prometo no volver a ausentarme, pero si prometo que siempre pensaré en ustedes y los llevaré en mi corazón. ¡Los amo!

Carlos te agradezco el apoyo y motivación, Gracias Mama Carmela por escucharme y amarme tal como soy, Papa David y Tía Lupita gracias por las palabras y motivación a seguir adelante, Tío Efraín, Tía Mary, Tío Rodrigo y Tía Juanita por sus oraciones y bendiciones a mi vida, gracias.

Es a ustedes, a mi familia amada a quienes dedico esta tesis, porque en todo momento, sentí su cariño, su apoyo, pero sobretodo, por la fe que en mi tuvieron.

Con amor, Betsy.

## Agradecimientos.

Agradezco a la empresa **Stela Genomics** por la confianza y el apoyo económico para la realización de este trabajo. Por depositar en mi su confianza en un proyecto tan importante, es de gran valor para mi.

Al Dr. Luis Herrera Estrella por la paciencia, la dirección y confianza a lo largo de mi estancia en su laboratorio. Por brindarme la oportunidad de aprender en el mundo de la investigación científica, con el mejor de los maestros.

A la Dra. Damar López Arredondo por la confianza y sus atinadas asesorías. Por entender en algún momento mi debilidad por el calor de hogar, por la paciencia ante mis actos de rebeldía, gracias.

Agradezco grandemente al Dr. Marco Antonio Leyva por la asesoría, consejos, apoyo, ánimo y la infinita paciencia que me brindó a lo largo de estos años. Gracias por compartir tus conocimientos conmigo con ese divino arte de enseñar que posees. Por convertirte en un amigo y en momentos hasta en mi confidente.

Gracias también a mis compañeros de laboratorio, por el apoyo intelectual y moral en esos días de "*otra vez, no salió nada*", y por la oportunidad entrar en sus vidas durante estos años de convivir dentro y fuera del lab. Ara gracias por el apoyo y atender cada una de mis solicitudes. Lenin por compartir tan "amablemente" tus pipetas, reactivos y secretos en el arte de extraer RNA. Rosy gracias por hacer mi trabajo mil veces mas fácil, por tu amistad y disposición para ayudarme. Ful gracias por tus enseñanzas, y estar siempre atento para escuchar, Alan por tu amistad y ayuda en el laboratorio. Lolis gracias por defenderme de Lenin y siempre regalarme una sonrisa. Sandy por esos momentos de ayuda y amistad dentro y fuera del lab. Javi por escuchar atentamente y responder cada una de mis dudas gracias!. Marybel por el apoyo técnico y discusión de resultados. Anahi, Poncho, Kike gracias por hacer mas amena y divertida mi estancia en el laboratorio.

Al personal de LANGEBIO Andrea, Bety Jiménez por las facilidades brindadas a la elaboración de este proyecto.

A mis amigos Celia, Frank, Leidi gracias por la ayuda y amistad a lo largo de esta difícil pero bella carrera.

A German por la compañía y motivación en la escritura de esta tesis. Las veladas por internet en las que me motivaste a seguir escribiendo, Gracias por la paciencia que hasta hoy me sigues regalando.

A Florecita Alcantar Por tu amistad, cuidados y complicidad. Gracias por convertirte en mi familia durante estos años. Nuestra amistad se cuenta por parte, no es fácil compartir tanto espacio con la misma persona, casa, carro, laboratorio, platicas, paseos, conciertos, lágrimas y podría seguir la lista interminable, te llevo con cariño en mi corazón. Hasta pronto.

Manu por todas las horas de discusión de resultados, no solo me enoje jajaja también aprendí mucho. Gracias por apoyarme en esta aventura, guardo todos esos momentos en mi corazón.

Al ITTG por ser un excelente espacio de formación y estudio.

A mis maestros, sin excepción alguna, agradezco a quienes en todo momento me motivaron, agradezco también a los maestros con sus palabras me hicieron luchar por salir adelante y probarme a mi misma que se puede llenar tan lejos como el cielo lo permita, gracias por fortalecer mi determinación a ser mejor, a pesar del castigo o la adversidad y por supuesto que no puedo dejar de agradecer a los maestros que fueron mis ejemplos a seguir: QBP Aura Flores, gracias por sus enseñanzas y su esfuerzo en hacer relucir lo mejor de mi, tiene usted mi admiración y respeto. Dr. Miceli gracias por la atención brindada a este trabajo, contar con su apoyo y respaldo ha sido de gran valor para mi. Ing. Javier Ramírez, gracias por su apoyo incondicional durante mis estudios en esta

institución.

En muy especial manera gracias Dr. Reiner Rincón Rosales, por creer en mi cuando nadie mas lo hizo, y darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación ser mi guía y mi mentor, Gracias por enseñarme a confiar en mi misma y en mi instinto como estudiante y mostrarme el mundo de la investigación científica, gracias por enseñarme que un intento fallido en el laboratorio, no es más que una pequeña victoria, en el largo camino hacia el objetivo. Gracias por su apoyo no solamente por este período de tesis, sino por lo que antecede y trasciende a este período, forma parte importante de mi vida como estudiante y como ser humano. Gracias por esa profunda huella que ha dejado en mi.

Y a todas las personas que directa o indirectamente estuvieron apoyándome en esta etapa.

¡¡GRACIAS!!

# ÍNDICE

**Índice.**

**Índice de Figuras.**

**Índice de Tablas.**

**Resumen.** 1

**Abstract.** 2

**I. Introducción.** 3

**II. Antecedentes.**

**II. I. Las cianobacterias.**

**II.I.I Historia y evolución.** 6

<b>II.I.II</b> Clasificación	9
<b>II. II.</b> Transformación genética de cianobacterias.	11
<b>II. III.</b> Importancia biotecnológica de las cianobacterias.	14
<b>II. III. I.</b> Fijación biológica de nitrógeno (FBN).	15
<b>II. III. II.</b> Metabolitos útiles en farmacología.	17
<b>II. III. III.</b> Nutrición humana.	19
<b>II. III. IV.</b> Biocombustibles a través de cianobacterias.	21
<b>II. III. V.</b> Biorremediación.	22
<b>II. III. VI.</b> Obtención de bioplásticos.	24
<b>II. III. VII.</b> Floraciones de cianobacterias (BLOOMS).	25
<b>II. III. VIII.</b> Tóxicas.	27
<b>II. IV.</b> Sistemas de cultivo de cianobacterias.	27
<b>II. IV. I.</b> Sistemas cerrados.	28
<b>II. IV. I. I.</b> Fotobiorreactores tubulares.	29
<b>II. IV. I. II.</b> Reactores con forma $\alpha$ .	29
<b>II. IV. I. III.</b> Fotobiorreactores con superficie plana.	30
<b>II. IV. I. IV.</b> Fotobiorreactores tipo fermentador de tanque	
Agitado.	30

<b>II. IV. II</b> Sistemas abiertos.	31
<b>II. V.</b> Fósforo macronutriente esencial para la vida.	34
<b>II. VI.</b> El fosfito no puede ser utilizado como fuente de fósforo.	36
<b>II. VII.</b> Uso de fosfito en la agricultura.	36
<b>II. VIII.</b> Metabolismo de fosfito.	37
<b>II: IX.</b> Metabolismo del fosfito en <i>P. stutzeri</i> .	39
<b>II. X.</b> Sensibilidad de <i>S. elongatus</i> PCC7942 a fosfito.	40
<b>III. Hipótesis.</b>	44
<b>IV. Objetivos.</b>	
<b>IV. I.</b> Objetivo general.	45
<b>IV. II.</b> Objetivos específicos.	45
<b>V. Materiales y métodos.</b>	
<b>V. I.</b> Ubicación de lugar de trabajo.	46

<b>V. II.</b> Microorganismos utilizados y condiciones de cultivo.	46
<b>V. II.I.</b> Cianobacteria.	47
<b>V. II. II.</b> Bacteria.	50
<b>V. III.</b> Recolección de células.	51
<b>V. IV.</b> Generación de las construcciones empleadas para transformar	
<i>S. elongatus</i> PCC7942 .	51
<b>V. IV. I.</b> Diseño del plásmido pSyn_1/D-TOPO-PNi:PTXD.	52
<b>V. IV. II.</b> Amplificación del gen PTXD de <i>P. stutzeri</i> WM88.	52
<b>V. IV. III.</b> Electroforesis.	53
<b>V. IV. IV.</b> Purificación del producto de PCR del gen PTXD.	54
<b>V. IV. V.</b> Cuantificación de DNA.	56
<b>V. IV. VI.</b> Clonación del gen PTXD en el plásmido	
pSyn_1/D-TOPO.	56
<b>V. IV. VII.</b> Transformación genética de células	
electrocompetentes de <i>E. coli</i> DH5- $\alpha$ .	58
<b>V. IV. VIII.</b> Extracción de DNA plasmidico de <i>E. coli</i> .	
(MINIPREP).	60
<b>V. IV. IX.</b> Restricción enzimática.	62

<b>V. V.</b>	Transformación de células de <i>S. elongatus</i> PCC7942.	64
<b>V. V. I.</b>	Protocolo de transformación.	65
<b>V. V. II.</b>	Protocolo de transformación "Clerico et al., 2007 (modificado)".	66
<b>V. VI.</b>	Análisis de transformantes.	
<b>V. VI. I.</b>	PCR de colonia.	67
<b>V. VII.</b>	Generación del vector pSyn_1/D-TOPO-PnirA-PTXD.	
<b>V. VII. I.</b>	Amplificación del gen PnirA de <i>S. elongatus</i> PCC7942.	68
<b>V. VII. II.</b>	Electroforesis.	69
<b>V. VII. III.</b>	Clonación del promotor PnirA en el vector pJet.	70
<b>V. VII. IV.</b>	Restricción enzimática.	72
<b>V. VIII.</b>	Transformación de <i>S. elongatus</i> PCC7942 con el vector pSyn_1/D-TOPO-PnirA::PTXD.	78
<b>V. IX.</b>	Análisis de transformantes.	78
<b>V. IX. I.</b>	PCR de colonia.	78
<b>V. X.</b>	Cinéticas de crecimiento de <i>S. elongatus</i> PCC7942.	79
<b>V. X. I.</b>	Cinética de crecimiento de <i>S. elongatus</i> PCC7942 en medios de cultivo con fosfato y/o fosfito como fuente	

de fósforo.	80
<b>V. X. II.</b> Cinética de crecimiento de las líneas transformantes con el plásmido pSyn_1/D-TOPO-PTXD.	81
<b>V. X. III</b> Cinética de crecimiento de <i>S. elongatus</i> con plásmido pSyn_1/D-TOPO-PTXD en presencia de níquel.	82
<b>V. X. IV.</b> Cinética de crecimiento de las líneas transformantes plásmido pSyn_1/D-TOPO-PnirA-PTXD.	83
<b>V. X. V.</b> Cinética de crecimiento de las líneas transformantes plásmido pSyn_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11 suplementado con ácido nicotínico.	84
<b>V. X. VI.</b> Cinética de crecimiento de las líneas transformantes plásmido pSyn_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11 enriquecido con sacarosa.	84
<b>V. X. VII.</b> Cinética de crecimiento de las líneas transformantes plásmido pSyn_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11 con alta concentración de hierro.	85
<b>V. X. VIII.</b> Efecto de la adaptación (aclimatación) a Phi.	86

## **VI. Resultados.**

<b>VI. I.</b> Cinética de crecimiento de <i>S. elongatus</i> PCC7942 en concentraciones ascendentes de fosfato y/o fosfito.	87
<b>VI. II.</b> Amplificación del gen PTXD de <i>P. stutzeri</i> WM88.	89
<b>VI. III.</b> Clonación del gen PTXD de <i>P. stutzeri</i> WM88.	89
<b>VI. IV.</b> Transformación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> (DH5- $\alpha$ ) con el plásmido pSyn_1/D-TOPO-PTXD.	90
<b>VI. V.</b> Transformación de <i>S. elongatus</i> PCC7942 con plásmido pSyn_1/D-TOPO-PTXD.	94
<b>VI. VI.</b> Análisis de transformantes.	
<b>VI. VI. I.</b> PCR de colonia.	94
<b>VI. VI. II.</b> Cinética de crecimiento de las líneas transformantes PNi::PTXD.	95
<b>VI. VII.</b> Amplificación de promotor inducible por nitrato (PnirA) de <i>S. elongatus</i> PCC7942.	99
<b>VI. VIII.</b> Clonación de PnirA en el vector pJet.	101
<b>VI. IX.</b> Clonación de PnirA en pSyn_1/D-TOPO-PTXD.	102

<b>VI. X.</b> Análisis del vector pSyn_1/D-TOPO-PnirA-PTXD.	102
<b>VI. X. I.</b> PCR.	102
<b>VI. X. II.</b> Secuenciación.	104
<b>VI. XI.</b> Transformación de <i>S. elongatus</i> con el vector pSyn_1/D-TOPO-PnirA-PTXD.	107
<b>VI. XII.</b> Análisis de transformantes.	108
<b>VI. XIII.</b> Cinética de crecimiento de <i>S. elongatus</i> transformada con el vector pSyn_1/D-TOPO-PnirA-PTXD.	108
<b>VI. XIII. I.</b> Cinética en concentraciones ascendentes de fosfato y/o fosfito.	108
<b>VI. XIII. II.</b> Cinética de crecimiento en medio BG-11 suplementado con ácido nicotínico.	111
<b>VI. XIII. III.</b> Cinética de crecimiento en medio BG-11 suplementado con sacarosa.	115
<b>VI. XIII. IV.</b> Cinética de crecimiento en medio BG-11 suplementado con hierro.	121
<b>VI. XIV.</b> Efecto de la adaptación (aclimatación) a Phi.	125

<b>VII. Discusión.</b>	136
<b>VIII. Conclusiones.</b>	140
<b>IX. Perspectivas.</b>	142
<b>X. Bibliografía.</b>	144
<b>XI. Anexos.</b>	157

## Índice de Tablas.

<b>Tabla 1.</b>	Composición del medio de cultivo BG-11 para <i>S. elongatus</i> .	48
<b>Tabla 2.</b>	Elementos traza de la solución de metales para medio BG-11.	49
<b>Tabla 3.</b>	Composición medio LB para el cultivo de células de <i>E. coli</i> .	50
<b>Tala 4.</b>	Condiciones de cultivo para experimentos adaptación a Phi.	86

## RESUMEN.

En la actualidad, la creciente demanda de metabolitos útiles en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmetóloga, biomédica, entre otras, exige la creación de alternativas verdes y sustentables para la obtención de dichos productos de interés comercial. Las cianobacterias se propusieron como una alternativa promisoría para saciar estos requerimientos; sin embargo, no han tenido el impacto esperado debido, entre otras cosas, a las dificultades asociadas a los sistemas de su cultivo a gran escala. Uno de los retos más grandes es el mantenimiento de monocultivos, por lo que la creación de un sistema de control de pureza beneficiaría el uso de sistemas abiertos, asegurando así la asepsia de cultivos con altos requerimientos de calidad sanitaria.

Proponemos la creación de un sistema de control de pureza basado en el uso de cianobacterias transgénicas que expresen la enzima fosfito oxidoreductasa (PTXD) de origen bacteriano, que permita el uso de fosfito (Phi) como única fuente de fertilización fosfatada y a su vez, ser un agente control de biocontaminantes.

En este trabajo se reporta que la transformación del gen codificante para la enzima PTXD en *Synechococcus elongatus* no le confiere a ésta la capacidad de metabolizar Phi. Lo que sugiere que para lograr esta meta es necesaria la expresión del conjunto de genes (operón ptx) involucrados en este proceso.

## **ABSTRACT.**

Nowadays, there is an increasing demand for metabolites that are useful in the food, pharmaceutical, cosmetology and biomedical industries, but its production generates huge environmental problems. So, it is required the creation of green and sustainable alternatives in order to obtain this products of commercial interest. Cyanobacteria were proposed as a promising alternative to satisfy these requirements, but they have not had the expected impact due to the difficulties associated to its large-scale cultivation. One of the biggest challenges is the maintaining of monocultures, so the creation of a purity control system would benefit to the open systems. The control system ensures aseptic and sanitary quality requirements in the cultures.

It is proposed the creation of a purity control system based on the use of transgenic cells of cyanobacteria expressing the phosphite oxidoreductase enzyme (PTXD) from bacterial origin. This would permit the use of phosphite as the sole source of phosphorus fertilization and at the same time, would function as a contamination control agent.

In this work, it is reported that the transformation of the encoding gene for the PTXD enzyme in *Synechococcus elongatus* does not confer the ability to metabolize Phi in this cyanobacterium. This suggests that to perform this it is required the expression of all genes (ptx operon) involved in this process.

# I. INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias son organismos procariotas que tienen la capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica, fijando CO<sub>2</sub> y utilizando agua como donador de electrones (Whitton & Potts, 2000; Flores & Herrero, 2005). Han tenido una larga evolución desde hace 2,8 a 3,5 millones de años (Knoll, 2008), durante este tiempo se han adaptado a los diversos cambios que ha sufrido el planeta sobreviviendo en ambientes que en ocasiones fueron extremos.

Actualmente muchas cianobacterias tienen un lugar privilegiado debido a que participan en procesos biológicos importantes o se han utilizado en diversas aplicaciones a nivel industrial, que van desde la fijación de nitrógeno, la producción de toxinas, la floración de blooms, hasta su cultivo para alimentación humana y su valor farmacológico.

Las cianobacterias generan gran interés no solo debido a su aplicación industrial, si no también a las ventajas que estas poseen para realizar investigación científica de gran interés, un ejemplo de cianobacteria que es empleada como modelo de estudio para dicho fin es *Synechococcus elongatus* pese a que no se conoce una aplicación biotecnológica o patología adjudicada a ésta *Synechococcus elongatus*, el hecho de tener un genoma totalmente secuenciado (Vijayan et al., 2011), y ser fácilmente cultivable, han permitido la realización de investigaciones tales como: estudios de ciclo circadiano (Hanaoka & Tanaka, 2008, Williams et al., 2002, Zouni

et al., 2001), de mecanismos en la ruta de asimilación de nutrientes como el nitrato (Fadi Aldehni et al., 2003, Gorl, Sauer, & Forchhamer, 1998) , y la búsqueda de nuevas alternativas que permitan la mejora de cultivos y metabolitos de interés (Rosales-Loaisa et al, 2008) son algunas de las investigaciones realizadas en esta cianobacteria.

En general, la mayoría de los sistemas de cultivo de cianobacterias tienen elevados requerimientos de nutrientes y son altamente susceptibles a contaminación. Por esta razón se requieren alternativas que permitan optimizar los sistemas de cultivo, y satisfacer la demanda de nutrientes requeridos, así como el mantenimiento de monocultivos.

En un estudio reciente López-Arredondo y Herrera-Estrella, (2012) reportaron el efecto benéfico que produce el fosfito como fertilizante fosfatado y a su vez como agente control de malezas en cultivos de plantas transgénicas que poseen una enzima de origen bacteriano capaz de convertir el fosfito en fosfato. Las plantas modificadas de esta manera fueron capaces de utilizar el fosfito para producir biomasa de una manera 50% más eficiente que bajo un esquema de fertilización con una fuente normal de fosfato (Lopez-Arredondo & Herrera-Estrella, 2012). Esto se debió a que el fosfito posee ventajas frente al fosfato como mayor solubilidad y menor reactividad, además de representar una fuente indisponible de fósforo para la mayoría de los microorganismos (Morton y et al., 2005; White y et al., 2007).

Por lo anterior surge la posibilidad de adaptar la tecnología del uso de fosfito para reducir el uso de nutrientes en el cultivo de cianobacterias y a su vez funcionar como inhibidor del crecimiento de microorganismos indeseados frecuentemente presentes en los sistemas de cultivo abierto e incluso en los sistemas cerrados crecidos heterotróficamente (Chen y et al., 2011). Mediante el uso de herramientas moleculares, se introdujo al material genético de *S. elongatus* el gen codificante para la enzima fosfito deshidrogenasa con el propósito de generar una cepa capaz de crecer en un medio de cultivo que contenga Phi como única fuente de fósforo y al mismo tiempo que pudiera evitar la toxicidad característica del Phi que inhibiría el crecimiento de otros microorganismos.

## **II. ANTECEDENTES**

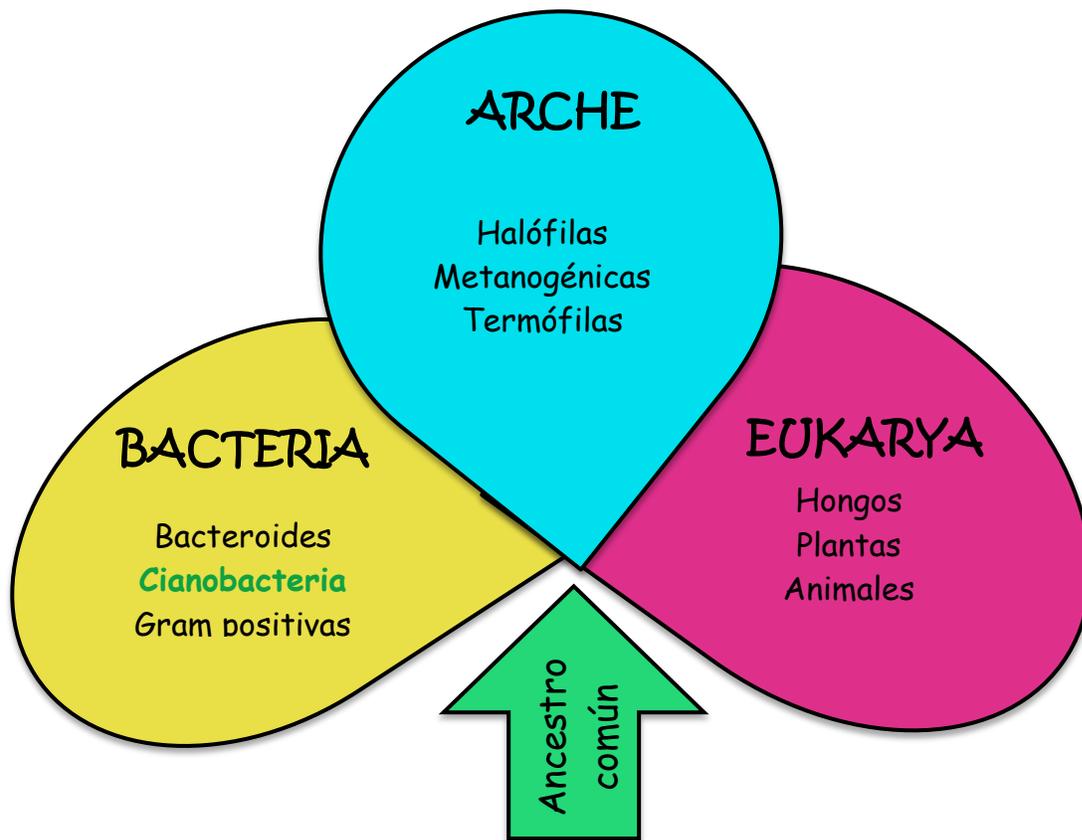
### **II.I Las Cianobacterias.**

#### **II.I.I Historia y evolución.**

Las cianobacterias son un grupo diverso aunque bien definido de eubacterias perteneciente al dominio Bacteria (Woese, 1990) y subdominio Prokaryota (Mayr, 1990) (**Figura 1**), capaces de desarrollar fotosíntesis oxigénica análoga a la que desarrollan las plantas, y con un aparato fotosintético muy similar al de éstas (Stanier & Cohen-Bazire, 1977; Woese, 1987). Se les considera las principales responsables de la acumulación de oxígeno atmosférico a lo largo de la evolución de la Tierra.

Se estima que el origen de las cianobacterias es muy primitivo (hace unos 2.800-3.500 millones de años), desempeñando un papel crucial en la evolución del ambiente geoquímico y de la vida en la Tierra, al promover la transformación de la atmósfera desde un estado reductor inicial hasta su actual estado oxidante, además de ser las causantes de la aparición de la capa de ozono protectora de la radiación ultravioleta (Schopf, 1993). Por otro lado, según la teoría del endosimbionte, las cianobacterias son los microorganismos que dieron lugar al cloroplasto eucariótico (Gray, 1989). En la actualidad, estos organismos ocupan hábitats muy diversos, estando presentes en gran variedad de ecosistemas estudiados: aguas oceánicas y continentales, suelos y ambientes extremos, aguas

termales y desiertos (Tandeau de Marsac & Houmard, 1993).



**Figura 1. Árbol de la vida.** Construido a partir de la comparación de las secuencias de los ARN ribosómicos 16S y 18S. Dentro de cada dominio solo se muestran algunos organismos de cada linaje. La flecha verde es la raíz hipotética del árbol y representa el antecesor común de todas las células. Modificado de Aharon Oren, 2008.

Desde el punto de vista metabólico, todas las cianobacterias conocidas son capaces de vivir en condiciones fotoautotróficas, aunque algunas pueden crecer además en condiciones heterotróficas en presencia de alguna fuente de carbono. La fijación de dióxido de carbono atmosférico la llevan a cabo mediante el Ciclo de Calvin. Como peculiaridad en el metabolismo del carbono, las cianobacterias

poseen un Ciclo de Krebs incompleto, debido a la carencia de la enzima 2-oxoglutarato deshidrogenasa, quedando este ciclo como una ruta de función anabólica que proporciona 2-oxoglutarato: la molécula de carbono sobre la que se realiza la fijación de nitrógeno (Stanier & Cohen-Bazire, 1977). La degradación de azúcares se lleva a cabo mediante la ruta oxidativa de las pentosas fosfato (Smith, 1982). Como fuente de nitrógeno las cianobacterias pueden utilizar nitrato, nitrito y amonio (Guerrero & Lara, 1987), aunque algunas cepas pueden utilizar además urea, algunos aminoácidos, o nitrógeno molecular atmosférico (Stewart, 1980; Flores & Herrero, 1994). En este último caso, algunas cepas han desarrollado células diferenciadas llamadas heterocistos, que aparecen en condiciones de ausencia de nitrógeno no atmosférico. Es en estas células especializadas donde se realiza el proceso de fijación de dinitrógeno, para separarlo espacialmente de la fotosíntesis y evitar así la inactivación irreversible de la nitrogenasa por oxígeno molecular (Wolk, 1982). Las cianobacterias capaces de incorporar nitrógeno molecular, pero que no desarrollan heterocistos, impiden la inactivación de la nitrogenasa mediante el incremento del metabolismo respiratorio y la separación temporal de los procesos de fotosíntesis y fijación de nitrógeno (Fay, 1992). El desarrollo de heterocistos no es el único caso de diferenciación celular presente en las cianobacterias, ya que algunas especies filamentosas forman acinetos, células de resistencia en condiciones desfavorables (Nichols & Adams, 1982), y hormogonios, células especializadas en la reproducción y la dispersión (Tandeau de Marsac, 1994).

## II.I.II Clasificación.

Las cianobacterias son muy diversas morfológicamente. (**Figura 2**). Existen especies tanto unicelulares como filamentosas, lo que ha llevado a su clasificación en cinco secciones (Rippka et al., 1979). La Sección I incluye estirpes unicelulares que se dividen por fisión binaria o por gemación, perteneciendo a esta división, entre otros, los géneros *Synechococcus* y *Synechocystis*. La Sección II, a la que pertenecen los géneros *Dermocarpa* y *Pleurocapsa* entre otros, está constituida por estirpes unicelulares que se reproducen por fisión múltiple y/o fisión binaria. En la Sección III aparecen estirpes que, como *Pseudanabaena* y *Spirulina*, son filamentosas no formadoras de heterocistos. Las Secciones IV y V la conforman especies filamentosas formadoras de heterocistos, representando la Sección IV especies que presentan división en un plano (como los géneros *Anabaena* y *Nostoc*), mientras que en la Sección V se clasifican especies con división en más de un plano (por ejemplo, el género *Fischerella*) (Giovannoni et al., 1988). Sin embargo, hoy día la clasificación de las cianobacterias está en revisión, provocada por el empleo de marcadores quimiotaxonómicos y el análisis comparativo de macromoléculas. De este modo, se ha demostrado que únicamente la Sección II, y las Secciones IV y V conjuntamente, forman grupos filogenéticos verdaderos.

Con objeto de incrementar el área fotosintéticamente activa, las cianobacterias han desarrollado un sistema de membranas intracitoplasmáticas (ICM), en el cual se localiza el aparato fotosintético de transporte de electrones. El pigmento básico fotosintético en las cianobacterias es la clorofila a, a diferencia de las plantas, que

también poseen clorofila b. Sin embargo, un grupo de cianobacterias, las proclorofitas, también presentan clorofila b. (Purves et al., 1992):



**Figura 2. Fotografías ejemplos de cianobacterias.** A) *Spirulina sp* B) *Nostoc sp.* C) *Synechocystis sp.* D) *Synechococcus elongatus* PCC7942. Tomado de **A)** wellstar company.com **B)** Rifka Biology, 2011. **C)** Kopfmann et al., 2013. Scholz et al., 2013. **D)** www.osel.cz ).

La mayoría de cianobacterias estudiadas son poliploides, presentando un alto número de copias cromosómicas (en torno a 12) por célula. Muchas cianobacterias pueden incorporar DNA exógeno a su genomio de manera estable por medio de un sistema de conjugación y recombinación homóloga (Porter, 1986). Además, se han

desarrollado técnicas de transferencia genética por transformación (Wolk et al., 1984; Flores & Wolk, 1985), con o sin electroporación (Thiel & Poo, 1989). Todo ello hace de las cianobacterias organismos ideales para el estudio molecular de los procesos fotosintéticos, respiratorios y metabólicos en general.

## II.II **Transformación genética de cianobacterias.**

La transferencia de DNA es una práctica común en un gran número de cepas de laboratorio muy diversas. La transformación natural, también ha quedado patente en algunas cianobacterias.

En cianobacterias los estudios más detallados relacionados con la transformación natural, se han llevado a cabo en *Synechocystis* sp. PCC 6803. Esta cianobacteria, cuyo genoma ha sido uno de los primeros secuenciados de organismos fotosintéticos (Kaneko *et al.*, 1996), es transformable de forma natural con alta eficiencia (Zang *et al.*, 2007). Debido a su simple organización genética, y amplia flexibilidad metabólica (puede crecer heterótroficamente y fotoautótroficamente, este organismo se ha convertido en un excelente candidato para la manipulación genética en cianobacterias. En concreto, *Synechocystis* sp. PCC 6803, ha servido para analizar en qué medida algunos factores afectan a la transformación natural de cianobacterias. Entre los factores examinados, se han estudiado con detalle algunos como la longitud, la forma (lineal o circular) y la concentración del DNA, el tiempo de incubación de la suspensión celular con el DNA, la presencia de

sustancias químicas y restos de DNA contaminantes, así como la influencia de factores propios de la cepa (Kufryk *et al.*, 2002; Zang *et al.*, 2007). El estudio de la transformación natural en esta cianobacteria, también ha permitido conocer las proteínas involucradas en el proceso (Nakasugi *et al.*, 2006), y ha supuesto el inicio del camino para entender con detalle los aspectos más relevantes de la transformación natural en otras cianobacterias.

En *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, tras la secuenciación de su genoma (Nakamura *et al.*, 2002), se han identificado algunos genes homólogos a los descritos como importantes para la transformación natural en *Synechocystis* sp. PCC 6803, tales como los homólogos a *recA*, *recF*, *recG*, *recJ*, *recQ*, *pilB*, *pilM*, *pilN*, *pilQ*, *comA*, *comE* y *comM* (Yoshihara *et al.*, 2001; Okamoto & Ohmori 2002; Yoshihara *et al.*, 2002). Además, a nivel experimental, M. Iwai et al y K. Onai et al (Iwai *et al.*, 2004; Onai *et al.*, 2004) demostraron que las células silvestres de *T. elongatus* BP-1 experimentaban transformación natural, aunque su eficiencia era menor que en *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Iwai *et al.*, 2004). Además, comprobaron que al igual que ocurre en otras cianobacterias (Stevens & Porter, 1980; Grigorieva & Shestakov, 1982), la eficiencia de la transformación era mayor cuando las células se encontraban en fase exponencial de crecimiento que cuando estaban en fase estacionaria.

*S. elongatus* PCC7942 es otra cianobacteria ampliamente utilizada como modelo de estudio en el campo de la biología molecular, y es la empleada en este trabajo



### II.III **Importancia biotecnológica de las cianobacterias.**

Las cianobacterias tienen muchas aplicaciones industriales y biotecnológicas las cuales impactan favorablemente a la economía y medio ambiente, así mismo existen algunos riesgos sanitarios aunados al crecimiento descontrolado de algunas especies productoras de toxinas o metabolitos indeseables. Algunos de estos se presentan en la **Figura 4** y se describen a continuación.



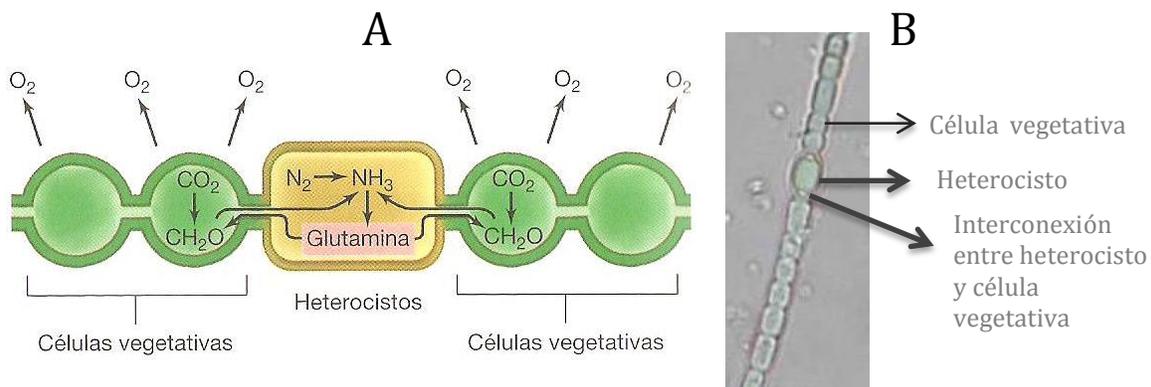
**Figura 4. Aplicaciones e impacto de las cianobacterias.** 1) Fijación biológica de nitrógeno. 2) Farmacología. 3) Alimentación humana. 4) Biocombustibles. 5) Bioplásticos y Biorremediación. 6) Blooms. 7) Toxinas.

### II.III.I Fijación biológica de Nitrógeno.

La vida en la Tierra tal como la conocemos no sería posible si algunos de los procariotas no hubieran conservado la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. El nitrógeno, aunque es un elemento abundante en la corteza terrestre, es muy poco biodisponible, y la mayoría del nitrógeno combinado que circula en los ciclos de materia, procede de fijación biológica. Esta capacidad que conservan algunas cianobacterias, tiene una gran relevancia ecológica y económica. En los océanos, se lleva a cabo el 30% de la introducción de nitrógeno global, y la mayor parte debido a las cianobacterias. Esta diazotrofia, junto con su fotoautotrofia, hace que el fitoplancton marino sea responsable aproximadamente el 66% de la producción primaria del planeta. Muchas cadenas tróficas tienen su base en la productividad primaria de cianobacterias. Sin duda, las cianobacterias son organismos cuyo crecimiento tiene unos requerimientos nutricionales muy bajos, con capacidad de obtener por sí mismas carbono y nitrógeno en presencia de luz. Esta característica hace que sean especialmente interesantes en biotecnología, debido al bajo costo de la producción de su biomasa. (Alcocer et al., 2008).

El uso de las cianobacterias como abono verde ha sido tradicionalmente utilizado por la humanidad. Como se ha indicado anteriormente, los suelos son de forma natural limitantes en el macronutriente nitrógeno, e incluso en la agricultura actual, los abonos nitrogenados suponen un alto coste económico y medioambiental.

Debido a que las cianobacterias combinan los mecanismos de fotosíntesis y respiración en la misma célula. Para fijar nitrógeno, algunos géneros tienen células especializadas denominadas heterocistos que regulan el proceso de difusión de  $O_2$ . El heterocisto presenta paredes gruesas que impiden el ingreso de  $O_2$  y allí se produce la fijación. El poder reductor para que se realice la fijación biológica de nitrógeno (FBN) se obtiene a partir del material orgánico producido en las células vegetativas adyacentes. La glutamina es la forma en que se transporta el nitrógeno fijado en los hetero



cistos a las células vegetativas. (Figura 5).

**Figura 5. Mecanismo de fijación biológica de nitrógeno (FBN) en cianobacterias filamentosas.** A) Mecanismo de FBN. B) *Anabaena* sp. Fotografía representando las estructuras involucradas en la FBN.

Sin embargo no todas las cianobacterias poseen heterocistos. Estas especies resuelven el problema de la FBN en forma alternativa. En un grupo de cianobacterias filamentosas no heterocísticas y unicelulares se observa la separación temporal de la FBN y fotosíntesis. La síntesis de la nitrogenasa se

realiza en las primeras horas del período de oscuridad y desaparece durante la fase de luz.

### II.III.II **Metabolitos útiles en farmacología.**

Las cianobacterias son fuente de multitud de metabolitos bioactivos de potencial interés farmacológico, todavía inexplorados. Producen gran cantidad de metabolitos con interés terapéutico, que incluyen antivirales, antitumorales, inhibidores de enzimas, protectores de luz ultravioleta entre otros efectos. (Skulberg 2005, Gademann & Kobylinska 2009, Jones et al., 2009). Se considera que la mayoría de los metabolitos secundarios de las cianobacterias constituyen uno de los grupos más prometedores en la búsqueda de nuevos productos bioactivos (Belay et al., 2002, Belay et al., 1993. Vazquez et al., 2009). Además de los productos naturales, las cianobacterias pueden ser utilizadas para la producción de metabolitos de interés, mediante recombinación génica, insertando los genes implicados en su síntesis.

Hay una larga lista de compuestos que se han estudiado desde el punto de vista farmacológico, pero solo se han identificado algunas de las rutas biosintéticas, y muy pocos genes responsables de la síntesis de estas moléculas (Cingi et al., 2008; Mao et al., 2005; Ramirez et al., 2002. Dartsch, 2008 ). Muchos de estos metabolitos son péptidos, alcaloides y policétidos, y su mecanismo de acción es muy variado. Estas moléculas han mostrado un potencial farmacológico

importante, en especial son muy interesantes como fármacos antipalúdicos y antitumorales (Sivonen et al., 2010).

Entre una gran variedad de alcaloides presentes en muchos géneros de cianobacterias, algunos tienen alto potencial antitumoral, así como efectos sobre la proliferación de otras células del fitoplancton. Un alcaloide aislado de *Nodularia harveyana*, muestra acción alelopática contra otras especies de cianobacterias (Volk, 2008) por lo que podría ser utilizado para controlar la proliferación de cianobacterias productoras de toxinas. Otros alcaloides, por ejemplo los aislados de *Hapalosiphon fontinalis*, *Fischerella musciola*, *Tolypothrix tjipanasensis* y *Hapalosiphon weilwitschi*, muestran también actividad alguicida, fungicida e insecticida (Gademann & Portmann 2008), pudiendo ser utilizados en plagas agrícolas. Fischerellina-A, obtenida de *Fischerella musciola* UTEX 1829 es un potente inhibidor del fotosistema II, y afecta a cianobacterias, algas y plantas, pudiendo ser utilizado como herbicida. (Resson et al., 1994; Gademann y Portmann 2008).

Especialmente relevantes son la calothrixina-A y la calothrixina-B, aisladas de cepas del género *Calothrix* capaces de inhibir el crecimiento de una cepa resistente a la cloroquina del parásito *Plasmodium falciparum* que causa la malaria (Rickards et al., 1999). *Synechococcus* PCC 6301 transformado con genes de compuestos tóxicos para mosquitos, procedentes de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus sphaericus* podrían ser una buena alternativa para destruir larvas de mosquitos que los ingieren y poder combatir así enfermedades transmitidas por mosquitos

(Sangthongpitag et al., 1997).

Muchos de estos compuestos son potentes antivirales, y se han ensayado con éxito para combatir infecciones por VIH, herpes simplex, citomegalovirus humanos, y virus de gripes. (Larsen et al., 1994, Mori et al., 1998)

Las protecciones que las cianobacterias han desarrollado a lo largo de la evolución para evitar daños de la luz ultravioleta pueden ser útiles para ser utilizadas como protectores solares (Jones et al., 2009). En la pared externa de las cianobacterias se producen pigmentos solubles, estos pigmentos tienen capacidad antiinflamatoria y antiproliferativa (Rastogi & Sinha 2009), por lo que tienen un alto potencial farmacológico.

### II.III.III **Nutrición humana.**

Las cianobacterias han sido utilizadas para nutrición humana y son fuente de suplementos alimenticios debido a que son una buena fuente de vitaminas, por ejemplo, 20 g de *Spirulina* aportan toda la vitamina B12 requerida en un día, así como el 70% de B1 (tiamina), el 50% de B2 (riboflavina) y el 12% de B3 (niacina) (Watanabe et al., 2002). *Spirulina* es rica en tocoferol (vitamina E) (Hudson & Karis 1974). Uno de los argumentos para el consumo de *Spirulina* es su contenido de ciertos ácidos grasos como el ácido gamma-linolénico (GLA) el cual es un ácido graso poliinsaturado que se encuentra en muy bajas proporciones en los alimentos, y al que se le atribuyen muchas funciones terapéuticas. Se está

utilizando actualmente para tratar enfermedades de la piel, vasculares y neuronales, como el Parkinson y la esclerosis múltiple. Su ingesta también ayuda a mantener bajos los niveles de colesterol; *Spirulina* se consideran una de las fuentes con mayor contenido de linolénico (Cingi et al., 2011).. *Aphanizomenon flos-aquae* contiene también cantidades significativas de este ácido graso (Kushak et al., 2000).

Los pigmentos fotosintéticos que contienen las cianobacterias han sido también considerados para su uso en alimentación. Las cianobacterias contienen únicamente clorofila *a*, y además de los carotenoides (antioxidantes muy utilizados, presentes en todos los vegetales) que se encuentran en los complejos antena de los fotosistemas, contienen unos pigmentos llamados ficoeritrinas y ficobilinas, que forman parte también de las antenas, unidos a una serie de proteínas específicas. Las ficobiliproteínas confieren el matiz azulado que da nombre al grupo, cianobacterias, bacterias azules. Además de las ficobilinas, también pueden contener eritrinas, y tener tonalidades rojizas. Estas ficobiliproteínas han sido utilizadas en los últimos años comercialmente en usos cosméticos, y mayoritariamente como colorante alimentario; colores azules o rojos de helados y caramelos, así como sombras de ojos, delineadores o labiales incorporan estos pigmentos que se consideran inofensivos y no causan alergias. (Bermejo et al., 2002; Kronick et al., 1986; Glazer 1994). Las ficobilinas tienen un altísimo coeficiente de extinción y también se podrían utilizar comercialmente como cromóforos para analítica o biosensores (Kronick et al., 1986).

Las cianobacterias pueden tener un alto contenido de carbohidratos, dependiendo éste de las condiciones de cultivo utilizadas. Las cianobacterias almacenan glucógeno, muy parecido al glucógeno animal, además, algunas cepas, como *Synechococcus* sp. MA (FERM P-15099) produce polihidroxiбутirato (PHB) en alta proporción, que puede ser utilizado para producción de plásticos biodegradables.

#### II.III.IV **Biocombustibles a partir de cianobacterias**

La biomasa procedente de cianobacterias para la obtención de biocombustibles está despertando un interés importante como alternativa para la obtención de energía sostenible. Las cianobacterias muestran unos requerimientos nutricionales muy rústicos, son transformables genéticamente, tienen una alta tasa de duplicación, y algunas cepas pueden presentar características muy interesantes para ser transformadas en combustibles. Además, el proceso puede formar parte de un programa de biorremediación de aguas eutrofizadas, secuestra CO<sub>2</sub> de la atmósfera, y no desvía alimentos de consumo humano. En años recientes, utilizar cultivos (soya, remolacha, caña de azúcar, maíz, jatrofa, etc.) normalmente destinados a consumo humano y/o animal para biocombustibles, ha generado problemas a países en desarrollo, provocando escasez y carestía de alimentos básicos. Además, la biomasa procedente de cianobacterias, tampoco implica deforestación, otro de los problemas de los biocombustibles de origen vegetal. Se

ha desarrollado abundante tecnología para la producción de biomasa de cianobacterias a gran escala, y se ha optimizado el uso de determinados tipos de cianobacterias. Por ejemplo, han seleccionado cepas ricas en lípidos (algunas de ellas, entre el 50 y el 70% referido a peso seco) para maximizar la producción de los biodiesel, o utilizando cepas recombinantes, se puede optimizar el proceso adicionando vías metabólicas fermentativas, que den lugar directamente a etanol (Deng & Coleman, 1999).

Una alternativa biotecnológica muy interesante, es la generación de hidrógeno por cianobacterias fijadoras de nitrógeno, o otras cianobacterias con distintos tipos de hidrogenasas. Durante la fijación biológica de nitrógeno, el complejo de la nitrogenasa tienen también actividad hidrogenasa y se produce H<sub>2</sub> como producto del proceso (Abedet al., 2009, Ananyev et al., 2008, Lindberg et al., 2000 y 2004, Tamagnini et al., 2007, Angermayr et al., 2009). Se han descrito 14 géneros de cianobacterias apropiados para producir hidrógeno (Dutta et al., 2005)

#### II.III.V

#### **Biorremediación**

La biorremediación es la utilización de organismos vivos para combatir problemas medioambientales. Las cianobacterias tienen un alto potencial como organismos que pueden contribuir a resolver algunos problemas de contaminación o desequilibrios ambientales.

También se ha puesto de manifiesto su eficacia en la regeneración de aguas residuales o eutrofizadas. Algunas cepas de cianobacterias han mostrado alta eficacia para degradar colorantes sintéticos, como rojo de metilo, fucsina básica utilizados en industrias textiles o papel impreso. Estos colorantes son muy tóxicos para el medioambiente, y carcinogénicos.

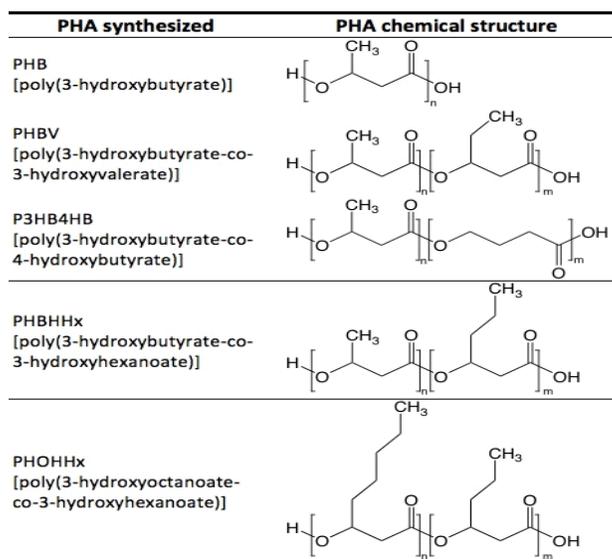
Las cianobacterias son también una interesante alternativa para el tratamiento de aguas residuales (Hall et al., 1995). *Anabaena* sp. PCC 7120 y *Nostoc ellipsosporum* tienen la propiedad de degradar lindano, un plaguicida altamente dañino para la salud humana (Kuritz & Wolk, 1995, Bueno et al., 2004).

Las industrias farmacéuticas producen desechos como residuos de antibióticos que no pueden liberarse al medio ambiente. Los ríos contienen una alta concentración de fármacos procedentes del alcantarillado, entre ellos antibióticos. Afortunadamente, algunas cianobacterias como por ejemplo *Phormedium valderianum*, son capaces de utilizar ciertos antibióticos como fuente de nitrógeno, degradándolos al utilizarlos (Prabaharan et al., 1994).

Las cianobacterias, solas o en combinación con otros organismos, muestran una gran capacidad de restauración de suelos degradados o suelos contaminados, especialmente en climas extremos, pueden ser tratados con cianobacterias siendo este tratamiento de gran eficacia (Abed et al., 2006). Suelos muy pobres, en climas áridos o semiáridos, pueden incrementar su fertilidad mediante los exopolisacáridos de las cianobacterias que mejoran la estructura del suelo, y el nitrógeno procedente de la fijación biológica (Maqubela et al., 2010).

## II.III.VI Obtención de bioplásticos

En condiciones de exceso de nutrientes, los microorganismos pueden almacenar diversos materiales para reserva futura. Las cianobacterias pueden acumular polihidroxicanoatos (PHAs), que polimerizan y pueden formar gránulos en el citosol. Los PHAs (**Figura 6**) pueden considerarse plásticos con propiedades similares a las del polipropileno, y se considera que es un material biodegradable, potencial sustituto de plásticos no degradables procedentes de derivados de petróleo (Khanna y Srivastava 2005; Salehizadeh y Van Loosdrecht 2004). También se propone su uso como biomaterial en medicina y farmacología. Algunas cepas de cianobacterias pertenecientes a los géneros *Spirulina* y *Synechocystis*, han mostrado acumulación de hasta un 7% de PHAs referido a peso seco (Abed et al., 2009).



**Figura 6. Ejemplos de PHAs comúnmente empleados en la industria.**

Tomado de PolyFerm Canada Inc. 2010.

## II.III.VII **Floraciones de cianobacterias (BLOOMS)**

Las cianobacterias no solo producen metabolitos benéficos, algunas ocasiones también pueden producir efectos negativos en el medio ambiente, o metabolitos tóxicos para su hábitad e incluso para los humanos. Por esta razón es importante un sistema que permita controlar estos sucesos naturales que causan estragos ambientales y económicos.

Una de las formas más frecuentes de contaminación de los ecosistemas acuáticos es a través de su enriquecimiento excesivo de nutrientes, conocido como eutrofización (*eutrofo en griego: bien nutrido*). Este fenómeno natural es un proceso lento, que puede durar hasta cientos de años y forma parte de transformación general del lago en pantano y finalmente en prado. A partir de la Revolución Industrial y la Revolución Verde, con el modelo de grandes urbanizaciones y grandes áreas de agricultura intensiva, se ha incrementado notablemente el aporte de nutrientes que provienen de aguas residuales no tratadas, de fertilizantes inorgánicos industriales o extractivos, abonos orgánicos y de desechos de industriales.

La eutrofización está íntimamente asociada con la proliferación de la población vegetal microscópica marina (fitoplancton), llamada "Bloom" o floración, que pasa a dominar un cuerpo de agua. Un fenómeno de este tipo se considera problemático a partir de una concentración de 20000 células/mL que equivale

aproximadamente a 10 ug/L de clorofila *a*.(Havens, 2008).

Los blooms causan graves impactos en un ecosistema. La proliferación de las cianobacterias en la comunidad de fitoplancton bloquea o disminuye la luz en las capas más profundas. Por esta razón, toda la flora presente en los estratos inferiores no recibe luz y muere. Durante la proliferación masiva de cianobacterias, el oxígeno disuelto (DO) en el agua disminuye, y durante la noche frecuentemente hay carencia de DO. Esto es debido a que, las células muertas son descompuestas, y esto requiere el consumo de mucho oxígeno (Diersing, 2009).

Este ambiente anóxico afecta negativamente a los organismos de diferentes niveles tróficos de la cadena alimentaria y además, el agua pasa a tener tanto un sabor como un olor desagradables.

Estos "blooms" o floraciones, que en medios marinos pueden constituir las llamadas mareas rojas, con dinoflagelados, muy frecuentemente pueden estar dominados por cianobacterias, ya que tienen una tasa de duplicación muy alta. En aguas continentales pueden formar grandes masas, que pueden dar lugar problemas diversos. Algunos de estos "blooms" de cianobacterias, pueden ser tóxicos, y los problemas ya no son solo medioambientales, sino también sanitarios.

### II.III.VIII **Toxinas**

Algunos de los metabolitos secundarios que producen algunas cianobacterias están en dosis que resultan tóxicas para humanos y animales. Por esta razón, desde el punto de vista antropocéntrico, se habla de cianotoxinas. No obstante, no hay que olvidar que estas mismas cianotoxinas pueden tener su acción terapéutica asociada, y que otros principios activos que hemos citado anteriormente, ingeridos indiscriminadamente y en dosis altas, pueden ser tóxicos también. Algunas cianotoxinas se han ensayado con éxito como fármacos, fundamentalmente antitumorales (Belay 1993; Chamorro et al., 1996; Chamorro et al., 2002). .

### II.IV **Sistemas de cultivo de cianobacterias.**

Los cultivos de cianobacterias son típicamente fotoautotróficos; sin embargo se presentan alternativas de cultivos en condiciones mixotróficas donde la asimilación oxidativa de los compuestos orgánicos y de CO<sub>2</sub> a través de las reacciones fotosintéticas ocurren simultáneamente (Lee & Erickson, 1987). De ahí que los factores en los que debemos de poner atención al cultivar cianobacterias son: suministro de luz, transferencia de masa de gases hacia el medio (CO<sub>2</sub>) y desde el medio (O<sub>2</sub>), suministro de nutrientes y remoción de metabolitos secundarios (Lee, 1999) así como control de temperatura, presión y pH.

Existen diferentes formas de cultivar cianobacterias, las más utilizadas son:

#### II.IV.I **Sistemas Cerrados**

Un sistema alternativo para el crecimiento de algas es mediante invernaderos, y estanques. Aunque se reduce el área de cultivo se solucionan muchos problemas que poseen los sistemas abiertos: menor probabilidad de contaminación por especies no deseadas, pueden cultivarse un mayor número de especies, el periodo de cultivo es mayor ya que hay control de la temperatura y puede incrementarse la cantidad de CO<sub>2</sub> en el ambiente, con lo que también aumentaría la tasa de crecimiento. (Fernández et al., 2001; Molina-Grima et al., 1999; E. Molina et al., 2001).

Los estanques poseen sistemas que permiten a las cianobacterias mantenerse en movimiento en el medio, de forma que todas reciban la misma cantidad de luz y nutrientes. Por otro lado se renueva continuamente la cantidad de CO<sub>2</sub> y nutrientes del medio. (Chun-Yen et al., 2011)

Otro tipo de sistemas cerrados de cultivos son los fotobiorreactores, los cuales son sistemas flexibles que pueden ser optimizados de acuerdo con las características biológicas y fisiológicas de las cianobacterias cultivadas, permitiendo cultivar algunas que no pueden crecer en campos abiertos. Dependiendo de su forma o diseño este tipo de reactores ofrecen mejor control sobre las condiciones del cultivo y los parámetros de crecimiento (pH, temperatura, mezclado, CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>), previenen la evaporación, reducen las pérdidas de CO<sub>2</sub>, permiten obtener una alta

densidad de células, y una mayor productividad volumétrica (Chun-Yen et al., 2011; Muñoz et al., 2009; Jorquera et al., 2009; Posten et al., 2007; Pruvos et al., 2008; Ugwu & Uchiyama, 2008; Li-Hai et al., 2008).

Se han diseñado fotobiorreactores de diferentes formas que pueden agruparse en tres tipos básicos: tubulares, de superficie plana y tipo tanque agitado. Los tubulares y de superficie plana son las opciones más utilizadas considerando que utilizan luz solar.

#### II.IV.I.I **Fotobiorreactores tubulares**

Son los fotobiorreactores más fáciles de escalar incrementando la longitud, el número de tubos y uniendo múltiples unidades por medio de colectores (Borowitzka, 1997). Tienen mayor eficiencia de utilización de luz que los fotobiorreactores de placa plana por la gran superficie reactiva por unidad de espacio ocupado (Tredici & Zittelli, 1998). Dentro de los fotobiorreactores tubulares hay diferentes configuraciones:

-  Tubulares verticales
-  Tubulares Horizontales
-  Tubulares Helicoidales

#### II.IV.I.II **Reactores con forma $\alpha$**

Están hechos de tubos de PVC y usan bombas airlift para lograr una trayectoria ascendente/descendente con una gran inyección de CO<sub>2</sub> a lo largo de su

trayectoria (Lee et al., 1995)

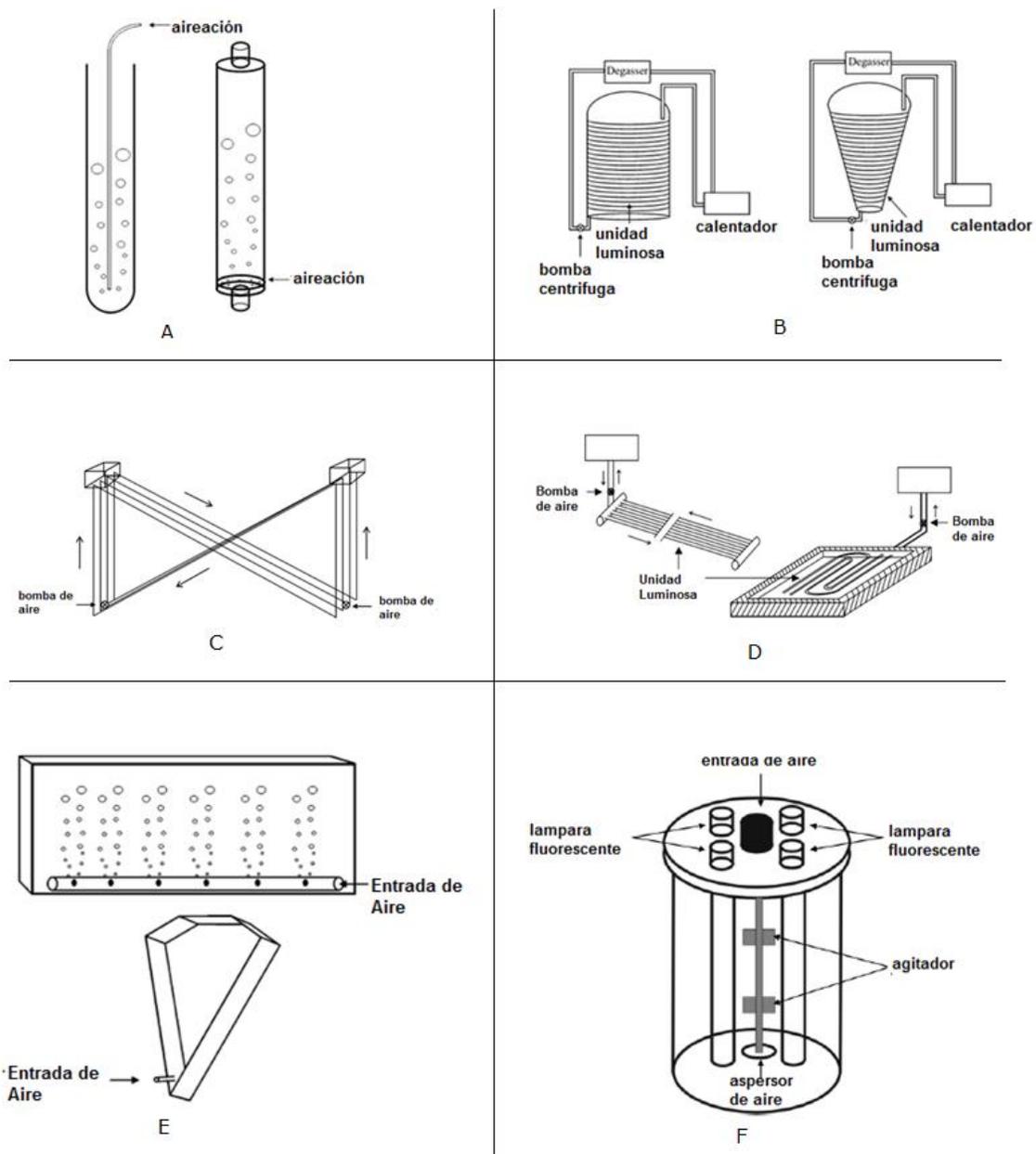
#### II.IV.I.III **Fotobioreactores de superficie plana**

Están diseñados para hacer un uso eficiente de la luz solar, sus paneles están contruidos de tal manera que la relación de área volumen sea grande. Este tipo de fotobiorreactores pueden ser organizados de tal forma que estén orientados hacia el sol, lo cual permite mejor eficiencia en términos de energía absorbida (Carvahlo et al., 2006, Sierra et al., 2008).

#### II.IV.I.IV **Fotobioreactores tipo fermentador de tanque agitado**

Para poder utilizar este tipo de reactores en el crecimiento de cianobacterias debe adaptarse un sistema de iluminación interna que permita una distribución homogénea de luz. Pueden ser operados en cultivos por lote, continuos o semicontinuos. Pueden mantenerse cultivos axénicos por grandes periodos de tiempo debido a que los parámetros de producción pueden ser controlados completamente.

En la **Figura 7** se muestran ejemplos de los fotobiorreactores frecuentemente empleados en el cultivo de cianobacterias.



**Figura 7. Representación esquemática de diferentes tipos de fotobiorreactores.** A) Reactor airlift y columna de burbujeo, B) Reactores tubulares helicoidales, C) Reactores con forma  $\alpha$ , D) Reactores tubulares horizontales, E) Reactores de superficie plana, F) Reactor tipo fermentador de tanque agitado. (según Sepúlveda-Gálvez, 2011).

Los fotobiorreactores son las opciones más ampliamente utilizadas en el cultivo de cianobacterias destinadas a consumo humano, farmacología y cosmetología,

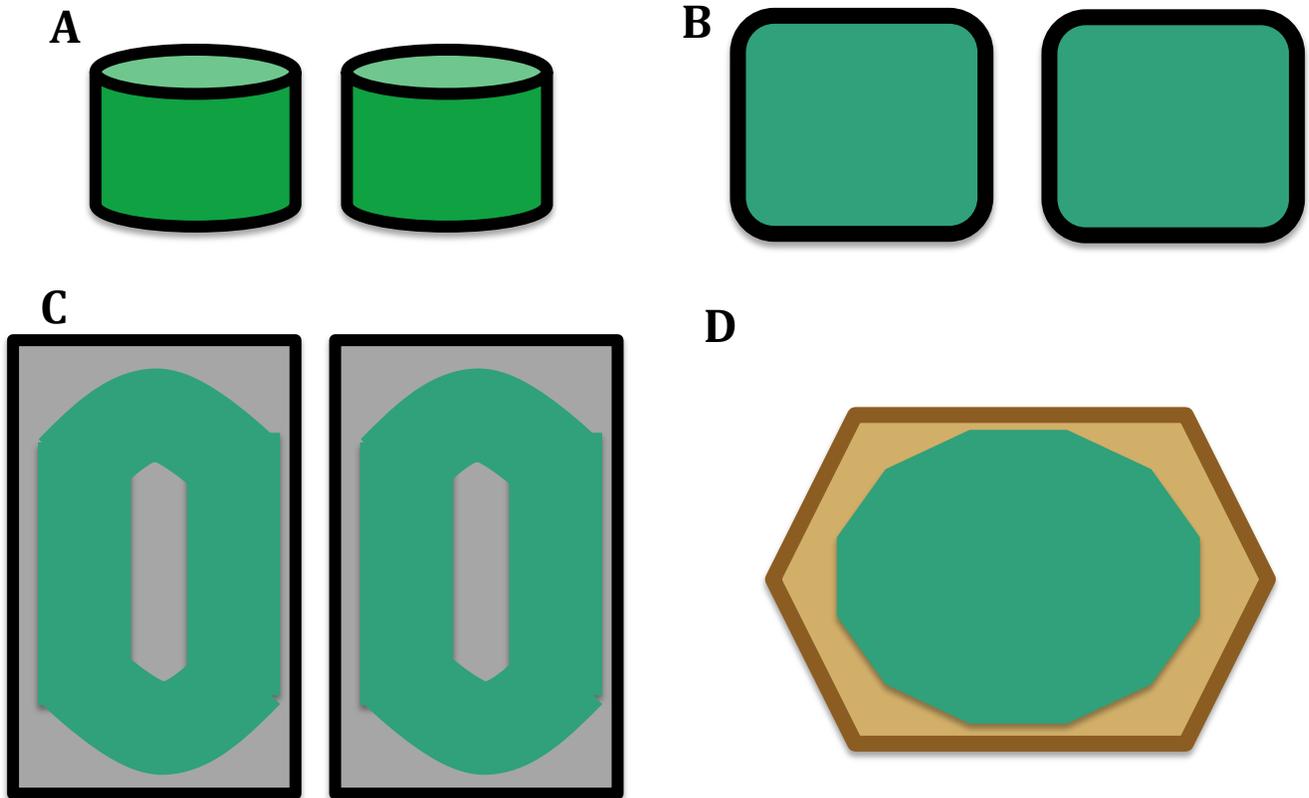
debido a la necesidad de asepsia demandada por estos sectores económicos, puesto que permiten el mantenimiento de monocultivos, desafortunadamente este tipo de cultivo es de costo muy elevado. Ante esto, se han desarrollado sistemas de cultivo abierto que permiten disminuir los costos de dicho proceso.

#### II.IV.II **Sistemas abiertos.**

Los "sistemas abiertos" son normalmente menos costosos en lo que se refiere a su construcción y operación, más duraderos que los reactores cerrados y con una capacidad de producción más amplia cuando se compara con sistemas cerrados (Jorqueta et al., 2009; Borowitzka et al., 1999). Sin embargo, los tanques utilizan más energía para homogenizar los nutrientes (Mata et al., 2010; Papageorgiou et al., 2007). Generalmente estos tanques son más susceptibles a las condiciones ambientales, no permite el control de la temperatura del agua, evaporación e iluminación (Kulczyk et al., 1981; Ai et al., 2008). Este tipo de sistema produce una gran cantidad de biomasa, pero ocupa grandes áreas y por lo tanto es más susceptible a contaminación de otras cianobacterias, hongos, microalgas o bacterias.

La ventaja que tienen los sistemas abiertos es que son muy baratos y fáciles de construir ya que básicamente lo que se hace es construir estanques (Fernandez et al., 2003; Masojídek et al., 2008; Goldman 1982; Converti et al., 2009). Pero la

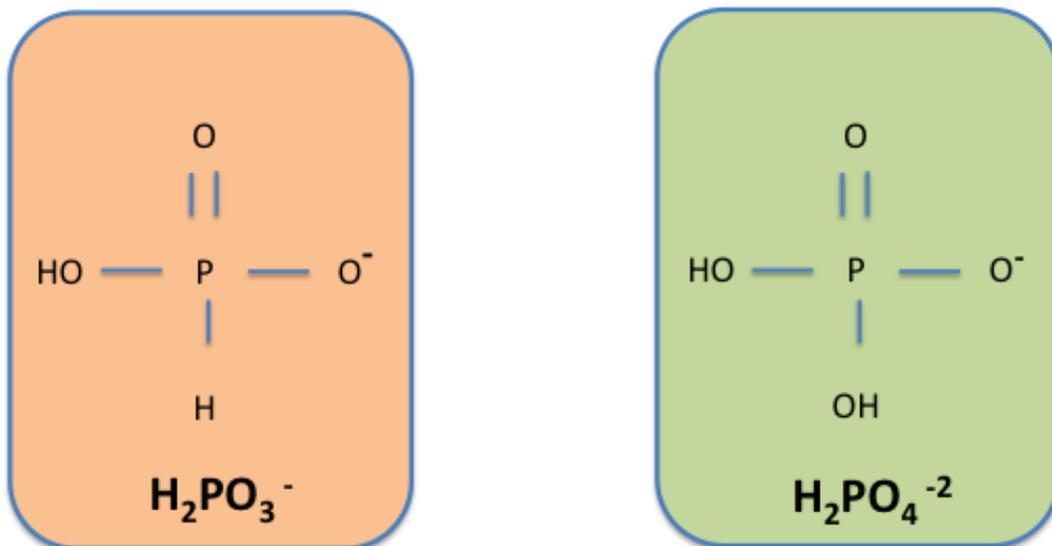
principal limitante en su uso es la susceptibilidad a la contaminación. En la **Figura 8** se muestran algunos ejemplos de sistemas de cultivo abierto.



**Figura 8. Sistemas de cultivo abierto.** A) Sistema en tanques agitados con aire. B) Tanques abiertos sin agitación. C) Canales de cultivos agitados periódicamente. D) Laguna artificial.

## II.V Fósforo macronutriente esencial para la vida.

El fósforo (P), es un nutriente esencial requerido por todos los organismos. El P en forma elemental no se presenta en la naturaleza, debido a su reactividad se combina rápidamente con otros elementos como el oxígeno y el hidrógeno. Cuando el P se oxida completamente se une a cuatro moléculas de oxígeno, formando la molécula conocida como fosfato; Sin embargo, cuando no se oxida completamente un átomo de hidrógeno ocupa el lugar de una molécula de oxígeno, dando lugar a la formación del ácido fosforoso ó fosfito el cual se puede encontrar asociado a un ion (+2) como lo son el sodio y potasio. **(Figura 9).**



**Figura 9. Ejemplos de P en estados reducido y oxidado.** En el recuadro naranja se puede apreciar el ácido fosforoso (fosfito) el cual representa la forma reducida de P. En el recuadro verde se muestra el ácido fosfórico (fosfato) el cual representa la forma oxidada de P.

El P es generalmente un macronutriente limitante en el crecimiento de

cianobacterias debido a las bajas concentraciones en el ambiente acuático (Schindler, 1977; Hudson et al., 2000). Este nutriente es indispensable debido a que forma parte de la membrana celular, ADN, ATP y demás componentes necesarios para la vida.

La forma metabolizable de fósforo (P) es su estado oxidado, recientemente se ha probado la existencia de formas reducidas de fosfatos en diferentes hábitats, mayormente en los que existe actividad agrícola e industrial. (Morton et al., 2005).

Debido a la similitud entre estos dos compuestos (**Figura 9**) el Phi ha generado un gran interés en estudios fisiológicos y moleculares. (McDonald et al., 2001). Las diferencias estructurales existentes entre estos dos compuestos son, el Pi presenta una estructura tetraédrica con cuatro átomos de oxígeno y presenta gran electronegatividad, lo que lo hace altamente reactivo con los cationes presentes en el suelo. (Tiessen, 2008; McDonald et al., 2001) mientras que el Phi es menos electronegativo debido a que presenta únicamente tres átomos de oxígeno, el cuarto oxígeno es sustituido por un átomo de hidrogeno, razón por la cual es mas estable en el suelo. (McDonald et al., 2001).

## II.VI **El fosfito no puede ser utilizado como fuente de fósforo.**

A pesar de estar demostrado que en plantas el Phi es rápidamente absorbido y movilizado mediante el mismo sistema que el Pi, la mayoría de los microorganismos no poseen la capacidad de metabolizar este compuesto. Estudios realizados en mostaza (*Brassica Nigra*), nabo (*Brassica rapa*), cebolla (*Allium cepa*), maíz (*Zea mays* L.), *Arabidopsis thaliana*, lechuga, apio (*Apium graveolens*) y la macro alga *Ulva lactuca* han demostrado que el Phi no representa una forma disponible de P para las plantas, por esta razón no puede ser considerado como fertilizante fosfatado. (McIntire et al., 1950; Sukarno et al., 1993; Carswell et al., 1996, Foster et al., 1998; Ticconi et al., 2000; Varadarajan et al., 2002; Schroetter et al., 2006; Thao et al., 2008<sub>1</sub>, 2008, 2009; Lee et al., 2005).

## II.VII **Uso de fosfito en la agricultura.**

El principal uso de Phi en la agricultura es como agente control de enfermedades, puesto que el Phi tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de agentes infecciosos en plantas principalmente de Oomicetos entre los cuales destacan: *Phytophthora* spp, *Pythium* spp y algunos hongos (Oka et al., 2007; Thao, 2009; Föster, 1998; Carswell et al., 1996); que son los principales responsables de las

enfermedades en plantas. También el Phi tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de malezas, bacterias, y nematodos indeseables en los cultivos agrícolas. (Oka et al., 2007).

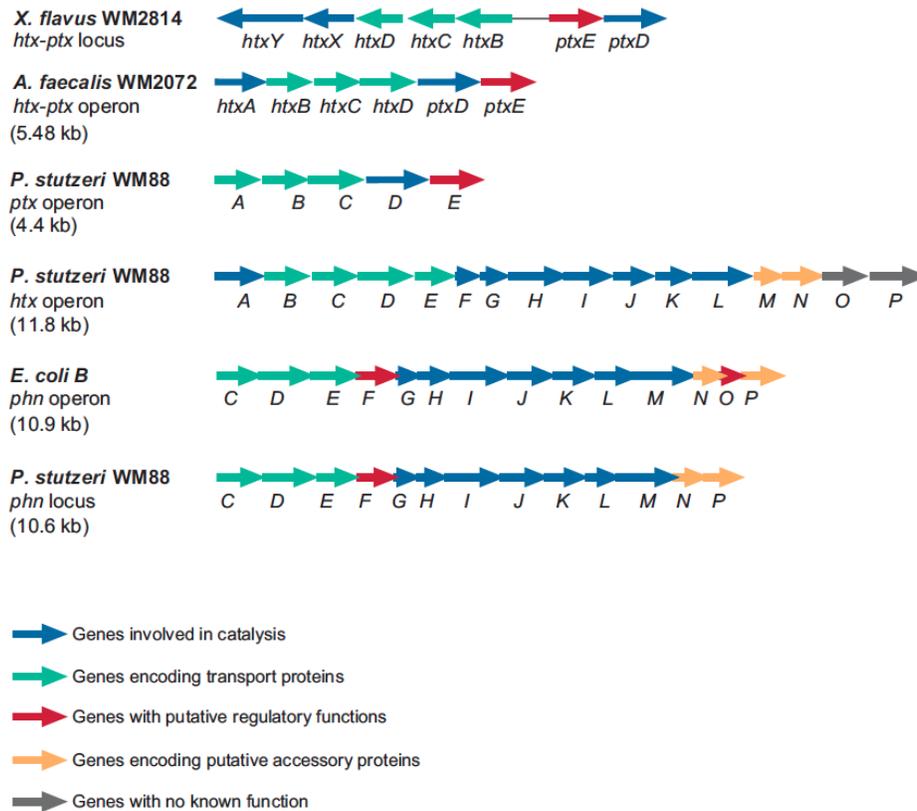
Así mismo, a pesar de la imposibilidad de utilizar el Phi como fertilizante fosfatado puesto que no favorece el crecimiento de las plantas, algunos estudios sugieren que el Phi desencadena respuestas bioquímicas frente a condiciones de estrés biótico y abiótico (Guest & Grant, 1991; McDonald et al., 2001; Orbovic et al., 2008; William-Álvila et al., 2011; Moor et al., 2009). En cultivos de fresa el Phi ha mostrado efectos como incremento de ácido ascórbico, y la presencia de antocianinas, esto como respuesta al tratamiento previo a la siembra.

## II.VIII **Metabolismo de fosfito.**

Existen algunos organismos que poseen la capacidad de metabolizar fuentes reducidas de fósforo como el Phi, algunos ejemplos son *Desulfotignum phosphitoxidans* la cual utiliza el Phi como fuente de energía (Schick and Friedrich, 2000), *Bacillus caldolyticus* (Heinen & Lawrence, 1974) y *Pseudomonas fluorescens* (Malacinski & Konetzka, 1967).

Se ha descrito ya la existencia de algunas bacterias con la capacidad de realizar la oxidación de Phi a Pi, como lo son: algunas cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas stutzeri*, *Alcaligenes faecalis* y *Xanthobacter flavus*.

(Figura 10) (White & Metcalf, 2007).

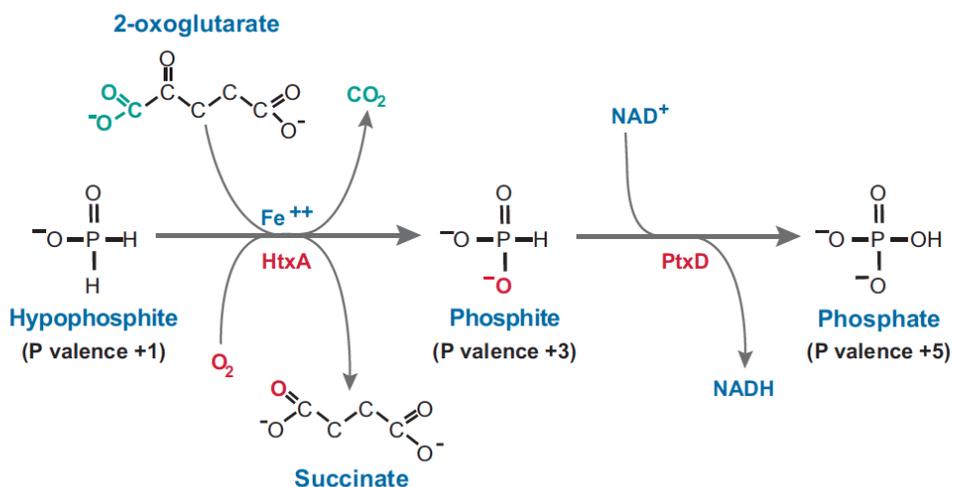


**Figura 10. Operón para la oxidación de hipofosfito (HPhi) o fosfito (Phi)**

**en especies bacterianas.** Según White & Melcalf (2007). Los operones de *P. stutzeri* y *E. coli* también permiten crecimiento en fosfonatos.

## II.IX Metabolismo de fosfito en *P. stutzeri*.

Son pocos los microorganismos que poseen la capacidad de realizar la conversión de HPhi a Pi, pese a esto, se encuentra descrito los requerimientos básicos para llevar a cabo este proceso (**Figura 11**).



**Figura 11. Ruta bioquímica para la oxidación de hipofosfito a fosfato en *P. stutzeri* VM88.** Según White & Metcalf (2007).

En *P. stutzeri* el HPhi y el Phi son utilizados como fuente de P; y para realizar la conversión de HPhi a Pi se requieren dos enzimas. (White & Metcalf, 2007). En primer lugar la oxidación del HPhi se encuentra bajo el dominio del operón htx el cual está compuesto por dieciséis genes. *HTXABCDEFGHIJLMNOP*, de los cuales el *HTXA*, codifica para la enzima HPhi dioxigenasa, la cual es estrictamente necesaria para la oxidación de HPhi a Phi, este proceso también es dependiente de 2-

oxoglutarato, hierro y oxígeno. (White & Metcalf, 2007)

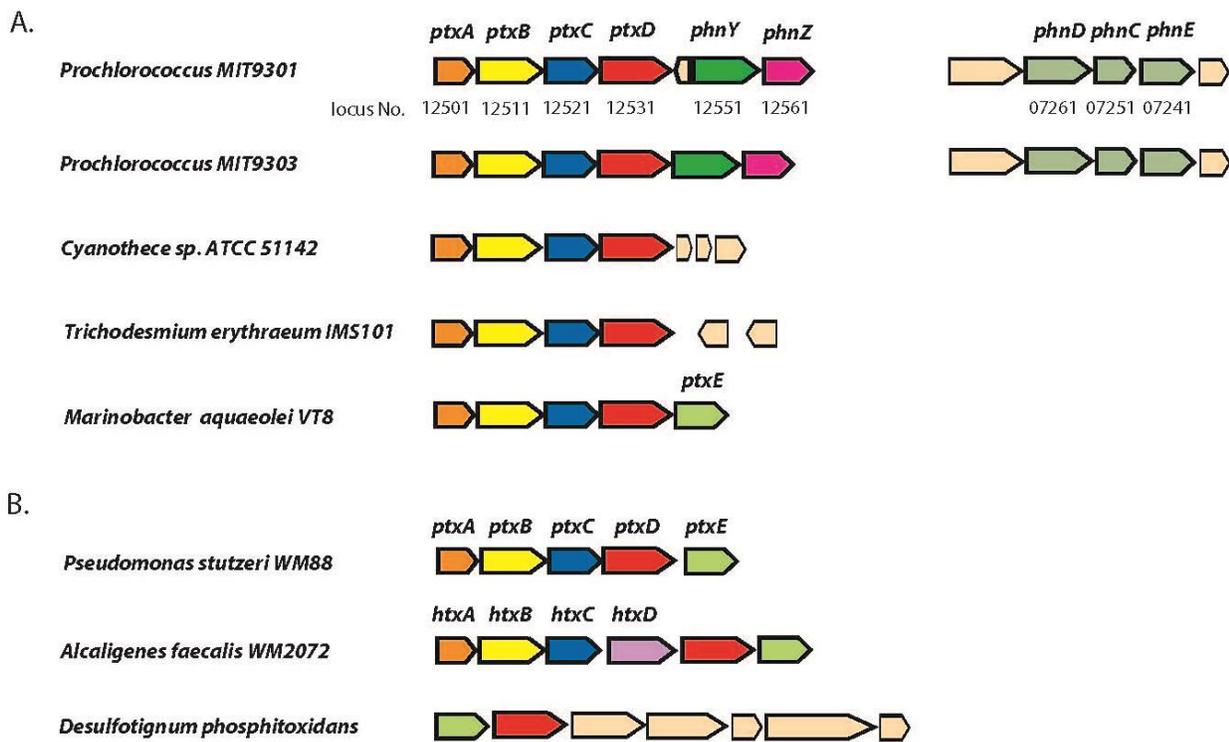
La segunda fase para la conversión a Pi, es la oxidación de Phi a Pi, el operón relacionado a este proceso es el *ptx*, el cual está compuesto de cinco genes *PTXDABCDE*; de los cuales el gen *PTXD* es el codificante a la enzima fosfito oxidoreductasa (PTXD) la cual cataliza la oxidación de Phi a Pi, mediante la reducción de NAD a NADH.

El mecanismo de oxidación de Phi no está ampliamente estudiado, se conoce la enzima PTXD de *P. stutzeri* VM88, la cual es eficiente y posee alta afinidad hacia su sustrato (Phi) y su cofactor (NAD), (García-Costas et al., 2001).

Se ha demostrado que la enzima *ptxD* no posee afinidad con sustratos de otras enzimas homólogas a ésta como lo son a glicerato y lactato, así como con otros sustratos estructuralmente similares al Phi, como el HPhi, el arsenito, sulfito, y nitrito. (García-Costas et al., 2001). La enzima PTXD es incapaz de realizar la reducción de Pi a Phi. (White & Metcalf, 2007).

## II.X **Sensibilidad de *S. elongatus* a fosfito.**

Existen algunas cianobacterias que poseen dentro de su genoma genes codificantes a enzimas catalizadoras de reacciones que permiten la oxidación de Phi y el metabolismo de fosfonatos. (**Figura 12**).

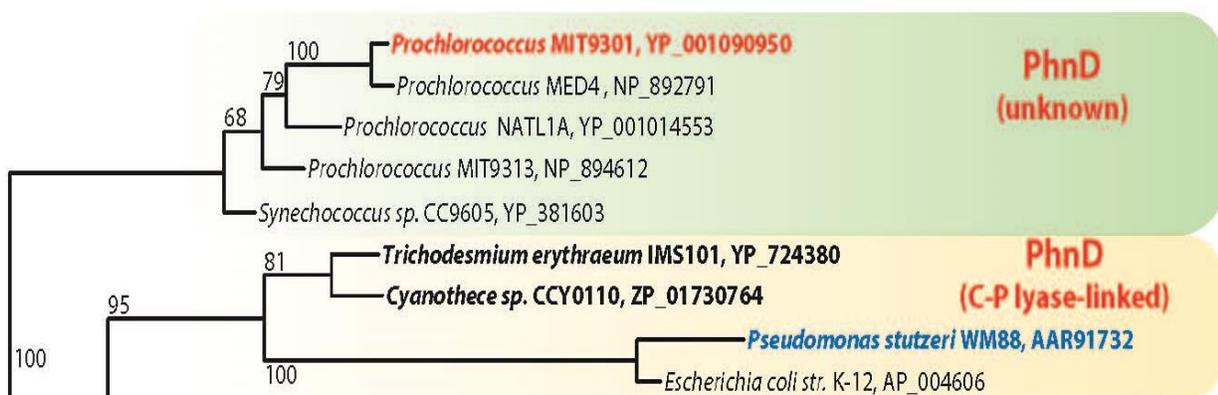


**Figura 12. Genes involucrados en la utilización de fosfito y fosfonatos.** A)

Cianobacterias que poseen genes del operon *ptx*. B) Bacterias que poseen la capacidad de oxidar fosfito, operon *ptx* y *htx*. (Martínez et al., 2012).

Martínez *et al* (2012) han reportado que la existencia del operón *ptx* en *Prochlorococcus* MIT9303 no le confiere a dicha cianobacteria la capacidad de realizar la oxidación de Phi a Pi, a pesar de contar con la el gen *PTXD* codificante para la enzima fosfito oxidoreductasa. (Martínez et al., 2012).

*Synechococcus* sp. posee dentro de su genoma, un gen denominado *PhnD* el cual no tiene función conocida asignada, posee gran similitud con los genes encontrados en el operon *ptx*, principalmente al gen *ptxB*; dicho gen (*PhnD*) presenta se propone como una proteína vinculada a fosfonatos. (**Figura 13**). (Martinez et al., 2012)



**Figura 13. Árbol filogenético para *ptxB*.** En amarillo proteínas relacionadas a la enzima *ptxD*. En verde supuestas proteínas relacionadas a fosfonatos. (según Martinez et al., 2012)

*Synechococcus elongatus* PCC 7942 no presenta en su genoma genes correspondientes al operon *ptx*, por lo cual no posee la enzima *PTXD* (Martinez et al., 2012). Esta cepa no tiene la capacidad de utilizar Phi como fuente de P. (Zhang et al., 2011). Esto aunado a las características antes mencionadas como, la capacidad de incorporar DNA exógeno a su genoma, la disponibilidad de su genoma totalmente secuenciado, existencia de kits comerciales que permiten su

manipulación genética, entre otras, han permitido el uso de esta cepa para la realización de este trabajo.

### **III. HIPOTESIS**

El gen codificante para la enzima fosfito oxidoreductasa PTXD podría conferir a *S. elongatus* PCC7942 la capacidad de utilizar Phi como única fuente de P. Debido a que las cianobacterias y otros microorganismos indeseados no pueden metabolizar Phi de manera natural, el uso del sistema PtxD-Phi en *S. elongatus* podría ser un sistema eficiente de fertilización y control de pureza.

## IV. OBJETIVOS

### Objetivo General

Generar cianobacterias (*S. elongatus* PCC7042) capaces crecer en un medio con Phi como única fuente de fósforo.

### Objetivos específicos

- ✚ Determinar el efecto producido por Phi en células silvestres de *S. elongatus* PCC7942.
- ✚ Generar células transgénicas de *S. elongatus* que presenten de la enzima fosfito oxidoreductasa (*PTXD*) de *P. stutzeri* VM88.
- ✚ Evaluar la capacidad de las células de *S. elongatus* :: *PTXD* para utilizar Phi como única fuente de fósforo.
- ✚ Generar una construcción con un promotor (*PnirA*) que permita la expresión de el gen *PTXD* en *S. elongatus* PCC7942.
- ✚ Evaluar la capacidad de las células transgénicas de *S. elongatus* :: *PnirA* :: *PTXD* para utilizar Phi como fuente de fósforo.

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **V.I Ubicación del lugar de trabajo.**

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología e Ingeniería Metabólica de Plantas en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV). Este proyecto forma parte de una colaboración establecida entre el mencionado laboratorio, bajo el liderazgo del Dr. Luis Herrera Estrella, y la empresa StelaGenomics México S de RL de CV.

### **V.II Microorganismos utilizados y condiciones de crecimiento.**

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron dos microorganismos: *Synechococcus elongatus* PCC7942 y *E. coli* DH5 $\alpha$

*S. elongatus* fue utilizado como modelo de estudio, para la expresión del gen codificante para la enzima PTXD proveniente de *P. stutzeri* WM88. Mientras que *E. coli* fue utilizada como una herramienta habitual para la transformación y obtención de los plásmidos utilizados en este trabajo (Hanahan, 1983).

### V.II.I Cianobacteria

La cianobacteria *S. elongatus* PCC7942 fue cultivada bajo condiciones fotoautotróficas en medio BG-11 (ver **Tabla 1**) líquido o sólido, según lo requerido (Rippka *et al.*, 1979). Para los medios sólidos se utilizó BactoAgar (DIFCO). El medio de cultivo BG-11 consiste en una mezcla de nutrientes requeridos por *S. elongatus* para presentar un crecimiento óptimo, tales como: nitrógeno (como  $\text{NaNO}_3$ ), carbono  $\text{CO}_2$  y  $(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7)$ , magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ), calcio (en forma de  $\text{CaCl}_2$ ), y dos compuestos como fuentes de fósforo: fosfato, como fosfato de potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) y fosfito, como fosfito de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) o fosfito de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Además de una solución de metales que contiene elementos traza como lo son: boro (en forma  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), manganeso ( $\text{MnCl}_2$ ), zinc (como  $\text{ZnSO}_4$ ), molibdato ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ), cobre como  $\text{CuSO}_4$ , cobalto ( $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ .) (**Tabla 2**).

Una vez preparados, los medios fueron esterilizados en autoclave a  $120\text{ }^\circ\text{C}$  durante 20 minutos.

---

**Tabla 1.** Composición del medio de cultivo BG-11 para *S. elongatus*.

---

<b>Componente</b>	<b>Concentración Final</b>
NaNO <sub>3</sub>	17.6 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.22 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3 mM
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.2 mM
Acido Citrico·H <sub>2</sub> O	0.03 mM
Citrato Férrico de Amonio	0.02 mM
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	0.002 mM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.18 mM
Solución de metales	Agregar 1ml por cada litro de medio.

---

**Tabla 2.** Elementos traza de la solución de metales para el medio BG-11.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86 g/L
MnCl <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	1.81 g/L
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.22 g/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.39 g/L
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	0.079 g/L
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	49.4 mg/L

El cultivo de este microorganismo se realizó bajo iluminación continua proveniente de lámparas fluorescentes de luz blanca ( $100 \mu$  Einsteins m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>,) en matraces Erlenmeyer de 50 ml incubados a 34°C con agitación orbital constante a 150 rpm.

Para el crecimiento de cepas resistentes a antibióticos, los medios de cultivo fueron suplementados con el antibiótico requerido (Espectinomicina  $10 \mu$  g mL<sup>-1</sup>). El antibiótico, previamente esterilizado por filtración, fue añadido al medio ya estéril a una temperatura manejable.

### V.II.II Bacteria

Para el crecimiento de *E. coli* se utilizó el medio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido o sólido según lo requerido (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición se describe en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Composición del medio LB para cultivo de células de *E. coli*.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
NaCl	10 g L <sup>-1</sup>
Triptona	10 g L <sup>-1</sup>
Extracto de levadura	5 g L <sup>-1</sup>

El medio sólido fue preparado añadiendo bactoagar (10 g.L<sup>-1</sup>) y la esterilización se llevó a cabo como se describió previamente.

De acuerdo con el propósito de los cultivos, se añadieron al medio LB los antibióticos estériles Ampicilina (100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) ó Espectinomicina (100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>).

Los cultivos en medio líquido se realizaron en tubos Falcon de 15 mL (agitación orbital continua a 200 rpm), mientras que para los cultivos sólidos se utilizaron cajas Petri (marca SyM LA). Ambos cultivos fueron incubados a 37 °C durante 16 o 24 h, según se requiriera, antes de su uso o recolección.

### **V.III Recolección de células.**

Las células, tanto de *S. elongatus* como de *E. coli*, se colectaron por centrifugación en microcentrífuga eppendorf modelo 545R a 13000rpm, por 10 y 3 minutos respectivamente.

En este trabajo se han empleado algunas técnicas básicas de biología molecular cuyos protocolos se encuentran detallados en manuales de laboratorio y en artículos científicos (Sambrook et al., 1989; Clerico et al., 2007, etc.), además se siguieron las instrucciones de las casas comerciales suministradoras de kits específicos. A continuación se detallan los procedimientos y métodos empleados.

### **V.IV Generación de las construcciones empleadas para transformar *S. elongatus* PCC7942.**

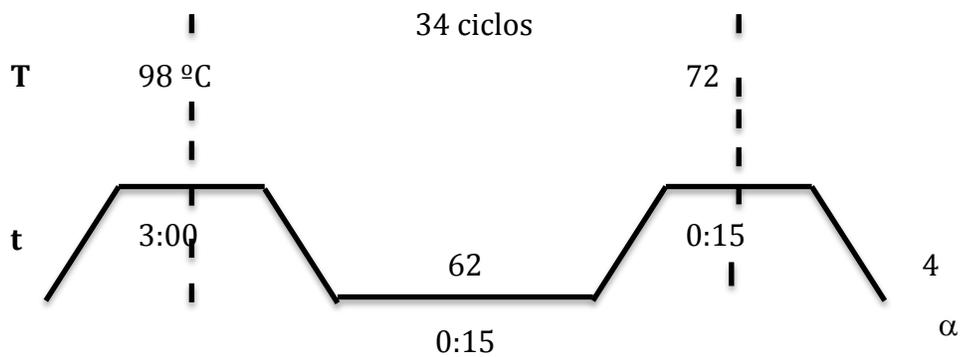
*S. elongatus* es un modelo de estudio que permite la expresión de genes heterólogos mediante la introducción natural de estos a su genoma, esto mediante recombinación homóloga en sitios específicos (Clerico et al., 2007), esta propiedad ha sido utilizada por la empresa INVITROGEN, quienes han desarrollado un kit basado en la tecnología TOPO, el cual tiene por nombre "The GeneArt Synechococcus TOPO Engineering kits". El cual es empleado en este trabajo.

#### V.IV.I **Diseño del plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PNi:ptxD**

Para expresar el gen *ptxD*, se utilizó el plásmido recomendado por el kit para la transformación de *S. elongatus*; este plásmido incluye en su diseño un promotor inducible por Niquiel (*PNi*). El gen *ptxD* fue introducido al plásmido mediante una clonación mediada por la complementariedad existente entre el inserto y el plásmido destino. (**Ver figura 15 y 16**). Para la obtención de esta construcción es necesario seguir los pasos detallados a continuación.

#### V.IV.II **Amplificación del gen *PTXD* de *Pseudomonas stutzeri* WM88.**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en ingles, Polymerase Chain reaction) es una técnica de biología molecular que permite la obtención de un gran numero de copias de un fragmento determinado de ADN, mediante la propiedad de las enzimas polimerasas para replicar el ADN. Esta producción de ADN es guiada por oligonucleótidos específicos que indican a la enzima polimerasa la región a amplificar. El gen *PTXD* fue amplificado mediante esta técnica (PCR) utilizando la enzima Phusion (Biolabs) bajo las condiciones mostradas en la **Figura 14**.



**Figura 14. Diagrama de tiempos y temperaturas para la amplificación del gen *PTXD*.**

Para la amplificación de este gen se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

PTXDFW

**CACCTGCCATATGATGCTGCCGAAACTCGTTATAACTCACCGA**

PTXDReV

AAAAGGAAAATCTAGATTAACATGCGGCAGGCTCGGC

#### V.IV.III **Electroforesis.**

La electroforesis es una técnica analítica la cual es utilizada para la separación de moléculas en un campo eléctrico basado en las cargas eléctricas, y a la masa (peso

molecular) que estas poseen. En este trabajo la separación de los fragmentos de DNA por electroforesis en gel de agarosa permitió tanto la identificación de genes, así como su aislamiento para posteriores estudios.

Se emplearon geles de agarosa al 1% (p/v) en buffer Tris-acetato-EDTA (TAE 1X) ver composición en Anexo 1. Los geles de 100 ml de volumen contenían 1  $\mu$ l de bromuro de etidio (BrEt) para la posterior visualización del DNA mediante iluminación con luz ultravioleta. El DNA se suplementó con buffer de carga que contenía colorante Orange G y glicerol (ver composición en Anexo 2). En todos los geles se incluyeron 2  $\mu$ l de marcador de DNA Ladder 1kbplus marca Invitrogen (concentración de 100 ng/ $\mu$ l) este marcador nos da referencia de fragmentos de 100-12,000 pb. Las electroforesis se llevaron a cabo en una cámara horizontal en buffer TAE 1X. Los voltajes aplicados variaron entre 60-80 V durante 40 min-1.5 h. Para la visualización de las bandas de DNA se empleó luz ultravioleta en un analizador de imágenes fotodocumentador marca BIORAD.

#### V.IV.IV **Purificación del producto de PCR del gen *PTXD***

Una vez que identificado el fragmento deseado mediante electroforesis en geles de agarosa, el siguiente paso fue aislar este fragmento para poder utilizarlo en la clonación en el plásmido destino (pSyn\_1/D-TOPO). Para este procedimiento se

necesita DNA del gen *PTXD* de buena calidad, por lo que es necesario realizar una purificación de DNA proveniente de gel de agarosa, para esto se utilizo el kit Zymoclean Gel DNA Recovery kit (Zymo research, USA), bajo el siguiente protocolo:

- Cortar la banda correspondiente al gen *PXDT* (1000 pb), y transferirla a un tubo de 1.5ml.
- Adicionar 3 volúmenes de buffer ADB a un volumen de agarosa.
- Incubar a 55°C durante 5-10 minutos, hasta que el gel este completamente disuelto.
- Transferir la solución de agarosa disuelta a una columna "Zymo-spin" dentro de un tubo recolector.
- Centrifugar a 10,000 rpm durante 1 minuto.
- Descartar el sobrenadante.
- Adicionar 200  $\mu$  L de "Wash Buffer" a la columna "Zymo-sipin".
- Centrifugar a 10,000 rpm por 30 segundos.
- Descartar el sobrenadante. Y repetir el procedimiento de lavado con "Wash Buffer".
- Adicionar cantidad deseada de agua para eluir el DNA.

#### V.IV.V **Cuantificación de DNA.**

La concentración de DNA se midió espectrofotométricamente en un equipo NanoDrop ND-1000 spectrophotometer registrando la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm. La pureza de la muestra se calculó determinando la relación existente entre los valores de absorbancia a 260 nm y 280 nm.

#### V.IV.VI **Clonación del gen *PTXD* en el plásmido pSyn\_1/D-TOPO.**

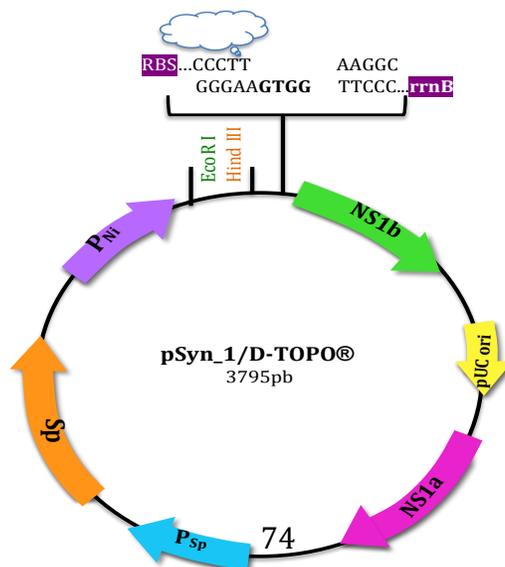
Se realizó la ligación del gen *ptxD* con el vector pSyn\_1/D-TOPO (INVITROGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante, esto permite la clonación direccional debido a la complementariedad existente, entre el gen (*ptxD*) y el plasmido (pSyn\_1/D-TOPO) lo que permite la estabilización del fragmento de PCR en el vector destino (**Figura 15**). Para este proceso se requiere la reacción siguiente:

Producto de PCR purificado (0.5µL-4µL)	4µL
Solución salina (1:4)	1µL
Agua	-
Vector pSyn_1/D-TOPO	1µL
	<hr/>
	6µL

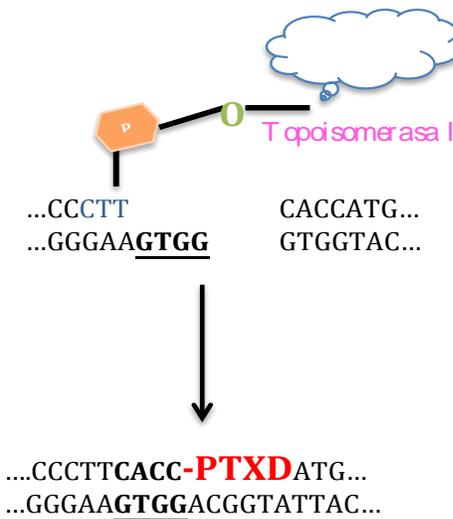
Esta ligación se incubó por 5 min a temperatura ambiente (22°- 23°C)

Pasado este tiempo el producto de la ligación se dializó utilizando un filtro de membrana millipore de 0.25µm durante 20 minutos y se procede a la transformación, o se almacena a -20°C hasta su utilización.

En la **Figura 15** se puede apreciar el mapa del vector pSyn\_1/D-TOPO. Este plásmido se basa en la tecnología TOPO que consiste en el uso de la enzima topoisomerasa I, con sitio específico en 5'CCCTT después de este sitio las hebras del DNA son separadas dejando expuesto el sitio GTGG complementario al gen de interés debido a que el oligonucleótido PTXDFW diseñado para la amplificación del gen *PTXD* se incluyó la adición de las 4 bases CACC recomendado por la casa comercial INVITROGEN (mostradas en negritas en los oligonucleótidos anteriores), que permite la inserción del producto de PCR en el vector destino. Como se muestra en la **Figura 16**. El fragmento puede ser ligado en orientación correcta con una eficiencia igual o superior al 90%.



**Figura 15. Mapa del vector pSyn\_1/D-TOPO utilizado para transformar *S. elongatus*.** NS1b es el neutral site 1b (166-967). pUC origen (1025-1640). NS1a es neutral site 1 a (1712-2510). P<sub>Sp</sub> es el promotor de espectinomicina (2517-2650). Sp es el gen de la resistencia a espectinomicina (2651-3661). P<sub>Ni</sub> promotor de Níquel (3666-3766). RBS es la unión a ribosoma (3780-3786). GTGG sitio de unión de gen de la PTXD (3792-3796). rrnB región de terminación de la transcripción (28-185).modificado de GeneArt Synechococcus Engineering kit Invitrogen.



**Figura 16. Tecnología TOPO.** Mecanismo de la enzima topoisomerasa I modificado de GeneArt Synechococcus Engineering kit Invitrogen.

#### V.IV.VII Transformación de células electrocompetentes de *E. coli* (DH5-α...)

La transformación genética es un proceso por el cual células incorporan información genética exógena que se encuentra presente en el medio. Este

proceso requiere que la bacteria tenga ciertas condiciones, denominadas estado de competencia. Este proceso de transformación genética, es de gran utilidad en biología molecular, razón por la cual su aplicación se ha mimetizado en laboratorio empleando organismos modelo de estudio. *E. coli*, que puede ser transformada por métodos físicos y químicos;. Uno de los métodos físicos más empleados y eficientes es la electroporación, que consiste en inducir la competencia mediante un breve, pero fuerte pulso eléctrico que permite la introducción del DNA a la célula. Para este método se requieren células de *E. coli* capaces de resistir dicho pulso eléctrico, estas células se denominan electrocompetentes (**Anexo 3**); una vez introducido el DNA de interés, las células deben pasar por un proceso que les permita recuperarse de dicho tratamiento físico.

El protocolo de transformación de transformación genética de células electrocompetentes de *E. coli* DH5- $\alpha$  se detalla a continuación:

- Descongelar las células electrocompetentes de *E. coli*
- Las células se colocan en una cubeta para electroporar de 0.2 mm.
- Se agrega el producto de la ligación a la cubeta de electroporación.
- Colocar en el electroporador y dar un pulso eléctrico, (observar que los parámetros indicados por el electroporador correspondan a una transformación exitosa por ejemplo: 2.5KV y 5.6ms)
- Inmediatamente se agrega medio SOC (ver composición del medio en **Anexo 4**)

- Transferir la transformación a un tubo de 1.5ml.
- Incubar por 1 hora a 37°C en agitación de 200 rpm.
- Pasado este tiempo transferir a medio solido LB enriquecido con el antibiótico de selección.
- Incubar de 12-14 horas a 37°C.
- Seleccionar colonias resistentes al antibiótico, clonas exitosas.

#### **V.IV.VIII Extracción de DNA plasmídico de *E. coli* (MINIPREP).**

Miniprep es una técnica que se utiliza para extraer DNA plasmídico de células bacterianas basado en el procedimiento de lisis alcalina desarrollada por Birnboim and Doly (1979). Este procedimiento se basa en la diferencia en la topología existente entre el DNA plasmídico y el DNA genómico, la cual permite la precipitación selectiva de DNA genómico y proteínas celulares de plásmidos. Bajo condiciones alcalinas las células son lisadas, de manera tal que se desnaturalizan todas las moléculas de DNA y proteínas. Cuando la solución es neutralizada, el DNA genómico y las proteínas precipitan debido a que es imposible que renaturalicen correctamente (por su gran tamaño), mientras que los plásmidos se renaturalizan correctamente quedando en solución.

Para la realización de este procedimiento se utilizo el kit de la casa comercial

Qiagen, el cual emplea los siguientes reactivos. BufferP1, que contiene RNAasa A, un buffer que optimiza su actividad enzimática y EDTA, necesario para quelar los metales cofactores de las DNAasas. La RNAasa cataliza la hidrólisis del RNA con el fin de evitar una la contaminación del DNA plasmídico, pues como se mencionó anteriormente el DNA plasmídico queda en solución junto con todos los tipos de RNA. Para la lisis celular se emplea el buffer de lisis (P2), el cual incluye SDS y NaOH. El SDS es un detergente iónico que rompe las membranas de las células y desestabiliza todas las interacciones hidrofóbicas que poseen varias macromoléculas. El pH altamente alcalino generado por NaOH también desnaturaliza las macromoléculas. Estos dos componentes del buffer, provocan la ruptura de las paredes celulares y desnaturalización de proteínas. La neutralización se lleva a cabo con el buffer N3 que contiene acetato de potasio. El pH bajo de la solución del acetato del potasio neutraliza el NaOH. Por ultimo el buffer PE contiene etanol que permite eliminar las sales residuales.

- Cultivar una colonia de *E. coli* seleccionada del protocolo anterior en medio LB líquido con el antibiótico de resistencia durante 12 hrs a 37° C en agitación constante a 200 rpm.
- Tomar 1-5 ml de cultivo y centrifugar a 8000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente.

- Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 250  $\mu$  L de buffer P1.
- Transferir a un tubo de 1.5ml y adicionar 250  $\mu$  L de buffer P2.
- Invertir el tubo de 4-6 veces (hasta que la solución este clara) Nota: no exceder de 5min.
- Adicionar 350  $\mu$  L de buffer N3 y mezclar inmediatamente 4-6 veces.
- Centrifugar por 10 minutos a 13000 rpm.
- Transferir el sobrenadante del paso anterior a una columna QIAprep.
- Centrifugar de 30-60 segundos. Descartar el remanente.
- Adicionar 750  $\mu$  L de buffer PE a la columna.
- Centrifugar de 30-60 segundos y nuevamente descartar el liquido.
- Centrifugar la columna por 1 min a máxima velocidad, (cuantas veces sea necesario) para eliminar el residuo de buffer.
- Eluir el DNA en 50  $\mu$  L de buffer EB o agua.

#### V.IV.IX **Restricción enzimática.**

Se analizó el DNA mediante el uso de enzimas de restricción para verificar la orientación del gen *PTXD* en el plásmido pSyn\_1/D-TOPO, para este análisis enzimático se realizaron las siguientes restricciones dobles:

Buffer 3 (Biolabs)	2 $\mu$ L
Xba I	1 $\mu$ L
Bgl II	1 $\mu$ L
DNA	1 $\mu$ g
H <sub>2</sub> O	13 $\mu$ L

---

20  $\mu$ L

Buffer 4 (Biolabs)	2 $\mu$ L
Xba I	1 $\mu$ L
Nde I	1 $\mu$ L
DNA	1 $\mu$ g
H <sub>2</sub> O	13 $\mu$ L

---

20  $\mu$ L

Una vez confirmado el sentido de la clonación por el patrón de restricción, se seleccionó una clona para secuenciar con los oligonucleotidos recomendados por el fabricante de kit TOPO GeneArt.

pSynSecFW

5´-GATTTTCACCTGAATTTTCAT-3´

pSynSecRev

5´-CCCACACTACCATCGGCG-3´

Se realizó un blast tomando como referencia la base de datos del The National Center for Biotechnology Information (NCBI) para confirmar que los datos arrojados por la secuenciación corresponden al gen que codifica para la enzima PTXD de *P. stutzeri*.

#### V.V Transformación de células de *S. elongatus* PCC7942

*S. elongatus* PCC7942 es un excelente modelo de estudio debido a su pequeño genoma (totalmente secuenciado) y a la facilidad con la que puede ser manipulado genéticamente por recombinación natural (Atsumi et al., 2009; Lan & Liao, 2011).

El método de transformación empleado en este trabajo se basa en recombinación homóloga entre el cromosoma de *S. elongatus* y el DNA exógeno que contiene secuencias complementarias al cromosoma de *S. elongatus*. El lugar en donde se realiza la integración al cromosoma recibe el nombre de neutral site (NS1), este

sitio ha sido desarrollado exitosamente como lugar de clonación (Clerico et al., 2007) ya que puede ser alterado o interrumpido sin consecuencias de fenotipo aberrante.

### V.V.I **Protocolo de transformación**

Para la transformación de *S. elongatus* PCC7942 se utilizó el kit "The GeneArt® Synechococcus TOPO® Engineering Kit" de Invitrogen. Siguiendo las instrucciones del fabricante.

- .....en medio BG-11 a 34°C en agitación y luz continua hasta que la OD=1 (medida a 750nm).
- Recolectar 1.5 ml de cultivo celular por centrifugación durante 10 min a 6000 rpm.
- Descartar el sobrenadante, cuidando no tocar el paquete celular.
- Eluir con 1 ml de medio BG-11 gentilmente con ayuda de una micropipeta.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Remover el sobrenadante con micropipeta.
- Resuspender las células en 100  $\mu$  L de medio BG-11 y mezclar gentilmente.
- Adicionar 100 ng de DNA (plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PTXD)
- Incubar a 34°C por 4 horas.

- Transferir a medio BG-11 con espectinomicina 10  $\mu$  g/ml. Incubar a 34°C y luz constante por 4-6 días.

Debido a la baja eficiencia de la transformación reportada por el fabricante del "The GeneArt® Synechococcus TOPO® Engineering Kit" y por los requerimientos propios de este trabajo se optimizó el protocolo de transformación indicado, así como el descrito por Clerico et al. (2007). Siendo el resultado el siguiente protocolo:

**V.V.II Protocolo de transformación "Clerico et al., 2007 (Modificado)".**

- .....en medio BG-11 a 34°C en agitación y luz continua hasta saturación.
- Tomar 25 ml de cultivo saturado y reinocularlo en 75 ml de medio óptimo nuevo. Crecer bajo las mismas condiciones durante 48 horas, OD=0.23-0.3.
- Recolectar 20 ml de las células por centrifugación durante 20 min a 4000 rpm.
- Descartar el sobrenadante, cuidando no tocar el paquete celular.
- Eluir en 10 ml de solución de NaCl a 10 mM y mezclar gentilmente con ayuda de una micropipeta.

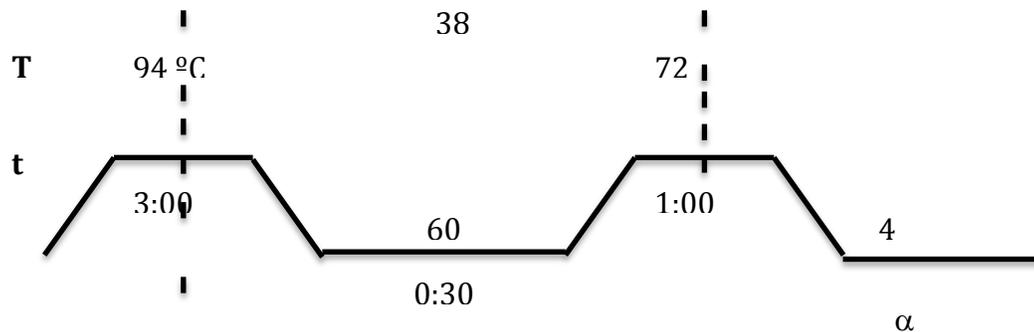
- Centrifugar a 4000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Remover el sobrenadante cuidadosamente.
- Eluir en 10 ml de agua destilada estéril.
- Centrifugar a 4000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Eliminar el sobrenadante.
- Resuspender las células en 300  $\mu$  L de medio BG-11 libre de fosfato y mezclar gentilmente.
- Adicionar 100 ng de DNA (plásmido pSyn\_1/D-TOPO-*PTXD*)
- Incubar en oscuridad a 34°C por 12-14 horas en tubos de 15 ml con agitación constante a 100rpm.
- Inocular en medio BG-11 sólido enriquecido con espectinomicina 10  $\mu$  g/ml. Incubar a 34° C y luz constante por 4-6 días.

## V.VI **Análisis de las transformantes.**

### V.VI.I **PCR de colonia.**

Se realizó PCR de colonia para verificar la presencia del inserto (vector pSyn\_1/D-TOPO- *PTXD*) con el programa que se muestra en la **Figura 17**.

La reacción se llevo a cabo con la enzima Taq polimerasa de la marca Fermentas, utilizando los oligonucleótidos PTXDFW y PTXDReV en las siguientes condiciones:



**Figura 17. Programa de PCR en colonia utilizando enzima Taq recombinante.**

La visualización de la amplificación se realizó por electroforesis en gel de agarosa-BrEt 1% expuesto a luz UV.

## V.VII Generación del vector pSyn\_1/D-TOPO-*PnirA*-PTXD

### V.VII.I Amplificación del gen *PnirA* de *S. elongatus* PCC7942.

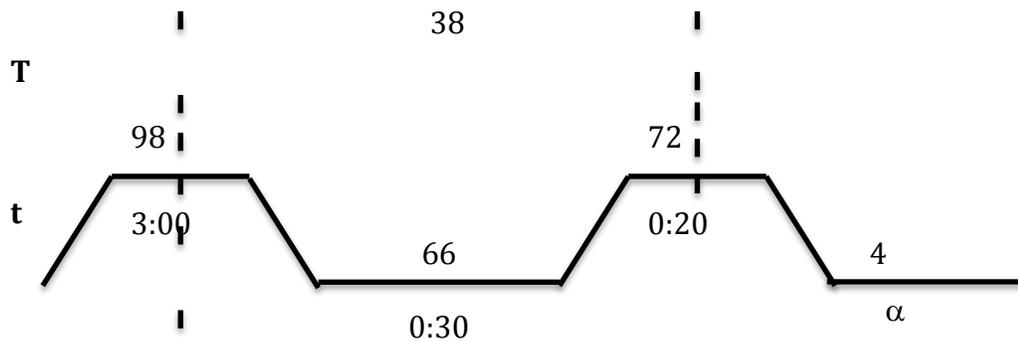
*PnirA* es un promotor de 166 pb inducible a una concentración de 17.6 mM de nitrato, y se encuentra en *S. elongatus* PCC7942, (Qi et al., 2005) razón por la cual se realizó una amplificación de este gen en *S. elongatus* PCC7942 utilizando los

siguientes oligonucleotidos. Los cuales se diseñaron adicionando sitios de corte específicos para las enzimas HindIII y EcoRI los cuales se encuentran subrayados.

pronirAFW 5' -CCCAAGCTTTCCTCTCAGCTCCAAAAAGT-3'

pronirARev 5' - CGGGAATTCGGATTGATCTGCCTACAA- 3'

La amplificación se realizó con la enzima Phusion (Biolabs) bajo las siguientes condiciones de amplificación mostradas en la **Figura 18**.



**Figura 18. Programa de PCR para la amplificación de PnirA con enzima Phusion.**

#### V.VII.II **Electroforesis.**

Se empleo gel de agarosa al 2.5% (p/v) en buffer Tris-acetato-EDTA (TAE 1X). Los geles de 100 ml de volumen contenían 1  $\mu$ l de bromuro de etidio para la posterior visualización del DNA mediante iluminación con luz ultravioleta, fueron corridos en

cámara de electroforesis horizontal a 70V durante 1h.

Se cortó la banda correspondiente al tamaño del promotor, y se purificó con el protocolo antes descrito.

### V.VII.III **Clonación del promotor *PnirA* en el vector pJet.**

El DNA purificado se clonó en el vector pJet de la casa comercial Fermentas (**Figura 20**), el cual es ampliamente utilizado para la clonación de fragmentos de PCR debido a su rapidez, facilidad y versatilidad. Esto fue realizado debido al pequeño tamaño del promotor, y para asegurar la correcta clonación del gen *PnirA* en el plasmido destino. La ligación se lleva a cabo utilizando la enzima T4 DNA ligasa, la reacción fue incubada a 22°C por 5 minutos, La clonación se realizó en células de *E. coli* DH5 $\alpha$ , después de la transformación por electroporación las células fueron cultivadas en medio LB suplementado con ampicilina 100  $\mu$  g/ml. Pasadas las 16 horas de incubación a 37°C, se seleccionaron cinco colonias para ser sometidas a crecimiento en medio LB líquido, con el objetivo de extraer el DNA plasmídico, y realizar el análisis por PCR correspondiente. Se empleó Taq polimerasa de la marca Fermentas y los oligonucleotidos indicados por el fabricante del vector pJet los cuales se muestran a continuación.

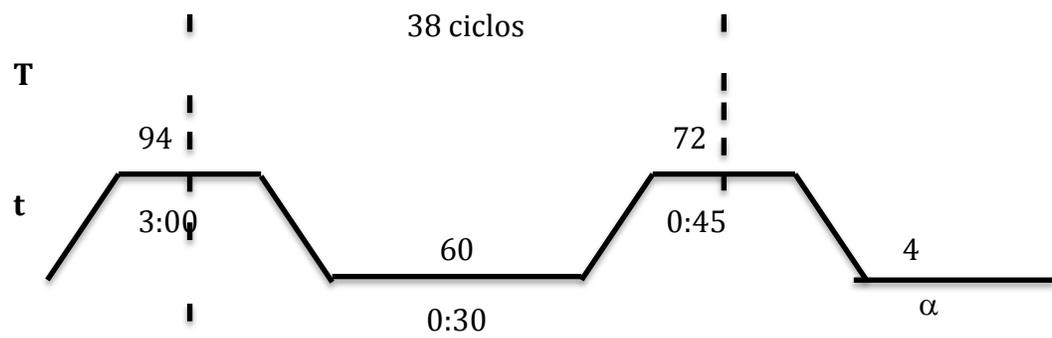
pJetFW

5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'

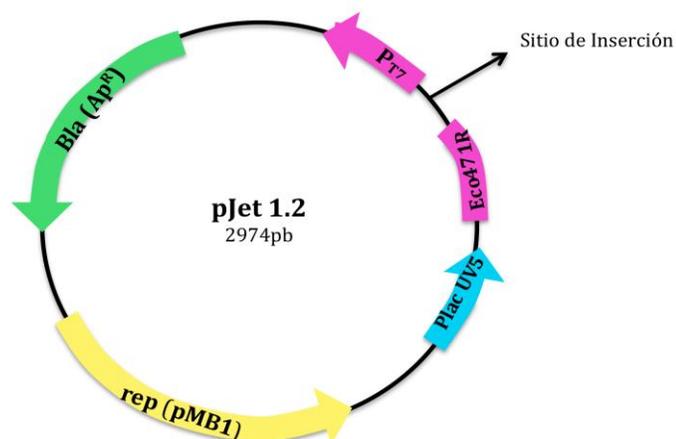
pJetRev

5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'

Las condiciones de amplificación se detallan en la **Figura 19**.



**Figura 19. Programa PCR plásmido pJet.**



## **Figura 20. Mapa del plásmido pJet utilizado para la clonación de PnirA.**

Modificado de <http://www.thermoscientificbio.com>

Como ya se mencionó anteriormente el fragmento correspondiente al promotor de Nitrato (PnirA) perteneciente al operón *nir*, el cual se utilizará para permitir la sobreexpresión del gen *PTXD* en *S. elongatus*, incluye en el diseño de los oligonucleótidos empleados los sitios de corte para las enzimas Hind III y EcoR I, esto permite realizar la clonación direccional al plásmido pSyn\_1/D-TOPO-*PTXD*, puesto que este también cuenta con los sitios cohesivos complementarios, lo que permite realizar la inserción de manera exitosa, es decir en sentido correcto y a su vez impide la religación del plásmido debido a la falta de complementariedad en ambos extremos de éste.

### **V.VII.IV Restricción enzimática**

El DNA del pJet purificado fue digerido con las siguientes enzimas, para liberar el fragmento correspondiente al promotor *PnirA*:

Buffer 2 (Biolabs)	2 $\mu$ L
EcoR I	1 $\mu$ L
Hind III	1 $\mu$ L
DNA	4 $\mu$ g
H <sub>2</sub> O	8 $\mu$ L

---

20  $\mu$ L

Para hacer posible la ligación del promotor *PnirA* con el vector pSyn\_1/D-TOPO-*PTXD*, este último también se trato con las enzimas de restricción de la manera siguiente:

Buffer 2 (Biolabs)	2 $\mu$ L
EcoR I	1 $\mu$ L
Hind III	1 $\mu$ L
DNA	600ng
H <sub>2</sub> O	13 $\mu$ L

---

20  $\mu$ L

Se corrió gel de electroforesis para el promotor de Nitrato en gel de agarosa al 2.5% y para el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PTXD en gel de agarosa al 1% siguiendo la metodología antes descrita. Una vez visualizada la correcta digestión se procedió a ligar ambos fragmentos.

La ligación se llevó a cabo utilizando enzima T4 DNA ligasa de la marca Invitrogen de la manera siguiente:

Buffer	15 $\mu$ L
pSyn_1/D-TOPO-PTXD	10 $\mu$ L
<i>PnirA</i>	3 $\mu$ L
T4 DNA ligasa	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	1 $\mu$ L

---

30  $\mu$ L

La ligación se incubó a 22° C durante 20 minutos.

El producto de esta ligación se dializó en membrana millipore de 0.25  $\mu$  m por 20 minutos y se transformó mediante electroporación a células de *E. coli* DH5 $\alpha$ .....sólido LB conteniendo espectinomicina 100  $\mu$  g/ml como medio de selección. Pasado el tiempo de incubación necesario para la aparición de las colonias, éstas se picaron y se inocularon en medio LB líquido con

el mismo antibiótico de selección para realizar la extracción de DNA plasmídico con el protocolo antes descrito.

Se analizó mediante patrón de restricción, el DNA plasmídico proveniente de las colonias de *E. coli* resistentes al antibiótico de selección, las enzimas empleadas para este análisis fueron:

Buffer 4 (Biolabs)	2 $\mu$ L
Nde I	1 $\mu$ L
Xba I	1 $\mu$ L
DNA	2 $\mu$ g
H <sub>2</sub> O	14 $\mu$ L

---

20  $\mu$ L

Buffer 2 (Biolabs)	2 $\mu$ L
Hind III	1 $\mu$ L
Xba I	1 $\mu$ L
DNA	2 $\mu$ g
H <sub>2</sub> O	14 $\mu$ L

---

20  $\mu$ L

Buffer 2 (Biolabs)	2 $\mu$ L
EcoR I	1 $\mu$ L
Hind III	1 $\mu$ L
DNA	2 $\mu$ g
H <sub>2</sub> O	14 $\mu$ L

---

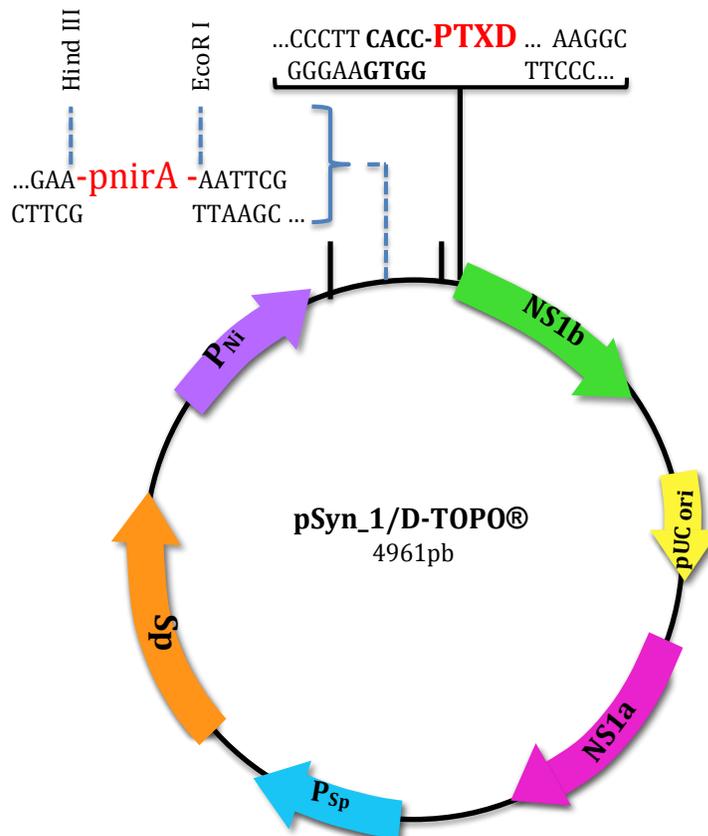
20  $\mu$ L

Se corrió gel de electroforesis para todas las digestiones, para las primeras dos mencionadas gel de agarosa al 1%, y para la digestión de EcoR I con Hind III gel de agarosa al 2.5%.

Para verificar la construcción del plásmido pSyn\_1/D-TOPO-*PnirA:PTXD* se analizó la secuencia utilizando los oligonucleotidos recomendados por el fabricante del GeneArt TOPO *Synechococcus* TOPO Engineering kit (secuencia antes mostrada). Los cuales flanquean la región en donde se encuentra el promotor *PnirA* y el gen *PTXD* que codifica para la proteína fosfito deshidrogenasa.

Una vez recibida la secuencia, se analizó mediante un blast la presencia completa y correcta de ambos genes de interés el *PnirA* y el gen *PTXD*.

En la **Figura 21** se muestra el plásmido pSyn\_1/D-TOPO indicando el sitio de inserción del gen *PTXD* y el lugar en donde se integra el *PnirA* por unión complementaria a los sitios Hind III y Eco RI.



**Figura 21. Mapa del plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD.**

## V.VIII TRANSFORMACIÓN DE *S. elongatus* CON EL VECTOR pSyn\_1/D-TOPO-*PnirA:PTXD*.

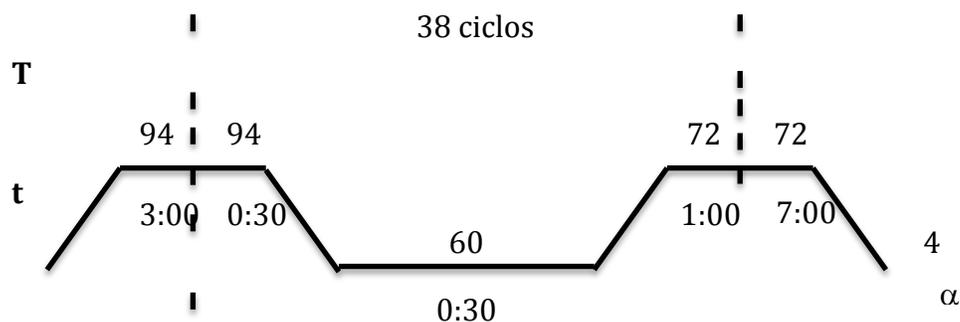
Se realizó la transformación de *S. elongatus* PCC7942 con el protocolo de Clerico modificado antes descrito.

## V.IX Análisis de las transformantes.

### V.IX.I PCR de colonia.

Se realizó PCR de colonia para verificar la presencia del inserto (vector pSyn\_1/D-TOPO-*PnirA:PTXD*).

La reacción se llevó a cabo con Taq polimerasa de la marca Fermentas, utilizando los primers PTXDFW-PTXDReV, *pnirA* FW- *pnirA* ReV, y SeqFW-SeqReV, (antes mostrados), bajo las condiciones indicadas en la **Figura 22**.



**Figura 22.** Diagrama de tiempos y temperaturas de PCR *S. elongatus* con plásmido vector pSyn\_1/D-TOPO-*PnirA:PTXD*.

La visualización de la amplificación se realizó por electroforesis en gel de agarosa-BrEt 1% expuesto a luz UV. Para el amplicón correspondiente a los oligonucleótidos pnirAFW - PNirA ReV la visualización se llevó a cabo en un gel de agarosa al 2.5%.

#### V.X **Cinéticas de crecimiento de *S. elongatus* PCC 7942.**

En este trabajo se realizaron cinéticas de crecimiento para determinar condiciones de cultivo, y analizar comportamientos de interés. La primera fase de cinéticas de crecimiento, con células tipo silvestre, se realizó en matraces Erlenmeyer de 50 ml conteniendo 10 ml de medio de cultivo líquido BG-11.

El resto de los experimentos de crecimiento analizados, con células transgénicas, (sacarosa, fierro, ácido nicotínico, aclimatación a Phi, etc.) fueron realizados en placas de cultivo de 24 pozos conteniendo 2 ml de cultivo BG-11 líquido. Ambos se cultivaron con temperatura de 34°C y agitación orbital constante a 200rpm.

**V.X.I Cinéticas de crecimiento de *S. elongatus* PCC7942 en medios de cultivo con fosfato y/o fosfito como fuente de fósforo.**

Para determinar la concentración de Pi que permita el crecimiento óptimo, y la concentración mínima de Phi capaz de inhibir el crecimiento de *S. elongatus*, se realizaron cinéticas de crecimiento utilizando medio de cultivo BG-11 con diferentes combinaciones de fuente de fósforo, de la manera siguiente:

- 0  $\mu\text{M}$  Pi, 0  $\mu\text{M}$  Phi.
- 50  $\mu\text{M}$  Pi
- 100  $\mu\text{M}$  Pi
- 500  $\mu\text{M}$  Pi
- 1000  $\mu\text{M}$  Pi
- 50  $\mu\text{M}$  Phi
- 100  $\mu\text{M}$  Phi
- 500  $\mu\text{M}$  Phi
- 1000  $\mu\text{M}$  Phi

**V.X.II Cinética de crecimiento de las líneas transformantes plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PTXD.**

Las transformantes y la cepa silvestre de *S. elongatus* con el vector pSyn\_1/D-TOPO-PTXD se sometieron a crecimiento en medio líquido BG-11 (antes descrito), las concentraciones de Pi empleadas fueron

- 0  $\mu$ M
- 50  $\mu$ M
- 100  $\mu$ M
- 500  $\mu$ M
- 1000  $\mu$ M

Las mismas concentraciones fueron empleadas en medio suplementado con Phi.

El crecimiento fue medido por método espectrofotométrico utilizando absorbancia de 750 nm cada 24 horas en el equipo Infinite M1000-TECAN en placas de 96 pozos conteniendo 200  $\mu$ L de medio, las mediciones se realizaron con 3 réplicas técnicas.

**V.X.III Cinética de crecimiento de *S. elongatus* con plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PTXD en presencia de níquel.**

El plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PTXD contiene un promotor inducible por níquel a una concentración de 5  $\mu\text{M}$ , con la intención de observar si es posible mejorar la inducción del promotor para tener una actividad elevada de la enzima PTXD realizamos una cinética de la cepa silvestre y una transformante en medio BG-11 óptimo variando la concentraciones de níquel siendo evaluadas las siguientes:

- 0  $\mu\text{M}$
- 1  $\mu\text{M}$
- 2  $\mu\text{M}$
- 3  $\mu\text{M}$
- 5  $\mu\text{M}$
- 7  $\mu\text{M}$
- 10  $\mu\text{M}$
- 20  $\mu\text{M}$
- 40  $\mu\text{M}$
- 80  $\mu\text{M}$

V.X.IV                    **Cinética de crecimiento de las líneas transformantes  
plásmido pSyn\_1/D-TOPO- *PnirA* : *PTXD*.**

Las transformantes de *S. elongatus* con el vector pSyn\_1/D-TOPO-*PnirA*:*PTXD* se sometieron a crecimiento en medio líquido BG-11 (antes descrito), las concentraciones de Pi empleadas fueron

- 0µM
- 25 µM
- 250 µM
- 1000 µM

Las mismas concentraciones fueron empleadas en medio suplementado con Phi.

Se analizaron 19 clonas y la cepa silvestre como control.

El crecimiento fue medido por método espectrofotométrico utilizando absorbancia de 750 nm cada 24 horas, las mediciones se realizaron con 3 réplicas técnicas.

V.X.V            **Cinética de crecimiento de las líneas transformantes plásmido pSyn\_1/D-TOPO-*PnirA:PTXD* en medio BG-11 suplementado con ácido nicotínico.**

Las transformantes de *S. elongatus* con el vector pSyn\_1/D-TOPO-*pnrA-PTXD* se sometieron a crecimiento en medio líquido BG-11 conteniendo

- 100  $\mu\text{M}$  de Pi
- 0  $\mu\text{M}$  de Pi y 0  $\mu\text{M}$  de Phi
- 100  $\mu\text{M}$  de Phi

Se sometieron 19 clones y la cepa silvestre a este análisis. El crecimiento fue medido por método espectrofotométrico utilizando absorbancia de 750 nm cada 24 horas, las mediciones se realizaron con 3 replicas técnicas.

V.X.VI            **Cinética de crecimiento de las líneas transformantes plásmido pSyn\_1/D-TOPO-*PnirA:PTXD* en medio BG-11 enriquecido con sacarosa.**

Este experimento fue realizado en placas de 24 pozos, conteniendo 2 ml de medio BG-11 suplementado con 5 g/L de sacarosa. Se analizaron 19 clonas y la cepa silvestre.

El crecimiento se realizo a 34° C, agitación constante de 150 rpm, con fotoperiodo 12 horas de luz con intensidad de 100  $\mu\text{Einsteins m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  /12 oscuridad.

De la misma manera se analizaron las 19 clonas y la cepa silvestre en medio con 5 g/L de sacarosa, variando la intensidad a 50  $\mu\text{Einsteins m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

**V.X.VII Cinética de crecimiento de las líneas transformantes plásmido pSyn\_1/D-TOPO- *PnirA:PTXD* en medio BG-11 con alta concentración de fierro.**

La concentración de fierro presente en el medio de cultivo BG-11 es de 20 $\mu\text{M}$ , se realizó una cinética de crecimiento adicionando 80 $\mu\text{M}$  de Fe, para obtener una concentración final en el medio de cultivo de 100 $\mu\text{M}$ , este análisis se realizó con medios que contenían 100 $\mu\text{M}$  de Pi y medios con 100 $\mu\text{M}$  de Phi. Se analizaron 19 clonas y la cepa silvestre.

## V.X.VIII **Efecto de la adaptación (aclimatación) a Phi.**

Se realizó una cinética de crecimiento para analizar la sustitución gradual del Pi por Phi, y su efecto en el crecimiento de 4 clonas y la cepa silvestre.

La primera etapa fue el crecimiento en 200 $\mu$ M de Pi. Pasados 8 días de estar creciendo en esa condición se realizó la recolección de las células, y el lavado de éstas con agua estéril, y se inocularon en condiciones que consistieron en disminuir la concentración de Pi hasta eliminarla y cultivar únicamente con Phi, como se muestra en la tabla 4:

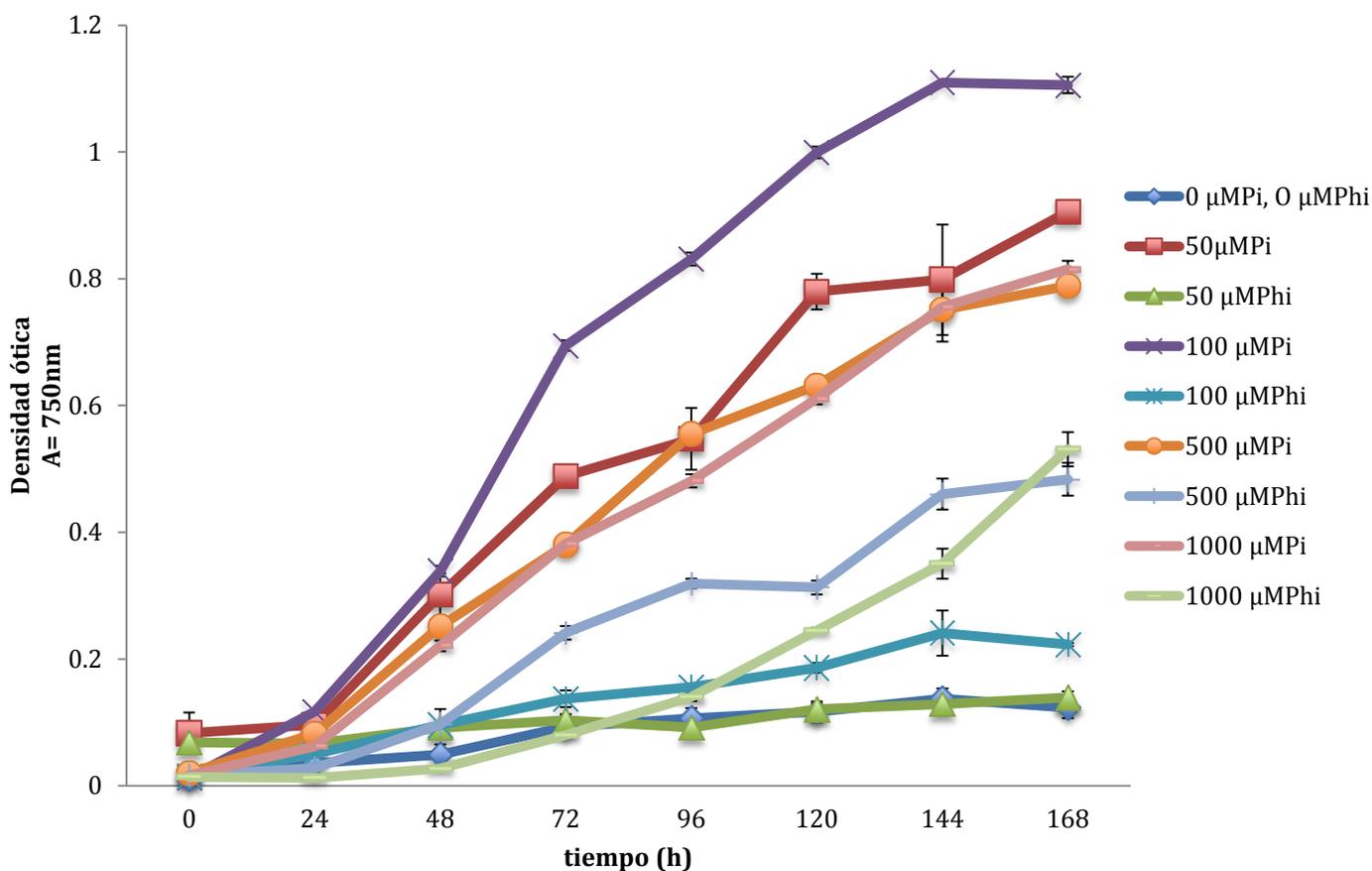
**Tabla 4.** Condiciones de cultivo para experimentos de adaptación a Phi.

<b>1ª. Etapa</b>	<b>2ª. Etapa</b>	<b>3ª. Etapa</b>	<b>4ª. Etapa</b>
200 $\mu$ M fosfato	100 $\mu$ M fosfato	100 $\mu$ M fosfato	0 $\mu$ M fosfato
200 $\mu$ M fosfato + 100 $\mu$ M fosfito	100 $\mu$ M fosfato + 100 $\mu$ M fosfito	100 $\mu$ M fosfato + 100 $\mu$ M fosfito	0 $\mu$ M fosfato + 100 $\mu$ M fosfito
200 $\mu$ M de fosfato + 200 $\mu$ M fosfito	100 $\mu$ M fosfato + 200 $\mu$ M fosfito	100 $\mu$ M fosfato + 200 $\mu$ M fosfito	0 $\mu$ M fosfato + 200 $\mu$ M fosfito
200 $\mu$ M fosfato + 500 $\mu$ M fosfito	100 fosfato + 500 $\mu$ M fosfito	100 fosfato + 500 $\mu$ M fosfito	0 $\mu$ M fosfato + 500 $\mu$ M fosfito.

## VI. RESULTADOS

### VI.I Cinética de crecimiento de *S. elongatus* PCC7942 en concentraciones ascendentes de fosfato y fosfito.

Se cultivaron células de tipo silvestre de *S. elongatus* en distintas concentraciones de Pi y Phi, monitoreando el crecimiento cada 24 horas (**Figura 23**).



**Figura 23. Cinética de crecimiento de *S. elongatus* en diversas concentraciones de Pi y Phi.** Las mediciones se realizaron con 3 replicas técnicas, la gráfica muestra el error estándar en cada punto de la cinética. Este experimento repitió su comportamiento en 4 réplicas biológicas.

Como se puede apreciar en la **Figura 23** las concentraciones probadas de Phi no permitieron el crecimiento de *S. elongatus*. Así mismo la ausencia de fuente de fósforo inhibe el crecimiento de dicho microorganismo.

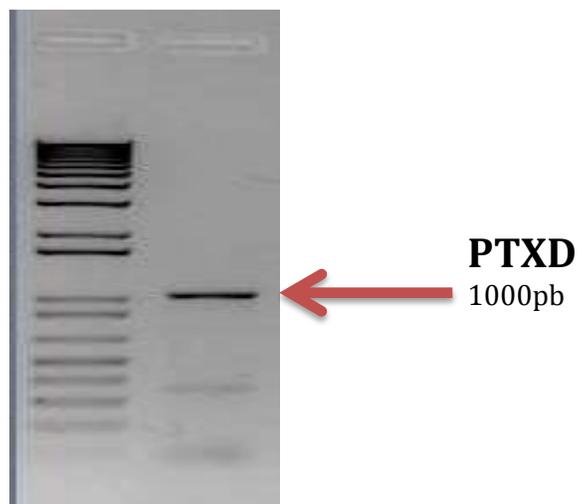
Concentraciones bajas de Pi, como 50  $\mu\text{M}$  le permiten a *S. elongatus* crecer óptimamente, esto debido a que esta cianobacteria posee la característica de crecer en ambientes oligotróficos (Scanlan, 2003; Waterbury et al., 1986), es por ello que altas concentraciones de Pi como 500 o 1000  $\mu\text{M}$ , no le resultan ventajosas en la tasa de crecimiento.

La fase exponencial del crecimiento tiene lugar 48 horas después de iniciarse la cinética, mostrando inmediatamente la tendencia diferencial existente entre Pi y Phi; obteniendo el máximo crecimiento a la hora 144 en todas las condiciones siendo 100  $\mu\text{M}$  el punto máximo alcanzado, seguido de 50  $\mu\text{M}$  el cual a pesar de presentar un error de 0.087 debido a la falta de homogeneidad del medio de cultivo al momento de tomar la lectura de la densidad óptica celular, presenta evidente crecimiento superior a los presentados en medios con Phi, y a su vez muy similar con el resto de las concentraciones de Pi analizadas.

En base a los resultados obtenidos en este experimento se decidió emplear como concentraciones apropiadas para la realización de esta tesis 50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  de Pi o de Phi.

## VI.II Amplificación del gen *PTXD* de *P. stutzeri* WM88.

El gen que codifica a la enzima fosfito deshidrogenasa fue amplificado exitosamente como se muestra en la **Figura 24**.

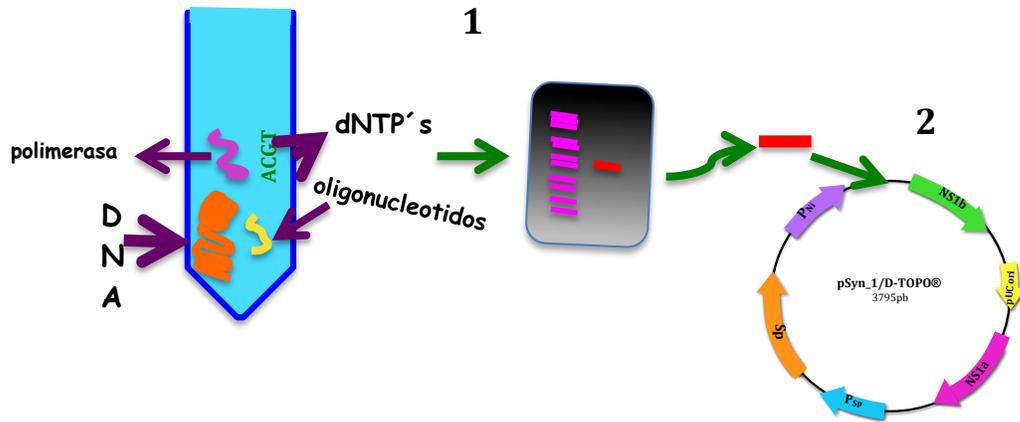


**Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa del gen *PTXD*.** Carril 1. 1kb+, carril 2.

Amplificación correspondiente al gen *PTXD* el cual tiene un tamaño de 1000 pb.

## VI.III Clonación del gen *PTXD* en el plásmido pSyn\_1/D-TOPO.

El DNA producto de la amplificación del gen *PTXD* fue purificado y clonado en el vector pSyn\_1/D-TOPO (**Figura 25**).



**Figura 25. Esquema de clonación de gen PTXD en vector pSyn\_1/D-TOPO.**

1) Amplificación del gen *PTXD* de *P. stutzeri*. 2) El DNA purificado es clonado en el plásmido vector pSyn\_1/D-TOPO.

#### VI.IV Transformación de células electrocompetentes de *E. coli* (DH5- $\alpha$ ) con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PTXD.

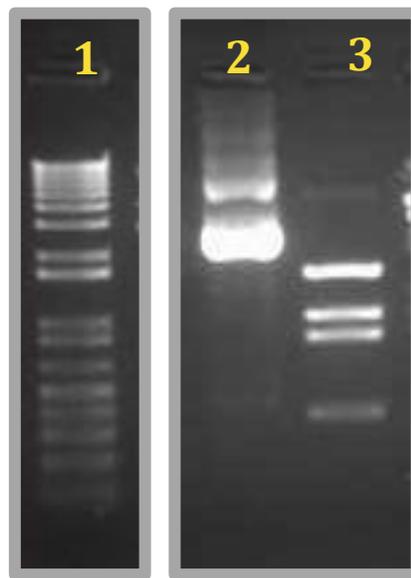
La construcción anterior fue clonada con éxito en células de *E. coli* DH5- $\alpha$ . Pasadas 16 horas crecieron abundantes colonias, bien definidas como se muestra en la

**Figura 26.**



**Figura 26. Células de *E. coli* transformadas con el vector pSyn\_1/D-TOPO-PTXD.** Las células se encuentran creciendo en medio LB con espectinomicina 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

El DNA plasmídico de las colonias seleccionadas fue extraído y analizado mediante restricción enzimática doble, utilizando las enzimas Xba I la cual produce 2 cortes en el plásmido pSyn\_1/D-TOPO en las bases 473 y 2512; y la enzima Nde I que produce un corte en el plásmido en la base 17, esto nos permitirá analizar si se ha clonado en sentido correcto dicho gen en el plásmido vector. **(Figura 27)**



**Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa del análisis de restricción enzimática con las enzimas Xba I y Nde I.** 1.- 1Kb plus, 2.- Plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PTXD sin digerir. 3.- Plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PTXD digerido con Xba I y Nde I.

En la figura anterior se observa que las bandas corresponden a las esperadas, un fragmento de 2039 pb el cual es producto del corte de la enzima Xba I en el plásmido pSyn\_1/D-TOPO, uno de 1017 pb producto del corte entre Nde I- Xba I, uno más de 457 pb el cual corresponde al corte generado por Nde I en el nucleótido 17 del plásmido y el corte de Xba I en el 473. Y un último fragmento el cual corresponde al corte de Xba I en el nucleótido 2512 hasta el resto del

plásmido, este fragmento es de aproximadamente 1288 pb, También existe una pequeña banda que no es visible debido a su tamaño de 30 pb la cual es producto de el corte de Xba I en la base 4816 y Nde I en el nucleótido 17 . Basados en este análisis se seleccionó una clona la cual presenta el patrón descrito anteriormente. Su DNA fue secuenciado utilizando los oligonucleótidos pSynseqFW y pSynseqRev siendo la secuencia obtenida mostrada en la **Figura 28**.

```
TTTCACCTGATTCATACCCCCTTTGGCAGACTGGGAAAATCTTGGACAAATTCCCAATTTGAGGT
GGTGTGAAGCTTCGAATTCGAAGGAGCCCTTACCTGCCATATGATGCTGCCGAAACTCGTTATA
ACTCACCGAGTACACGATGAGATCCTGCAACTGCTGGCGCCACATTGCGAGCTGATGACCAACC
AGACCGACAGCACGCTGACGCGCGAGGAAAATTCTGCGCCGCTGTCGCGATGCTCAGGCGATGA
TGCGTTCATGCCGATCGGGTCGATGCAGACTTTCTTCAAGCCTGCCCTGAGCTGCGTGTAGT
CGGCTGCGCGCTCAAGGGCTTCGACAATTTGATGTGGACGCCTGTACTGCCCGCGGGGTCTG
GCTGACCTTCGTGCCTGATCTGTTGACGGTCCCGACTGCCGAGCTGGCGATCGGACTGGCGGT
GGGGCTGGGGCGGCATCTGCGGGCAGCAGATGCGTTCGTCCGCTCTGGCGAGTTCAGGGCT
GGCAACCACAGTCTACGGCACGGGGCTGGATAACGCTACGGTCGGCATCCTTGGCATGGGCG
CCATCGGACTGGCCATGGCTGATCGCTTGCAGGGATGGGGCGCGACCCTGCAGTACCACGAG
GCGAAGGCTCTGGATACACAAACCGAGCAACGGCTCGGCCTGCGCCAGGTGGTTCGTCCGCTC
TGGCGAGTTCAGGGCTGGCAACCACAGTCTACGGCACGGGGCTGGATAACGCTACGGTCGG
CATCCTTGGCATGGGCGCCATCGGACTGGCCATGGCTGATCGCTTGCAGGGATGGGGCGCGAC
CCTGCAGTACCACGAGGCGAAGGCTCTGGATACACAAACCGAGCAACGGCTCGGCCTGCGCCA
GGTGGCGTGCAGCGAACTCTTCGCCAGCTCGGACTTCATCCTGCTGGCGCTTCCCTTGAATGCC
GATACCCAGCATCTGGTCAACGCCGAGCTGCTTGCCCTCGTACGGCCGGGCGCTCTGCTTGTA
AACCCCTGTTCGTGGTTTCGGTAGTGGATGAAGCCGCCGTGCTCGCGGCGCTTGAGCGAGGCCAG
CTCGGCGGGTATGCGGCGGATGTATTCGAAATGGAAGACTGGGCTCGCGCGGACCGGCCGCG
GCTGATCGATCCTGCGCTGCTCGCGCATCCGAATACGCTGTTCACTCCGCACATAGGGTTCGGCA
GTGCGCGCGGTGCGCCTGGAGATTGAACGTTGTGCAGCGCAGAACATCATCCAGGTATTGGCA
GGTGCGCGCCCAATCAACGCTGCGAACCCTGCTGCCAAGGCCGAGCCTGCCGCATGTTAATCT
AAAGGGTGTACCATATGCATCGAGTGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCA
TGCCGAACTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGT
```

**Figura 28. Secuencia pSyn\_1/D-TOPO-PTXD.** Secuencia obtenida con los oligonucleótidos pSynseqFW y pSynseqRev.

Esta secuencia se analizó mediante un blast en la pagina web del The National Center for Biotechnology Information (NCBI) mostrando el resultado siguiente

(Figura 29):

Sequence ID: |c|42875|Length: 1011|Number of Matches: 1

**Related Information**

Range 1: 4 to 1008 [Graphics](#)

[Next Match](#)

[Previous Match](#)

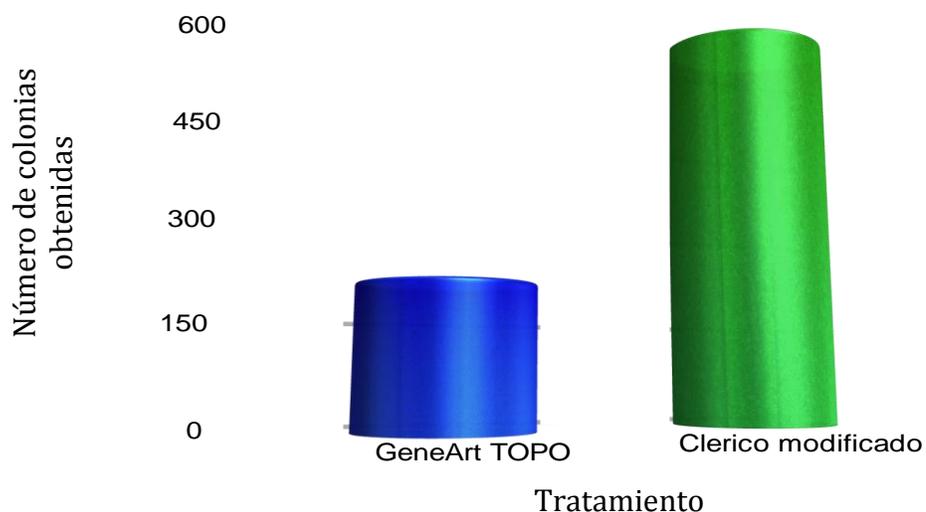
Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1687 bits(913)	0.0	1002/1038(97%)	33/1038(3%)	Plus/Plus
Query 1	CTGCCGAAACTCGTTATAACTCACCGAGTACACGATGAGATCCTGCAACTGCTGGCGCCA	60		
Sbjct 4	CTGCCGAAACTCGTTATAACTCACCGAGTACACGATGAGATCCTGCAACTGCTGGCGCCA	63		
Query 61	CATTGCGAGCTGATGACCAACCAGACCACAGCAGCTGACGCGGAGGAAATTCGCGC	120		
Sbjct 64	CATTGCGAGCTGATGACCAACCAGACCACAGCAGCTGACGCGGAGGAAATTCGCGC	123		
Query 121	CGCTGTCGCGATGCTCAGGCGATGATGGCGTTCATGCCGATCGGGTTCGATGACAGACTTT	180		
Sbjct 124	CGCTGTCGCGATGCTCAGGCGATGATGGCGTTCATGCCGATCGGGTTCGATGACAGACTTT	183		
Query 181	CTTCAAGCCTGCCCCTGAGCTGCGTGTAGTCGGCTGCGCGCTCAAGGGCTTCGACAATTC	240		
Sbjct 184	CTTCAAGCCTGCCCCTGAGCTGCGTGTAGTCGGCTGCGCGCTCAAGGGCTTCGACAATTC	243		
Query 241	GATGTGGACGCCTGTACTGCCCGGGGTCTGGCTGACCTTCGTGCCTGATCTGTTGACG	300		
Sbjct 244	GATGTGGACGCCTGTACTGCCCGGGGTCTGGCTGACCTTCGTGCCTGATCTGTTGACG	303		
Query 301	GTCCCAGTCCGAGCTGGCGATCGGACTGGCGGTGGGGCTGGGGCGGCATCTCGGGC	360		
Sbjct 304	GTCCCAGTCCGAGCTGGCGATCGGACTGGCGGTGGGGCTGGGGCGGCATCTCGGGC	362		
Query 361	AGCAGATGCGTTCGTCCGCTCTGGCGAGTTCAGGGCTGGCAACCACAGTTCTACGGCAC	420		
Sbjct 363	AGCAGATGCGTTCGTCCGCTCTGGCGAGTTCAGGGCTGGCAACCACAGTTCTACGGCAC	422		
Query 421	GGGGCTGGATAACGCTACGCTCGGCATCCTTGGCATGGGGCGCCCATCGGACTGATCCTT	480		
Sbjct 423	GGGGCTGGATAACGCTACGCTCGGCATCCTTGGCATGGG-CGCC-ATCGGACTGG-CCAT	479		
Query 481	GGCATGGGGCCCATCGGACTGGCCATGGCTGATCGCTTGACGGGATGGGGCGCGACC	540		
Sbjct 480	GGC-TG-----ATCG--CTTGC--A-GG--GAT-----GGGGCGCGACC	510		
Query 541	CTGCAGTACCACGAGGCGAAGGCTCTGGATACACAAACCGAGCAACGGCTCGGCCCTGCGC	600		
Sbjct 511	CTGCAGTACCACGAGGCGAAGGCTCTGGATACACAAACCGAGCAACGGCTCGGCCCTGCGC	570		
Query 601	CAGGTGGCGTGCAGCGAACTCTTCGCCAGCTCGGACTTCATCCTGCTGGCGCTTCCCTTG	660		
Sbjct 571	CAGGTGGCGTGCAGCGAACTCTTCGCCAGCTCGGACTTCATCCTGCTGGCGCTTCCCTTG	630		
Query 661	AATGCCGATACCCAGCATCTGGTCAACGCCGAGCTGCTTGCCCTCGTACGGCCGGGGCGCT	720		
Sbjct 631	AATGCCGATACCCAGCATCTGGTCAACGCCGAGCTGCTTGCCCTCGTACGGCCGGGGCGCT	690		
Query 721	CTGCTTGTAACCCCTGTCTGGTTCGGTAGTGGATGAACCGCCGCTGCTCGCGCGCTT	780		
Sbjct 691	CTGCTTGTAACCCCTGTCTGGTTCGGTAGTGGATGAACCGCCGCTGCTCGCGCGCTT	750		
Query 781	GAGCGAGGCCAGCTCGCGGGTATGCCGCGGATGTATTGAAATGGAAGACTGGGCTCGC	840		
Sbjct 751	GAGCGAGGCCAGCTCGCGGGTATGCCGCGGATGTATTGAAATGGAAGACTGGGCTCGC	810		
Query 841	GCGACCGCCCGCGCTGATCGATCCTGCGCTGCTCGCGCATCCGAATACGCTGTTCACT	900		
Sbjct 811	GCGACCGCCCGCGCTGATCGATCCTGCGCTGCTCGCGCATCCGAATACGCTGTTCACT	870		
Query 901	CCGCACATAGGGTTCGGCAGTGCAGCGGCTGCGCTGGAGATTGAACGTTGTGCAGCGCAG	960		
Sbjct 871	CCGCACATAGGGTTCGGCAGTGCAGCGGCTGCGCTGGAGATTGAACGTTGTGCAGCGCAG	930		
Query 961	AACATCATCCAGGTATTGGCAGGTGCGCGCCCAATCAACGCTGCGAACCCTGTCGCCAAG	1020		
Sbjct 931	AACATCATCCAGGTATTGGCAGGTGCGCGCCCAATCAACGCTGCGAACCCTGTCGCCAAG	990		
Query 1021	GCCGAGCCTGCCCATGT	1038		
Sbjct 991	GCCGAGCCTGCCCATGT	1008		

**Figura 29. Blast del pSyn\_1/D-TOPO-PTXD.** Este análisis se realizó con la secuencia obtenida con los oligonucleótidos pSynseqFW y pSynseqRev.

#### VI.V Transformación de *S. elongatus* PCC7942 con plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PTXD.

Para transformar *S. elongatus* se utilizaron 2 protocolos distintos, el recomendado por Invitrogen (fabricante del kit GeneArt *Synechococcus* TOPO) y el desarrollado por Clerico que se modificó en el presente trabajo con el objetivo eliminar las trazas de Pi en las células. No solo se logró eliminar el Pi presente, si no también optimizar el número de colonias transformadas (**Figura 30**). La implementación del nuevo protocolo (Clerico modificado) resultó exitosa puesto que hubo un incremento de aproximadamente el 200% en el número de transformantes obtenidas.



**Figura 30. Número de colonias obtenidas de la transformación de *S. elongatus* PCC7942 con el vector pSyn\_1/D-TOPO-PTXD.** En azul se puede apreciar el número de

colonias obtenidas con el protocolo recomendado por el fabricante del kit GeneArt *Synechococcus* TOPO, en verde se pueden apreciar el número de colonias obtenidas con el protocolo de Clerico modificado.

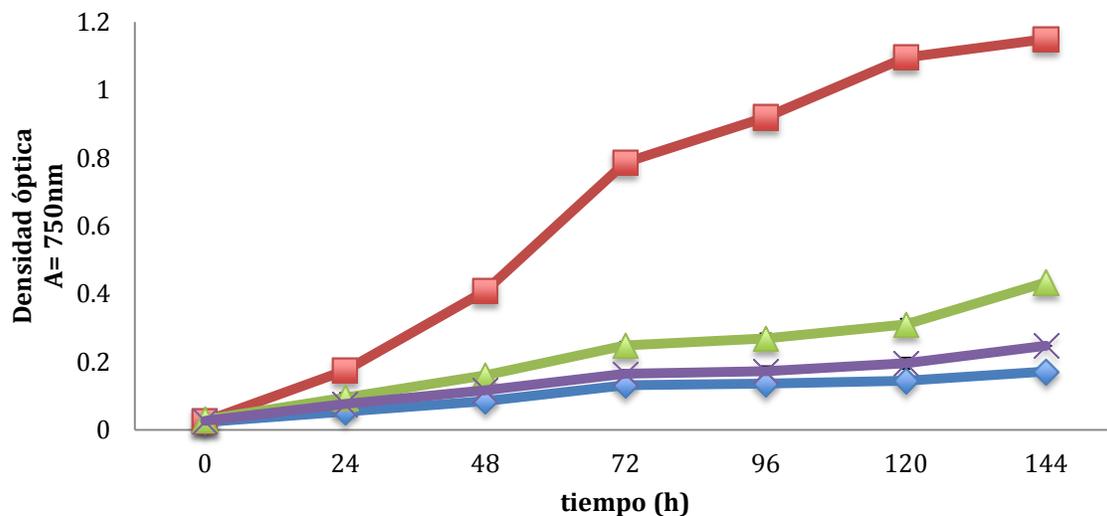
## VI.VI **Análisis de transformantes.**

### VI.VI.I **PCR de colonia.**

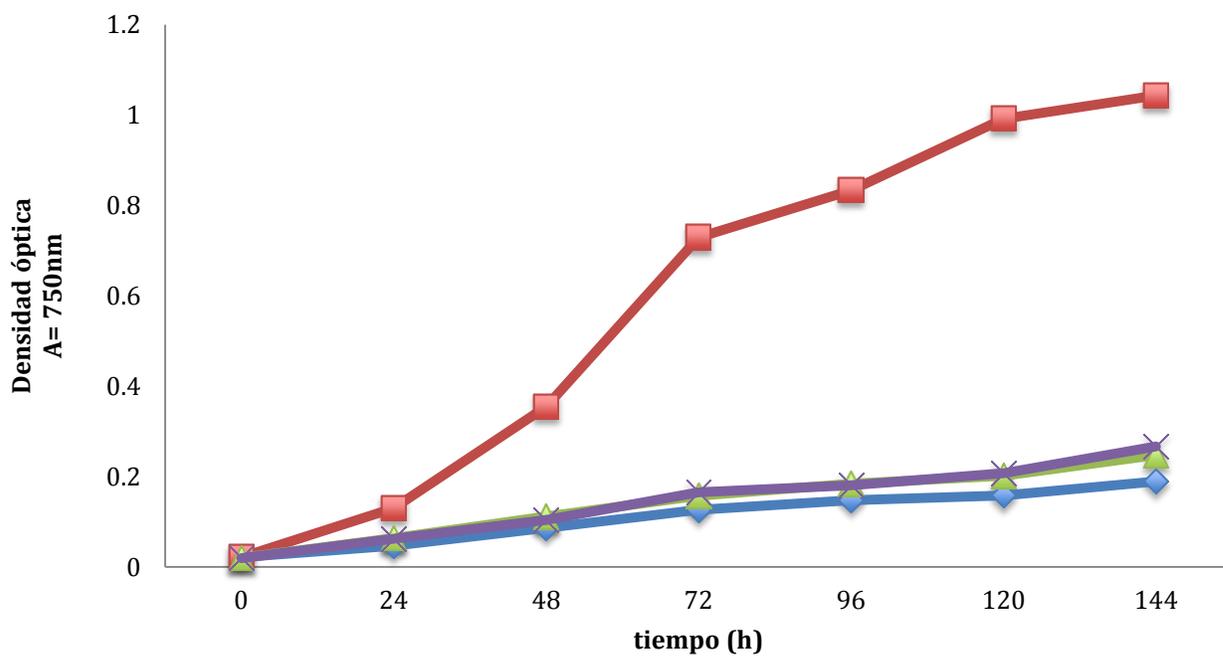
Las transformantes obtenidas se analizaron por PCR de colonia proveniente de cultivo en medio BG-11 sólido con espectinomicina, se analizaron 90 clonas por PCR con los oligonucleotidos PTXDFW y PTXDRev, todas resultaron positivas.

### VI.VI.II **Cinética de crecimiento de las líneas transformantes *PNi:PTXD*.**

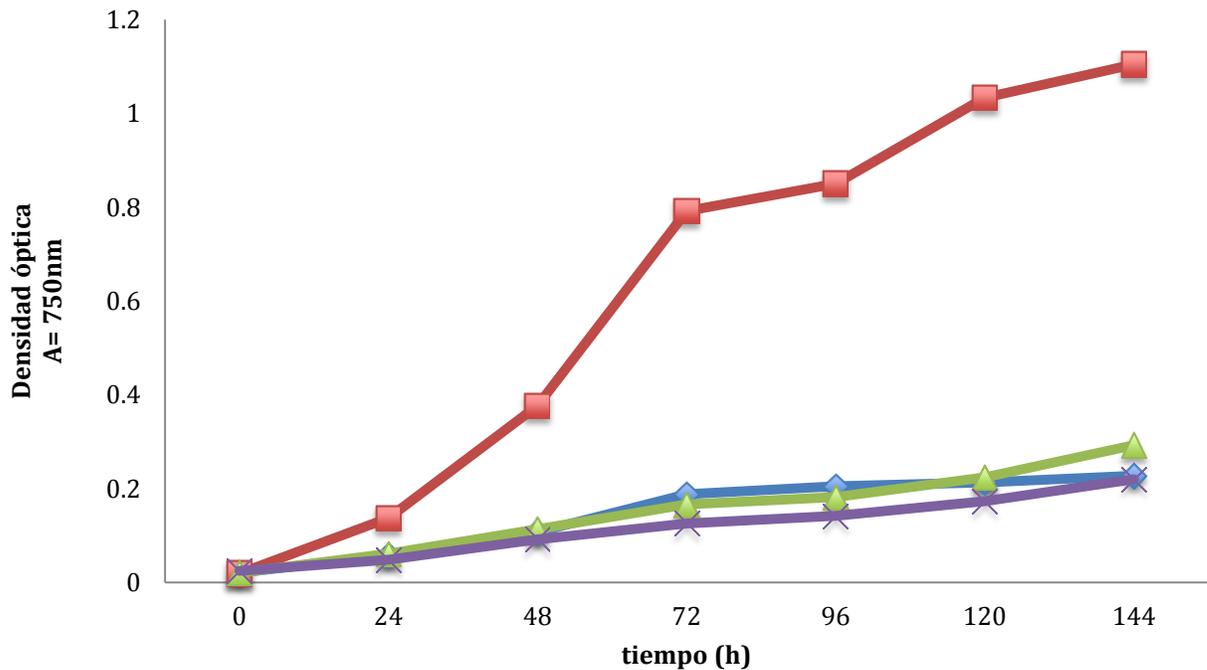
Se analizó el crecimiento de 5 cepas de *S. elongatus* transformadas con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PTXD, en la **Figuras 31, 32 y 33** se muestra el comportamiento de tres de éstas.



**Figura 31. Cinética de crecimiento de la cepa transformada (clona 51) con el gen *PTXD*.** En azul 0µM de Pi, 0µM de Phi. En morado 100µM de fosfito con 3µM de níquel. En verde 100µM de Phi. Y en rojo 100µM de Pi.

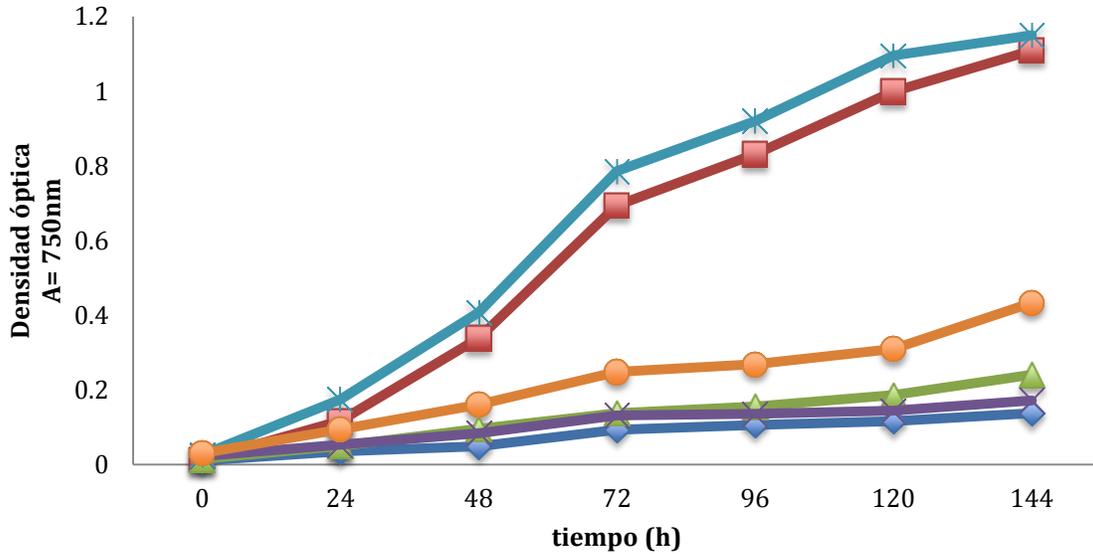


**Figura 32. Cinética de crecimiento de la cepa transformada (clona 12) con el gen *PTXD*.** En azul 0 $\mu$ M de Pi, 0 $\mu$ M de Phi. En morado 100 $\mu$ M de fosfito con 3 $\mu$ M de níquel. En verde 100 $\mu$ M de Phi. Y en rojo 100 $\mu$ M de Pi.



**Figura 33. Cinética de crecimiento de la cepa transformada (clona 28) con el gen *PTXD*.** En azul 0 $\mu$ M de Pi, 0 $\mu$ M de Phi. En morado 100 $\mu$ M de fosfito con 3 $\mu$ M de Níquel. En verde 100 $\mu$ M de Phi. Y en rojo 100 $\mu$ M de Pi.

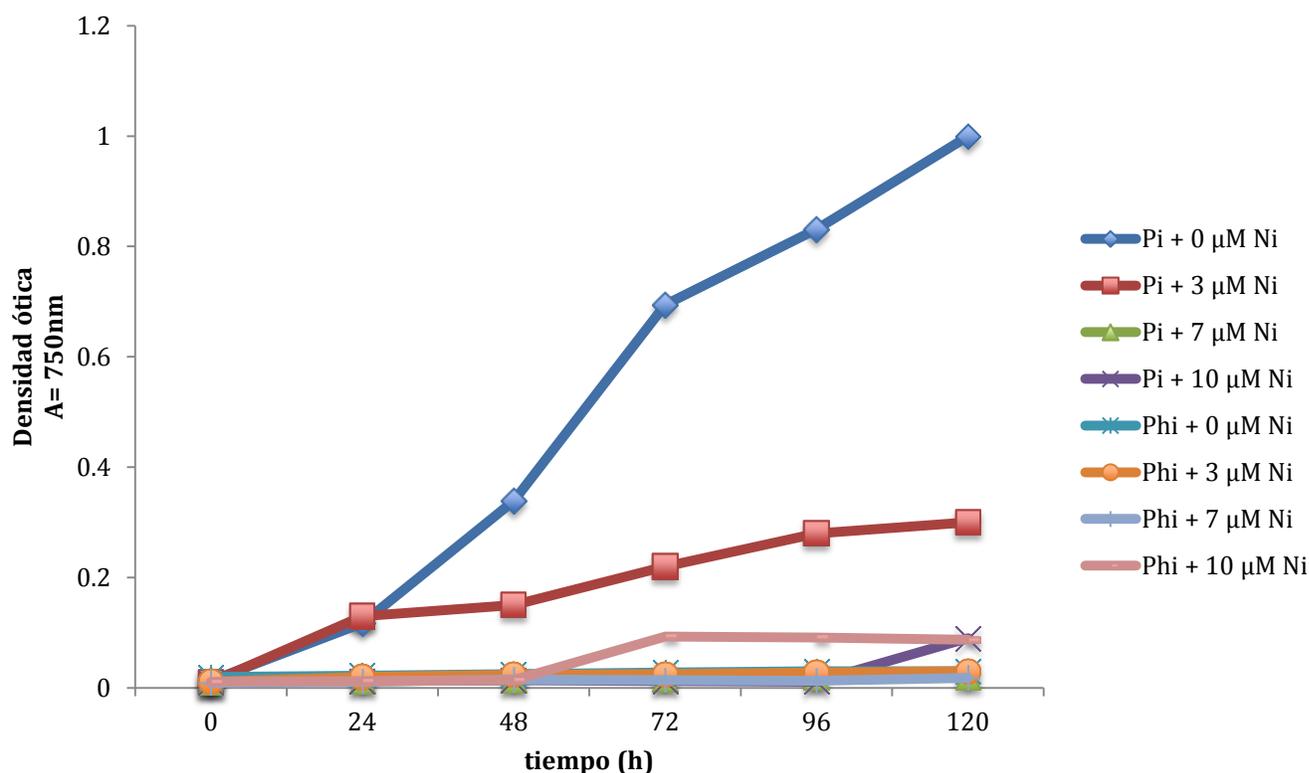
En la **Figura 34** se puede apreciar la diferencia en el crecimiento de la cepa transgénica 51, y la cepa silvestre como control de crecimiento.



**Figura 34. Cinética de crecimiento comparativa, cepa transgénica (clona 51) con la cepa silvestre de *S. elongatus*.** En azul y morado se puede apreciar el crecimiento de ambas cepas en medio BG-11 con 0  $\mu\text{M}$  de Pi y 0  $\mu\text{M}$  de Phi respectivamente. En verde se muestra el crecimiento de la cepa silvestre en medio enriquecido con Phi. La línea naranja representa la cepa transgénica 51 en Phi. El color cian y rojo corresponde al crecimiento en Pi de la cepa transgénica y la silvestre, respectivamente.

Las cepas que contienen el gen *PTXD* muestran crecimiento óptimo en medio BG-11 conteniendo 100 $\mu\text{M}$  de Pi, se probó esa misma concentración en medio suplementado con Phi, resultando muy poco crecimiento en comparación con Pi, a pesar de esto, se muestra un poco más de crecimiento que en medio carente de fuente fosfatada. La concentración de níquel presente en el medio de cultivo resulta desfavorable para el crecimiento de las 3 cepas evaluadas.

Debido al bajo crecimiento presentado en medio suplementado con Phi, se evaluó el aumento en la concentración de níquel el cual es agente inductor de la expresión del gen PTXD. Mostrando este incremento un efecto tóxico como se muestra en la **Figura 35**.



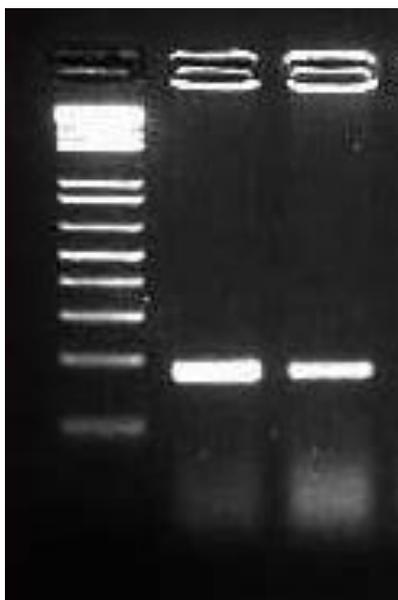
**Figura 35. Cinética de crecimiento de *S. elongatus* tipo silvestre en presencia de níquel.**

Debido al bajo crecimiento presentado por las cepas transgénicas en Phi, y el efecto no deseado al inducir el promotor de Ni, se optó por la alternativa de probar un promotor diferente para mejorar la expresión del gen *PTXD*. Por esta razón se

elaboró la construcción de plásmido pSyn\_1/D-TOPO adicionando en la construcción un promotor inducible por 17.6 mM de Nitrato (*PnirA*) descrito por Qi et al. (2005).

#### VI.VII **Amplificación de promotor inducible por Nitrato (*PnirA*) de *S. elongatus* PCC7942.**

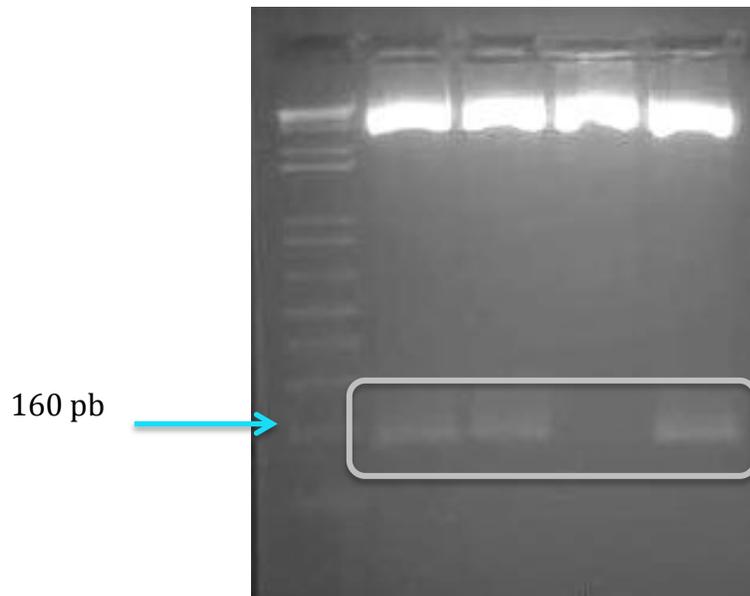
El resultado del PCR para la obtención del *PnirA* se verificó, por medio de gel de agarosa (**Figura 36**). Se comprobó que la longitud de la región amplificada corresponde con la esperada.



**Figura 36. Análisis por electroforesis en gel de agarosa 2.5% BrEt del PCR realizado para amplificar el *PnirA*. Carril 1. 1Kb plus. Carril 2 y 3. *PnirA* (166pb).**

## VI.VIII Clonación del PNirA en el vector pJET.

El *PnirA* fue clonado en el vector pJet y transformado en células de *E. coli* DH5- $\alpha$  exitosamente, esto se corroboró por el perfil de DNA de algunas clonas obtenidas al ser digeridos con las enzimas Hind III y EcoR I que permiten la liberación del fragmento de 166pb. (**Figura 37**).



**Figura 37.** Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de DNA de bacterias transgenicas con el plásmido pJet, mediante digestion con enzimas **Hind III** y **EcoR I**. Carril 1.- 1kb plus, carril. 2-5.- DNA digerido con Hind III y EcoR I.

#### VI.IX **Clonación de P*NirA* en pSyn\_1/D-TOPO-PTXD.**

El DNA tratado con las enzimas de restricción genera el fragmento correspondiente a P*nirA* con los sitios específicos para la unión con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PTXD el cual se encuentra digerido también con estas enzimas lo que permite la unión direccional correcta. Esto se pudo verificar al transformar células de *E. coli* con el producto de esta ligación y obtener 4 colonias positivas.

#### VI.X **Análisis del vector pSyn\_1/D-TOPO-P*nirA*-PTXD.**

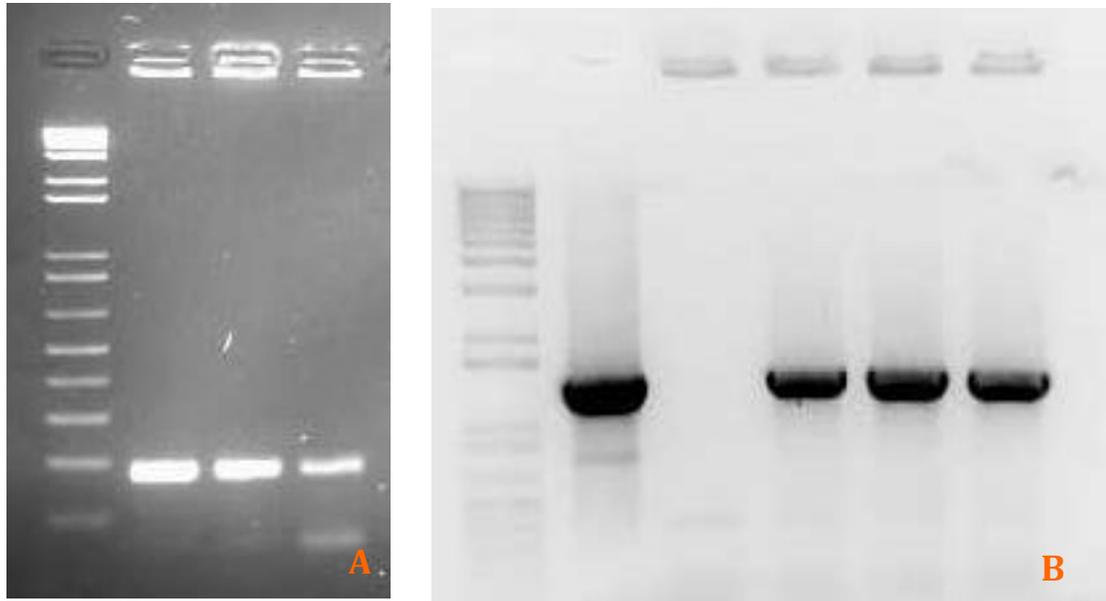
Las cuatro colonias crecidas en el medio LB con el antibiótico de resistencia fueron analizadas para la comprobación de la presencia del pSyn\_1/D-TOPO-P*nirA*-PTXD obteniendo los siguientes resultados.

##### VI.X.I **PCR**

Se realizó PCR con los oligonucleótidos P*nirA* FW y P*nirA* Rev, así también con los oligonucleótidos recomendados por el fabricante del kit GeneArt *Synechococcus*,

esto para verificar la presencia de ambos genes de interés en la construcción.

**(Figura 38)**



**Figura 38. Análisis por electroforesis en gel de agarosa para la verificación del plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD. A)** Gel de agarosa al 2.5% donde se muestra la amplificación con los oligonucleótidos PnirAFW y PnirARev. Carril 1.- 1kb plus, carril 2.- Clona 1. Carril 3.- Clona 2. Carril 4.- Clona 3. **B)** Gel de agarosa al 1% de la amplificación del gen *PTXD*. Carril 1.- 1kb plus, carril 2.- pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD. Carril 3.- *S. elongatus* silvestre. Carril 4.- Clona 1. Carril 5.- Clona 2. Carril 6.- Clona 3.

## VI.X.II Secuenciación.

Se seleccionó la clona 1 para su análisis por secuenciación, con los oligonucleótidos recomendados por el fabricante del kit GeneArt Synechococcus. Siendo el resultado positivo a la presencia de ambos fragmentos de interés. (**Figura 39**).

```
ATTTACCTGATTTTCATACCCCCTTTGGCAGACTGGGAAAATCTTGGACAAATTCCCAATTTGAGGT
GGTGTGAAGCTTTCCTCTCAGCTCCAAAAAGTATCAATGATTACTTAATGTTTGTCTGCGCAAAC
TTCTTGCAGAACATGCATGATTTACAAAAAGTTGTAGTTTCTGTTACCAATTGCGAATCGAGAAGTGC
CCTAATCTGCCGAGTATGCAAGCTGCTTTGTAGGCAGATCAATCCGAATTCGAAGGAGCCCTTCAC
CTGCCATATGATGCTGCCGAACTCGTTATAACTCACCGAGTACACGATGAGATCCTGCAACTGCT
GGCGCCACATTGCGAGCTGATGACCAACCAGACCGACAGCACGCTGACGCGCGAGGAAATTCG
CGCCGCTGTCGCGATGCTCAGGCGATGATGGCGTTCATGCCGATCGGGTCGATGCAGACTTTCT
TCAAGCCTGCCCTGAGCTGCGTGTAGTCGGCTGCGCGCTCAAGGGCTTCGACAATTCGATGTGG
ACGCCTGTACTGCCCGCGGGGTCTGGCTGACCTTCGTGCCTGATCTGTTGACGGTCCCAGCTGC
CGAGCTGGCGATCGGACTGGCGGTGGGGCTGGGGGCGGCATCTGCGGGCAGCAGATGCGTTCG
TCCGCTCTGGCGAGTCCAGGGCTGGCAACCACAGTTCTACGGCACGGGGCTGGATAACGCTAC
GGTCGGCATCCTTGGCATGGGGCGCCCATCGGACTGATCCTTGGCATGGGCGCCCATCGGACTG
GCCATGGCTGATCGCTTGCAGGGATGGGGGCGCGACCCTGCAGTACCACGAGGCGAAGGCTCT
GGATACACAAACCGAGCAACGGCTCGGCCCTGCGCCAGGTGGCGTGCAGCGAACTCTTCGCCAGC
TCGGACTTCATCCTGCTGGCGCTTCCTTGAATGCCGATACCAGCATCTGGTCAACGCCGAGCT
GCTTGCCCTCGTACGGCCGGGCGCTCTGCTTGTAAACCCCTGTCGTGGTTCGGTAGTGGATGAAG
CCGCCGTGCTCGCGGCGCTTGAGCGAGGCCAGCTCGGCCGGTATGCGGCGGATGTATTGAAAT
GGAAGACTGGGCTCGCGCGGACCGGCCGCGGCTGATCGATCCTGCGCTGCTCGCGCATCCGAAT
ACGCTGTTCACTCCGCACATAGGGTCGGCAGTGCGCGCGGTGCGCCTGGAGATTGAACGTTGTG
CAGCGCAGAACATCATCCAGGTATTGGCAGGTGCGCGCCCAATCAACGCTGCGAACCGTCTGCC
CAAGGCCGAGCCTGCCGATGTAACTAAAGGGTGTACCATATGCATCGAGTGCCTGGCGGCAG
TAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCGAACTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGT
AGTGTG
```

**Figura 39. Secuencia pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD.** Secuencia obtenida con los oligonucleótidos pSynseqFW y pSynseqRev. En color amarillo se puede apreciar la secuencia codificante al promotor de nitrato *PnirA* (166 pb). En color cian se puede observar la secuencia correspondiente al gen que codifica para la enzima fosfito deshidrogenasa PTXD (1000 pb) y en rojo los codones de inicio y fin.

Esta secuencia fue analizada mediante un blast en la pagina web del The National Center for Biotechnology Information (NCBI) mostrando los resultados siguientes

**(Figura 40 y 41):**

Sequence ID: lcl|56903Length: 167Number of Matches: 1

**Related Information**

**Range 1: 1 to 167**[Graphics](#)

[Next Match](#)

[Previous Match](#)

		Alignment statistics for match #1			
	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	309 bits(167)	1e-88	167/167(100%)	0/167(0%)	Plus/Plus
Query	80	TCCCTCTCAGCTCCAAAAAGTATCAATGATTACTTAATGTTTGTCTGCGCAAACCTTCTT	139		
Sbjct	1	TCCCTCTCAGCTCCAAAAAGTATCAATGATTACTTAATGTTTGTCTGCGCAAACCTTCTT	60		
Query	140	GCAGAACATGCATGATTACAAAAAGTTGTAGTTTCTGTTACCAATTGCGAATCGAGAAC	199		
Sbjct	61	GCAGAACATGCATGATTACAAAAAGTTGTAGTTTCTGTTACCAATTGCGAATCGAGAAC	120		
Query	200	TGCTAATCTGCGAGTATGCAAGCTGCTTTGTAGGCAGATCAATCC	246		
Sbjct	121	TGCTAATCTGCGAGTATGCAAGCTGCTTTGTAGGCAGATCAATCC	167		

**Figura 40. Blast del PnirA en pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD.** Este análisis se realizó con la secuencia obtenida con los oligonucleótidos pSynseqFW y pSynseqRev.

De la misma manera se analizó la secuencia para verificar la presencia del gen de la PTXD en el vector. (**Figura 41**).

Sequence ID: lc|31711Length: 1011Number of Matches: 1

**Related Information**

Range 1: 1 to 1009Graphics

Next Match

Previous Match

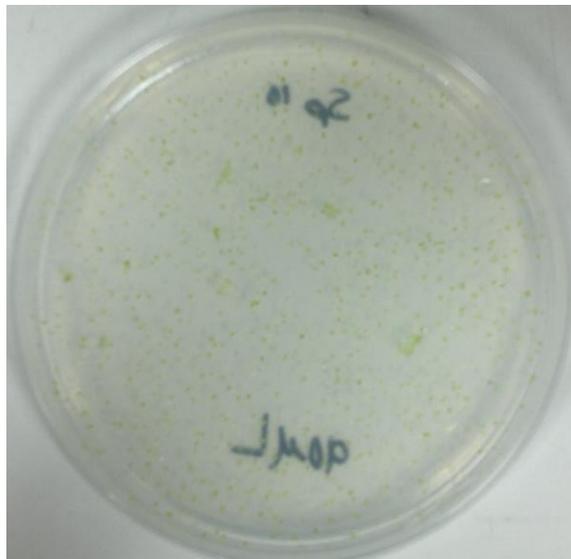
Alignment statistics for match #1					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1688 bits(914)	0.0	1005/1042(96%)	33/1042(3%)	Plus/Plus	
Query 278	ATGCTGCCGAAACTCGTTATAA	ATGCTGCCGAAACTCGTTATAA	CTCACCAGTACACGATGAGATCCTGCAACTGCTGGCG	337	
Sbjct 1	ATGCTGCCGAAACTCGTTATAA	ATGCTGCCGAAACTCGTTATAA	CTCACCAGTACACGATGAGATCCTGCAACTGCTGGCG	60	
Query 338	CCACATTGCGAGCTGATGACCA	CCACATTGCGAGCTGATGACCA	ACCAGACGACGCTGACGCGCAGGAAATTCG	397	
Sbjct 61	CCACATTGCGAGCTGATGACCA	CCACATTGCGAGCTGATGACCA	ACCAGACGACGCTGACGCGCAGGAAATTCG	120	
Query 398	CGCCGCTGTCGCGATGCTCAGG	CGCCGCTGTCGCGATGCTCAGG	CGCGATGATGGCGTTCATGCCCGATCGGGTCGATGCAGAC	457	
Sbjct 121	CGCCGCTGTCGCGATGCTCAGG	CGCCGCTGTCGCGATGCTCAGG	CGCGATGATGGCGTTCATGCCCGATCGGGTCGATGCAGAC	180	
Query 458	TTTCTTCAAGCCTGCCCTGAGC	TTTCTTCAAGCCTGCCCTGAGC	TGCGTGTAGTCGGCTGCGCGCTCAAGGGCTTCGACAAT	517	
Sbjct 181	TTTCTTCAAGCCTGCCCTGAGC	TTTCTTCAAGCCTGCCCTGAGC	TGCGTGTAGTCGGCTGCGCGCTCAAGGGCTTCGACAAT	240	
Query 518	TTTCGATGTGGACGCTGTACTG	TTTCGATGTGGACGCTGTACTG	CCCCGGGGTCTGGCTGACCTTCGTCGCTGATCTGTTG	577	
Sbjct 241	TTTCGATGTGGACGCTGTACTG	TTTCGATGTGGACGCTGTACTG	CCCCGGGGTCTGGCTGACCTTCGTCGCTGATCTGTTG	300	
Query 578	ACGGTCCCGACTGCCGAGCTGG	ACGGTCCCGACTGCCGAGCTGG	CGATCGGACTGGCGGTGGGGCTGGGGCGGCATCTGCG	637	
Sbjct 301	ACGGTCCCGACTGCCGAGCTGG	ACGGTCCCGACTGCCGAGCTGG	CGATCGGACTGGCGGTGGGGCTGGGGCGGCATCTGCG	359	
Query 638	GGCAGCAGATGCGTTCGTCGCT	GGCAGCAGATGCGTTCGTCGCT	TGGCGAGTTCAGGGCTGGCAACCACAGTTCTACGG	697	
Sbjct 360	GGCAGCAGATGCGTTCGTCGCT	GGCAGCAGATGCGTTCGTCGCT	TGGCGAGTTCAGGGCTGGCAACCACAGTTCTACGG	419	
Query 698	CACGGGGCTGGATAACGCTACG	CACGGGGCTGGATAACGCTACG	GTCGGCATCCTTGGCATGGGGCGCCATCGGACTGATC	757	
Sbjct 420	CACGGGGCTGGATAACGCTACG	CACGGGGCTGGATAACGCTACG	GTCGGCATCCTTGGCATGGGGCGCCATCGGACTGATC	476	
Query 758	CTTGGCATGGGCGCCATCGGACT	CTTGGCATGGGCGCCATCGGACT	TGGCCATGGCTGATCGCTTGCAGGGATGGGGCGCG	817	
Sbjct 477	CATGGC-TG-----ATCG--	CATGGC-TG-----ATCG--	-CCTGC--A-GG--GAT-G---G--GGC--G----CG--	507	
Query 818	ACCCTGCAGTACCACGAGGCGA	ACCCTGCAGTACCACGAGGCGA	AGGCTCTGGATACACAACCGAGCAACGGCTCGGCCTG	877	
Sbjct 508	ACCCTGCAGTACCACGAGGCGA	ACCCTGCAGTACCACGAGGCGA	AGGCTCTGGATACACAACCGAGCAACGGCTCGGCCTG	567	
Query 878	CGCCAGGTGGCGTGCAGCGAACT	CGCCAGGTGGCGTGCAGCGAACT	CTTCGCCAGCTCGGACTTCATCCTGCTGGCGCTTCCC	937	
Sbjct 568	CGCCAGGTGGCGTGCAGCGAACT	CGCCAGGTGGCGTGCAGCGAACT	CTTCGCCAGCTCGGACTTCATCCTGCTGGCGCTTCCC	627	
Query 938	TTGAATGCCGATACCCAGCATCT	TTGAATGCCGATACCCAGCATCT	TGGTCAACGCCGAGCTGCTTGCCCTCGTACGGCCGGC	997	
Sbjct 628	TTGAATGCCGATACCCAGCATCT	TTGAATGCCGATACCCAGCATCT	TGGTCAACGCCGAGCTGCTTGCCCTCGTACGGCCGGC	687	
Query 998	GCTCTGCTTGTAACCCCTGTCG	GCTCTGCTTGTAACCCCTGTCG	TGGTTCGGTAGTGGATGAAGCCGCGTCTCGCGCG	1057	
Sbjct 688	GCTCTGCTTGTAACCCCTGTCG	GCTCTGCTTGTAACCCCTGTCG	TGGTTCGGTAGTGGATGAAGCCGCGTCTCGCGCG	747	
Query 1058	CTTGAGCGAGGCCAGCTCGGCG	CTTGAGCGAGGCCAGCTCGGCG	GGTATGCGCGGATGATTCGAAATGGAAGACTGGGCT	1117	
Sbjct 748	CTTGAGCGAGGCCAGCTCGGCG	CTTGAGCGAGGCCAGCTCGGCG	GGTATGCGCGGATGATTCGAAATGGAAGACTGGGCT	807	
Query 1118	CGCGCGACCGGCCCGGCTGATC	CGCGCGACCGGCCCGGCTGATC	GATCGATCCTGCGCTGCTCGCGCATCCGAATACGCTGTT	1177	
Sbjct 808	CGCGCGACCGGCCCGGCTGATC	CGCGCGACCGGCCCGGCTGATC	GATCGATCCTGCGCTGCTCGCGCATCCGAATACGCTGTT	867	
Query 1178	ACTCCGCACATAGGGTCGGCAG	ACTCCGCACATAGGGTCGGCAG	TGCGCGGTCGCGCTGGAGATTGAACGTTGTGCAGCG	1237	
Sbjct 868	ACTCCGCACATAGGGTCGGCAG	ACTCCGCACATAGGGTCGGCAG	TGCGCGGTCGCGCTGGAGATTGAACGTTGTGCAGCG	927	
Query 1238	CAGAACATCATCCAGGTATTGG	CAGAACATCATCCAGGTATTGG	CAGGTGCGCGCCAATCAACGCTGCGAACCCTGCCCC	1297	
Sbjct 928	CAGAACATCATCCAGGTATTGG	CAGAACATCATCCAGGTATTGG	CAGGTGCGCGCCAATCAACGCTGCGAACCCTGCCCC	987	
Query 1298	AAGGCCGAGCCTGCCGATGTT	AAGGCCGAGCCTGCCGATGTT	1319		

**Figura 41. Blast del gen PTXD en pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD.** Este análisis se

realizó con la secuencia obtenida con los oligonucleótidos pSynseqFW y pSynseqRev

## VI.XI Transformación de *S. elongatus* con el vector pSyn\_1/D-TOPO-PNirA-PTXD.

Una vez verificado el vector pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD se transformó en *S. elongatus*, obteniendo abundantes colonias (**Figura 42**) de las cuales se cultivaron 96 clonas, en medio BG-11 con espectinomicina para escrutinio de transformantes.



**Figura 42.** Células de *S. elongatus* transformadas con el vector pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD. Las células se encuentran creciendo en medio BG-11 con espectinomicina  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

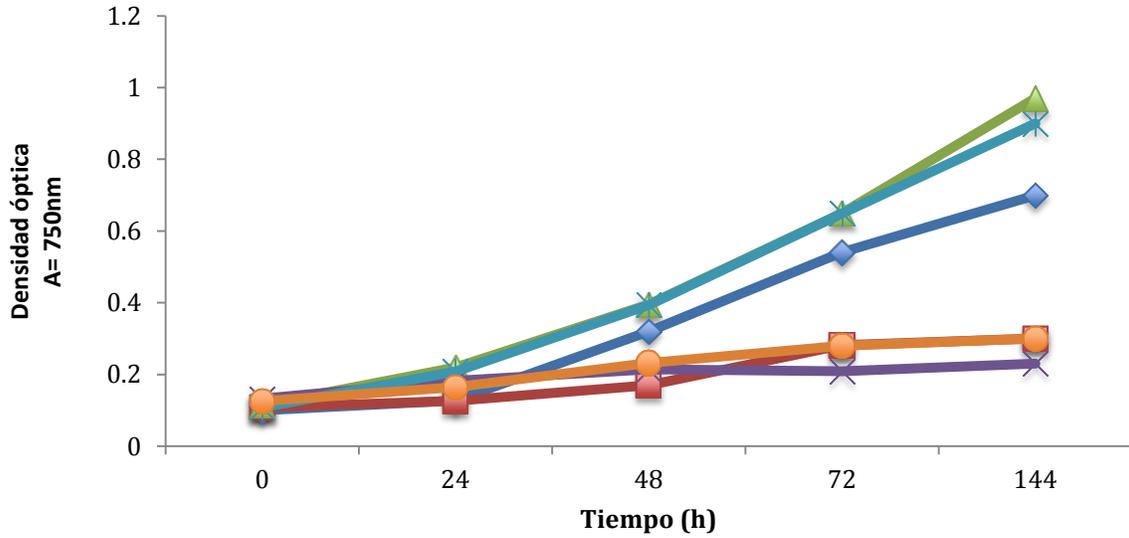
## VI.XII **Análisis de transformantes.**

Las clonas se analizaron mediante PCR de colonia, con los oligonucleótidos correspondientes al gen PnirA, los oligonucleótidos para la amplificación de *PTXD*, y los oligonucleótidos recomendados por el fabricante del kit. Todas las muestras analizadas, resultaron positivas a todos los PCR realizados.

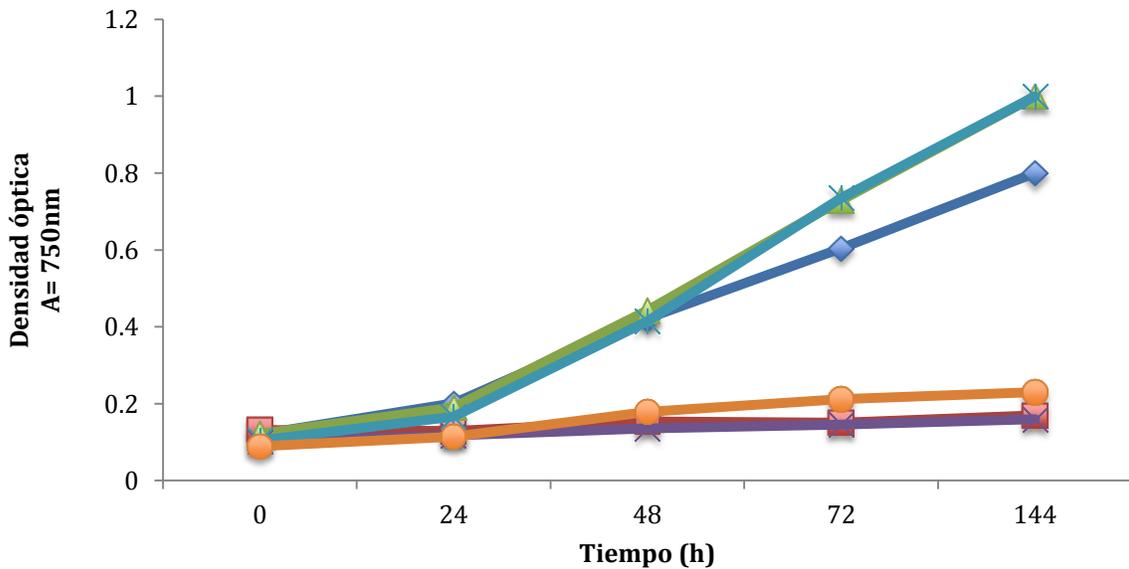
## VI.XIII **Cinéticas de crecimiento de *S. elongatus* transformadas con el vector pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD.**

### VI.XIII.I **Cinética en concentraciones ascendentes de fosfato y/o fosfito.**

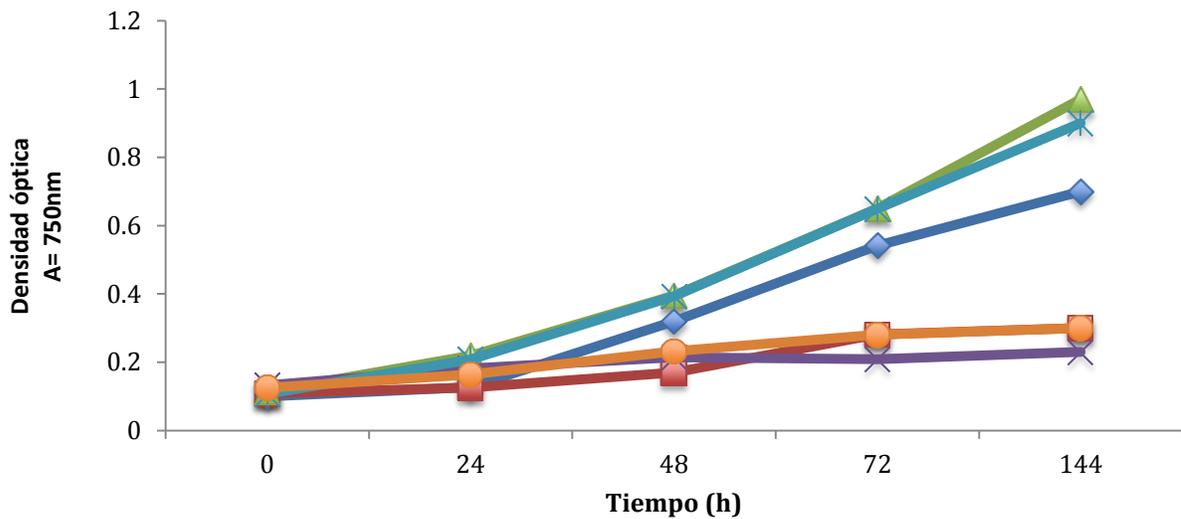
Se analizó la capacidad de 20 transformantes de *S. elongatus* con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD de crecer en Phi. En las **Figuras 43, 44 y 45** se muestra el crecimiento celular de tres de las transformantes analizadas.



**Figura 43. Células de *S. elongatus* transformadas con el vector pSyn\_1/D-TOPO-PnrA-PTXD clona O.** En azul se puede apreciar el crecimiento en medio BG-11 con 25  $\mu\text{M}$  de Pi, el verde corresponde a 250  $\mu\text{M}$  de Pi, el cian indica 1000  $\mu\text{M}$  de Pi, el color rojo indica el crecimiento en 25  $\mu\text{M}$  de Phi, el morado 250  $\mu\text{M}$  de concentración de Phi, y la línea naranja representa 1000  $\mu\text{M}$  de Phi.

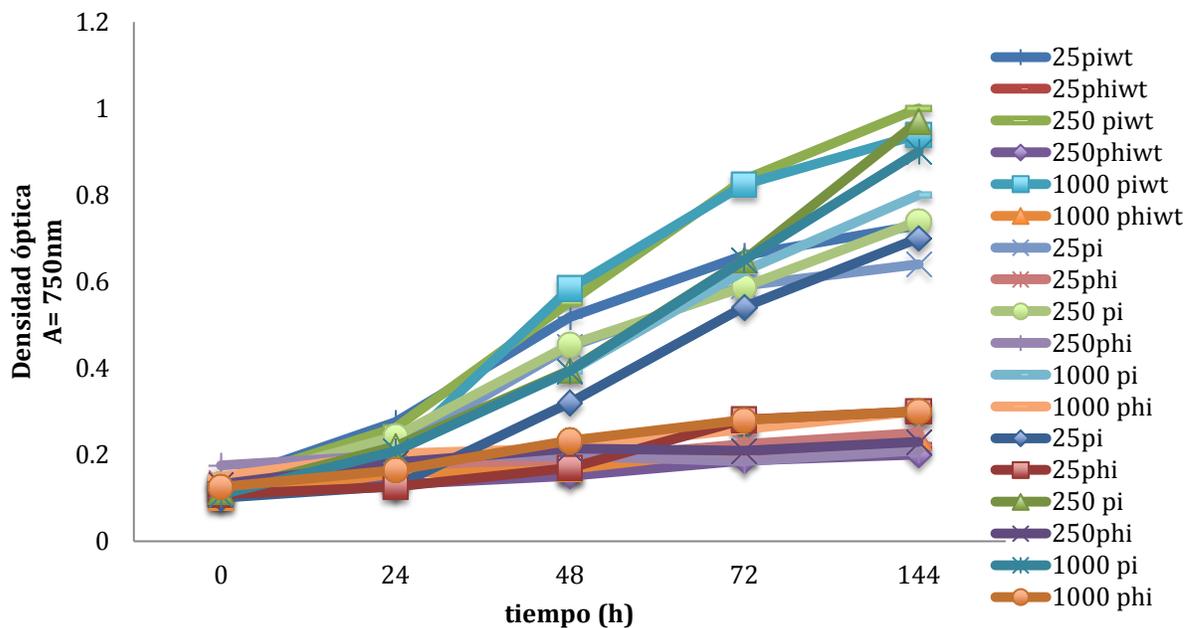


**Figura 44. Células de *S. elongatus* transformadas con el vector pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD clona P.** En azul se puede apreciar el crecimiento en medio BG-11 con 25  $\mu\text{M}$  de Pi, el verde corresponde a 250  $\mu\text{M}$  de Pi, el cian indica 1000  $\mu\text{M}$  de Pi, el color rojo indica el crecimiento en 25  $\mu\text{M}$  de Phi, el morado 250  $\mu\text{M}$  de concentración de Phi, y la línea naranja representa 1000  $\mu\text{M}$  de Phi.



**Figura 45. Células de *S. elongatus* transformadas con el vector pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD clona B.** En azul se puede apreciar el crecimiento en medio BG-11 con 25  $\mu\text{M}$  de Pi, el verde corresponde a 250  $\mu\text{M}$  de Pi, el cian indica 1000  $\mu\text{M}$  de Pi, el color rojo indica el crecimiento en 25  $\mu\text{M}$  de Phi, el morado 250  $\mu\text{M}$  de concentración de Phi, y la línea naranja representa 1000  $\mu\text{M}$  de Phi.

En la **Figura 46** se muestra comparación entre una cepa transformante de *S. elongatus* con la construcción pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD y la cepa silvestre.



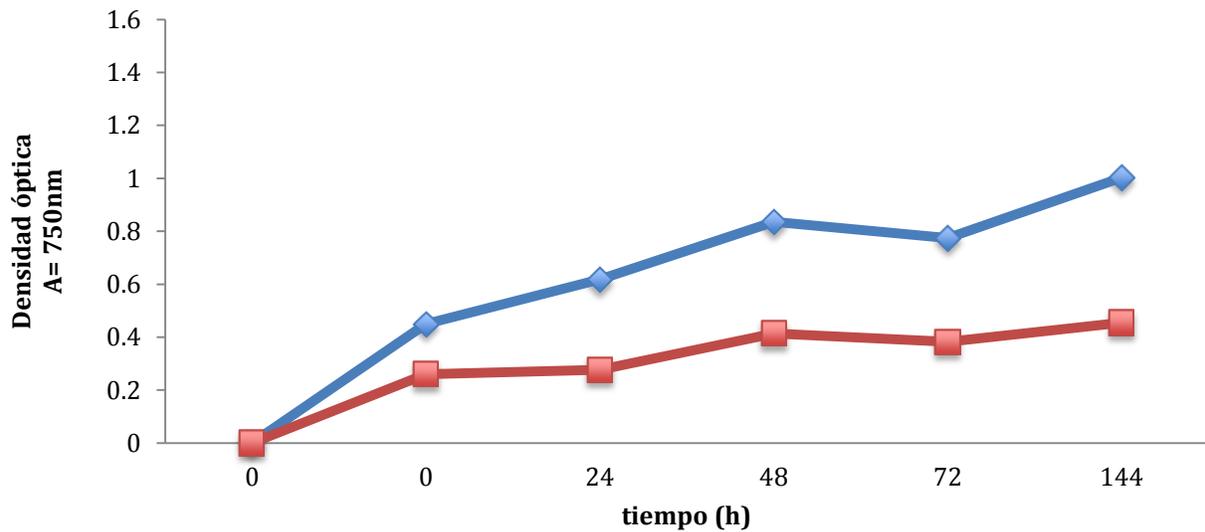
**Figura 46. Gráfica de crecimiento comparativa de células de *S. elongatus* transformadas con el vector pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD clona A y la cepa tipo silvestre (WT).** En colores suaves (pastel) se muestra la cepa transgénica A y en colores de tono firme la cepa silvestre.

Las cepas transgénicas de *S. elongatus* no mostraron el crecimiento esperado en medio suplementado con Phi, el promotor de nitrato, no es suficiente para permitir el crecimiento en ninguna concentración de Phi.

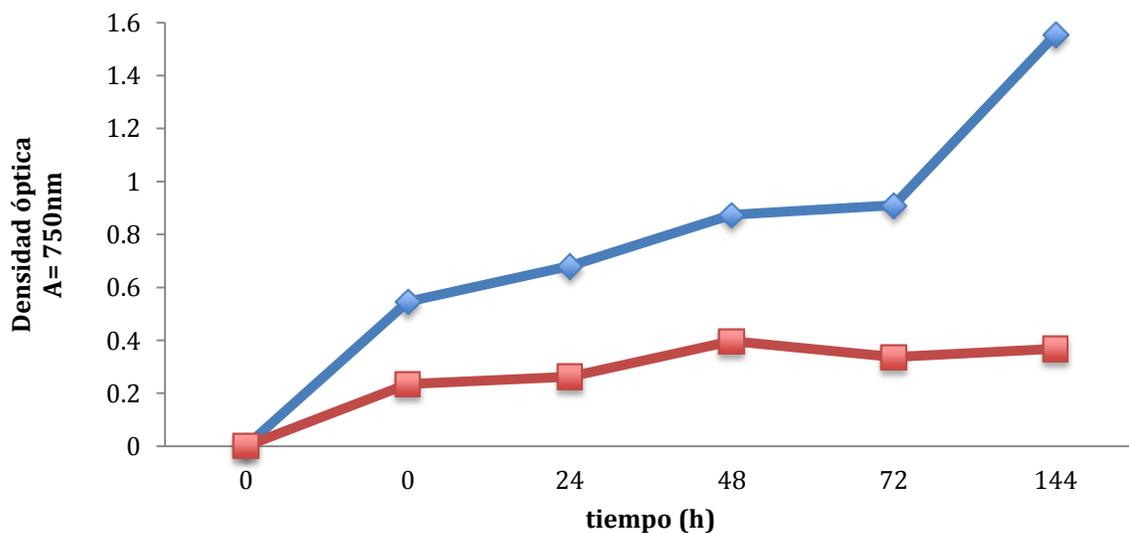
### VI.XIII.II Cinética de crecimiento en medio BG-11 suplementado con ácido nicotínico.

Se analizó si adicionar 20  $\mu\text{M}$  de ácido nicotínico al medio de cultivo le resulta ventajoso a las transformantes crecidas en medio con Phi (**Figura 47, 48, y 49**),

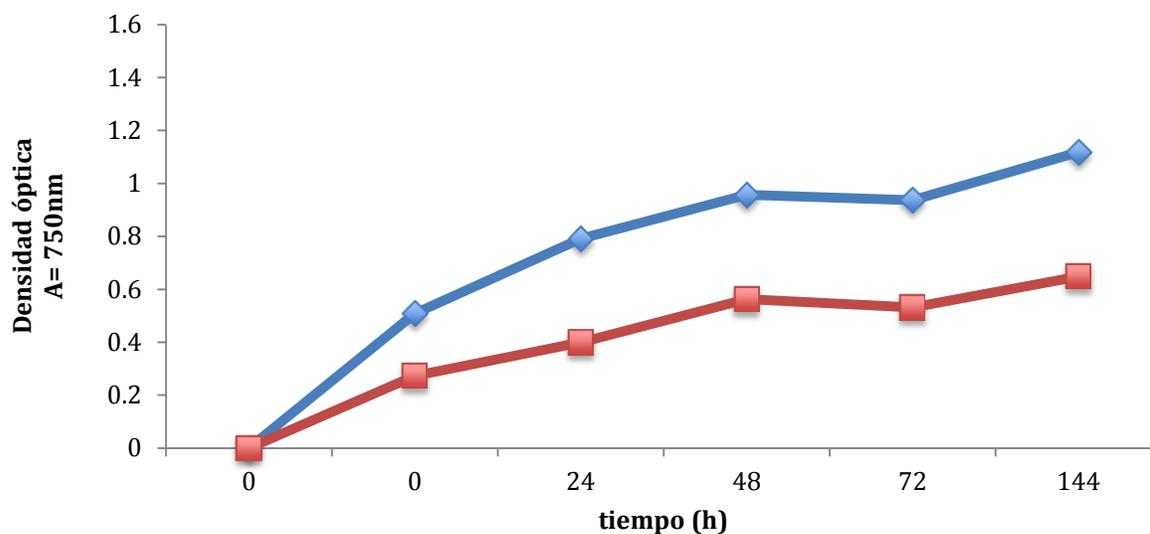
esto debido a que el ácido nicotínico es un precursor en la biosíntesis de NAD (IUBMB, 2008) el cual es cofactor de la enzima fosfito deshidrogenasa (PTXD) (White and Metcalf, 2007).



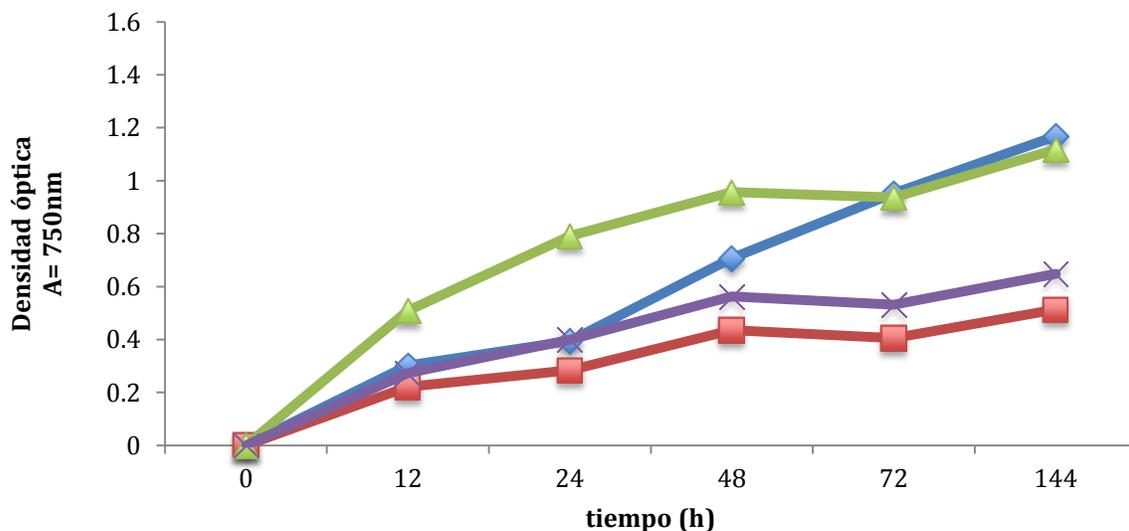
**Figura 47. Cinética de crecimiento de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11 suplementado con ácido nicotínico cepa nombrada B.** En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100 µM de Pi y 20 µM de ácido nicotínico. En rojo 100 µM de Phi con 20 µM de ácido nicotínico.



**Figura 48. Cinética de crecimiento de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11 suplementado con ácido nicotínico cepa nombrada C.** En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi y 20  $\mu\text{M}$  de ácido nicotínico. En rojo 100  $\mu\text{M}$  de Phi con 20  $\mu\text{M}$  de ácido nicotínico.



**Figura 49. Cinética de crecimiento de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11 suplementado con ácido nicotínico cepa nombrada D.** En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi y 20  $\mu\text{M}$  de ácido nicotínico. En rojo 100  $\mu\text{M}$  de Phi con 20  $\mu\text{M}$  de ácido nicotínico.



**Figura 50. Cinética de crecimiento comparativa de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11 suplementado con ácido nicotínico cepa nombrada D y la cepa tipo silvestre.** En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi y 20  $\mu\text{M}$  de ácido nicotínico para la cepa silvestre. En rojo 100  $\mu\text{M}$  de Phi con 20  $\mu\text{M}$  de ácido nicotínico de *S. elongatus* silvestre. En verde se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi y 20  $\mu\text{M}$  de ácido nicotínico para la cepa transgénica D. En rojo 100  $\mu\text{M}$  de Phi con 20  $\mu\text{M}$  de ácido nicotínico de la clona D.

La falta de NAD no es lo que limita el crecimiento de las cepas transgénicas de *S. elongatus* en medios enriquecidos con Phi, puesto que el incremento en ácido nicotínico no aumentó el crecimiento de éstas en comparación con la cepa tipo silvestre (**Figura 50**).

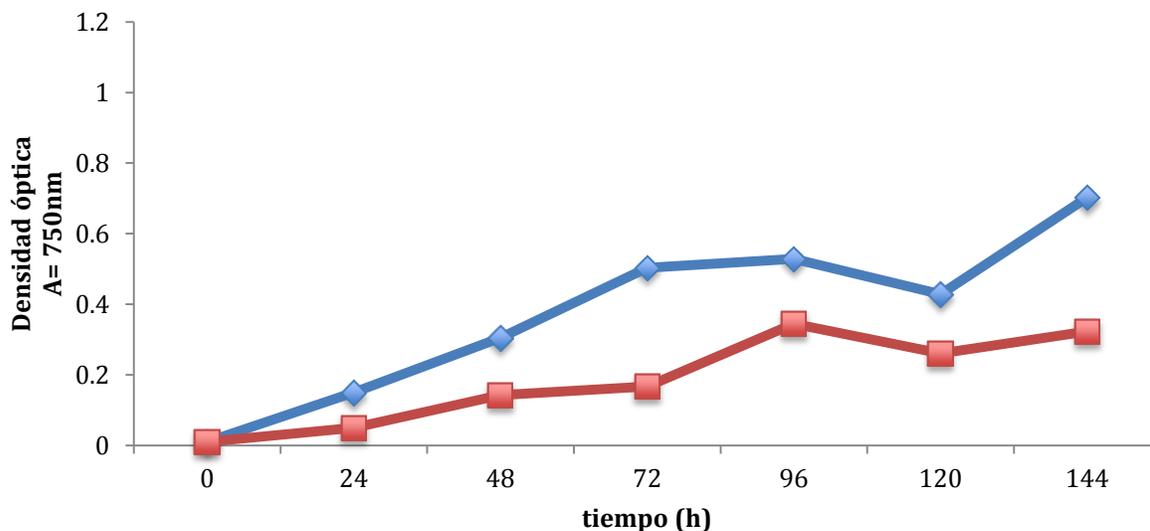
Este resultado se encuentra apoyado por el obtenido al analizar el crecimiento de las células transformadas con el plasmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio

BG-11 enriquecido con sacarosa, puesto que la sacarosa al ser utilizada como fuente de Carbono, optimiza el gasto de NAD en la fase luminica de la fotosíntesis.

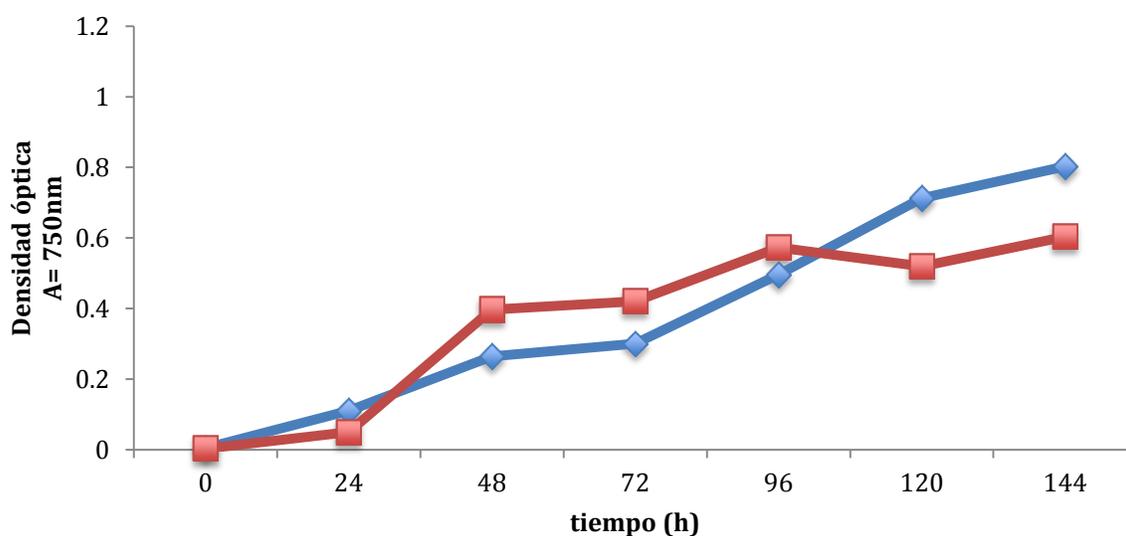
### VI.XIII.III **Cinética de crecimiento en medio BG-11 suplementado con Sacarosa.**

*S. elongatus* tiene la capacidad de crecer heterotróficamente en una concentración de 5  $\mu\text{M}$  de sacarosa, y puesto que, las células transformadas poseen incapacidad de crecer en Phi, se pretende observar si la disminución de la actividad fotosintética representa una ventaja en el crecimiento celular, esto debido a que se disminuye el gasto energético (NAD) cofactor indispensable para la actividad de la enzima PTXD.( IUBMB, 2008), por esta razón se realizó cinética de crecimiento de 4 líneas transformantes y la cepa silvestre en medio BG-11 enriquecido con sacarosa, este experimento se llevo a cabo con fotoperiodo de luz oscuridad 10/14 (luz/oscuridad) h, probando dos intensidades lumínicas 100  $\mu\text{Einstein m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y 50  $\mu\text{Einstein m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Las **Figuras 51, 52, y 53** muestran el comportamiento de tres clonas crecidas en alta luz, y la **Figura 54** es una grafica comparativa de una cepa transformada y la cepa tipo silvestre.

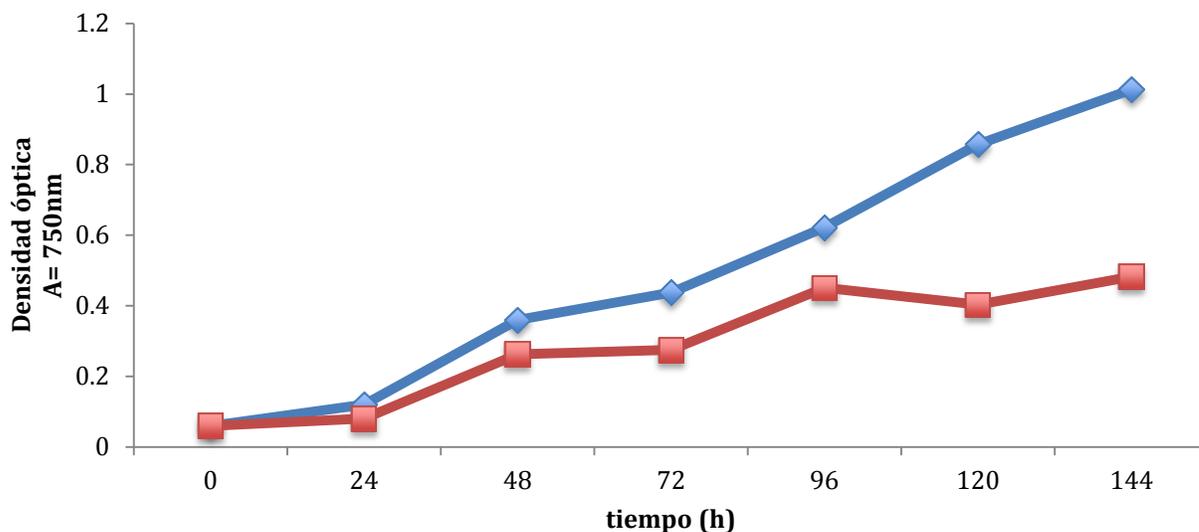


**Figura 51. Cinética de crecimiento de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11 suplementado con sacarosa y 100  $\mu\text{Einstein}$ s  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad luminosa, cepa nombrada O.** En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi y 5  $\mu\text{M}$  de sacarosa. En rojo 100  $\mu\text{M}$  de Phi con 5  $\mu\text{M}$  de sacarosa.

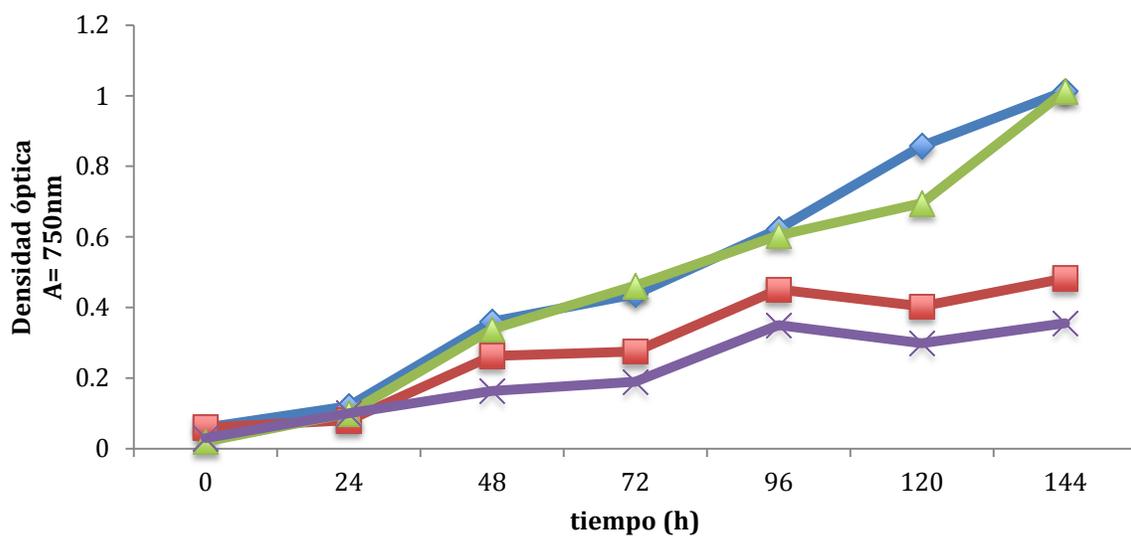


**Figura 52. Cinética de crecimiento de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/DPP-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11 suplementado con**

**sacarosa y  $100 \mu\text{Einsteins m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad luminosa, cepa nombrada P.** En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con  $100 \mu\text{M}$  de Pi y  $5 \mu\text{M}$  de sacarosa. En rojo  $100 \mu\text{M}$  de Phi con  $5 \mu\text{M}$  de sacarosa.

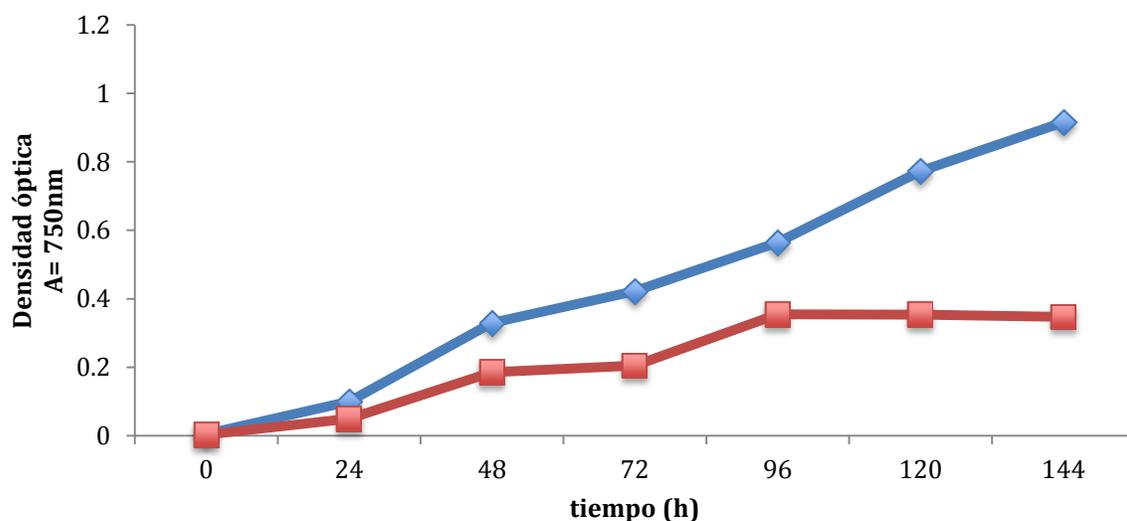


**Figura 53. Cinética de crecimiento de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11 suplementado con sacarosa y  $100 \mu\text{Einsteins m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad luminosa, cepa nombrada S.** En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con  $100 \mu\text{M}$  de Pi y  $5 \mu\text{M}$  de sacarosa. En rojo  $100 \mu\text{M}$  de Phi con  $5 \mu\text{M}$  de sacarosa.



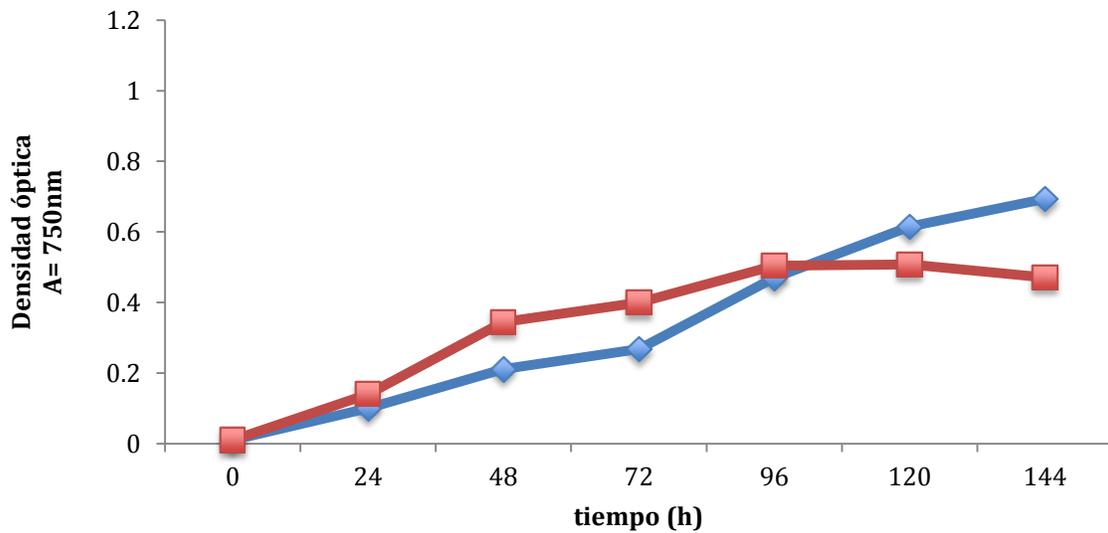
**Figura 54. Cinética de crecimiento comparativa de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11 suplementado con sacarosa, 100  $\mu$ Einsteins  $m^{-2} s^{-1}$  de intensidad luminosa, cepa nombrada S y la cepa tipo silvestre.** En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu$ M de Pi y 5  $\mu$ M de sacarosa para la cepa silvestre. En rojo 100  $\mu$ M de Phi con 5  $\mu$ M sacarosa de *S. elongatus* silvestre. En verde se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu$ M de Pi y 5  $\mu$ M de sacarosa para la cepa transgénica S. En morado 100  $\mu$ M de Phi con 5  $\mu$ M de sacarosa de la clona S.

En las **Fguras 55, 56, y 57** se pueden apreciar 3 líneas transformantes creciendo en baja intensidad luminosa, y de igual manera una gráfica comparativa (**Figura 56**) entre la cepa silvestre y una cepa transgénica.

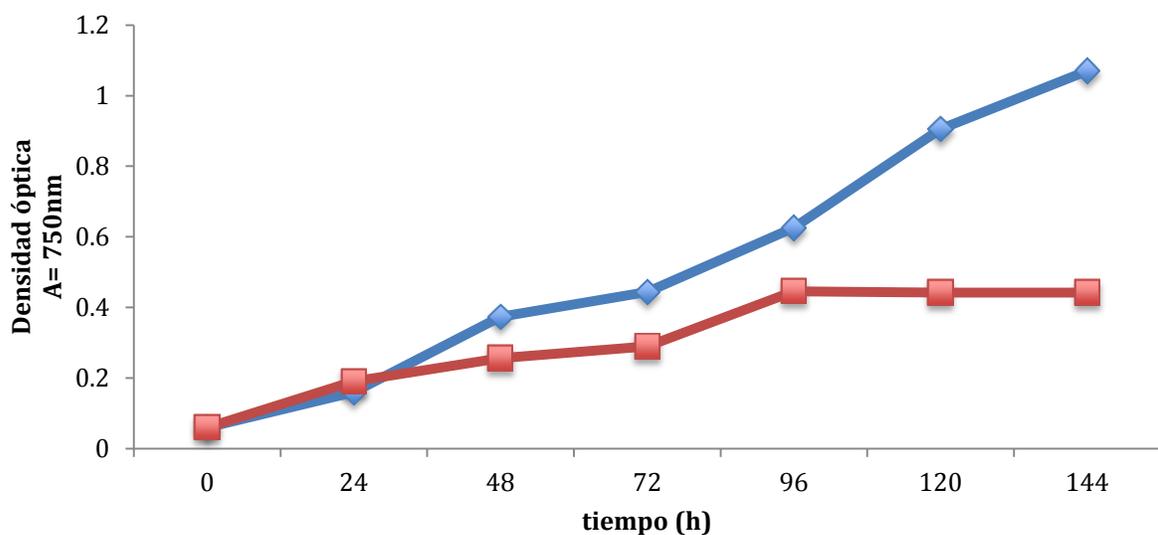


**Figura 55. Cinética de crecimiento de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11 suplementado con sacarosa y 50  $\mu$ Einsteins  $m^{-2} s^{-1}$  de intensidad luminosa, cepa nombrada B.** En

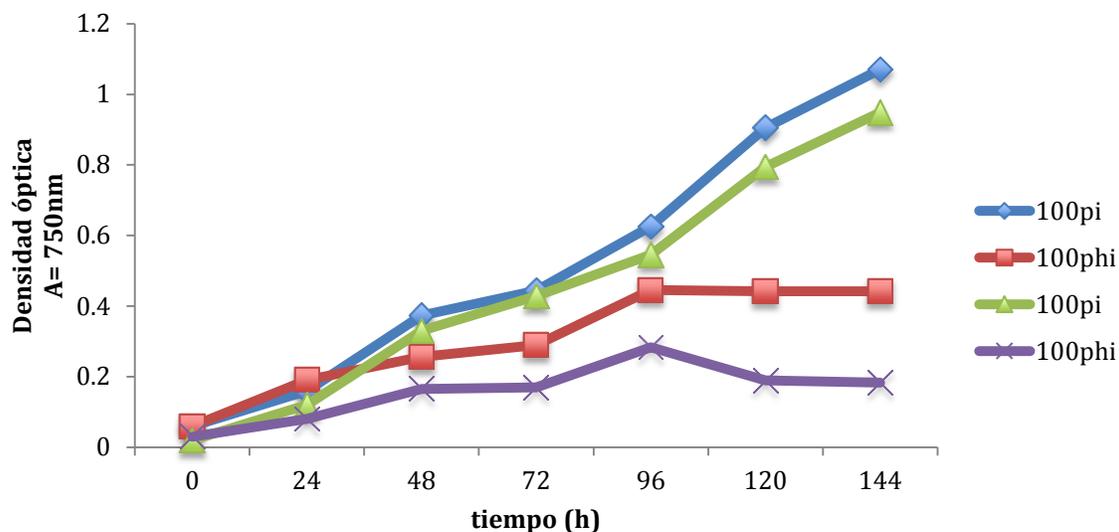
azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi y 5  $\mu\text{M}$  de sacarosa. En rojo 100  $\mu\text{M}$  de Phi con 5  $\mu\text{M}$  de sacarosa.



**Figura 56. Cinética de crecimiento de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11 suplementado con sacarosa y 50  $\mu\text{Einsteins m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad luminosa, cepa nombrada A.** En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi y 5  $\mu\text{M}$  de sacarosa. En rojo 100  $\mu\text{M}$  de Phi con 5  $\mu\text{M}$  de sacarosa.



**Figura 57. Cinética de crecimiento de *S. elongatus* transformada con el plasmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11 suplementado con sacarosa y 50  $\mu\text{Einstein s}^{-1}$  de intensidad luminosa, cepa nombrada C.** En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi y 5  $\mu\text{M}$  de sacarosa. En rojo 100  $\mu\text{M}$  de Phi con 5  $\mu\text{M}$  de sacarosa.



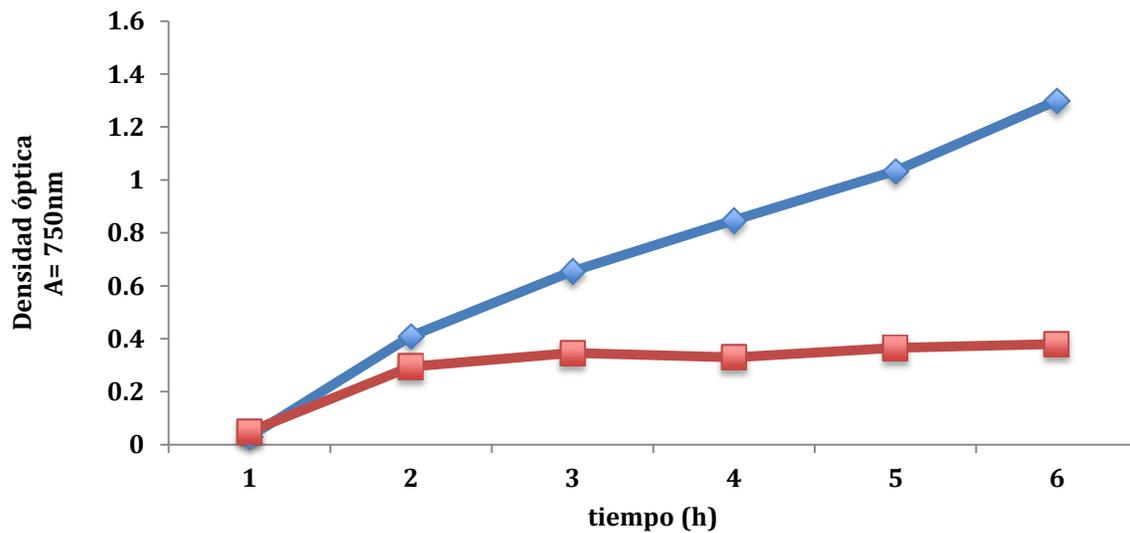
**Figura 58. Cinética de crecimiento comparativa de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11 suplementado con Sacarosa, 50  $\mu\text{Einstein s}^{-1}$  de intensidad luminosa, cepa nombrada C y la cepa tipo silvestre.** En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi y 5  $\mu\text{M}$  de sacarosa para la cepa silvestre. En rojo 100  $\mu\text{M}$  de Phi con 5  $\mu\text{M}$  de sacarosa de *S. elongatus* silvestre. En verde se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi y 5  $\mu\text{M}$  de sacarosa para la cepa transgénica C. En morado 100  $\mu\text{M}$  de Phi con 5  $\mu\text{M}$  de sacarosa de la clona C.

Como se puede observar (**Figuras 51-58**) el NAD parece no ser un factor limitante para el crecimiento en Phi; puesto que, la adición de sacarosa al medio

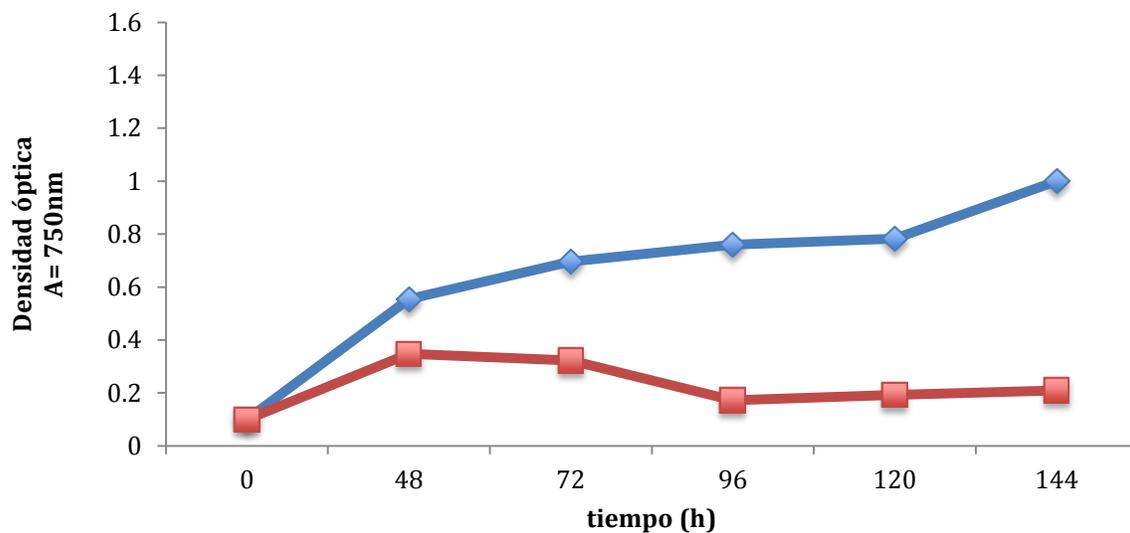
de cultivo BG-11 no resulta favorable, a pesar de disminuir la intensidad luminosa y por ende la fase luminica de la fotosíntesis, ahorrando así, gasto de NAD lo que permite la disponibilidad de este para el uso como cofactor enzimático. ( IUBMB, 2008)

#### VI.XIII.IV **Cinética de crecimiento en medio BG-11 suplementado con Fierro.**

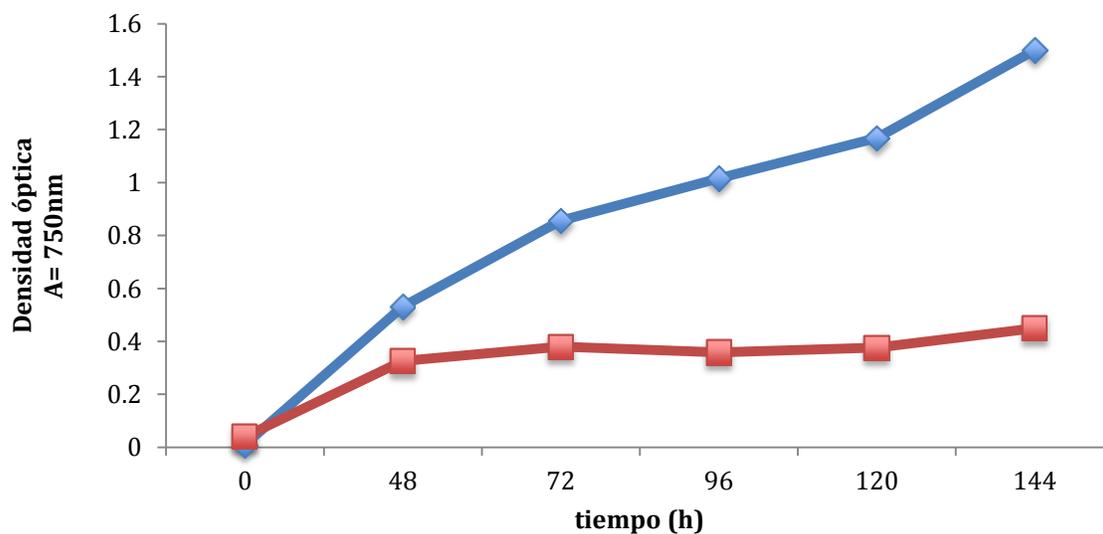
Debido a las diferencias fenotípicas existentes entre el crecimiento de las cepas de *S. elongatus* transgénicas en medio BG-11 con Pi en el cual crece verde azulado intenso y el presentado en Phi, en el cual presenta crecimiento de color amarillo claro, se probó enriquecer el medio de cultivo con Fe, puesto que se ha reportado que la carencia de este elemento en plantas superiores como lo es *A. thaliana* (Briat, Curie & Gaymard, 2007) y microalgas como *C. Reihardtii* (Kropat et al, 2011) produce clorosis. Este experimento se realizó con una concentración de 100  $\mu$ M de Fe y se analizaron 12 cepas transformantes de las cuales se muestran 3 en **las Figuras 59, 60 y 61.**



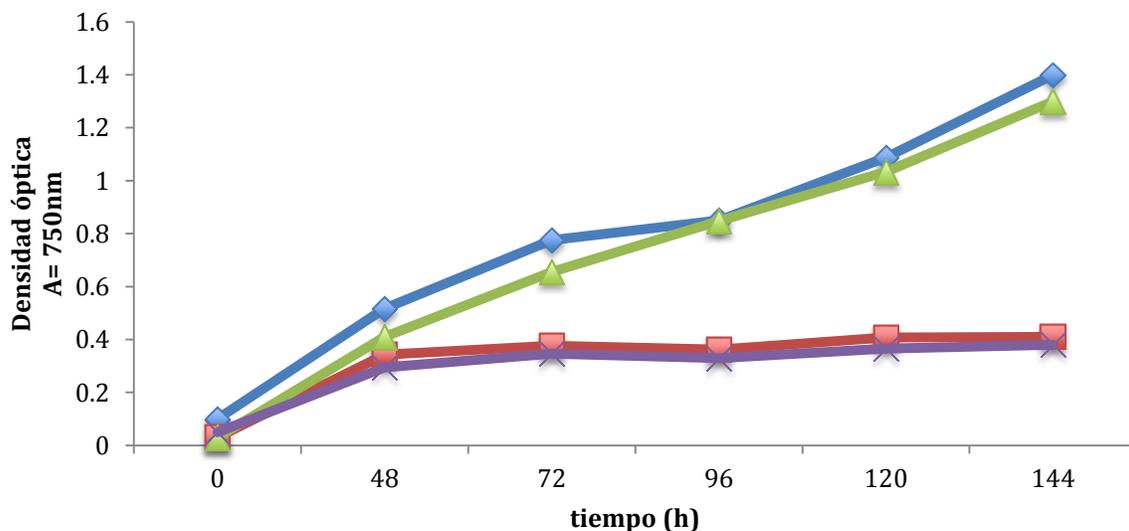
**Figura 59. Cinética de crecimiento de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11 suplementado con Fe cepa nombrada B.** En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi y 100  $\mu\text{M}$  de sulfato de Hierro. En rojo 100  $\mu\text{M}$  de Phi con 100  $\mu\text{M}$  de sulfato de fierro.



**Figura 60. Cinética de crecimiento de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11 suplementado con Fe cepa nombrada A.** En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi y 100  $\mu\text{M}$  de sulfato de Hierro. En rojo 100  $\mu\text{M}$  de Phi con 100  $\mu\text{M}$  de sulfato de fierro.



**Figura 61. Cinética de crecimiento de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11 suplementado con Fe cepa nombrada P.** En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi y 100  $\mu\text{M}$  de sulfato de Hierro. En rojo 100  $\mu\text{M}$  de Phi con 100  $\mu\text{M}$  de sulfato de fierro.



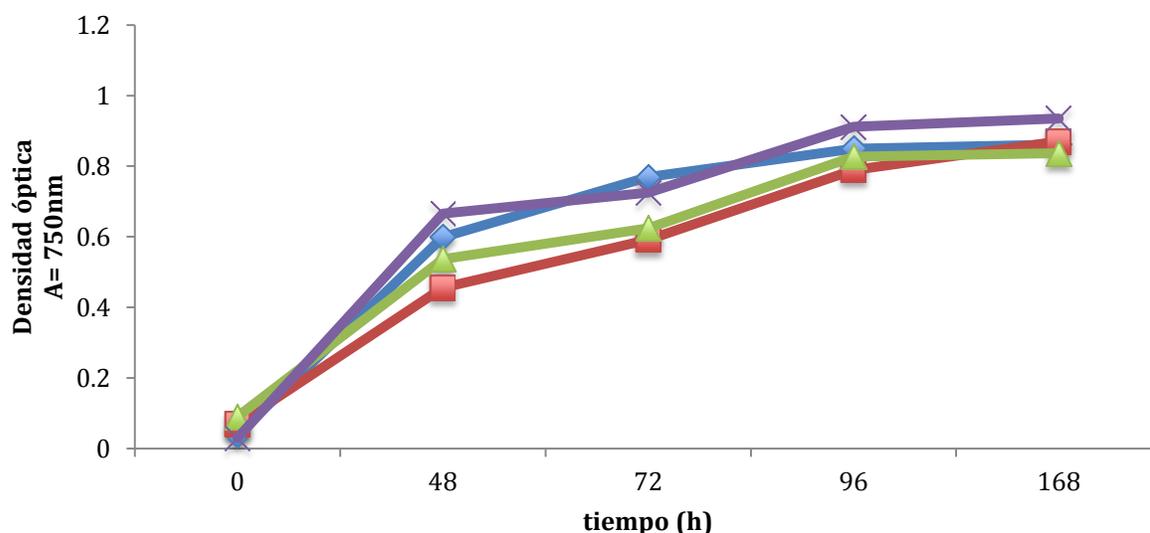
**Figura 62. Cinética de crecimiento comparativa de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11 suplementado con Sulfato de Hierro cepa nombrada B y la cepa tipo silvestre.** En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi y 100  $\mu\text{M}$  de sulfato de hierro para la cepa silvestre. En rojo 100  $\mu\text{M}$  de Phi con 100  $\mu\text{M}$  de sulfato de hierro de *S. elongatus* silvestre. En verde se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi y 100  $\mu\text{M}$  de sulfato de hierro para la cepa transgénica B. En morado 100  $\mu\text{M}$  de Phi con 100  $\mu\text{M}$  de sulfato de hierro de la clona B.

El Hierro parece no estar limitando el crecimiento de transformantes de *S. elongatus* en medios enriquecidos con Phi. Puesto que no le confiere ventaja para adaptarse a esta condición, se aprecia en la **Figura 62** la comparación de una cepa transgénica con la cepa silvestre como referencia.

## VI.XIV Efecto de la adaptación (aclimatación) a Phi

El cambio en la composición del medio de cultivo puede representar a *S. elongatus* dificultades para su adaptación a las nuevas condiciones (Schwarz & Forchhammer, 2005), razón por la cual se realizó la sustitución gradual de Pi por Phi. Para este análisis se cultivo *S. elongatus* tipo silvestre, y cuatro clonas en medio BG-11 con diferentes concentraciones de Pi y Phi.

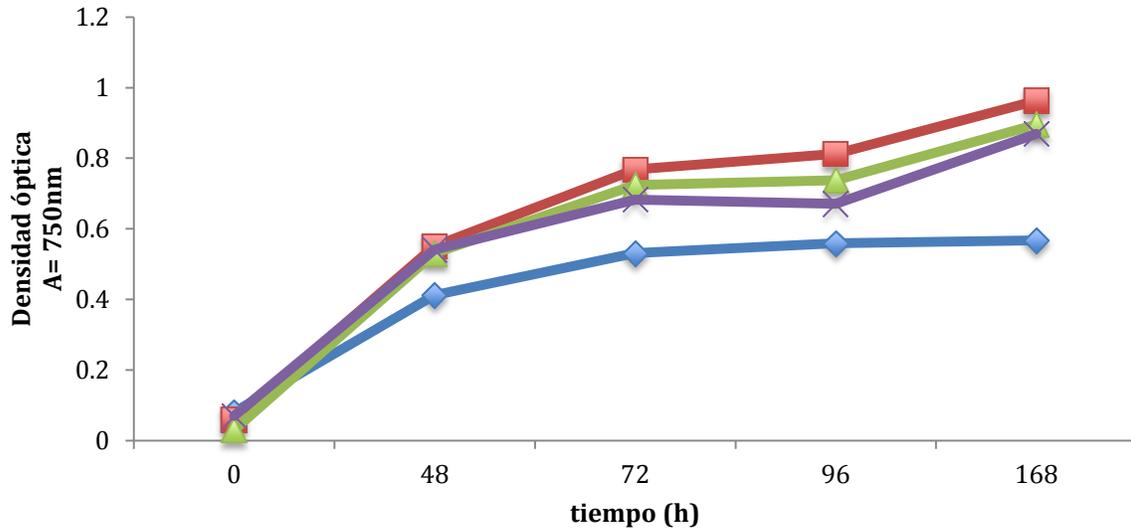
La primera etapa de este experimento fue el cultivo en medio con 500  $\mu\text{M}$  de Pi con diferentes concentraciones de Phi. Se analizaron 4 clonas, 3 de ellas se muestran a continuación.(**Figura 63, 64, 65**).



**Figura 63. Cinética de crecimiento de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11, clona denominada O.**

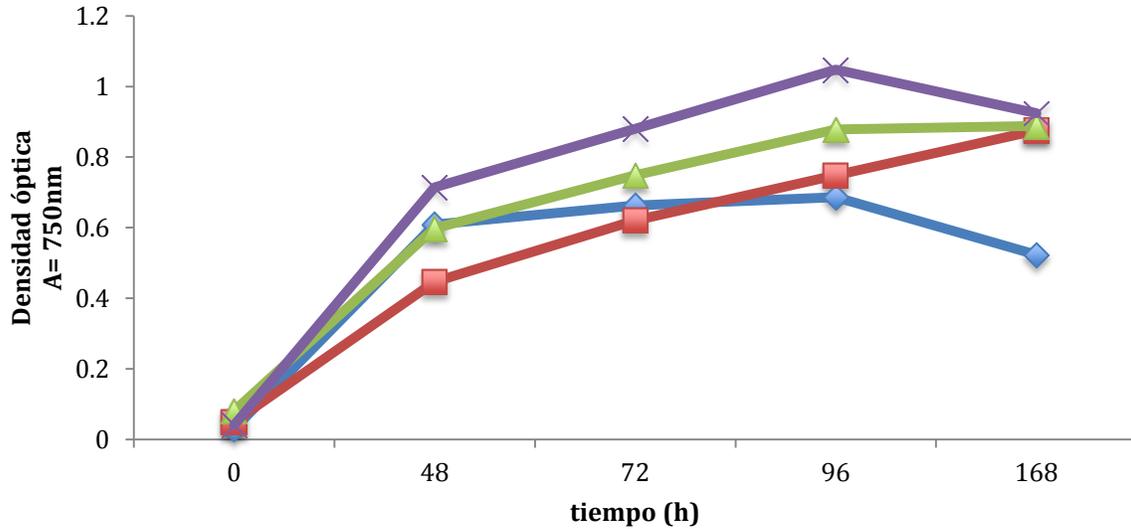
En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 500  $\mu\text{M}$  de Pi. En rojo 500  $\mu\text{M}$  de Pi con

100  $\mu\text{M}$  de Phi. En verde se muestra el crecimiento en el tratamiento con 500  $\mu\text{M}$  de Pi y 200  $\mu\text{M}$  de Phi. En morado 500  $\mu\text{M}$  de Pi con 500  $\mu\text{M}$  de Phi.



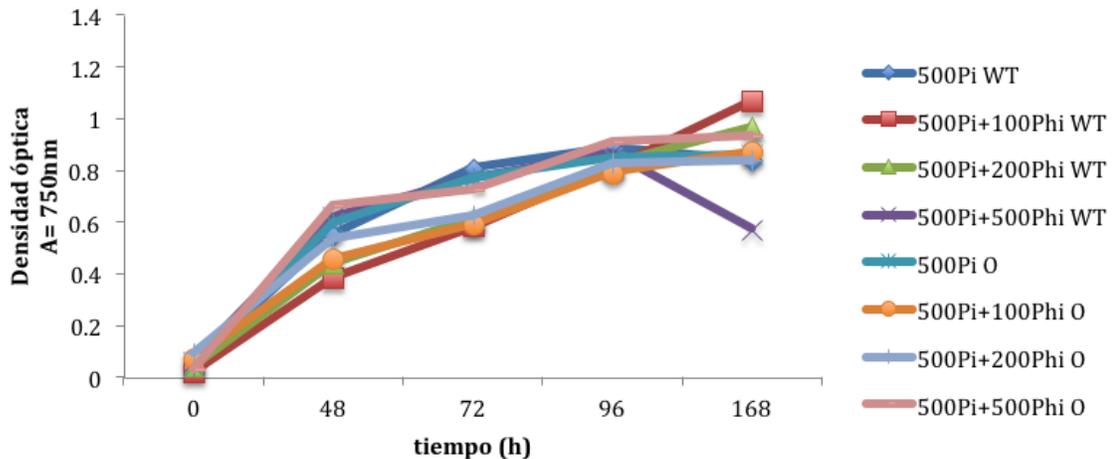
**Figura 64. Cinética de crecimiento de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11, clona denominada A.**

En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 500  $\mu\text{M}$  de Pi. En rojo 500  $\mu\text{M}$  de Pi con 100  $\mu\text{M}$  de Phi. En verde se muestra el crecimiento en el tratamiento con 500  $\mu\text{M}$  de Pi y 200  $\mu\text{M}$  de Phi. En morado 500  $\mu\text{M}$  de Pi con 500  $\mu\text{M}$  de Phi.



**Figura 65. Cinética de crecimiento de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11, clona denominada B.**

En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 500  $\mu\text{M}$  de Pi. En rojo 500  $\mu\text{M}$  de Pi con 100  $\mu\text{M}$  de Phi. En verde se muestra el crecimiento en el tratamiento con 500  $\mu\text{M}$  de Pi y 200  $\mu\text{M}$  de Phi. En morado 500  $\mu\text{M}$  de Pi con 500  $\mu\text{M}$  de Phi.

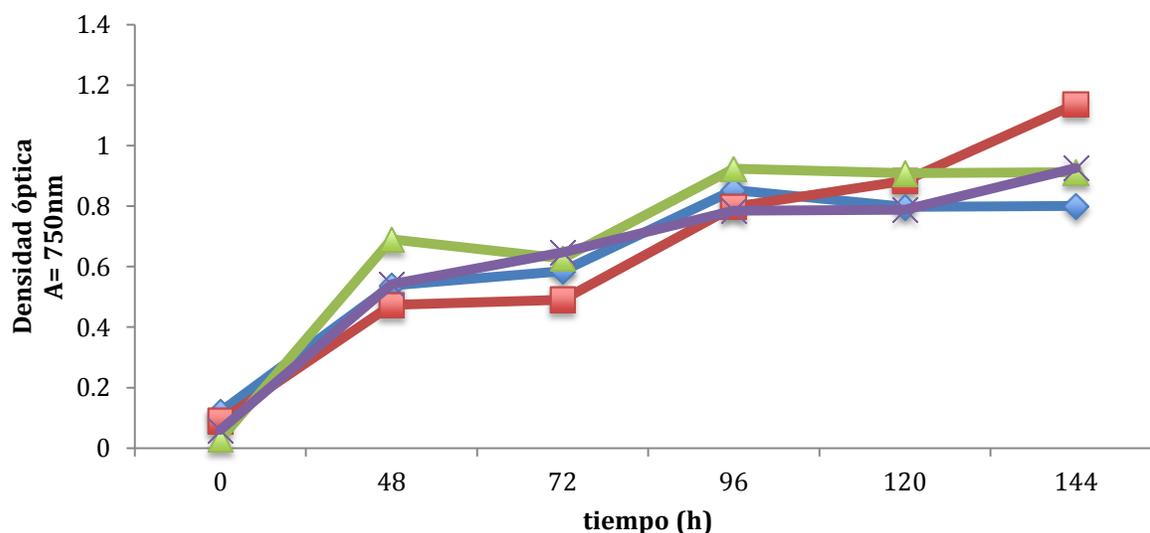


**Figura 66. Cinética de crecimiento comparativa de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11, clona denominada O y la cepa tipo silvestre WT.**

El tiempo de la cinética fue prolongado debido a que se pretende agotar las reservas de Pi que pudieran existir en las células. Teniendo así una duración de 168 horas.

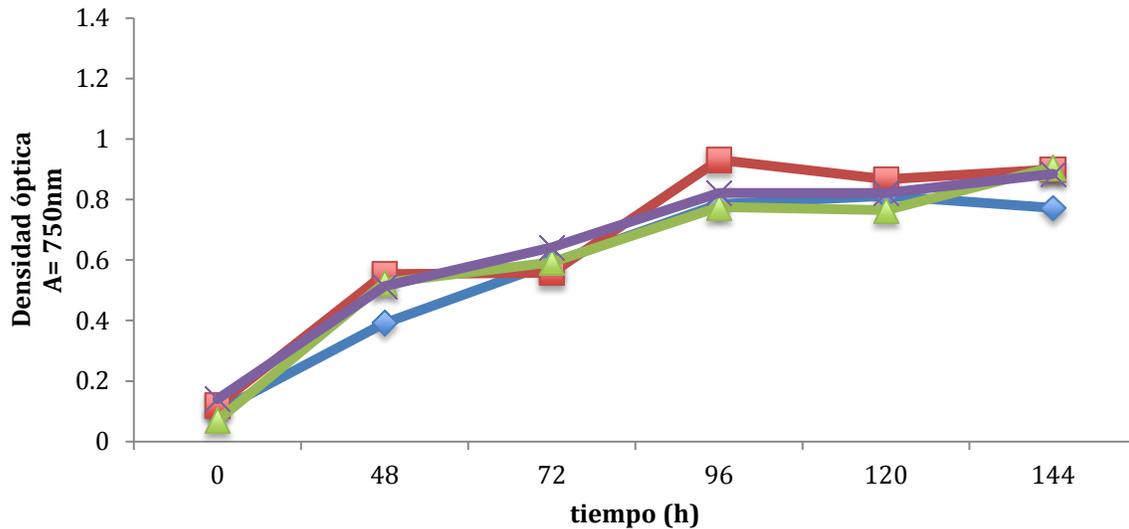
La **Figura 66** muestra la comparación en el crecimiento de una cepa transgénica y la tipo silvestre, se observa que el crecimiento para ambas es similar.

La siguiente fase del experimento, fue el cultivo en una concentración mas baja de Pi, con las mismas concentraciones de Phi de la fase anterior; como se muestra en las **Figuras 67, 68, y 69**.



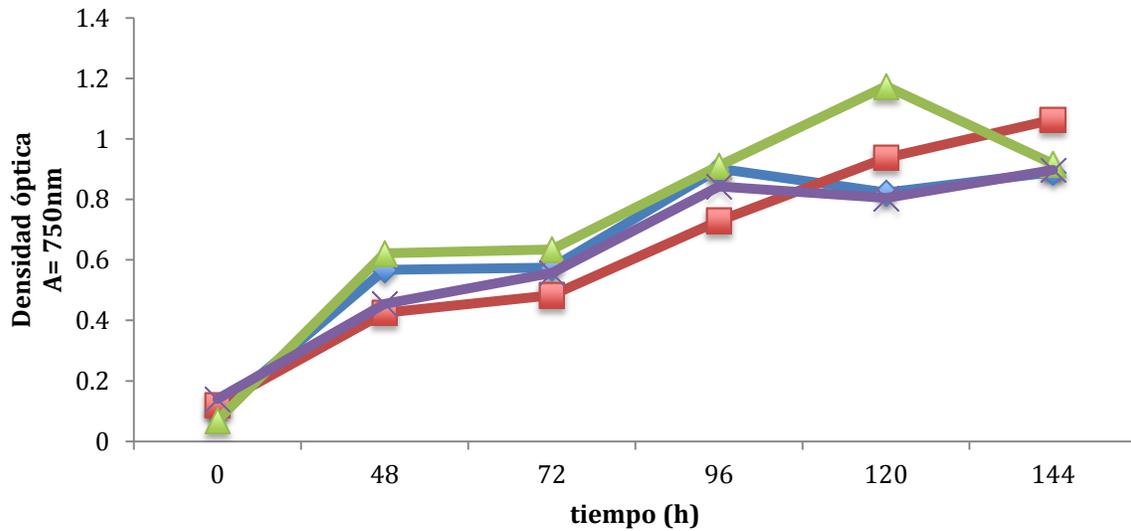
**Figura 67.** Cinética de crecimiento de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11, clona denominada A.

En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi. En rojo 100  $\mu\text{M}$  de Pi con 100  $\mu\text{M}$  de Phi. En verde se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi y 200  $\mu\text{M}$  de Phi. En morado 100  $\mu\text{M}$  de Pi con 500  $\mu\text{M}$  de Phi.



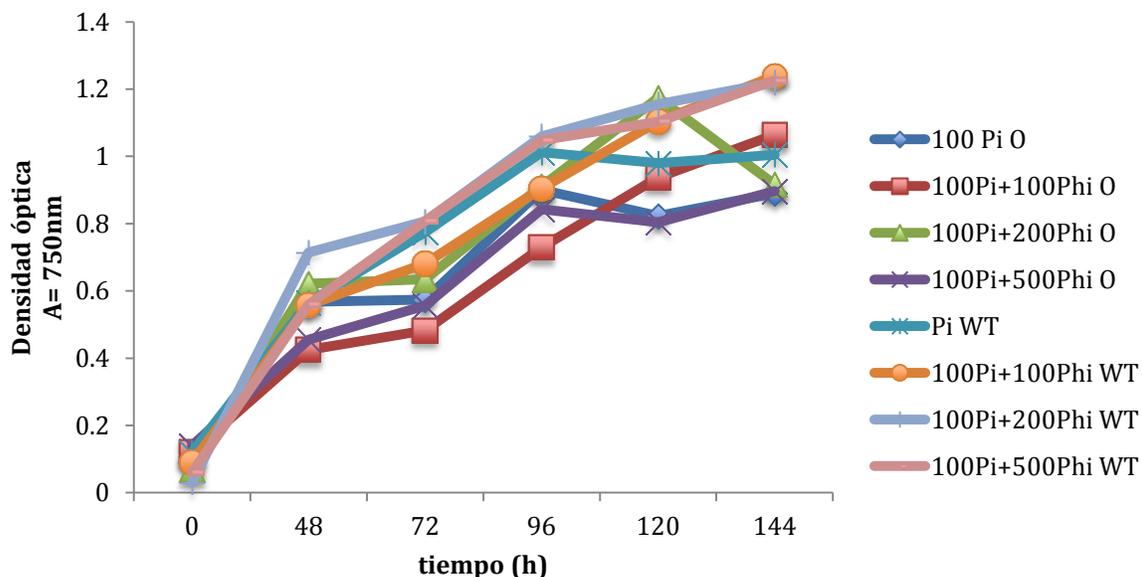
**Figura 68. Cinética de crecimiento de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11, clona denominada B.**

En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi. En rojo 100  $\mu\text{M}$  de Pi con 100  $\mu\text{M}$  de Phi. En verde se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi y 200  $\mu\text{M}$  de Phi. En morado 100  $\mu\text{M}$  de Pi con 500  $\mu\text{M}$  de Phi.



**Figura 69. Cinética de crecimiento de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11, clona denominada O.**

En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi. En rojo 100  $\mu\text{M}$  de Pi con 100  $\mu\text{M}$  de Phi. En verde se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi y 200  $\mu\text{M}$  de Phi. En morado 100  $\mu\text{M}$  de Pi con 500  $\mu\text{M}$  de Phi.

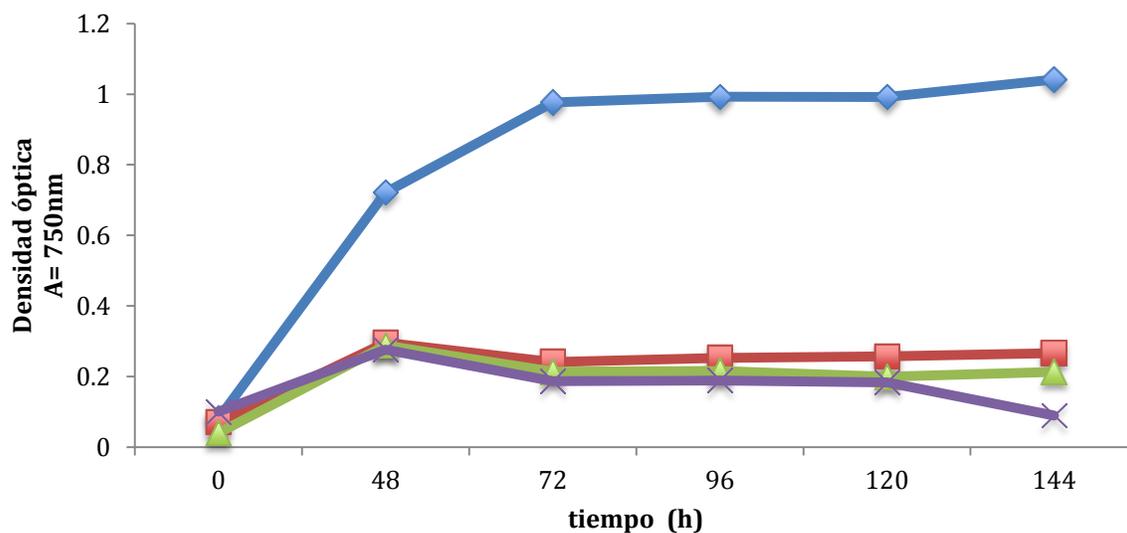


**Figura 70. Cinética de crecimiento comparativa de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11, clona denominada O y la cepa tipo silvestre WT.**

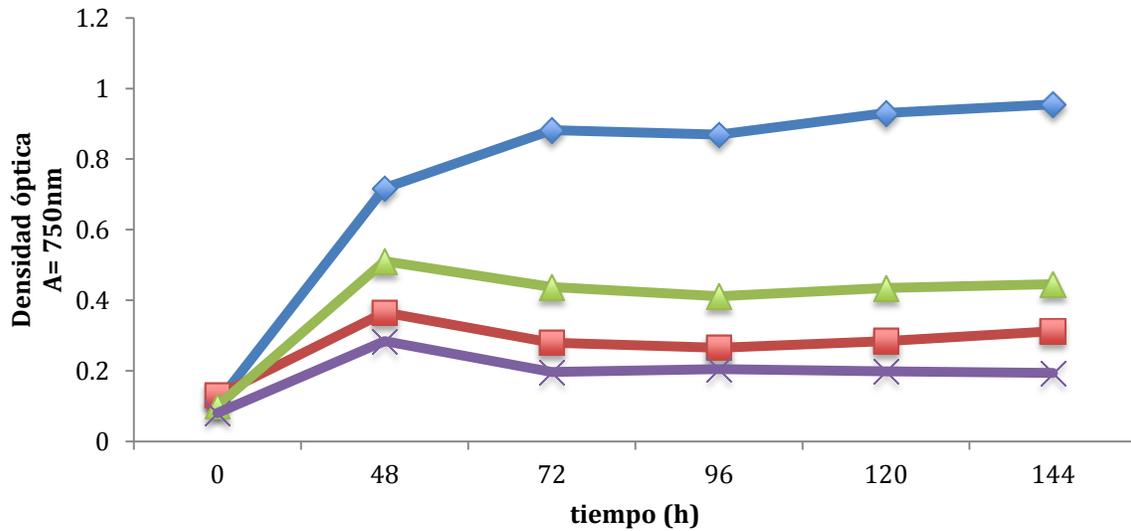
En los resultados mostrados en las **Figuras 63-70** se observa que el *S. elongatus* ya sea tipo silvestre, o transgénicas, tienen crecimiento óptimo, sin influir en el la concentración de Phi presente en el medio, como se ha reportado para otras cianobacterias como *M. aeruginosa* (Zhang et al. 2011).

La última fase de este experimento consiste en cultivar las muestras de *S. elongatus* en medio BG-11 libre de Pi, conteniendo únicamente Phi como fuente de fósforo.

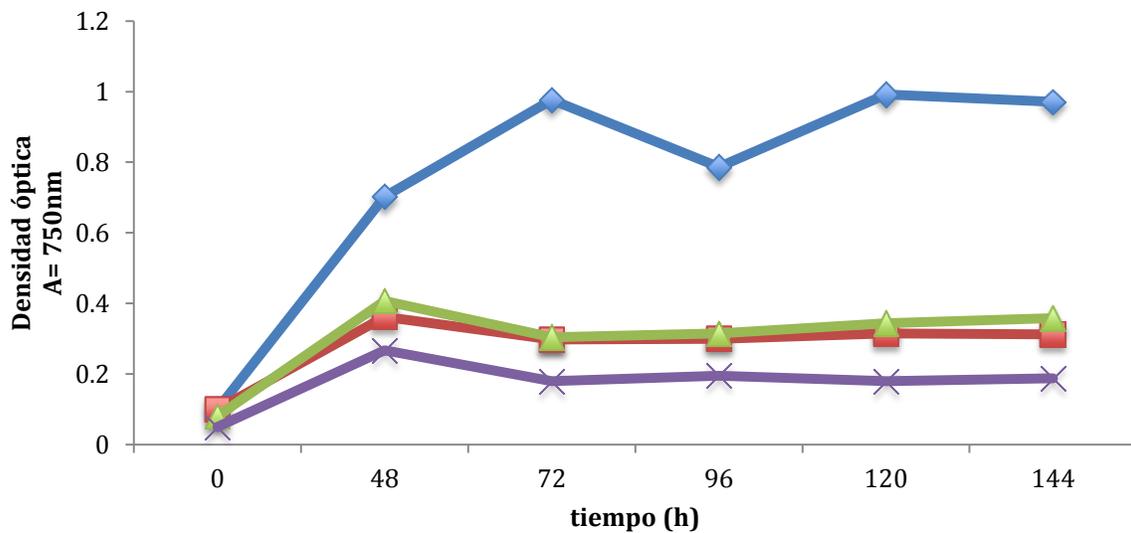
En las **Figuras 71, 72 y 73** se observa el crecimiento de cepas transgénicas de *S. elongatus* en Phi, y en la **Figura 74** se presenta la tipo silvestre creciendo bajo las mismas condiciones.



**Figura 71. Cinética de crecimiento de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11 con Phi, clona denominada A.** En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Phi. En rojo 100  $\mu\text{M}$  de Phi. En verde se muestra el crecimiento en el tratamiento con 200  $\mu\text{M}$  de Phi. En morado 500  $\mu\text{M}$  de Phi.

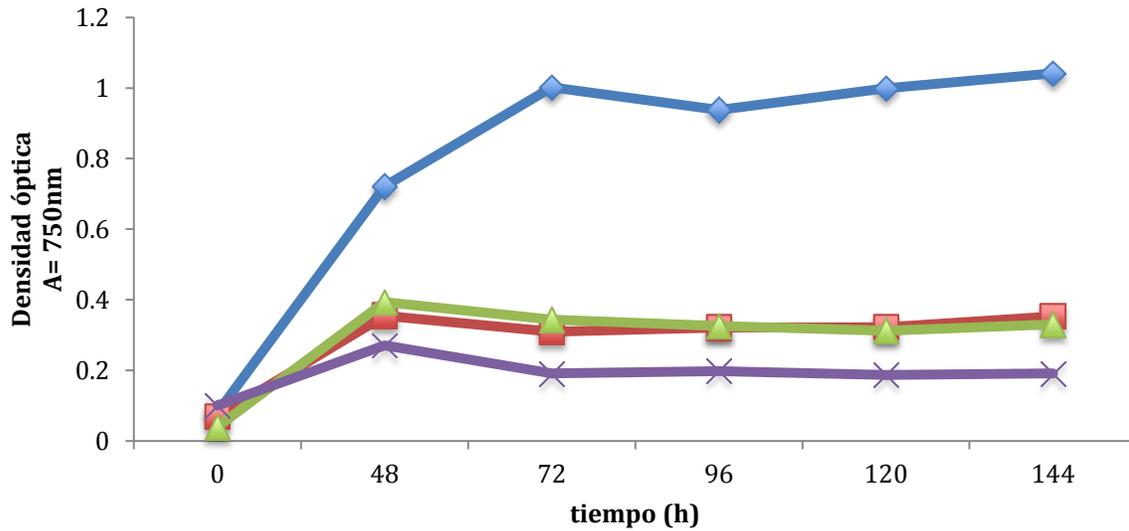


**Figura 72. Cinética de crecimiento de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11 con Phi, clona denominada B.** En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi. En rojo 100  $\mu\text{M}$  de Phi. En verde se muestra el crecimiento en el tratamiento con 200  $\mu\text{M}$  de Phi. En morado 500  $\mu\text{M}$  de Phi.



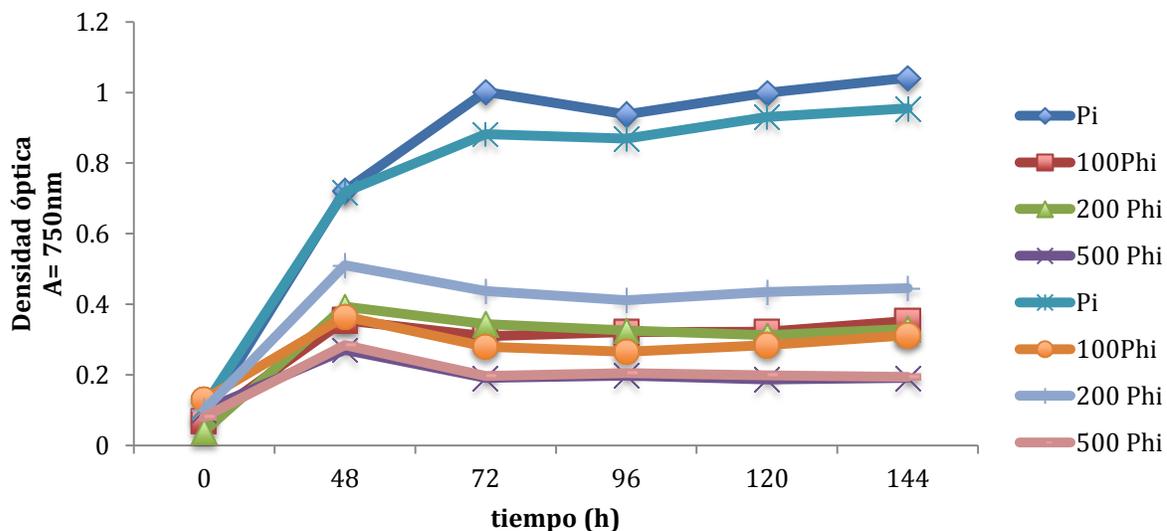
**Figura 73. Cinética de crecimiento de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11 con Phi, clona**

**denominada O.** En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi. En rojo 100  $\mu\text{M}$  de Phi. En verde se muestra el crecimiento en el tratamiento con 200  $\mu\text{M}$  de Phi. En morado 500  $\mu\text{M}$  de Phi.



**Figura 74. Cinética de crecimiento de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11 con Phi, cepa WT.** En azul se muestra el crecimiento en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi. En rojo 100  $\mu\text{M}$  de Phi. En verde se muestra el crecimiento en el tratamiento con 200  $\mu\text{M}$  de Phi. En morado 500  $\mu\text{M}$  de Phi

La **Figura 75** muestra la comparación en el crecimiento de una cepa transgénica y la tipo silvestre, se observa que el crecimiento para ambas es similar.



**Figura 75. Cinética de crecimiento comparativa de *S. elongatus* transformada con el plásmido pSyn\_1/D-TOPO-PnirA-PTXD en medio BG-11, clona denominada B y la cepa tipo silvestre WT.**

El crecimiento de *S. elongatus* en medio BG-11 con Phi como única fuente de fósforo no le permite crecer a ninguna de las cepas evaluadas en este experimento, esto nos indica que la adaptación a un nutriente diferente a Pi en el medio de cultivo no es el factor limitante para poder metabolizar el Phi.

Todos los resultados antes descritos indican que el gen *PTXD* codificante a la enzima fosfita deshidrogenasa, no le confiere a *S. elongatus* la capacidad de crecer en presencia de Phi.

## VII. Discusión

Las cianobacterias se encuentran entre los microorganismos de mayor distribución en la biosfera, su metabolismo se basa en la fotosíntesis oxigénica similar a la de las plantas, estos microorganismos están provistos de numerosos mecanismos que les permiten sobrevivir en condiciones de carencia de nutrientes, algunos de estos mecanismos son únicos para estos microorganismos (Schwarz and Forchhammer, 2005).

Existe un interés creciente por el desarrollo de técnicas eficientes del cultivo de cianobacterias, debido a que son una fuente de sustancias de uso industrial y farmacológico de gran valor económico; (Paniagua-Michel & Sasson 1995; De Philippis & Vicenzini 1998; Hejazi & Wijffles 2004; García-González *et al.*, 2005, Dayananda *et al.*, 2007). Los métodos de cultivo actualmente empleados incluyen opciones que van desde un costo muy elevado, hasta cultivos económicamente viables pero con gran susceptibilidad a la contaminación. Esta razón demanda la creación de alternativas que permitan realizar cultivos de cianobacterias en sistemas económicos que ofrezcan tener control sobre la pureza de estos.

Recientemente, López-Arredondo y Herrera-Estrella han desarrollado un sistema que permite la fertilización al mismo tiempo que contrala la contaminación en

cultivos de plantas transgénicas superiores. Este sistema (ptxD-Phi) se basa en la actividad de la enzima fosfito deshidrogenasa para convertir el fosfito en fosfato que es la forma metabolizable de fósforo, dando excelentes resultados en pruebas de invernadero (López-Arredondo & Herrera-Estrella, 2012).

Este descubrimiento abrió la posibilidad de implementar este sistema en cianobacterias. Para este fin se utilizó como cepa modelo *S. elongatus* PCC7942 la cual carece de la enzima PTXD, y no posee la capacidad de crecer en presencia de Phi en la **Figura 21** (Zhang et al 2011). Podemos observar la inhibición del crecimiento de la cepa tipo silvestre, a la cual el Phi no le genera un efecto toxico, si no resulta un inhibidor del crecimiento, puesto que las células son viables al recultivarlas en medio de cultivo enriquecido con Pi. Esto aunado a los resultados mostrados en las graficas 63-70 demuestran que no existe riesgo alguno al medio ambiente en caso de existir una liberación de un efluente con contenido de Phi, puesto que no seria capaz de afectar el crecimiento de cianobacterias como los es *S. elongatus* PCC7942 las cuales podrían desarrollarse óptimamente al existir una fuente de Pi natural disponible en el entorno. Celulas de esta cepa se sometieron a manipulación genética para introducir en su genoma el gen heterólogo codificante para la enzima fosfito deshidrogenasa. La transformación se llevó a cabo con el plásmido vector pSyn\_1/D-TOPO-PTXD el cual incluye un promotor activado por Níquel que permite la inducción de la expresión del gen de interés en tiempos cortos (López-Maury et al., 2002), siendo el níquel inductor indispensable para

mantener una actividad transcripcional elevada de la enzima PTXD, y el níquel presenta un efecto negativo en el crecimiento de *S. elongatus*, como se mostró en las Figuras 19-22 resulta inviable el aumento de este para producir la cantidad de la enzima necesaria para la oxidación del Phi. Existen pocos promotores reportados para la expresión constitutiva de genes heterólogos en *S. elongatus* uno de los que ha demostrado mejores resultados es el reportado por Qi y colaboradores (2005) el cual es inducible a una concentración de 17.6 mM de nitrato (*PnirA*) en el medio de cultivo, siendo esta la concentración óptima para el crecimiento de esta cianobacteria. Este promotor fue clonado en el vector pSyn\_1/D-TOPO-PTXD los resultados obtenidos de las cepas transgénicas *PnirA:PTXD* mostraron intolerancia a Phi, la falta de funcionalidad de la enzima con dos promotores distintos, sugiere que esto no es una consecuencia de baja actividad transcripcional, puesto que el *PnirA*, es un promotor reportado como fuerte y funcional a tiempos prolongados. Todos estos resultados indican que podría existir un factor que se encuentre limitando la actividad de la enzima. Garcia-Costas y colaboradores (2001) han reportado que la enzima fosfito deshidrogenasa de *P. stutzeri* requiere NAD como cofactor. El ácido nicotínico juega un papel crucial, debido a que es un precursor simple en la biosíntesis de NAD. (IUBMB, 2008). La adición de este precursor en el medio de cultivo permitiría aumentar la cantidad de coenzima disponible para la reacción redox de la enzima PTXD. También se hizo disminuir la actividad fotosintética lo cual permitiría disminuir el gasto de NAD realizado en la fase lumínica y por consecuencia, mayor disponibilidad de la coenzima para la actividad

de la PTXD. Ambos resultados mostraron que la cantidad de NAD no es el factor limitante de la actividad de la enzima PTXD.

El proceso de adaptación a nuevas condiciones en el ambiente de crecimiento, pudiera resultar estresante para *S. elongatus*, es por ello que la sustitución gradual de Pi por Phi podría ser benéfico para el crecimiento en esta nueva fuente de fósforo. Los datos obtenidos sugieren que la aclimatación a nuevas fuentes fosfatadas no es el factor que impide el crecimiento en presencia de Phi.

En general a través de estos resultados, se sugiere que el gen *PTXD* no es suficiente para conferir a *S. elongatus* la capacidad de crecer en presencia de Phi, mostrando así, que el sistema *ptxd/Phi*, tal como se mostró funcional en plantas superiores (Lopez-Arredondo & Herrera-Estrella 2012), no lo es en cianobacterias como *S. elongatus*. Se ha reportado en otras cianobacterias, como algunas especies de *Prochlorococcus* y *Cyanothece*, la existencia de un grupo de genes involucrados en mecanismos de transporte de Phi (*ptxA*, *ptxB*, *ptxC*) y fosfonatos (*phnCDE*), así como la presencia del gen *ptxD* (Martínez et al., 2012). Teniendo en cuenta lo anterior se podría hipotetizar que en *S. elongatus* el factor limitante de las cepas transformadas con el gen que codifica para la enzima PTXD para su crecimiento en medios de cultivo con Phi como única fuente de fósforo, sería la falta de un sistema de transporte capaz de introducir el Phi dentro de la célula.

## VIII. CONCLUSIONES.

- ✚ El Phi no es un agente toxico para células silvestres de *S. elongatus* PCC7942.
- ✚ El Phi es inhibidor en el crecimiento de células silvestres de *S. elongatus* PCC7942.
- ✚ La introducción únicamente del gen *PTXD P. stutzeri* VM88 no confiere a *S. elongatus* PCC7942 la capacidad de utilizar Phi como única fuente de P.
- ✚ Una falta de actividad transcripcional de los promotores que dirigen la expresión del gen *PTXD* no sería la responsable de la incapacidad de las clonas de crecer en medios con Phi, dado que se probaron dos promotores de naturaleza distinta, sin obtener mejoría en el crecimiento celular.

- ✚ El probable estrés asociado al cambio de nutriente en un medio de cultivo con Pi como fuente de fósforo a uno con Phi parece no ser el responsable del pobre desempeño de las cepas transgénicas *de S. elongatus* PCC7942.

No existe evidencia alguna que indique que el Phi esta siendo introducido al interior celular, en donde la enzima *PTXD* tiene actividad, esto podría indicar que existe un problema en el transporte de Phi.

## IX. PERSPECTIVAS.

Debido a la falta de crecimiento de las células transgénicas de *S. elongatus* con las dos construcciones evaluadas en este trabajo, y los resultados de los experimentos se propone que la razón de la ausencia de crecimiento en medios de cultivo enriquecidos con Phi, podría ser consecuencia de que el Phi no está siendo introducido al interior celular. Esto debido a que los transportadores de fosfonatos propios de *S. elongatus* son específicos para Pi, es decir que están especializados y tienen la capacidad de discriminar Pi de Phi, razón por la cual se propone:

- ✚ Hacer una nueva construcción para transformar células de *S. elongatus* la cual contenga el operón *PTX* de *P. stutzeri* VM88 que incluye los genes *ptxA*, *ptxB*, *ptxC*, *ptxD* y *ptxE*.
  
- ✚ Evaluar la capacidad de las células transformadas con la construcción generada con el operon *ptx* de *P. stutzeri* para utilizar Phi como fuente de P.
  
- ✚ Realizar un ensayo de actividad enzimática para la enzima PTXD que nos indique si ésta es funcional en *S. elongatus* PCC7942 y se encuentra realizando la conversión Phi a Pi.

- + Determinar si el uso de Phi es una estrategia eficiente como control de pureza en sistema de cultivos abiertos de *S. elongatus* transgénicas.
- + Evaluar si el Phi puede ser empleado como marcador de selección primario para transformaciones de *S. elongatus*.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- **A.S.Miron**, (1999) Comparative Evaluation Of Compact Photobioreactors For Large-Scale Monoculture Of Microalgae. . Journal Of Biotechnology. 70: P. 249-270.
- **Abayomi A, Tampier M, and Bibeau E** (2009). Microalgae Technologies and Processes for Biofuels/Bioenergy Production in British Columbia. Retrieved May 2, 2010 from [http://www.bcic.ca/images/stories/publications/lifesciences/microalgae\\_report.pdf](http://www.bcic.ca/images/stories/publications/lifesciences/microalgae_report.pdf)
- **Abed, R.M., Al-Thukair, A. y de Beer, D.** (2006) Bacterial diversity of a cyanobacterial mat degrading petroleum compounds at elevated salinities and temperatures. *FEMS Microbiol Ecol* 57: 290-301.
- **Abed, R.M., Dobretsov, S. y Sudesh, K.** (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *J Appl Microbiol* 106: 1-12.
- **Ación Fernández, F.G., Et Al.,** (2003). Outdoor Production Of Phaeodactylum Tricornutum Biomass In A Helical Reactor. Journal Of Biotechnology, 103(2): P.137- 152.
- **Ai, W.,** (2008). Development Of A Ground-Based Space Micro-Algae Photo Bioreactor. *Advances In Space Research.* 41(5): P. 742-747.
- **Alcocer, Elva Escobar y Luis A.** (2008). Oseguera Pelagic–benthic coupling: deep benthic zone response to winter diatom bloom sinking in oligotrophic Lake Alchichica, Puebla, Mexico *Hidrobiológica* v.18 n.1 supl.1 México ago.
- **Ananyev, G., Carrieri, D. y Dismukes, G.C.** (2008) Optimization of metabolic capacity and flux through environmental cues to maximize hydrogen production by the cyanobacterium "*Arthrospira (Spirulina) maxima*". *Appl Environ Microbiol* 74: 6102-6113.
- **Angermayr, S.A., Hellingwerf, K.J., Lindblad, P. Y de Mattos, M.J.** (2009). Energy biotechnology with cyanobacteria. *Curr Opin Biotechnol* 20: 257-263.
- **Apt KE, Behrens PW** (1999). Commercial developments in microalge biotechology. *J Phycol* 35: 215-226.
- **Asunción Martínez, Marcia S. Osburne, Adrian K. Sharma, Edward F. DeLong and Sallie W. Chisholm** (2012). Phosphite utilization by the marine picocyanobacterium *Prochlorococcus* MIT9301emi *Environmental Microbiology* 14(6), 1363-1377.
- **Atsumi, S., Higashide, W., and Liao, J. C.** (2009). Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. *Nat Biotechnol* 27, 1177-1180.
- **Attilio Converti , A.A.C., Erika Y. Ortiz, Patrizia Perego, Marco Del Borghi,** (2009). Effect Of Temperature And Nitrogen Concentration On The Growth And Lipid Content Of *Nannochloropsis Oculata* And *Chlorella Vulgaris* For Biodiesel Production. *Chemical Engineering And Processing*, 48: P. 1146–1151.
- **Aziz, M.A. And W.J. Ng,** (1992). Feasibility Of Wastewater Treatment Using The Activated-Algae Process. *Bioresource Technology.* 40(3): P. 205-208.
- **Belay, A.** (1993). Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *Journal of Applied Phycology* 5, 235-241.

- **Belay, A., Y. Otta, K. Miyakawas, y H. Shimamatsu.** (2002). The potential application of Spirulina (Arthrospira) as a nutritional and therapeutical supplement in health management. *Journal of the American Nutritional Association* 2, 27-48.
- **Bermejo, R. R., J. M. Álvarez, F.G. Acién y E. Molina.**(2002). Recovery of pure  $\beta$  phycoerythrin from the microalgae *Porphyridium cruentum*. *J. Biotech.* 93: 73-85.
- **Borowitzka MA** (1995). Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J Appl Phycol* 7: 3-15
- **Borowitzka, M. A.** (1997). Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*, 9, 393-401.
- **Borowitzka, M.A.,** (1999). Commercial Production Of Microalgae: Ponds, Tanks, Tubes And Fermenters. *Journal Of Biotechnology.* 70: P. 313-321.
- **Braun AR, Reight JH** (1993). Algen in de Nederlandse energiehuishouding. Netherlands Organization for Energy and the Environment (NOVEM): Report NO 9304.
- **Brennan L, Owende P** (2010). Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable Sustainable Energy Rev* 14: 557–77.
- **Briat Jean-Francois, Catherine Curie and Frederic Gaymard** (2007). Iron utilization and metabolism in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10:276–282
- **Bueno, M., Fillat, M.F., Strasser, R.J., Maldonado-Rodriguez, R., Marina, N., Smienk, H., Gomez-Moreno, C. y Barja, F.** (2004). Effects of lindane on the photosynthetic apparatus of the cyanobacterium *Anabaena*: fluorescence induction studies and immunolocalization of ferredoxin- NADP+ reductase. *Environ Sci Pollut Res Int* 11: 98-106.
- **Chamorro-Cevallos, G., L. Garduño-Siciliano, B.L. Barrón, E. Madrigal-Bujaidar, D.E. Cruz-Vega, y N. Pages.** (2007). Chemoprotective effect of Spirulina (Arthrospira) against cyclophosphamide-induced mutagenicity in mice. *Food and Chemical Toxicology* 46:567-574.
- **Chamorro, G., M. Salazar, K.G. Araújo, C. P. dos Santos, G. Ceballos, y L.F. Castillo.** (2002). Update on the pharmacology of Spirulina (Arthrospira), an unconventional food. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 52:232- 240.
- **Chamorro, G., M. Salazar, L. Favila y H. Bourges.** (1996). Pharmacology and toxicology of Spirulina alga. *Revista de Investigación Clínica* 48:389-399.
- **Carswell, C., Grant, B.R., Theodorou ME, Harris J, Niere JO, Plaxton WC** (1996). The fungicide phosphonate disrupts the phosphate-starvation response in *Brassica nigra* seedlings. *Plant. Physiol.* 110, 105-110.
- **Carswell, C., Grant, B.R., Theodorou ME, Harris J, Niere JO, Plaxton WC** (1996). The fungicide phosphonate disrupts the phosphate-starvation response in *Brassica nigra* seedlings. *Plant. Physiol.* 110, 105-110.
- **Carvahlo, A. P., Meireles, L. A. & Malcata, F. X.** (2006). Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances. *Biotechnology Progress*, 22, 1490-1506.
- **Chaumont D** (1993). Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *Journal of Applied Phycology* 5: 593-604.
- **Chen CY, Yeh KL, Aisyah R, Lee DJ, Chang JS** (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresour Technol* 102: 71–81
- **Cheng, C., and Shuman, S.** (2000). Recombinogenic Flap Ligation Pathway for

Intrinsic Repair of Topoisomerase IB-Induced Double-Strand Breaks. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8059-8068

- **Chisti Y** (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25: 294–306.
- **Chun-Yen Chen, K.-L.Y., Rifka Aisyah, Duu-Jong Lee, Jo-Shu Chang, Cultivation**, (2011.). Photobioreactor Design And Harvesting Of Microalgae For Biodiesel Production: A Critical Review. *Bioresource Technology*, 102: P. 71-81.
- **Cingi c, Sayin I.** (2011). Assessment of the probable therapeutic properties of spirulina. *Salud i ciencia* 18(6):535-37.
- **Cingi, C., M. Conk-Dalay, H. Cakli, y C. Bal.** (2008). The effect of Spirulina on allergic rhinitis. *European Archives of oto-rhino-laryngology* 265:1219- 1223.
- **Clark, L.L., Ingall, E.D., and Benner, R.** (1999). Marine organic phosphorus cycling: novel insights from nuclear magnetic resonance. *Am J Sci* 2999: 724–737.
- Clerico, 2007 mapa genoma *S. elongatus* secuenciado web: <http://www.bio.tamu.edu/synecho/>
- **Clerico, E. M., Ditty, J. L., and Golden, S. S.** (2007). Specialized techniques for site directed mutagenesis in cyanobacteria. *Methods Mol Biol* 362, 155-171.
- **Cohen Z** (1986). Products from microalgae. In Richmond A, editor. *Handbook of Microalgae Mass Culture*. Boca Raton: CRC. p421-p454.
- **D. J. Scanlan, N. H. Mann, and N. G. Carr** (1989). Effect of iron and other nutrient limitations on the pattern of outer membrane proteins in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 *Arch Microbiol* 152: 224- 228.
- **Dartsch, P. C.** (2008). Antioxidant potential of selected *Spirulina platensis* preparations. *Phytotherapy Research* 22:627-633.
- **Dawson CJ, Hilton J** (2011). Fertiliser availability in a resource-limited world: production and recycling of nitrogen and phosphorus. *Food Policy* 36: S14–S22.
- **Deng, M. D. and J. R. Coleman** (1999). "Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria." *Appl Environ Microbiol* 65(2): 523-528.
- **Dyhrman, S.T., Chappell, P.D., Haley, S.T., Moffett, J.W., Orchard, E.D., Waterbury, J.B., and Webb, E.A.** (2006). Phosphonate utilization by the globally important marine diazotroph *Trichodesmium*. *Nature* 439: 68–71.
- **E. Molina Grima, F.G.A.F., F. Garcia Camacho, Yusuf Chisti,** (1999). Photobioreactors: Light Regime, Mass Transfer, And Scaleup. *Journal Of Biotechnology*,. 70: P. 231-247
- **E. Molina, J.F., F.G. Acien, Y. Chisti,** (2001). Tubular Photobioreactor Design For Algal Cultures. *Journal Of Biotechnology*,. 92: P. 113-131.
- **Espíndola, A.** (2009). Remoción de arsénico de un medio líquido a nivel de laboratorio mediante la utilización de un consorcio y una cepa axénica de cianobacterias en suspensión aisladas a partir de las hojas de *Polylepis* pauta de bosques nativos del páramo de Papallacta, Ecuador. Tesis de Grado. 46 pp.
- **F. G. Aciehn Fernahdez, J.M.F.S., J. A. Sahnchez Pehrez, And Y.C. E. Molina Grima,** (2001.) Airlift-Driven External-Loop Tubular Photobioreactors For Outdoor Production Of Microalgae: Assessment Of Design And Performance. *Chemical Engineering Science*, 56: P. 2721-2732.
- **Fabregas, J., Herrero, C., Veiga, M.** (1984). Effect of Oil and Dispersant on Growth and Chlorophyll a Content of the Marine Microalga *Tetraselmis suecica*, J. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol 47:2, p. 445-447.
- **Falkowski PG, Raven JA** (1997). *Aquatic photosynthesis*. London: Blackwater Science. 375.

- **Fay, P.** (1992). Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol. Rev.*, 56: 340-373.
- **Flores, E. y Herrero, A.** (1994). Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. En *Advances in Photosynthesis. The molecular biology of cyanobacteria* (Bryant, D.A. ed.), pp. 487-517, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- **Flores, E. y Herrero, A.** (2005). Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria. *Biochem. Soc. Transac.* 33: 164-167.
- **Flores, E. y Wolk, C.P.** (1985). Identification of facultatively heterotrophic, N<sub>2</sub> fixing cyanobacteria able to receive plasmid vectors from *Escherichia coli* by conjugation. *J Bacteriol.*, 162: 1339-1341.
- **Förster, H., Adaskaveg, J.E., Kim, D.H., Stanghellini, M.E.** (1998). Effect of Phosphite on Tomato and Pepper plants and on susceptibility of Pepper to *Phytophthora* Root and Crown Rot in hydroponic culture. *Plant. Dis.* 82, 1165-1170.
- **Gademann, K. y Kobylinska, J.** (2009). Antimalarial natural products of marine and freshwater origin. *Chem Rec* 9: 187-198.
- **Gademann, K. y Portmann, C.** (2008). Secondary Metabolites from Cyanobacteria: Complex Structures and Powerful Bioactivities. *Curr. Org. Chem* 12: 326J341.
- **Garcia-Costas, A. M., White, A. K. & Metcalf W.W.** (2001). Purification and characterization of a novel phosphorous-oxidizing enzyme from *Pseudomonas stutzeri* WM88. *J. Biol. Chem.* 276, 17429-17436.
- **Giovannoni, S.J., Turner, S., Olsen, G.J., Barns, S., Lane, D.J. y Pace, N.R.** (1988) Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J Bacteriol.*, 170: 3584-3592.
- **Glazer, A. N.** (1994). Phycobiliproteins a family of valuables, widely used fluorophores. *J. Appl. Phycol.* 6: 105-102.
- **Golden, S. S., Brusslan, J., and Haselkorn, R.** (1987). Genetic engineering of the cyanobacterial chromosome. *Methods Enzymol.* 153, 215–231.
- **Goldman, J.C., C.B. Riley, And M.R. Dennett,** (1982). The Effect Of Ph In Intensive Microalgal Cultures. II. Species Competition. *Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology*, 57(1): P. 15-24.
- **Gray, M.W.** (1989). The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet.*, 5: 294 299.
- **Grigorieva, G. y Shestakov, S.** (1982). Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC6803. *FEMS. Microbiol. Lett.* 13: 367-370.
- **Grobbelaar JU** (2004). Algal nutrition. In: Richmond A, editor. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology.* Blackwell 97–115.
- **Guerrero, M.G. y Lara, C.** (1987). Assimilation of inorganic nitrogen. En *The cyanobacteria* (Fay, P. y van Baalen, C. eds.), pp. 163-186. Elsevier Science Publishers, New York, EEUU.
- **Guest D, Grant BR.** (1991). The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biol. Rev.* 66, 159-187.
- **Hall, D.O., Markov S.A., Watanabe Y. y Rao K.K.** (1995). The potential applications of cyanobacterial photosynthesis for clean Technologies. *Photosynthesis Research* 46: 159-167.
- **Hanrahan, G., Salmassi, T.M., Khachikian, C.S., and Foster, K.L.** (2005). Reduced inorganic phosphorus in the natural environment: significance, speciation and determination. *Talanta* 66: 435–444.

- **Havens Karl E.** (2008) Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems Chapter 33. Pp 734-747
- **Heinen, W., Lauwers, A.M.** (1974). Hypophosphite oxidase from *Bacillus caldolyticus*. *Arch. Microbiol.* 95, 267-74.
- **Hejazi AM & Wijffels RH** (2004). Milking of microalgae. *Trends Biotechnol.* 22(4):189-194.
- **Hipolito. C. Crabbe. E., M.C., Zarrabal. O., Morales. M., Pineda. G., Florez. G., Hernandez. M., Ishizaki., A. ,** (2008). Bioconversion Of Industrial Wastewater From Palm Oil Processing To Butanol By *Clostridium Saccharoperbutylacetonicum N1-4* (ATCC 13564). *Journal Of Cleaner Production.* 16: P. 632-638.
- **Hudson, B.J. y Karis, I.G.** (1974). The lipids of the alga *Spirulina*. *J Sci Food Agric* 25: 759-763.
- **Ilikchyan, I.N., McKay, R.M., Kutovaya, O.A., Condon, R., and Bullerjahn, G.S.** (2010). Seasonal expression of the picocyanobacterial phosphonate transporter gene *phnD* in the Sargasso Sea. *Front Microbiol* 1: 1–7.
- **Ilikchyan, I.N., McKay, R.M., Zehr, J.P., Dyhrman, S.T., and Bullerjahn, G.S.** (2009). Detection and expression of the phosphonate transporter gene *phnD* in marine and freshwater picocyanobacteria. *Environ Microbiol* 11: 1314–1324.
- IUBMB, 2008) <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/reaction/misc/NAD.html>
- **Ingeborg Scholz, Sita J. Lange, Stephanie Hein, Wolfgang R. Hess, Rolf Backofen.** (2012). CRISPR-Cas Systems in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 Exhibit Distinct Processing Pathways Involving at Least Two Cas6 and a Cmr2 Protein. *PLoS ONE*, 2013; 8 (2): e56470 DOI: 10.1371/journal.pone.0056470
- **Iwai, M., Katoh, H., Katayama, M. y Ikeuchi, M.** (2004). Improved genetic transformation of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Plant Cell Physiol.* 45: 171-175.
- **J. Pruvost., J.F.C., And J. Legrand** (2008). Hydrodynamics Influence On Light Conversion In Photobioreactors: An Energetically Consistent Analysis *Chemical Engineering Journal.* 63: P. 3679 - 3694
- **Janette Kropat<sup>1</sup>, Anne Hong-Hermesdorf, David Casero, Petr Ent<sup>1</sup>, Madeli Castruita, Matteo Pellegrini. Sabeeha S. Merchant and Davin Malasarn** (2011). A revised mineral nutrient supplement increases biomass and growth rate in *Chlamydomonas reinhardtii* *The Plant Journal* 66, 770–780.
- **Janssen M, Tramper J, Mur LR Wijffels RH** (2003). Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnology and Bioengineering* 81 (2):193–210
- **Jiang, W., Metcalf, W.W., Lee, K.S., and Wanner, B.L.** (1995). Molecular cloning, mapping, and regulation of *Pho* regulon genes for phosphonate breakdown by the phosphonatase pathway of *Salmonella typhimurium* LT2. *J Bacteriol* 177: 6411 6421.
- **Jones, A.C., Gu, L., Sorrels, C.M., Sherman, D.H. y Gerwick, W.H.** (2009). New tricks from ancient algae: natural products biosynthesis in marine cyanobacteria. *Curr Opin Chem Biol* 13: 216- 223.
- **Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, H., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura,**

- S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. y Tabata, S.** (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* 3: 109-136.
- **Kim S, Dale BE** (2005). Environmental aspects of ethanol derived from no-tilled corn grain: nonrenewable energy consumption and greenhouse gas emissions. *Biomass Bioenergy* 28: 475–89.
  - **Kolowitz, L.C., Ingall, E.D., and Benner, R.** (2001). Composition and cycling of marine organic phosphorus. *Limnol Oceanogr* 46: 309–320.
  - **Kopfmann, W. R.** (2013). Hess. Toxin-Antitoxin Systems on the Large Defense Plasmid pSYSA of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Biological Chemistry*, 2013; 288 (10): 7399 DOI: 10.1074/jbc.M112.434100
  - **Kosaric, N., Nguyen, H., Bergougnou, M.** (1974). Growth of *Spirulina maxima* algae in effluents from secondary waste-water treatment plants, *J. Biotechnology and Bioengineering*, págs 881 – 896.
  - **Kronick, M. N.** (1986). The use of phycobiliproteins as fluorescent labels in immunoassay. *J. Immunol. Meth.* 92: 1-13.
  - **Kufryk, G.I., Sachet, M., Schmetterer, G. y Vermaas Wim F.J.** (2002). Transformation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a tool for genetic mapping: optimization of efficiency. *FEMS Microbiol. Lett.* 26: 215-219.
  - **Kulczycki, G.R., R.W. Virnstein, And W.G. Nelson,** (2007.) The Relationship Between Fish Abundance And Algal Biomass In A Seagrass-Drift Algae Community. *Estuarine, Coastal And Shelf Science.* 12(3): P. 341-347.
  - **Kuritz, T. y Wolk, C.P.** (1995). Use of filamentous cyanobacteria for biodegradation of organic pollutants. *Appl Environ Microbiol* 61: 234-238.
  - **Kushak R.I., Drapeau C., Van Cott E.M.** (2000). Favorable effects of blue green algae *Aphanizomenon flos-aquae* on rat plasma lipids. *JANA* 2:59-65.
  - **Lam MK, Lee KT** (2012). Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnol Adv* 30:673–90.
  - **Lan, E. I., and Liao, J. C.** (2011). Metabolic engineering of cyanobacteria for 1 butanol production from carbon dioxide. *Metab Eng* 13, 353-363.
  - **Larsen, L.K., Moore, R.E. y Patterson, G.M.** (1994). beta-Carbolines from the blue-green alga *Dichothrix baueriana*. *J Nat Prod* 57: 419-421.
  - **Lee RE** (1980). *Phycology*. New York: Cambridge University Press.
  - **Lee, H. Y. & Erickson, L. E.** (1987). Theoretical and experimental yields for photoautotrophic, mixotrophic and photoheterotrophic growth. *Biotechnology and Bioengineering*, 29, 476-481.
  - **Lee, T-M., Tsai, P-F.** (2005). The effect of phosphite on phosphate starvation response of *Ulva lactuca* (Ulvales, Chlorophyta). *J. Phycol.* 41, 975-982.
  - **Lee, Y.-K., Ding, S.-Y., Low, C.-S., Chang, Y.-C., Forday, W. L. & Chew, P.-C.** (1995). Design and performance of an R-type tubular photobioreactor for mass cultivation of microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 7, 47-51.
  - **Li Q, Du W & Liu D** (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 80: 749-756.
  - **Li X, Xu H & Wu Q** (2007). Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnol Bioeng.* 98: 764-771.

- **Li-Hai Fan, Y.-T.Z., Lin Zhang, Huan-Lin Chen,** (2008). Evaluation Of A Membrane- Sparged Helical Tubular Photobioreactor For Carbon Dioxide Biofixation By *Chlorella Vulgaris*. *Journal Of Membrane Science*. 325: P. 336-345.
- **Liebert, C. A., Watson, A. L., and Summers, A. O.** (1999). Transposon Tn21, Flagship of the Floating Genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 507-522
- **Lindberg, P., Hansel, A. y Lindblad, P.** (2000). hupS and hupL constitute a transcription unit in the cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 73102. *Arch Microbiol* 174: 129-133.
- **López-Arredondo D, Herrera-Estrella L** (2012). Engineering phosphorus metabolism in plants to produce a dual fertilization and weed control system. *Nature Biotech* doi:10.1038/nbt.2346.
- **Lopez-Maury, L., Garcia-Dominguez, M., Florencio, F. J., and Reyes, J. C.** (2002). A two-component signal transduction system involved in nickel sensing in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol* 43, 247-256
- **M. & Torzillo, G.** (2004). Photosynthesis in microalgae. *In: RICHMOND, A. (ed.) Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. 1 ed.: Blackwell Publishing Ltd.
- **Malacinski, G.M., Konetzka, W.A.** (1967). Orthophosphite-nicotinamide adenine dinucleotide oxidoreductase from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 93, 1906-1910.
- **Mao, T. K., J. Van de Water, y M. E. Gershwin.** (2005). Effects of a Spirulina-based dietary supplement on cytokine production from allergic rhinitis patients. *Journal of Medical Food* 8:27-30.
- **Maria J. Barbosa, J.H., René H. Wijffels,** (2003). Optimization Of Cultivation Parameters In Photobioreactors For Microalgae Cultivation Using The A-Stat Technique. *Biomolecular Engineering*. 20: P. 115-123.
- **Markus G. Weinbauer, Osanabonilla-Findj, Amy M.Chan, John R.Doland, Steven M.Short, Karels Imek, Steven W.Wilhelm and Curtis A.Suttle.** (2011). *Synechococcus* growth in the ocean may depend on the lysis of heterotrophic bacteria *Journal of Plankton Research* Volume 0 Number 0 PAGES 1–12 .
- **Marsh, J. & D. Weinstein.** (1966). Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res.* 7: 574-576.
- **Martinez-Trujillo, Limones-Briones, V., Cabrera-Ponce, J.L., Herrera Estrella,L.** (2004). Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant. Mol. Biol. Reporter.* 22, 63-70.
- **Masojidek, J., Et Al.,** (2008). Mass Cultivation Of Freshwater Microalgae, In *Encyclopedia Of Ecology.*, Academic Press: Oxford. P. 2226-2235.
- **Mata TM, Martins AA, Caetano NS** (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable Sustainable Energy Rev* 14: 217–32.
- **McDonald, A.E., Grant, B.R., Plaxton, W.C.** (2001). Phosphite (phosphorus acid): its relevance in the environment and agricultura and influence on plant phosphate starvation response. *J. Plant. Nutr.* 24, 1505-1519.
- **Metcalfe, W.W., and Wanner, B.L.** (1991). Involvement of the *Escherichia coli* phn (psiD) gene cluster in assimilation of phosphorus in the form of phosphonates, phosphite, Pi esters, and Pi. *J Bacteriol* 173: 587–600.
- **Metcalfe, W.W., and Wolfe, R.S.** (1998). Molecular genetic analysis of phosphite and hypophosphite oxidation by *Pseudomonas stutzeri* WM88. *J Bacteriol* 180:

5547-5558

- **Moor, U., Põldma, P., Tõnutare, T., Karp, K., Starast, M., Vool, E.** (2009). Effect of phosphite fertilization on growth, yield and fruit composition of strawberries. *Sci. Hortc.* 119, 264–269.
- **Moore, L.R., Ostrowski, M., Scanlan, D.J., Feren, K., and Sweetsir, T.** (2005). Ecotypic variation of phosphorus acquisition mechanisms within marine picocyanobacteria. *Aquat Microb Ecol* 39: 257–269.
- **Mori, T., Gustafson, K.R., Pannell, L.K., Shoemaker, R.H., Wu, L., McMahon, J.B. y Boyd, M.R.** (1998). Recombinant production of cyanovirin-N, a potent human immunodeficiency virus inactivating protein derived from a cultured cyanobacterium. *Protein Expr Purif* 12: 151-158.
- **Morton, S.C., Glindemann, D., and Edwards, M.A.** (2003). Phosphates, phosphites, and phosphides in environmental samples. *Environ Sci Technol* 37: 1169–1174.
- **Morton, S.C., Glindemann, D., Wang, X., Niu, X., Edwards, M.** (2005). Analysis of reduced phosphorus in samples of environmental interest. *Environ. Sci. Technol.* 39, 4369–76.
- **Muñoz, R. & Guieysee, B.** (2006). Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Research*, 40, 2799-2815.
- **Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Ikeuchi, M., Katoh, H., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Tamada, M. y Tabata, S.** (2002). Complete genome structure of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *DNA Res.* 9: 123-130.
- **Nakasugi, K., Svenson, C.J. y Neilan, B.A.** (2006). The competence gene, *comF*, from *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 is involved in natural transformation, phototactic motility and piliation. *Microbiology* 152: 3623-3631.
- **Nichols, J.M. y Adams, D.G.** (1982). Akinets. En *The biology of cyanobacteria* (Carr, N.G. y Whitton, B.A. eds.), pp. 387-412, Blackwell Scientific Publications, Oxford, Reino Unido.
- **Oka, Y., Tkachi, N., and Mor M.** (2007). Phosphite inhibits development of the nematodes *Heterodera avenae* and *Meloidogyne marylandi* in cereals. *Phytopathology* 97, 4, 396-404.
- **Okamoto, S. y Ohmori, M.** (2002). The cyanobacterial PilT protein responsible for cell motility and transformation hydrolyzes ATP. *Plant Cell Physiol.* 43: 1127-1136.
- **Olson, RJ** (1990) Tamaño de Pigment y la distribución de *Synechococcus* en el Atlántico del Norte y los océanos del Pacífico. *Limnol Oceanogr.* Por Volumen De 35. p. 45-58.
- **Onai, K., Morishita, M., Kaneko, Y., Tabata, S. y Ishiura, M.** (2004). Natural transformation of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1: a simple and efficient method for gene transfer. *Mol. Genet. Genomics* 271: 50-59.
- **Orbović, V., Syvertsen, J.S., Bright, D., Van Clief, D.L., Graham, J.H.** (2008). Citrus seedling growth and susceptibility to root rot as affected by phosphite and phosphate. *J. Plant. Nutr.* 31, 774–787.
- **Orlando Jorquera, A.K., Emerson A. Sales, Marcelo Embiruçu, Maria L. Ghirardi,** (2009.). Comparative Energy Life-Cycle Analyses Of Microalgal Biomass

Production In Open Ponds And Photobioreactors. Bioresource Technology.

- **Palenik, B., Brahmsha, B., Larimer, F.W., Land, M., Hauser, L., Chain, P.** (2003). The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature* 424: 1037–1042.
- **Papageorgiou, G., M. Tsimilli-Michael, And K. Stamatakis,** (2007). The Fast And Slow Kinetics Of Chlorophyll Fluorescence Induction In Plants, Algae And Cyanobacteria: A Viewpoint. *Photosynthesis Research*, 94(2): P. 275-290.
- **Peca, L., Kos, P. B., Mate, Z., Farsang, A., and Vass, I.** (2008) Construction of bioluminescent cyanobacterial reporter strains for detection of nickel, cobalt and zinc. *FEMS Microbiol Lett* 289, 258-264
- **Perkins, F. O.** (1981). Puede la Ultraestructura de un *Synechococcus* marine poseyendo spinae. *J. Microbiol. Por Volumen De* 27. p. 318-329.
- **Porter, R.D.** (1986). Transformation in cyanobacteria. *Crit. Rev. Microbiol.*, 13: 111-132.
- **Posten, I.P.N.A.C.,** (2007.). Simulations Of Light Intensity Variation In Photobioreactors. *Journal Of Biotechnology*, 131: P. 276-285. **Posten, C. & Schaub, G.** (2009). Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels—A process view. *Journal of Biotechnology*, 142, 64-69.
- **Pulz O** (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 57: 287–293
- **Purves KP, Orians GH, y Heller HG** (1992) *Life: The science of biology*. Sinauer Associates. Boston.
- **Qi Qungang, Ming Hao, Wing-on Ng, Steven C. Slater, Susan R. Baszis, James D. Weiss, and Henry E. Valentin.** (2005). Application of the *Synechococcus nirA* Promoter To Establish an Inducible Expression System for Engineering the *Synechocystis* Tocopherol Pathway. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p. 5678–5684.
- **Rastogi, R.P. y Sinha, R.P.** (2009). Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 27: 521-539.
- **Raul Muñoz, B.G.,** (2006). Algal–Bacterial Processes For The Treatment Of Hazardous Contaminants: A Review. *WATER RESEARCH*, P. 2799-2815.
- **Raul Muñoz, C.K., Benoit Guieysse, Biofilm** (2009). Photobioreactors For The Treatment Of Industrial Wastewaters. *Journal Of Hazardous Materials*,. 161: P. 29 34.
- **Relyea, H.A., and van der Donk, W.A.** (2005). Mechanism and applications of phosphite dehydrogenase. *Bioorg Chem* 33: 171–189.
- **Remirez, D., V. Fernández, G. Tapia, R. González, y A. Videla.** (2002). Influence of c phycocyanin on hepatocellular parameters related to liver oxidative stress and Kupffer cell functioning. *Inflammation Research* 51:351-356.
- **Ressom, R., F.S. San, J. Fitzgerald, L. Turczynowicz, O. El Saadi, D. Roder, T Maynard & I. Falconer.** (1994). Health effects of toxic cyanobacteria (blue-green algae). National Health and Medical Research Council (NHMRC). Looking Glass Press, Australia, 112 pp.
- **Rickards, R.W., Rothschild, J.M., Willis, A. C., de Chazal, N. M., Kirk, J., Kirk, K., Saliba, K.J. y Smith, G.D.** (1999). Calothrixins A and B, novel pentacyclic metabolites from *Calothrix* cyanobacteria with potent activity against malaria parasites and human cancer cells. *Tetrahedrom* 55: 13513-13520.
- **Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herman, M., Stanier, R.Y.** (1979). Genetics asignements, strains histories and properties of pure cultures of

- cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 111: 1-61.
- **Rippka, R.** (2005.) Neurotoxinas en axénico oscillatorian cianobacterias: la coexistencia de anatoxina-a y homoanatoxin-un determinado por ensayo de ligando-vinculante y GC / MS. *Microbiología*. Por Volumen De 151. p. 1263-1273.
  - **Roi Feingersch, Alon Filosof, Tom Mejuch, Fabian Glaser, Onit Alalouf, Yuval Shoham and Oded Beja** (2012). Potential for phosphite and phosphonate utilization by *Prochlorococcus* The ISME Journal 6, 827–834
  - **Salehizadeh H. y Van Loosdrecht M.C.M.** (2004). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol. Adv.* 22, 261-279.
  - **Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
  - **Sangthongpitag, K., Penfold, R.J., Delaney, S.F. y Rogers, P.L.** (1997). Cloning and expression of the *Bacillus sphaericus* 2362 mosquitoicidal genes in a non-toxic unicellular cyanobacterium, *Synechococcus* PCC6301. *Appl Microbiol Biotechnol* 47: 379-384.
  - **Sato, M. et al.** (2005.) Análisis de Expresión de múltiples genes dnaK en la cianobacteria *Synechococcus elongatus* PCC 7942." *Journal of Microbiology*. 2007. Por Volumen De 189. p. 3751 a 3758.
  - **Scanlan DJ** (2003) Physiological diversity and niche adaptation in marine *Synechococcus*. *Adv Microbiol Physiol* 47:1–64
  - **Scanlan, DJ y la Nyree, JW** (2002) La ecología Molecular de la *Prochlorococcus* géneros cianobacteriana marina y *Synechococcus*. *FEMS Microbiology Ecology*. Volumen 40. p. 1-12.
  - **Schink, B., Thiemann, V., Laue, H., and Friedrich, M.W.** (2002). *Desulfotignum phosphitoxidans* sp. nov., a new marine sulfate reducer that oxidizes
  - **Schopf, J.W.** (1993). Microfossils of the earlye archaean apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science*, 260: 640-646.
  - **Schroetter, S., Angeles-Wedler, D., Kreuzig, R., Schnug, E.** (2006). Effects of phosphite on phosphorus supply and growth of corn (*Zea mays*). *Landbauforschung Völkenrode* 3/4 2006, 56, 87-99.
  - **Schwarz and Karl Forchhamme** (2005). Acclimation of unicellular cyanobacteria to macronutrient deficiency: emergence of a complex network of cellular responses *Microbiology*, 151, 2503–2514.
  - **Shuman, S.** (1991). Recombination Mediated by Vaccinia Virus DNA Topoisomerase I in *Escherichia coli* is Sequence Specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10104-10108.
  - **Shuman, S.** (1994). Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase. *J. Biol. Chem.* 269, 32678-32684.
  - **Sierra, E., Acién, F. G., Fernández, J. M., García, J. L., González, C. & Molina, E.** (2008). Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chemical Engineering Journal*, 138, 136-147. Masojídek, J., Koblížek,
  - **Simeonova, D.D., Wilson, M.M., Metcalf, W.W., and Schink, B.** (2010). Identification and heterologous expression of 1376 A. Martínez et al. genes involved in anaerobic dissimilatory phosphite oxidation by *Desulfotignum phosphitoxidans*. J

Bacteriol 192:5237–5244.

- **Sivonen, K., Leikoski, N., Fewer, D.P. y Jokela, J.** (2010). Cyanobactins ribosomal cyclic peptides produced by cyanobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 86: 1213-1225.
- **Skulberg, O.M.** (2005). Cyanobacteria/cyanotoxin research--looking back for the future: the opening lecture of the 6th ICTC, Bergen, Norway. *Environ Toxicol* 20: 220-228.
- **Smith, A.J.** (1982). Modes of cyanobacterial carbon metabolism. En *The biology of cyanobacteria* (Carr, N.G. y Whitton, B.A. eds.), pp. 47-85, Blackwell Scientific Publications, Oxford, Reino Unido.
- **Stanier, R.Y. y Cohen-Bazire, G.** (1977). Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 31: 225-274.
- **Stanier, R.Y. y Cohen-Bazire, G.** (1977). Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 31: 225-274.
- **Stevens, S.E. y Porter, R.D.** (1980). Transformation in *Agmenellum quadruplicatum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6052-6056.
- **Stewart, D.H. y Brudvig, G.W.** (1998). Cytochrome *b559* of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1367: 63-87.
- **Stewart, W.D.** (1980). Some aspects of structure and function in N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 34: 497-536.
- **Su, Z., Dam, P., Chen, X., Olman, V., Jiang, T., Palenik, B., and Xu, Y.** (2003). Computational inference of regulatory pathways in microbes: an application to phosphorus assimilation pathways in *Synechococcus* sp. WH8102. *Genome Inform*14: 3–13.
- **Sugita, C.** (2007). Secuencia de Completa el de nucleótidos de la de agua dulce unicellular cianobacteria *Synechococcus elongatus* PCC 6301 cromosoma:.. Contenido de genes y la organización, Res Photosynth.
- **Sukarno, N., Smith, S.E., Scott, E.S.** (1993). The effect of fungicides on vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis: I. The effects on vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth. *New Phytol* 25, 139–147.
- **Suzuki, E.** (2007) Papel de la la proteína GlgX en el metabolismo de glucógeno de la cianobacteria, *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Biochim Biophys Acta*. Por Volumen De 1770. p. 763-773.
- **Takahama, K., Matsuoka, M., Nagahama, K., and Ogawa, T.** (2004). High-frequency gene replacement in cyanobacteria using a heterologous *rps12* gene. *Plant Cell Physiol.* 45, 333–339.
- **Tamagnini, P., Leitao, E., Oliveira, P., Ferreira, D., Pinto, F., Harris, D.J., Heidorn, T. Y Lindblad, P.** (2007). Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications. *FEMS Microbiol Rev* 31: 692-720.
- **Tandeau de Marsac, N.** (1994). Differentiation of hormogonia and relationships with other biological processes. En *Advances in Photosynthesis. The molecular biology of cyanobacteria* (Bryant, D.A. ed.), pp. 825-842, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- **Tandeau de Marsac, N. y Houmard, J.** (1993). Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.*, 104: 119-190.
- **Teresa M. Mata, A.A.M., Nidia. S. Caetano,** (2010). Microalgae For Biodiesel Production And Other Applications: A Review. *Renewable And Sustainable Energy*

Reviews, 14: P. 217-232.

- **Terry KL, Raymond LP** (1985) System design for the autotrophic production of microalgae. *Enzyme and Microbial Technology* 7 (10): 474–487
- **Thao, H.T.B., and Yamakawa, T.** (2008<sub>1</sub>). Growth of celery (*Apium graveolens* var. dulce) as influenced by phosphite. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 53, 375–378.
- **Thao, H.T.B., Yamakawa, T., Sarr, P.S., Myint, A.K.** (2008<sub>2</sub>). Effects of phosphite, a reduced form of phosphate, on the growth and phosphorus nutrition of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 54, 761–768.
- **Thao, H.T.B., Yamakawa, T.** (2009). Phosphite (phosphorous acid): fungicide, fertilizer or bio-stimulator?. *Soil Science and Plant Nutrition*, 55, 228–234.
- **Thiel, T., y Poo, H.** (1989). Transformation of a filamentous cyanobacterium by electroporation. *J. Bacteriol.*, 171: 5743-5746.
- **Ticconi, C. A., Delatorre, C. A. & Abel, S.** (2001). Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in *Arabidopsis*. *Plant. Physiol.* 127, 963-972.
- **Tiessen, H.** (2008). Phosphorus in the global environment. Chapter 1. In the ecophysiology of plant-phosphorus interactions. P.J. White, J.P. Hammond (eds.). Springer Science + Business Media B.V.
- **Tredec, M. R. & Zittelli, G. C.** (1998). Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors. *Biotechnology and bioengineering*, 57, 187-197.
- **Ugwu, H.A., H. Uchiyama,** (2008). Photobioreactors For Mass Cultivation Of Algae. *Bioresource Technology*. 99: P. 4021-4028.
- **Varadarajan, D.K., Karthikeyan, A.S., Matilda, P.D., Raghothama, K.G.** (2002). Phosphite, an analogue of phosphate, suppresses the coordinated expression of genes under phosphate starvation. *Plant. Physiol.* 129, 1232-1240.
- **Vázquez-Sánchez J., M. A. Mojica-Villegas, M. A. Juárez-Oropeza, P. V. Torres Durán, y G. Chamorro-Cevallos.** (2009). Actualización en la farmacología del alga Spirulina (Arthrospira) y ficocianina.
- **Vijayan, V., Jain, I. H., and O'Shea, E. K.** (2011). A high resolution map of a cyanobacterial transcriptome. *Genome Biol* 12, R47
- **Volk, R.B.** (2008). Screening of microalgae for species excreting norharmane, a manifold biologically active indole alkaloid. *Microbiol Res* 163: 307-313.
- **Watanabe, F., Takenaka, S., Kittaka-Katsura, H., Ebara, S. y Miyamoto, E.** (2002). Characterization and bioavailability of vitamin B12-compounds from edible algae. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 48: 325-331.
- **Waterbury JB, Watson SW, Guillard RRL, Brand LE** (1979) Wide-spread occurrence of a unicellular, marine planktonic, cyanobacterium. *Nature* 277:293–294
- **Waterbury JB, Watson SW, Valois FW, Franks DG** (1986) Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. *Can Bull Fish Aquat Sci* 472:71–120
- **Waterbury, JB et al.** (1986.) Caracterización biológica y ecológica de la unicelular *Synechococcus* cianobacteria marine. *Bull. Fish. Go Acuático. Ciencia. Por Volumen De 214.* p. 71-120.
- **White AK, Metcalf WW** (2007). Microbial metabolism of reduced phosphorus compounds. *Annu Rev Microbiol* 61: 379–400.
- **White AK, Metcalf WW** (2007). Microbial metabolism of reduced phosphorus compounds. *Annu Rev Microbiol* 61: 379–400.

- **White, A.K., and Metcalf, W.W.** (2002). Isolation and biochemical characterization of hypophosphite/2-oxoglutarate dioxygenase. A novel phosphorus-oxidizing enzyme from *Pseudomonas stutzeri* WM88. *J. Biol. Chem.* 277, 38262-71. **White, A.K., Metcalf, W.W.** (2004). The htx and ptx operons of *Pseudomonas stutzeri* WM88 are new members of the Pho regulon. *J. Bacteriol.* 186, 5876-82.
- **White, A.K., and Metcalf, W.W.** (2004). Two C-P lyase operons in *Pseudomonas stutzeri* and their roles in the oxidation of phosphonates, phosphite, and hypophosphite. *J. Bacteriol.* 186: 4730.
- **White, A.K., and Metcalf, W.W.** (2007). Microbial metabolism of reduced phosphorus compounds. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 379-400.
- **Williams PJ** (2007). Biofuel: microalgae cut the social and ecological costs. *Nature.* 450: 478.
- **Williams, SB** (2007.). A mecanismo de circadiano de temporización en el las cianobacterias. *Adv Microb Physiol.* Por Volumen De 52. p. 229-296.
- **Woese, C.R.** (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 51: 221-271.
- **Wolk, C.P.** (1982). Heterocysts. En *The biology of cyanobacteria* (Carr, N.G. y Whitton, B.A. eds.), pp. 359-386. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Reino Unido.
- **Wolk, C.P., Vonshak, A., Kehoe, P. y Elhai, J.** (1984). Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 81: 1561-1565.
- **Yang, Mino et al.** (2007). Transfer Energía en Fotosistema I de Cyanobacteria elongatus *Synechococcus*:. Study Modelo con Estructura de-Based Semi-Empirical Density Espectral hamiltoniano and Experimental. *Journal Biophysical.* 2003. Por Volumen De 85. p. 140-158.
- **Yoshihara, S., Geng, X. y Ikeuchi, M.** (2002). *pilG* gene cluster and Split *pilL* genes involved in pilus biogenesis, motility and genetic transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 43: 513-521.
- **Yoshihara, S., Geng, X., Okamoto, S., Yura, K., Murata, T., Go, M., Ohmori, M. y Ikeuchi, M.** (2001). Mutational analysis of genes involved in pilus structure, motility and transformation competency in the unicellular motile cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 42: 63-73.
- **Zang, X., Liu, B., Liu, S., Arunakamura, K. y Zhang, X.** (2007). Optimal conditions for transformation of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Microbiol.* 45: 241-245.
- **Zhang Juan, Jinju Geng, Hongqiang Ren, Jun Luo, Aiqian Zhang, Xiaorong Wang** (2011). Physiological and biochemical responses of *Microcystis aeruginosa* to phosphite. *Chemosphere* 85 1325–1330.
- **Zhang, W-J., Jiang, F-B, Ou, J-F.** (2011). Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences* 1, 2, 125-144.

## XI. ANEXOS.

### Anexo 1. Preparación Buffer TAE.

Reactivo	Cantidad
Tris-base	242 g
Ácido acético	57.1 mL
EDTA (0.5M EDTA-Na)	100mL
H <sub>2</sub> O	Aforar a 1L

**NOTA:** Con la preparación anterior obtenemos TAE 50X, en este trabajo se utilizó buffer TAE 1X.

Por lo que de la solución descrita (TAE 50X), se toman 20mL y se diluyen en 980mL de agua destilada.

### Anexo 2. Preparación Buffer de carga "Orange G".

Reactivo	Cantidad
Orange G	0.125 g
Glicerol 30%	15mL
Tris-HCl (1 M)	0.5 mL
EDTA (0.5 M)	2.5 mL
H <sub>2</sub> O	32 mL

**NOTA:** Disolver el Orange G en agua, y a esta solución adicionar los demás componente.

### Anexo 3. Metodología para células electrocompetentes de *E. coli DH5-α*.

1. Inocular una colonia de *E. coli* en 5mL de medio líquido LB.
2. Incubar durante 12 horas a 37°C con agitación orbital continua de 200 rpm.
3. Pasado este tiempo, tomar 2.5mL de este cultivo, e inocular en 250mL de medio líquido YENB.
4. Incubar en un matraz Erlenmeyer de 500mL a 37°C y 200rpm, hasta obtener  $OD_{600}=1$  (recomendado 0.6).
5. Una vez alcanzada esta OD (aproximadamente 4h), enfriar por 15 minutos en agua helada.
6. Centrifugar a 4000 rpm por 15 min a 4°C de temperatura.
7. Decantar.
8. Resuspender el concentrado celular en 100 mL de agua destilada estéril fría.
9. Repetir pasos 6-8. (3 veces).
10. Resuspender el concentrado celular en 50 mL de glicerol frío estéril al 10%.
11. Centrifugar a 4000 rpm por 15 min a 4°C de temperatura.
12. Resuspender el concentrado celular en 1mL de glicerol estéril y frío al 10%.
13. Hacer alícuotas y congelar inmediatamente en  $N_2$ , almacenar a -70°C hasta su uso.

#### Anexo 4. **Composición de medio SOC.**

Reactivo	Cantidad
Extracto de levadura	5 g
Triptona	20 g
Cloruro de sodio (5M)	2 mL
Cloruro de potasio (1M)	2.5 mL
Cloruro de magnesio (1M)	10 mL
Sulfato de magnesio (1M)	10 mL
Glucosa (1M)	20mL
H <sub>2</sub> O	Aforar a 1L

**NOTA:** Ajustar pH a 7.0 con NaOH.