

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Desarrollo de herramientas biotecnológicas en cianobacterias

Development of biotechnological tools in cyanobacteria

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sara Baldanta Callejo

Directora

Juana María Navarro Llorens

Madrid

© Sara Baldanta Callejo, 2022

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID**

TESIS DOCTORAL

Desarrollo de herramientas biotecnológicas en cianobacterias

Development of biotechnological tools in cyanobacteria

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

SARA BALDANTA CALLEJO

DIRECTORA

Dra. JUANA MARÍA NAVARRO LLORENS

Madrid, 2022

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE DOCTORADO:

BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

TESIS DOCTORAL

Desarrollo de herramientas biotecnológicas en cianobacterias

Development of biotechnological tools in cyanobacteria

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

SARA BALDANTA CALLEJO

DIRECTORA

Dra. JUANA MARÍA NAVARRO LLORENS

Madrid, 2022

“When you look from really close, a new world is revealed to you, more beautiful and spectacular than you would ever have imagined.”

Micropia

“Microorganisms will give you anything you want if you know how to ask them.”

Kinichiro Sakaguchi

“Progress in science depends on new techniques, new discoveries and new ideas, probably in that order.”

Sydney Brenner

El trabajo descrito en esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid (Madrid, España). Como parte de la tesis se realizaron dos estancias predoctorales en el grupo de Ingeniería Metabólica de bacterias autótrofas dirigido por Paul Hudson en KTH-Royal Institute of Technology, Estocolmo, Suecia.

La investigación ha sido financiada por una beca predoctoral concedida por la Universidad Complutense de Madrid y por los proyectos INSPIRA1 (S2013/ABI2783) y ALGATEC-CM (P2018/BAA-4532), co-financiados por la Comunidad de Madrid y cofinanciados por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), y los proyectos HELIOS (BIO 2015-66960-C3-3-R) y SETH (RTI2018-095584-B-C44), del Ministerio de Ciencia e Innovación.

Las estancias internacionales realizadas fueron financiadas mediante una Beca Erasmus + (2020) y una beca FEBS *Summer Fellowship* concedida por FEBS (*Federation of European Biochemical Societies*, 2021).

ÍNDICE

ÍNDICE.....	9
ABREVIATURAS.....	13
I. SUMMARY.....	17
II. RESUMEN.....	23
III. INTRODUCCIÓN.....	29
1. Uso de cianobacterias para una economía circular sostenible.....	31
2. Aspectos generales de las cianobacterias.....	32
2.1. Metabolismo y organización celular de las cianobacterias.....	33
2.2. Clasificación de las cianobacterias.....	36
2.3. Cianobacterias de interés biotecnológico.....	36
3. Modificación genética de cianobacterias.....	45
3.1. Vectores empleados en cianobacterias.....	45
3.2. Métodos de transferencia génica.....	51
3.3. Barreras para la transferencia de ADN exógeno en cianobacterias.....	55
3.4. Edición genética en cianobacterias.....	60
4. Control de la expresión en cianobacterias.....	63
4.1. Promotores y RBS.....	63
4.2. CRISPRi.....	65
4.3. Módulos basados en estructura de ARN.....	66
4.4. Regulación post-traduccional.....	67
5. Aplicaciones biotecnológicas de las cianobacterias.....	70
5.1. Alimentación, cosmética y farmacia.....	70
5.2. Industria y biorremediación.....	72
5.3. Otras aplicaciones.....	73
IV. OBJETIVOS.....	75
V. RESULTADOS.....	79
CAPÍTULO 1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CIANOBACTERIAS PROCEDENTES DE UN PANEL SOLAR.....	81
1. Antecedentes: cianobacterias en ambientes extremos.....	83
2. Material y métodos.....	85
2.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos.....	85
2.2. Medios y condiciones de cultivo.....	86
2.3. Técnicas que manipulación de ADN.....	89
2.4. Otros ensayos con las cianobacterias aisladas.....	90
3. Resultados.....	92
3.1. Aislamiento e identificación de cianobacterias de un panel solar.....	92
3.2. Caracterización fisiológica del crecimiento de <i>Chroococcidiopsis</i> sp. Helios.....	100
3.3. Estudio de propiedades extremófilas asociadas al panel solar.....	108
3.4. Análisis <i>in silico</i> de clústeres génicos con posible interés biotecnológico.....	111
CAPÍTULO 2. ESTUDIOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN <i>ARTHROSPIRA PLATENSIS</i> PCC 9108.....	123
1. Antecedentes: modificación genética de la espirulina.....	125
2. Material y métodos.....	127

2.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos.....	127
2.2. Medios y condiciones de cultivo	127
2.3. Experimentos de transferencia génica.....	130
2.4. Técnicas de manipulación de ADN.....	134
3. Resultados	137
3.1. Caracterización fisiológica de <i>A. platensis</i> PCC 9108.....	137
3.2. Optimización de los sistemas de transferencia genética en <i>A. platensis</i> PCC 9108.....	142
CAPÍTULO 3. DESARROLLO DE HERRAMIENTAS MOLECULARES EN CIANOBACTERIAS DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO	159
1. Antecedentes	161
2. Material y métodos.....	163
2.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos.....	163
2.2. Medios y condiciones de cultivo	165
2.3. Experimentos de transferencia génica.....	166
2.4. Técnicas que manipulación de ADN	167
2.5. Medida y visualización de fluorescencia	170
2.6. Ensayo de clorosis en <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	170
3. Resultados	171
3.1. Evaluación plásmidos de la colección SEVA en cianobacterias.....	171
3.2. Prueba de promotores en cianobacterias utilizando pSEVA	175
3.3. Desarrollo de CRISPR-Cas en pSEVA para cianobacterias	176
CAPÍTULO 4. DESARROLLO DE HERRAMIENTAS DE EXPRESIÓN GÉNICA Y CONTROL DE PROTEÍNAS EN SYNECHOCOCCUS SP. PCC 11901.....	187
1. Antecedentes: Herramientas de control de la expresión en cianobacterias	189
2. Material y métodos.....	191
2.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos.....	191
2.2. Medios y condiciones de cultivo	195
2.3. Experimentos de transferencia génica.....	196
2.4. Técnicas que manipulación de ADN	197
2.5. Técnicas de manipulación de proteínas	201
2.6. Medidas de fluorescencia	202
3. Resultados	203
3.1. Construcción de plásmidos para modificación genética.....	203
3.2. Prueba de promotores.....	209
3.3. Desarrollo de un sistema de interferencia de proteínas.....	213
VI. DISCUSIÓN.....	221
1. Ampliando el porfolio de cianobacterias	223
1.1. Diversidad de cianobacterias cultivables procedentes de un panel solar	224
1.2. Caracterización de <i>Chroococidiopsis</i> sp.	225
1.3. Potencial biotecnológico <i>Chroococidiopsis</i> sp. Helios.....	226
1.4. Velocidad de crecimiento y acumulación de biomasa en cianobacterias	228
2. Mejora genética de cianobacterias.....	229
2.1. Transformabilidad de las cianobacterias.....	229
2.2. Barreras a la transformación de <i>A. platensis</i> PCC 9108.....	232
2.3. Edición genética de cianobacterias mediante CRISPR-Cas.....	235
3. Desarrollo de herramientas de biología sintética	236
3.1. Herramientas de control de la expresión genética en cianobacterias.....	236

3.2. Sistema de degradación de proteínas en <i>Synechococcus</i> 11901	237
4. Perspectivas futuras	239
4.1. <i>Chroococcidiopsis</i> sp. y otras cianobacterias procedentes del panel solar	239
4.2. Uso del sistema TEVp con fines biotecnológicos	240
VII. CONCLUSIONS.....	243
VIII. CONCLUSIONES.....	247
IX. REFERENCIAS.....	251
X. ANEXOS	283

ABREVIATURAS

µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ALE	Evolución adaptativa en el laboratorio (<i>Adaptive laboratory evolution</i>)
Amp	Ampicilina
Apra	Apramicina
ARNcr	Ácido ribonucleico CRISPR
ARNgs	Ácido ribonucleico guía sintético
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNtracr	Ácido ribonucleico trans-activador CRISPR
BG11	Medio <i>Blue-green</i> 11
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Albúmina de suero bovino
BSC	Costras biológicas de suelo (<i>biological soil crusts</i>)
C	Cicloheximida
Cas	CRISPR-associated proteins
Cm	Cloranfenicol
CRISPR	Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas (<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>)
C-terminal	Carboxilo terminal
DCMU	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	desoxirribonucleósidos 5'-trifosfato
DO _{xnm}	Densidad óptica medida a X nm, unidades arbitrarias.
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EPS	Exopolisacárido
FENIX	Ingeniería funcional para el control de flujo basado en SsrA/Nia (<i>functional engineering of SsrA/Nia-based flux control</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green fluorescent protein</i>)
Gm	Gentamicina
Hepes	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-iletanosulfónico
Hyg	Higromicina
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
Km	Kanamicina
LB	Luria-Bertani
MAA	Aminoácidos tipo micosporinas
Mb	Mega pares de bases
MCS	Sitio de clonaje múltiple (<i>multicloning site</i>)
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTasa	Metiltransferasa
N	Nistatina
Nal	Nalidíxico
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	Nanómetro
Nm	Neomicina
NS	Sitio neutral de integración en el genoma

nt	Nucleótido(s)
N-terminal	Amino terminal
O/N	Durante toda la noche (<i>Over-night</i>)
ORF	Marco de lectura abierto (<i>Open reading frame</i>)
p/v	Relación peso-volumen
pb	Par(es) de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RAST	<i>Rapid Annotation Using Subsystem Technology</i>
RBS	Ritio de unión al ribosoma
REasa	Enzima de restricción
Rif	Rifampicina
RM	Sistemas restricción-modificación
RNasa	ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEVA	<i>Standard European Vector Architecture</i>
Sm	Espectinomicina
Spt	Estreptomomicina
Tet	Tetraciclina
TEVp	Proteasa del virus del grabado del tabaco (<i>Tobacco Etch Virus nuclear-inclusion-a endopeptidase</i>)
Tn	Transposón
Tris	Trihidroximetilaminometano
UV-C	Radiación ultravioleta C
v/v	Relación volumen-volumen
WT	Estirpe silvestre
YFP	Proteína amarilla fluorescente (<i>Yellow fluorescent protein</i>)
Ω	Ohmio

Código de aminoácidos

Tres letras	Una letra	Nombre
Ala	A	Alanina
Arg	R	Arginina
Asn	N	Asparagina
Asp	D	Ácido aspártico
Cys	C	Cisteína
Gln	Q	Glutamina
Glu	E	Ácido glutámico
Gly	G	Glicina
His	H	Histidina
Ile	I	Isoleucina
Leu	L	Leucina
Lys	K	Lisina
Met	M	Metionina
Phe	F	Fenilalanina
Pro	P	Prolina
Ser	S	Serina
Thr	T	Treonina
Trp	W	Triptófano
Tyr	Y	Tirosina
Val	V	Valina

I. Summary

DEVELOPMENT OF BIOTECHNOLOGICAL TOOLS IN CYANOBACTERIA

1. Introduction

Cyanobacteria are among the oldest living organisms on the planet, and they can be found in every ecosystem on Earth, from freshwater oceans, rivers and lakes to hot springs and deserts. Apart from their ecological role in the global carbon and nitrogen cycles, cyanobacteria are becoming an increasingly attractive chassis in the biotechnological production of high value-added compounds since the requirements for their growth, light, and CO₂, are minimal, costless, and abundant.

Although various cyanobacteria, notably *Synechocystis* spp. and *Synechococcus* spp., have already been characterized for their industrial application, many of them grow in very specific conditions, mainly under controlled laboratory conditions. For this reason, new cyanobacteria that can be used as chassis or provide genes of interest in biotechnology are continually being sought. Therefore, it is important to study the diversity of cyanobacteria in order to develop their potential for human benefit. On the other hand, as molecular tools available to modify the metabolism of cyanobacteria are still limited compared to those described for other industrially or biotechnologically-used microorganisms, there is a need for developing new and more versatile biotechnological tools for them.

2. Objectives

Considering this background, the main objective of this Doctoral Thesis consisted on the isolation and characterization of new extremophile cyanobacteria strains, as well as the development and optimization of different molecular tools to improve the applications of cyanobacteria. To this end, the following partial objectives were set as:

- 1) Characterization of new strains of extremophile cyanobacteria (Chapter 1)
- 2) Development of Synthetic Biology tools in cyanobacteria with industrial and biotechnological interest (Chapters 2-4).

3. Results

Chapter 1. Characterization of new strains of extremophile cyanobacteria

Cyanobacteria from a solar panel were isolated with the idea of discovering new strains resistant to radiation and desiccation in order to develop different biotechnological applications. After the initial isolation, presence of cyanobacteria and also microalgae were identified, belonging to genera common in environments with low water availability.

Due to their better growth among all the isolates, four strains of *Chroococcidiopsis* were characterized in the laboratory and named *Chroococcidiopsis* sp. Helios. These strains were able to grow with moderate concentrations of NaCl, neutral pH and using different sources of nitrogen and carbon. Regarding its behaviour, *Chroococcidiopsis* sp. Helios showed, in general,

the ability to form biofilms. On the other hand, we investigated the desiccation tolerance of Helios strains and resistance to exposure to UV-C radiation. Helios strains were shown to be more resistant to these stresses than bacteria and cyanobacteria frequently used in the laboratory.

Finally, because many bacteria isolated from extreme environments produce secondary metabolites with biotechnological value in response to these harsh conditions, the genomes of the four *Chroococcidiopsis* sp. were sequenced. Through *in silico* analysis, genes involved in the synthesis of pigments against UV, genes related to the production of trehalose and the cluster responsible for nitrogen fixation were identified in the different *Chroococcidiopsis* sp. Helios. Furthermore, different clusters have been found for the synthesis of secondary metabolites presumably with antimicrobial and anti-inflammatory activity.

Chapter 2. Study of genetic transformation strategies in *Arthrospira platensis* PCC 9108

Different protocols for the genetic transformation of the cyanobacteria *Arthrospira platensis* PCC 9108, commonly known as spirulina, with enormous industrial interest, were evaluated. Different replicative plasmids and/or DNA cassettes were used to integrate into the cyanobacterial genome, transformed by conjugation with *Agrobacterium tumefaciens*, triparental conjugation with *E. coli* and electroporation. In the transformation with *A. tumefaciens*, different strains were used, while for the triparental conjugation, plasmids with different origins of replication were employed. In addition, the best conditions for electroporation have been defined and commercial methyltransferases have been used to protect the DNA against the restriction modification systems of this cyanobacteria. However, no transformants were obtained for any of the protocols tested, so further studies are needed to develop genetic transformation protocols.

Chapter 3. Development of biotechnological tools using pSEVA plasmids in cyanobacteria.

In this chapter, the functionality of pSEVA plasmids in different genera of cyanobacteria was evaluated: from industrial and research strain models such as *Synechocystis* or *Anabaena* to non-model extremophiles such as *Chroococcidiopsis*, validating the use of RSF1010 origin of replication. Subsequently, these pSEVA plasmids served as the basis for the expression of *yfp* as well as the application of CRISPR-Cpf1 technology. As a proof of concept, pSEVA-Cpf1 vectors were successfully applied in the deletion of the *nblA* gene in *Synechocystis* sp. PCC 6803. The pSEVA vectors with the CRISPR tools proved to be easy to handle and allowed the editing of *Synechocystis* sp. PCC 6803 through natural transformation, in addition to triparental conjugation, unlike other CRISPR systems described.

Chapter 4. Development of gene expression tools and protein control in *Synechococcus* sp. PCC 11901.

To increase the repertoire of tools available in cyanobacteria, integrative plasmids were developed, and different constitutive and inducible promoters were validated for heterologous expression in the fast-growing strain *Synechococcus* sp. PCC 11901. In addition, an inducible and directed protein degradation system has been designed, tested and characterized using YFP as the target protein.

4. Final conclusion

The work presented in this Doctoral Thesis demonstrates the biotechnological potential of cyanobacteria, especially from extreme environments. The molecular tools developed and described in this Doctoral Thesis, will increase the biotechnological potential of these microorganisms and other cyanobacteria in general.

II. Resumen

DESARROLLO DE HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS EN CIANOBACTERIAS

1. Introducción

Las cianobacterias se encuentran entre los organismos vivos más antiguos del planeta y se pueden hallar en todos los ecosistemas de la Tierra, desde océanos, ríos y lagos de agua dulce hasta fuentes termales y desiertos. Aparte de su papel ecológico en los ciclos globales del carbono y el nitrógeno, las cianobacterias se están convirtiendo en un chasis cada vez más atractivo en la producción biotecnológica de compuestos de alto valor añadido, pues los requerimientos para su crecimiento, luz y CO₂, son mínimos, gratuitos y abundantes.

Si bien diversas cianobacterias, sobre todo *Synechocystis* spp. y *Synechococcus* spp., han sido ya caracterizadas para su aplicación industrial, muchas de ellas crecen en condiciones muy concretas, principalmente en condiciones controladas de laboratorio. Por este motivo, continuamente se buscan nuevas cianobacterias que puedan utilizarse como chasis o bien aporten genes de interés en biotecnología. Por lo tanto, es importante estudiar la diversidad de cianobacterias para poder desarrollar su potencial para beneficio humano. Por otro lado, aunque cada vez se describen más, las herramientas moleculares de las que se dispone para modificar el metabolismo de las cianobacterias, aún son limitadas en comparación con las desarrolladas para otros microorganismos de uso industrial y biotecnológico.

2. Objetivos

Con estos antecedentes, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral consistió en el aislamiento y caracterización de nuevas cianobacterias extremófilas, así como el desarrollo y optimización de diferentes herramientas moleculares para mejorar las aplicaciones de las cianobacterias. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- 1) Caracterización de nuevas cepas de cianobacterias extremófilas (Capítulo 1)
- 2) Desarrollo de herramientas de Biología Sintética en cianobacterias de interés industrial y biotecnológico (Capítulos 2-4).

3. Resultados

Capítulo 1. Caracterización de nuevas cepas de cianobacterias extremófilas

Se aislaron cianobacterias procedentes de un panel solar de la ciudad de Valencia con la idea de buscar cepas resistentes a radiación y a desecación para poder desarrollar distintas aplicaciones biotecnológicas. Tras el aislamiento inicial, se identificaron los aislados mostrando la presencia de cianobacterias y también microalgas. Los géneros identificados son habituales de medios con baja disponibilidad de agua.

Debido a un mejor crecimiento entre todos los aislados, se caracterizaron en el laboratorio cuatro cepas de *Chroococcidiopsis*, que se identificaron con el nombre de *Chroococcidiopsis* sp. Helios. Las diferentes cepas fueron capaces de crecer con concentraciones moderadas de NaCl,

pH neutro y con diversas fuentes de nitrógeno y carbono. En cuanto a su comportamiento, *Chroococcidiopsis* sp. Helios mostró, en general capacidad de formación de biopelículas. Por otra parte, investigamos la tolerancia a la desecación de las cepas Helios y resistencia a exposición a radiación UV-C. Las cepas Helios mostraron ser resistentes a estos estreses, con una capacidad por encima de bacterias y cianobacterias de uso frecuente en el laboratorio.

Finalmente, debido a que muchas bacterias aisladas de ambientes extremos producen metabolitos secundarios con valor biotecnológico como respuesta a estas condiciones, se secuenciaron los genomas de las cuatro *Chroococcidiopsis* sp. aisladas. Mediante el análisis *in silico* se han identificado genes implicados en la síntesis de pigmentos frente a UV, genes relacionados con la producción de trehalosa y el clúster responsable de la fijación de nitrógeno en las distintas *Chroococcidiopsis* sp. Helios. Además, se han encontrado diferentes clústeres para la síntesis de metabolitos secundarios presumiblemente con actividad antimicrobiana y antiinflamatoria.

Capítulo 2. Estudio de protocolos de transformación genética en *Arthrospira platensis* PCC 9108

Se evaluaron diferentes protocolos para la transformación genética de la cianobacteria *Arthrospira platensis* PCC 9108, conocida comúnmente como espirulina, de enorme interés industrial. Se emplearon tanto plásmidos replicativos como casetes de ADN para integrarse en el genoma de la cianobacteria, transformados mediante conjugación con *Agrobacterium tumefaciens*, conjugación triparental con *E. coli* y electroporación. En la transformación con *A. tumefaciens* se emplearon diferentes cepas, mientras que para la conjugación triparental se utilizaron plásmidos con diferentes orígenes de replicación. Además, se han definido las mejores condiciones para la electroporación de esta y se han utilizado metiltransferasas comerciales para tratar de proteger el ADN frente a los sistemas de restricción modificación de esta cianobacteria. No obstante, no se consiguieron transformantes para ninguno de los protocolos ensayados, por lo que son necesarios más estudios para desarrollar protocolos de transformación genética.

Capítulo 3. Desarrollo de herramientas biotecnológicas usando plásmidos pSEVA en cianobacterias.

En este capítulo se evaluó la funcionalidad de los plásmidos SEVA en diferentes géneros de cianobacterias: desde modelos de cepas industriales y de investigación como *Synechocystis* o *Anabaena* hasta extremófilos no modelo como *Chroococcidiopsis*, validando el uso de origen de replicación RSF1010. Posteriormente, estos plásmidos SEVA sirvieron de base para la expresión de *yfp* así como la aplicación de la tecnología CRISPR-Cpf1. Como prueba de concepto del potencial de los vectores pSEVA-Cpf1 creados, se aplicó con éxito en la eliminación del gen *nbla* en *Synechocystis* sp. PCC 6803. Los vectores pSEVA con las herramientas CRISPR mostraron ser de fácil manejo y permitieron la edición de *Synechocystis* sp. PCC 6803 mediante transformación natural, además de conjugación triparental, a diferencia de otros sistemas CRISPR descritos.

Capítulo 4. Desarrollo de herramientas de expresión génica y control de proteínas en *Synechococcus* sp. PCC 11901.

Para incrementar el repertorio de herramientas disponibles en cianobacterias, se desarrollaron plásmidos integrativos y se validaron diferentes promotores constitutivos e inducibles para expresión heteróloga en la cepa de rápido crecimiento *Synechococcus* sp. PCC 11901. Además, se ha diseñado un sistema de degradación inducible y dirigida de proteínas que se ha ensayado y caracterizado empleando la YFP como proteína diana.

4. Conclusión final

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral demuestra el potencial biotecnológico de las cianobacterias, especialmente de ambientes extremos. Las herramientas moleculares desarrolladas y descritas en esta Tesis Doctoral incrementarán el potencial biotecnológico de estos microorganismos.

III. Introducción

1. USO DE CIANOBACTERIAS PARA UNA ECONOMÍA CIRCULAR SOSTENIBLE

El calentamiento global producido por la actividad humana se ha relacionado con impactos climáticos concretos, manifestándose, por ejemplo, en olas de calor más frecuentes en varias zonas del planeta. El dióxido de carbono (CO₂) es el principal gas responsable del efecto invernadero y, en gran medida, el principal contribuyente al calentamiento global. Los niveles de este gas en la atmósfera se han ido incrementando desde la Revolución industrial, alcanzándose niveles significativos hoy en día (Rigobello-Masini y Masini, 2021; Seneviratne *et al.*, 2016). Además, la deforestación masiva en los últimos años ha agravado este problema, pues los árboles actúan como sumideros del CO₂ atmosférico. Por otro lado, la actividad humana actual lleva parejo un incremento en la cantidad de residuos generados, en muchas ocasiones innecesarios, como por ejemplo aquellos que proceden de plásticos de un solo uso. Todo esto tiene su repercusión en el medio ambiente y la calidad de vida, como la desertificación, pérdida de biodiversidad en ambientes terrestres y marinos, problemas de salud asociados a la contaminación del aire/agua o el incremento del nivel del mar, entre otros (Seneviratne *et al.*, 2016; Zandalinas *et al.*, 2021). Dado que esta situación no es viable a largo plazo, existe una necesidad urgente de cambio industrial y de vida en la sociedad actual para evitar el consumo insostenible de recursos, la redundancia de productos, el desperdicio y la contaminación (Morseletto, 2020).

Una de las estrategias que está cogiendo fuerza en los últimos años es el cambio de una economía lineal basada en combustibles fósiles a una economía circular sostenible (Figura I.1) (D'amato y Korhonen, 2021). Una economía circular puede definirse como un modelo económico dirigido al uso eficiente de los recursos a través de la reducción de recursos primarios, la minimización de desechos, la retención de valor a largo plazo, y ciclos cerrados de productos y materiales dentro de los límites de la protección ambiental y los beneficios socioeconómicos (Morseletto, 2020). Una economía de este tipo tiene el potencial de permitir un desarrollo sostenible, desvinculando el crecimiento económico de las consecuencias negativas del uso de recursos y la degradación medioambiental (D'amato y Korhonen, 2021). Así, como se esquematiza en la Figura I.1, la biomasa se cosecha, transforma, consume, desecha y recicla, formando un ciclo que se alimenta de la luz solar.

En este contexto de economía circular, la reducción de los niveles de CO₂ mediante microorganismos es una solución biotecnológica prometedora ya que permite reciclarlo como biomasa. En este sentido, las cianobacterias ya son contribuyentes clave en aplicaciones sostenibles, pues son microorganismos procariotas fotosintéticos que pueden emplearse de diversas formas para reducir el carbono en la atmósfera, convirtiéndolo en productos de valor añadido (Fabris *et al.*, 2020; Rigobello-Masini y Masini, 2021). Por tanto, además del valor medioambiental en términos de reducción de los niveles de CO₂, el uso de cianobacterias presenta distintas aplicaciones de interés biotecnológico. En primer lugar, la biomasa producida como consecuencia del crecimiento cianobacteriano permitiría hacer frente a las crecientes demandas mundiales de alimentos, piensos, biocombustibles y producción química (Gonçalves, 2021). En segundo lugar; la gran diversidad bioquímica de las cianobacterias da lugar a una amplia variedad de productos químicos que son comercialmente valiosos, como lípidos,

polisacáridos, proteínas, pigmentos, vitaminas y antioxidantes, con aplicaciones que van desde la alimentación a la biomedicina o cosmética (Brennan y Owende, 2010; Jones *et al.*, 2021; Norena-Caro y Benton, 2018; Ragusa *et al.*, 2021). Finalmente, se está desarrollando la biotecnología de cianobacterias para otras aplicaciones muy diferentes como el tratamiento de aguas residuales (Sánchez-Bayo *et al.*, 2020; Tsolcha *et al.*, 2021), la regeneración de suelos (Gonçalves, 2021; Rossi *et al.*, 2022) o la posibilidad de su crecimiento en otros planetas (Billi *et al.*, 2021; Rzymiski *et al.*, 2022). Por todas estas razones, la aplicación biotecnológica de cianobacterias es una pieza clave en la implantación de una economía circular.

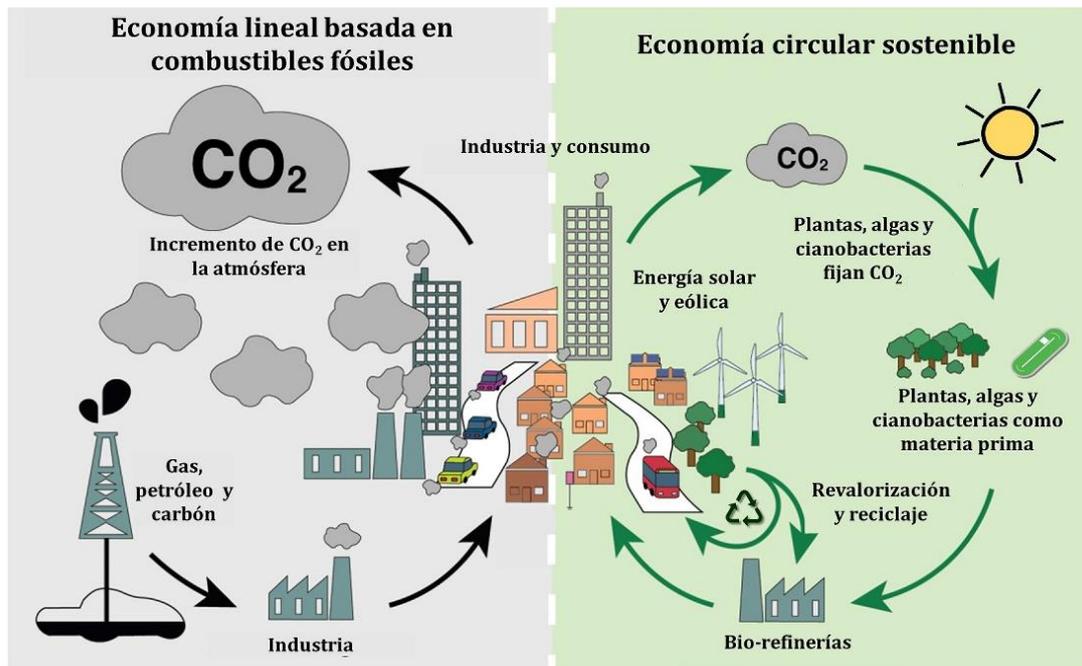


Figura I.1. Economía basada en fósiles vs. Economía circular sostenible. Adaptado de Shabestary, 2020.

2. ASPECTOS GENERALES DE LAS CIANOBACTERIAS

Las cianobacterias son organismos procariotas gram-negativos pertenecientes al dominio Bacteria y constituyen un grupo muy diverso capaz de realizar la fotosíntesis oxigénica (Sánchez-Baracaldo *et al.*, 2022; Whitton, 1992). Presentan clorofila a y ficobilinas como pigmentos fotosintéticos y la organización estructural y bioquímica se corresponde con la de las bacterias gram-negativas, si bien presentan características fotosintéticas similares a algas eucariotas y plantas (Kumar *et al.*, 2019). Morfológicamente, dentro de las cianobacterias existe una gran diversidad, desde especies unicelulares con forma de coco o bacilo, hasta filamentosas, las cuales pueden presentar bastante complejidad con diferentes ramificaciones (Whitton, 1992).

Evolutivamente, las cianobacterias han tenido un papel esencial en el desarrollo de la vida tal como se conoce hoy en día. La fotosíntesis oxigénica se desarrolló hace 2.5 mil millones de años dando lugar a una acumulación de O₂ en la atmósfera y la consecuente evolución de muchos organismos aerobios (Sánchez-Baracaldo *et al.*, 2022). Por otro lado, los cloroplastos descienden de la internalización de una cianobacteria en procesos de endosimbiosis, lo que permitió el desarrollo de la vida vegetal (Whitton y Potts, 2012). Algunas cianobacterias son capaces de realizar fotosíntesis anoxigénica, utilizando el sulfuro como donador de electrones (Cohen *et al.*, 1986), mientras que otras son capaces de fijar nitrógeno atmosférico en ausencia de este compuesto en el medio en condiciones aeróbicas (Norena-Caro y Benton, 2018; Wolk *et al.*, 1994). Todo ello hace que las cianobacterias tengan una función esencial en los ciclos biogeoquímicos (Sánchez-Baracaldo *et al.*, 2022).

En cuanto a su distribución ecológica, las cianobacterias son ubicuas, se pueden encontrar en casi cualquier lugar de la Tierra, pues son capaces de crecer en diversas condiciones ambientales al tolerar un amplio espectro de temperaturas, salinidad, valores de pH y diferentes intensidades de luz, entre otros factores (Evangelista *et al.*, 2008). Se han descrito cianobacterias tanto en sistemas acuáticos como terrestres (Whitton, 2012) e incluso en ambientes extremos como la Antártida (Velichko *et al.*, 2021), fuentes termales (Brenes-Guillen *et al.*, 2021), suelos volcánicos (Gerasimenko *et al.*, 2013), desiertos (Nelson y Garcia-Pichel, 2021) o ambientes con gran contaminación (Bogard *et al.*, 2020). En general, las cianobacterias toleran concentraciones bajas de oxígeno y concentraciones de sulfuro que son tóxicas para algas eucariotas, lo que contribuye a su supervivencia en ambientes anóxicos, como sedimentos acuáticos (Vincent, 2009). Por otro lado, cabe señalar que una inmensa mayoría de las cianobacterias suelen encontrarse en la naturaleza formando grupos de células o biopelículas junto con otros microorganismos, lo que les permite colonizar ambientes en los que no podrían vivir solas (Munoz-Martin *et al.*, 2019; Nelson y Garcia-Pichel, 2021). De hecho, son habituales las relaciones simbióticas entre cianobacterias y otros organismos, como bacterias, hongos, plantas e incluso animales invertebrados (Adams *et al.*, 2012; Mutalipassi *et al.*, 2021).

2.1. Metabolismo y organización celular de las cianobacterias

La estructura celular de las cianobacterias, pese a la diversidad morfológica existente en este filo, es común a todas ellas. En algunos géneros, las células vegetativas pueden diferenciarse, dando lugar a distintos tipos de células especializadas (Whitton, 1992). Las células vegetativas de muchas cianobacterias presentan una estructura uniforme, como se esquematiza en la Figura I.2 (Norena-Caro y Benton, 2018).

La envoltura se compone de una bicapa, similar en estructura y composición a la que presentan las bacterias gram-negativas. La pared celular está formada por una capa exterior rica en lipopolisacárido y una capa interna de peptidoglicano, separada por el periplasma. No obstante, a diferencia de otras bacterias gram-negativas, la capa de peptidoglicano presente en cianobacterias es hasta 5 veces más gruesa, además de presentar diferente composición (Norena-Caro y Benton, 2018). Las cianobacterias también se encuentran rodeadas de vainas o cápsulas, lo que permite la formación de biopelículas por la liberación de polisacáridos

extracelulares (EPS). Estas cápsulas desempeñan un papel protector frente a condiciones ambientales extremas (Derikvand *et al.*, 2017; S. Wu *et al.*, 2021). Por otro lado, en el citoplasma se encuentra el material genético y los componentes del aparato fotosintético que incluye carboxisomas y tilacoides, que ocupan gran parte del citoplasma.

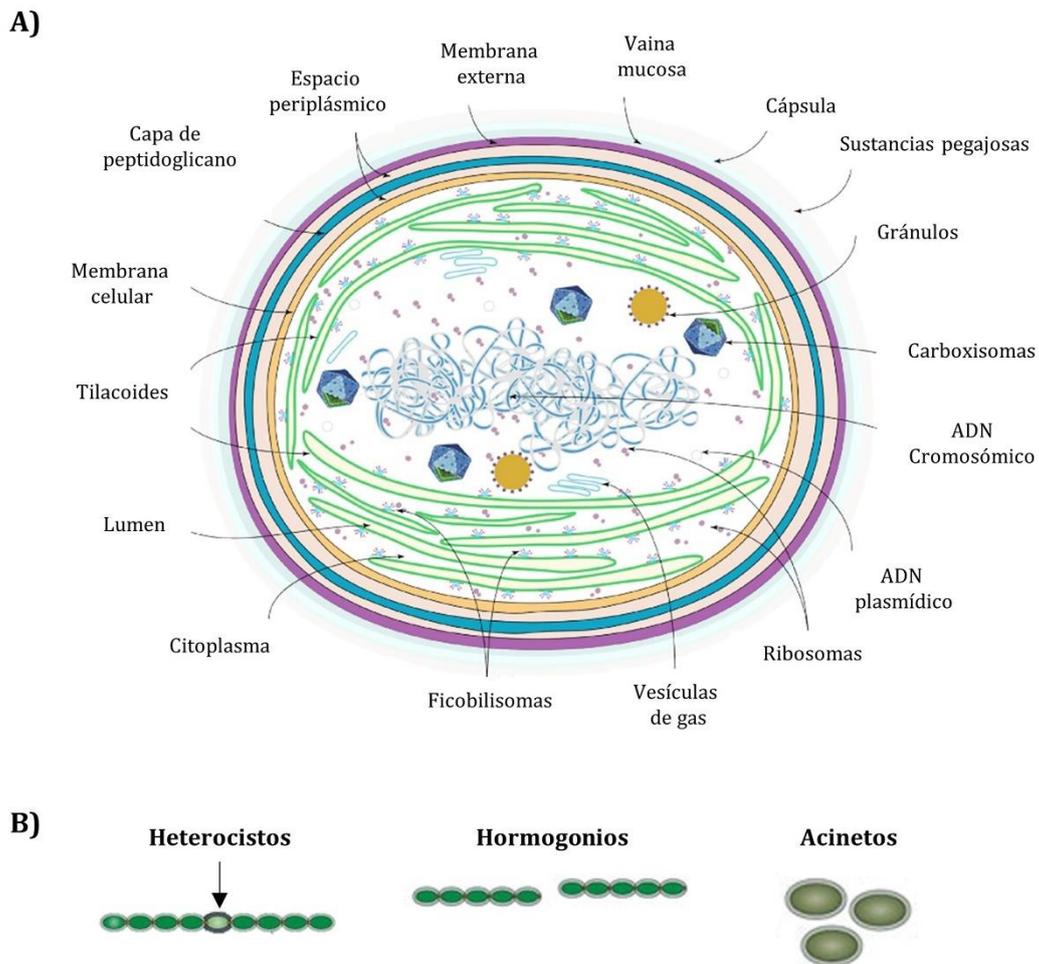


Figura I.2. Organización celular en cianobacterias. A) Representación celular de una cianobacteria unicelular. Imagen adaptada de Noreña-Caro y Benton, 2018. B) Células especializadas en cianobacterias: heterocistos, hormogonios y acinetos. Imagen tomada de Flores y Herrero, 2010.

Como se ha comentado, las cianobacterias realizan la fotosíntesis, un proceso de transporte de electrones en el que la luz se convierte en energía química, y que consta de reacciones en dos fases: lumínica y bioquímica (anteriormente denominada fase oscura). Las reacciones de la fase lumínica de la fotosíntesis se realizan en los tilacoides formados por bicapas lipídicas, situados en la periferia del citoplasma, y que contienen los pigmentos fotosintéticos (ficobilisomas) y las cadenas de transporte de electrones fotosintética y respiratoria. Por otro lado, los carboxisomas se componen de proteínas poliédricas que albergan la enzima RuBisCO y son responsables de la fijación de CO₂ (Whitton, 1992). Las reacciones de la fase bioquímica se producen en el citoplasma. En la fase lumínica, se capturan fotones para oxidar agua y reducir NADP a NADPH, lo que produce O₂ y ADP, que se transforma en ATP. La energía química obtenida en forma de estos compuestos se emplea posteriormente en reacciones de la fase bioquímica (no necesitan luz) para producir diferentes compuestos orgánicos (Norena-Caro y Benton, 2018). Esta fase tiene lugar en el citoplasma. Por otro lado, el citoplasma cianobacteriano también presenta vesículas de gas, que utilizan para realizar movimientos flotantes, y gránulos de polímero que actúan como reservas de almacenamiento (Norena-Caro y Benton, 2018).

El genoma de las cianobacterias consta por lo general de un ADN bicatenario y circular y una pequeña cantidad de plásmidos adicionales, que pueden tener un tamaño de varios cientos de kb. Existen algunas excepciones de cianobacterias, de los géneros *Prochlorococcus* y *Synechococcus*, que no presentan ningún plásmido (Hess, 2011). La adaptación de las cianobacterias a una gran cantidad de nichos ecológicos ha llevado a una diversidad en el tamaño de los genomas de estas (Larsson *et al.*, 2011). Los tamaños de los genomas van de un mínimo de 1.4 Mb, observados en cianobacterias marinas como *Prochlorococcus* spp., hasta un máximo de 9.01 Mb observado en la cianobacteria *Nostoc punctiforme* PCC 73102. Si bien genomas del tamaño de *Prochlorococcus* se considera el tamaño mínimo requerido para un organismo fotosintético, el genoma de *Nostoc punctiforme* PCC 73102 es mucho más complejo. Esto le permite un modo de crecimiento tanto fotoautotrófico como heterótrofo facultativo, además de presentar diversas formas de desarrollo y genes para establecer relaciones simbióticas con hongos y plantas terrestres (Hess, 2011). Otro aspecto variado dentro de las cianobacterias es el número de copias cromosómicas. Si bien algunas son monoploides (una copia), por lo general las cianobacterias presenten varios cromosomas (poliploides) o incluso son cromosomas no equivalentes (oligoploides) (Soppa, 2022). El número de copias cromosómicas varía desde 2-4 como ocurre en algunos *Synechococcus* spp., hasta 200 como puede ocurrir en *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Griese *et al.*, 2011; Zerulla *et al.*, 2016). En esta cianobacteria, además, se ha observado un cambio en el número de cromosomas en función de la fase y las condiciones de crecimiento (Zerulla *et al.*, 2016).

En cuanto a células especializadas, presentes en cianobacterias filamentosas se pueden destacar los heterocistos que son los responsables de la fijación de N₂ y constan de capas de polisacárido que bloquean la difusión de O₂ para prevenir la inactivación de la nitrogenasa. Otras células especializadas son los acinetos, formas esporuladas de resistencia que se diferencian cuando las condiciones ambientales no son las adecuadas, y los hormogonios, cuyas funciones principales son reproducción y dispersión (Figura I.2B) (Whitton, 1992).

2.2. Clasificación de las cianobacterias

Las cianobacterias son un grupo de procariotas muy diverso desde el punto de vista morfológico (Figura I.3). Por mucho tiempo, las cianobacterias fueron consideradas por los botánicos como una de las principales divisiones de las algas, incluidas en la división de algas verde-azuladas o Cyanophyta. No obstante, en la década de los setenta se reconocieron las características bacterianas de este grupo. La clasificación actual de las cianobacterias trata de integrar la información genotípica, fenotípica y filogenética, pues en un primer lugar la clasificación que se tenía solo incluía características morfológicas (Rippka *et al.*, 1979). Con el tiempo, el uso de nuevas tecnologías ha mostrado que numerosos organismos que en el pasado fueron considerados estrechamente relacionados desde el punto de vista filogenético, en realidad no lo son (Boone *et al.*, 2001). No obstante, ciertos órdenes y familias continúan siendo problemáticos y requieren revisiones, por eso la clasificación debe ser re-evaluada y revisada continuamente. En la actualidad, los esquemas de clasificación publicados se han revisado para incluir la información filogenética basada en las secuencias de ARN ribosómico 16S, así como nueva información de otro tipo como ultraestructura, porcentaje de G+C, etc. (Boone *et al.*, 2001; Rippka *et al.*, 1979). Como resultado se distinguen 5 subsecciones (I-V), equivalentes a los órdenes establecidos en la literatura botánica y con gran similitud a la clasificación inicial descrita por Rippka *et al.*, 1979.

Las subsecciones I y II incluyen especies unicelulares que se reproducen por fisión binaria en el primer caso, o por división múltiple en el segundo. En la subsección I se incluyen géneros muy destacados a nivel biotecnológico y ecológico como *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Microcystis* o *Phrochlorococcus*. En la subsección II, se incluye el género *Chroococciopsis*, modelo de cianobacteria extremófila. Las cianobacterias filamentosas y en su mayoría indiferenciadas pertenecientes al orden Oscillatoriales componen la Subsección III. Incluye géneros como *Arthrospira* y *Leptolyngbya*. Las subsecciones IV y V agrupan a los miembros de los órdenes Nostocales y Stigonematales que incluyen cianobacterias filamentosas capaces de diferenciación celular. No obstante, solo las cianobacterias de la subsección V presentan verdadera ramificación y división en más de un plano (Boone *et al.*, 2001; Norena-Caro y Benton, 2018; Rippka *et al.*, 1979; Rippka y Herdman, 1985; Whitton, 1992).

2.3. Cianobacterias de interés biotecnológico

Las características indicadas anteriormente, unido a los escasos requerimientos nutricionales, como luz y CO₂, ilimitados y gratuitos, ha despertado gran interés por aprovechar las capacidades metabólicas de las cianobacterias (Gonçalves, 2021; Kumar *et al.*, 2019). Dentro de la economía circular y la biotecnología, las cianobacterias presentan otras ventajas frente a las plantas, como (i) mayores eficiencias fotosintéticas, (ii) capacidad para crecer en ambientes hostiles, (iii) capacidad de crecer con nutrientes mínimos en tierras no cultivables para plantas y (iv) generación de mutantes relativamente rápida y económica (Gale *et al.*, 2019). Además, como se ha mencionado, los cloroplastos descienden de un proceso de endosimbiosis de una cianobacteria, por lo que ciertas características fisiológicas y bioquímicas de esta se conservan

en los organismos eucariotas fotosintéticos. Esto hace que, las cianobacterias sean microorganismos modelo de estudio de procesos básicos como la fotosíntesis (Cassier-Chauvat y Chauvat, 2018; Dvořák *et al.*, 2017). Por otro lado, como se ha comentado anteriormente, son un excelente chasis para la producción de productos naturales, consecuencia de su metabolismo secundario (Jones *et al.*, 2021; Norena-Caro y Benton, 2018), y también son interesantes en la biorremediación y degradación de compuestos (Gonçalves, 2021).

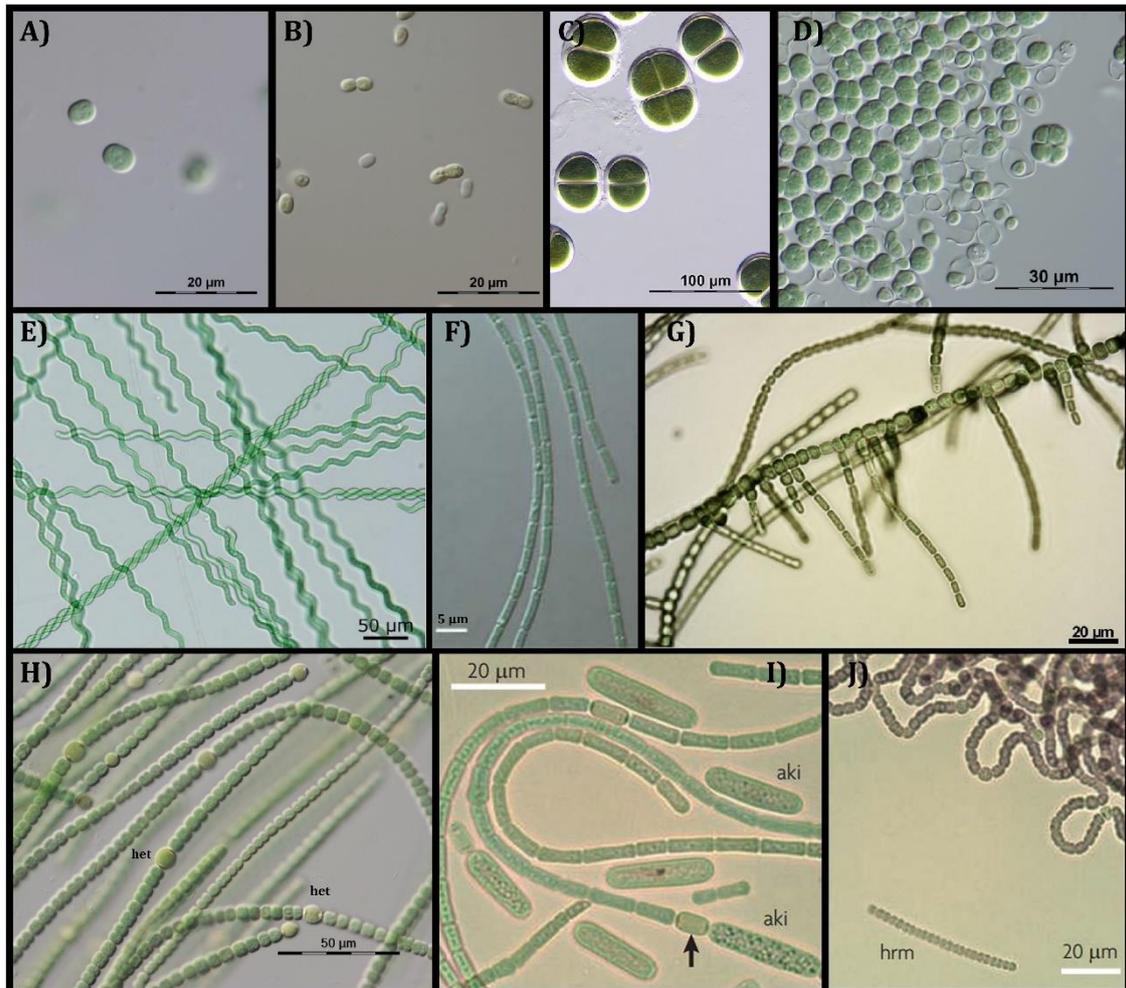


Figura I.3. Diversidad de cianobacterias de distintos géneros. A) *Synechocystis aquatilis* SAG 90.79 (I). **B)** *Synechococcus cedrorum* SAG_88.79 (I). **C)** *Chroococcus turgidus* SAG 36.85 (I). **D)** *Chroococciopsis thermalis* SAG 42.79 (II). **E)** *Arthrospira jenneri* (III) **F)** *Leptolyngbya* sp. BL0902 (III) **G)** *Fischerella thermalis* PCC 7521 (V). **H)** *Anabaena catenula* SAG 1403-1 (IV) **I)** *Anabaena cylindrica* (IV). **J)** *Nostoc* sp. PCC 9203 (IV). Se indica entre paréntesis la subsección a la que pertenece cada cianobacteria. Abreviaturas: het, heterocistos; aki, acinetos; hrm, hormogonios. Imágenes A, B, C, D y H tomadas de "The Culture Collection of Algae at Goettingen University, SAG". E tomada de Nowicka-Krawczyk *et al.*, 2019. F tomada de Taton *et al.*, 2012; G tomada de Koch *et al.*, 2017, I y J tomadas de Flores y Herrero, 2010.

La investigación y posterior uso industrial de cianobacterias se ha centrado en microorganismos cultivables fácilmente en condiciones de laboratorio, susceptibles de ser modificados genéticamente y que puedan criopreservarse a largo plazo. La bioprospección de nuevas especies de cianobacterias en diferentes ambientes lleva consigo la búsqueda de ciertas características deseables, propias de las cianobacterias que actualmente se consideran modelo y que se recogen en la Tabla I.1. Por otra parte, si bien las cianobacterias “no-modelo” pueden tener otros beneficios potenciales, la mayoría presentan desafíos para su uso generalizado o industrial. En los siguientes apartados, se resumen las características de las distintas cepas de cianobacterias, modelo y “no-modelo”, que pueden ser de interés biotecnológico y que se han utilizado en esta Tesis Doctoral.

2.3.1. Cianobacterias modelo de los géneros *Synechocystis* y *Synechococcus*

Si bien las cianobacterias constituyen un filo muy diverso, solo un pequeño número de cepas se usa de manera extendida como modelo, principalmente porque presentan la mayor parte de características recogidas en la Tabla I.1. Por otro lado, desde el punto de vista más industrial, el uso de cianobacterias como chasis de producción busca adicionalmente otros rasgos deseables. Entre estos se encuentran, por ejemplo, que tengan un crecimiento rápido, que cuenten con una tasa mejorada de fotosíntesis y captura de CO₂, y que, si es posible, sean capaces de tolerar alta temperatura, luz y otros estreses abióticos para su crecimiento en biorreactores abiertos (Jaiswal *et al.*, 2022). Tradicionalmente, el mayor desarrollo de estudios y aplicaciones biotecnológicas incluyen las cianobacterias de agua dulce *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Synechococcus elongatus* sp. PCC 7942 y la cianobacteria marina *Synechococcus* sp. PCC 7002 (en adelante, *Synechocystis* 6803, *S. elongatus* 7942, *Synechococcus* 7002) (Vijay *et al.*, 2019). En la Tabla I.2, se incluye un resumen de diferentes cianobacterias de uso a nivel industrial o biotecnológico, con sus tasas de crecimiento y otras características.

Tabla I.1. Características deseables para el cultivo y la ingeniería genética de cepas de cianobacterias.

1) Capacidad para crecer en placas de agar y generar colonias aisladas
2) Posibilidad de incorporación de ADN heterólogo
3) Sensibilidad a antibióticos para la selección después de la captación de ADN
4) Ausencia de endonucleasas nativas que digieran ADN heterólogo. En el caso de que estén presentes, que la entrada de ADN sea posible empleando metilasas, inhibidores de restricción o liposomas.
5) Capacidad para emplear plásmidos autoreplicativos de amplio rango de hospedadores para expresión génica.
6) Capacidad de integración estable en el genoma. Idealmente, las especies deberían ser susceptibles de generar mutantes no marcados, deseable para aplicaciones industriales.

Tabla adaptada de Gale *et al.*, 2019

Synechocystis 6803 y *S. elongatus* 7942 se caracterizan por presentar competencia natural, si bien se han establecido otros métodos de transformación (Tabla I.2). En cuanto a su uso, *S. elongatus* 7942 se utiliza como modelo del ciclo circadiano (Ditty *et al.*, 2003; Taton *et al.*, 2020), mientras que *Synechocystis* 6803 se ha empleado en el estudio de complejos fotosintéticos (Santos-Merino *et al.*, 2019). En cuanto a uso industrial, ambas cianobacterias se han empleado también como chasis para la producción de compuestos de interés industrial, como biocombustibles, vitaminas, azúcares o pigmentos, entre otros (Shabestary *et al.*, 2018; Y. Yu *et al.*, 2013; Yunus *et al.*, 2021, 2022). No obstante, en lo que respecta a crecimiento, ambas cianobacterias presentan tiempos de duplicación de entre 7-24 h (Berla *et al.*, 2013; Santos-Merino *et al.*, 2019). Además, estas cianobacterias modelo son sensibles a altas temperaturas e intensidades de luz, que pueden encontrarse en biorreactores abiertos donde estos factores no se encuentran totalmente controlados (Yu *et al.*, 2013). Todo ello limita su uso en comparación con otros microorganismos heterótrofos.

El uso *Synechococcus* 7002 como chasis elimina algunas de las limitaciones comentadas para las dos cianobacterias anteriores. *Synechococcus* 7002 también presenta competencia natural (Stevens y Porter, 1980) pero exhibe un tiempo de duplicación de 2.6 h (M. Ludwig y Bryant, 2012). Por otro lado, esta cianobacteria tolera altas concentraciones de sal y no requiere agua dulce para su crecimiento, lo que supone una ventaja en el crecimiento con agua de mar o en biorreactores abiertos, donde la concentración de sal puede incrementarse con la evaporación del agua. Además, *Synechococcus* 7002 también tolera altas temperaturas, por encima de 40°C, e intensidad de luz (M. Ludwig y Bryant, 2012; Ruffing *et al.*, 2016). No obstante, en comparación con *Synechocystis* 6803 y *S. elongatus* 7942, la cantidad de herramientas biotecnológicas disponibles es más limitada (Ruffing *et al.*, 2016). A nivel biotecnológico, *Synechococcus* 7002 se ha usado en la producción de biocombustibles, vitaminas y otros compuestos de valor industrial (Gordon *et al.*, 2016; Kachel y Mack, 2020; Ruffing, 2014).

Recientemente se han descrito varias *Synechococcus* spp. con gran potencial biotecnológico e industrial: las cepas de agua dulce *Synechococcus elongatus* UTEX 2973 (Yu *et al.*, 2015) y *Synechococcus elongatus* PCC 11801 (Jaiswal *et al.*, 2018) y, más recientemente, la cianobacteria marina *Synechococcus* sp. PCC 11901 (Włodarczyk *et al.*, 2020) (en adelante, *Synechococcus* UTEX 2973, *Synechococcus* 11801, *Synechococcus* 11901). Estas tres cepas exhiben tiempos de duplicación de 1.5-3.5h, cercanos a otros microorganismos de uso industrial y, además, son tolerantes a alta intensidad de luz ($>500 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y temperatura (38–43°C). Por otro lado, las tres cianobacterias han mostrado ser susceptibles de modificación genética, ya sea mediante conjugación o competencia natural.

III. INTRODUCCIÓN

Tabla I.2. Características relevantes de diversas especies de cianobacterias

Cianobacteria	T ^o óptima de crecimiento	Tiempo de duplicación ¹	Métodos de transformación ²	Herramientas biotecnológicas existentes	Aplicaciones desarrolladas o potenciales
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	30°C	6-12h	C, T, E	Amplios conjuntos de datos de biología de sistemas. Numerosos estudios de promotores, RBS, plásmidos y CRISPR/i	Producción de biocombustibles y otros compuestos de valor industrial
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	38°C	12-24h	C, T, E	Amplios conjuntos de datos de biología de sistemas. Numerosos estudios de promotores, RBS, plásmidos y CRISPR/i	
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	38°C	3.5h	C, T	Amplios conjuntos de datos de biología de sistemas. Numerosos estudios de promotores, RBS, plásmidos y CRISPR/i	
<i>Synechococcus elongatus</i> UTEX 2973	41°C	1.5-1.9h	C, T ³	Varios trabajos de promotores, RBS, plásmidos y CRISPR/i	
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 11801	41°C	2.3h	C, T	Varios trabajos de promotores, RBS, plásmidos y CRISPR/i	
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 11901	38°C	2.1h	T	Un solo trabajo de modificación genética de la cepa	
<i>Arthrospira platensis</i> C1	30°C	>24h	E	Escasez de protocolos de transformación genética, muchos ejemplos de transformación por mutagénesis química y física. Pocos estudios de herramientas biotecnológicas	Producción de biocombustibles, compuestos de interés industrial y alimentario
<i>Chroococcidiopsis thermalis</i>	30°C	>24h	C	Varios conjuntos de datos de biología de sistemas	Estudios de resistencia a desecación e irradiación. Desarrollo de aplicaciones en astrobiología
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	30°C	>24h	C, E	Promotores, RBS, plásmidos y CRISPR/i	Estudios de fijación de nitrógeno y de diferenciación celular
<i>Leptolyngbya</i> sp. BL0902	30°C	~20h	C	Varios trabajos de promotores, RBS, plásmidos	Producción de biocombustibles, compuestos de interés industrial

¹. Condiciones óptimas de luz y temperatura. ². C: conjugación, T: transformación natural, E: Electroporación. ³. En una cepa modificada genéticamente. Referencias: Berla *et al.*, 2013; Elhai *et al.*, 1997; Elhai y Wolk, 1988; Ferreira *et al.*, 2018; Gale *et al.*, 2019; Heidorn *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2010; T. Thiel y Poo, 1989; Wendt *et al.*, 2016, 2022; Włodarczyk *et al.*, 2020; Xia *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2015; Zang *et al.*, 2007.

Los estudios genómicos y proteómicos de estas nuevas cianobacterias descritas muestran una similitud del 99.8% en *Synechococcus* UTEX 2973 y del 83% en *Synechococcus* 11801 con respecto al genoma de *S. elongatus* 7942, pese a las diferencias observadas entre ellas (Santos-Merino *et al.*, 2019). Por ejemplo, los tiempos de duplicación son menores en estas dos nuevas cepas; por otro lado, a diferencia de *Synechococcus* 7942, *Synechococcus* 11801 es capaz de crecer con concentraciones de NaCl de 0.7M (Jaiswal *et al.*, 2018), mientras que *Synechococcus* UTEX 2793 es la única de estas tres que no presenta competencia natural (Yu *et al.*, 2015). Las reducidas diferencias entre *Synechococcus* UTEX 2793 y *S. elongatus* 7942 han permitido identificar a los determinantes genéticos responsables de una menor tasa de crecimiento, obteniéndose una cepa de *S. elongatus* 7942 mutante con un tiempo de duplicación de 2.3h frente a 6.8h del WT (Ungerer *et al.*, 2018). También, la cercanía filogenética entre las tres especies ha facilitado el desarrollo biotecnológico de las dos nuevas cepas descritas, pues *Synechococcus* UTEX 2793 se ha modificado genéticamente para poder ser transformada por competencia natural (Wendt *et al.*, 2022) mientras que los plásmidos empleados en *S. elongatus* 7942 han sido también funcionales en *Synechococcus* 11801 (Jaiswal *et al.*, 2018; Sengupta *et al.*, 2020). Estas dos cianobacterias nuevas descritas ya se han empleado en la producción de diferentes compuestos como succinato, etileno, sacarosa o bioplásticos (Lin *et al.*, 2020; Roh *et al.*, 2021; Sengupta *et al.*, 2020).

En lo que respecta a la cianobacteria *Synechococcus* 11901 se describió en 2020 y hasta la fecha, es una de las cepas de mejor rendimiento descritas, ya que logra una tasa de crecimiento comparable a *Synechococcus* 2973 durante más tiempo. Por otra parte, Włodarczyk *et al.*, 2020 compararon la acumulación de biomasa de esta nueva cepa con *Synechocystis* 6803, *S. elongatus* 7942, *Synechococcus* 7002 y *Synechococcus* UTEX 2973, mostrando que *Synechococcus* 11901 acumula de 2-3 veces más biomasa y alcanza una densidad óptica de 101 tras 10 días de cultivo. Esta cianobacteria es filogenéticamente cercana a *Synechococcus* 7002, lo que puede facilitar el desarrollo de diferentes herramientas biotecnológicas (Begemann *et al.*, 2013; Markley *et al.*, 2015). Actualmente, esta cianobacteria se ha empleado en la producción de ácidos grasos libres (Włodarczyk *et al.*, 2020).

Debido a todas las características comentadas, así como su extendido manejo, la mayor parte de los estudios en ingeniería metabólica y aplicación industrial está centrado en las cepas mencionadas, principalmente las descritas con más antigüedad. Además, como consecuencia de esto, el desarrollo de herramientas biotecnológicas es mayor en estas cianobacterias.

2.3.2. *Arthrospira* sp.

La cianobacteria *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* (conocida coloquialmente como “espirulina”) es una cianobacteria filamentosa no fijadora de nitrógeno, ubicua y que puede adaptarse a ambientes muy diferentes (Figura I.3E) (Sili *et al.*, 2012). Esta cianobacteria tolera altos niveles de alcalinidad y se cultiva en una gran variedad de reactores, tanto cerrados como abiertos. *Arthrospira* spp. puede crecer de manera auxótrofa, heterótrofa o mixta, y es habitual su producción a nivel industrial (Furmaniak *et al.*, 2017).

El motivo de la alta producción de espirulina es su elevado valor biotecnológico e industrial debido a sus diversas aplicaciones potenciales (Lupatini *et al.*, 2017). Parte del potencial de esta cianobacteria radica en su valor nutricional, consecuencia de un alto contenido en proteína, que puede llegar al 70% del peso seco, además de ser fuente de vitaminas, aminoácidos, pigmentos, antioxidantes y ácidos grasos (Kose *et al.*, 2017; Lupatini *et al.*, 2017). En cuanto a ácidos grasos, destaca su composición en ácido gamma linoléico, empleado ampliamente en alimentación animal de peces y ganado, y como aditivo alimentario en humanos (Furmaniak *et al.*, 2017). Por otro lado, entre los antioxidantes, se encuentra el b-caroteno y astaxantina, empleados tanto en alimentación como en el sector farmacéutico (An *et al.*, 2017). No obstante, uno de los productos derivados de la espirulina que mayor importancia tiene es la ficocianina. Este pigmento es parte del complejo de fotosintético y se emplea como colorante en cosmética y alimentación y como aditivo alimentario (Ragusa *et al.*, 2021; Sili *et al.*, 2012). Además, la ficocianina ha mostrado actividad como antioxidante, antitumoral, frente a la inflamación y en la mejora de la inmunidad humana y animal (Q. Liu *et al.*, 2016; H.-L. Wu *et al.*, 2016). Por otra parte, otros compuestos derivados de esta cianobacteria presentan capacidad antiviral, antifúngica o nematicida (Kumar *et al.*, 2019; Ragusa *et al.*, 2021; Sili *et al.*, 2012).

Tal como se ha comentado anteriormente, *A. platensis* es una de las cianobacterias cuyo cultivo está más extendido, lo que lleva a que se emplee a nivel industrial. Así, esta cianobacteria se utiliza ampliamente en la producción de bioetanol e hidrógeno (Aikawa *et al.*, 2012; Ananyev *et al.*, 2008). Por otro lado, también se ha empleado en la limpieza de aguas residuales (Hena *et al.*, 2018), eliminación de metales (Zinicovscaia *et al.*, 2018) o en la producción de PHA (Corrêa y Teixeira, 2021).

Sin embargo, pese a que esta bacteria ha sido utilizada a escala industrial desde hace muchos años, la mejora genética de *Arthrospira* spp. se ve limitada por la escasez de protocolos de transformación genética. Los genomas secuenciados de diversas cepas de *A. platensis*, revelan la presencia de muchos genes considerados barreras importantes para la transformación estable: tal como sistemas de restricción y modificación, intrones de los grupos I y II (ribozimas y retroelementos), elementos de inserción y también CRISPR (Cheevadhanarak *et al.*, 2012; Fujisawa *et al.*, 2010). Si bien existen trabajos en los que se emplea mutagénesis química o física para la obtención de mutantes, se han publicado muy pocos trabajos en los que se haya transformado esta cianobacteria para la sobreexpresión génica. El sistema de transformación más eficiente empleado hasta la fecha utiliza un casete de expresión de transposasa Tn5 para generar integración aleatoria en el genoma de *Arthrospira platensis* C1 (Jeamton *et al.*, 2017). El uso de liposomas y un inhibidor de restricción de tipo I en el ADN empleado en la transformación redujeron la degradación de este, obteniéndose transformantes que fueron estables durante varios meses. Las distintas barreras genéticas y físicas encontradas entre otras en este género se describen en el apartado 3.3. Barreras para la transferencia de ADN exógeno en cianobacterias.

2.3.3. *Chroococcidiopsis* sp.

Los miembros del género *Chroococcidiopsis* son cianobacterias unicelulares que han sido aisladas de diversos hábitats extremos, de desiertos cálidos como el de Atacama en Chile

(Warren-Rhodes *et al.*, 2007) o el Mojave en la parte suroeste de Estados Unidos (Smith *et al.*, 2014) hasta los fríos Valles Secos de la Antártida (Figura I.3D) (Friedmann, 1980). Por otro lado, algunas cepas se han aislado de muestras procedentes de ambientes hipersalinos como el mar o agua salobre (Dor *et al.*, 1991; Dor *et al.*, 1991; Dor *et al.*, 1991), fuentes termales de Indonesia o de biomasa creciendo en rocas porosas (Bothe, 2019; Wierzchos *et al.*, 2006). La mayor parte de las especies del género *Chroococcidiopsis* existen como agregados de células, aunque también se han observado células individuales (Bothe, 2019).

Una característica importante de *Chroococcidiopsis* spp. es su resistencia a la desecación y la radiación (Fagliarone *et al.*, 2017; Singh, 2018; Verseux *et al.*, 2017a). La cepa *Chroococcidiopsis* sp. CCMEE 029, aislada del desierto del Néguev (Israel) fue capaz de crecer tras 4 años en desecación al aire en condiciones de laboratorio (Fagliarone *et al.*, 2017) y las biopelículas secas de esa cepa sobrevivieron a una exposición de 672 días en vacío espacial en la órbita terrestre fuera de la estación espacial internacional (Mosca *et al.*, 2021). Cuando se mantienen en desecación, otras cepas de *Chroococcidiopsis* sp. toleran hasta 24 kGy de rayos gamma (Verseux *et al.*, 2017a) y 1.5×10^3 kJ / m² de flujo UV similar al de Marte (Mosca *et al.*, 2019). La capacidad de sobrevivir en esas duras condiciones ha llevado a que *Chroococcidiopsis* sea un género común en los estudios de astrobiología y a considerarlo un organismo adecuado para la terraformación de Marte (Bothe, 2019).

Los mecanismos de protección que presentan estas cianobacterias son variados. En el caso de la desecación, *Chroococcidiopsis* spp. presentan mecanismos para evitar la fragmentación del genoma y un poder antioxidante fuerte que reduce el daño por estrés oxidativo en ausencia prolongada de agua (Billi, 2009; Fagliarone *et al.*, 2017). En lo que respecta a la radiación, producen compuestos absorbentes como la escitonemina (un pigmento de protección de interés farmacéutico y cosmético) o los EPS para contrarrestar los efectos del daño oxidativo. La producción de pigmentos y metabolitos singulares, como absorbentes de luz UV o antioxidantes, junto con la elevada resistencia a condiciones adversas hace que este género pueda ser particularmente interesante para las industrias farmacológica, cosmética y alimentaria (Assunção *et al.*, 2021; Montero-Lobato *et al.*, 2020). En la búsqueda de enzimas versátiles y la implementación industrial de bioprocesos, las enzimas de extremófilos pueden ser valiosos biocatalizadores que pueden soportar condiciones más extremas. Por ejemplo, el análisis bioinformático del genoma completo de *Chroococcidiopsis thermalis* PCC 7203 ha permitido encontrar y caracterizar un gen que codifica una nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa cuyo producto es termoestable y tolerante a los ácidos (del Arco *et al.*, 2018).

En cuanto a herramientas genéticas, se ha conseguido la transferencia de genes en algunas cepas de *Chroococcidiopsis* sp. mediante conjugación y electroporación y se ha observado que los plásmidos se mantienen en las células hasta 18 meses de desecación (Billi, 2012; Billi *et al.*, 2001). Actualmente, existen pocos genomas secuenciados de *Chroococcidiopsis* spp. El único genoma cerrado depositado en una base de datos hasta el momento es el de *Chroococcidiopsis thermalis* PCC 7203 (NC_019695.1).

2.3.4. Otras cianobacterias

Otros géneros que pueden ser también útiles en biotecnología son *Nostoc* y *Leptolyngbya*. El género *Nostoc* pertenece a la subsección IV y con frecuencia gran parte de los estudios se han centrado en *Anabaena* (*Nostoc*) sp. PCC 7120 (en adelante *Anabaena* 7120) principalmente para el estudio del metabolismo del nitrógeno y la formación de heterocistos (Figura I.3H) (Wolk *et al.*, 1994). Si bien se ha conseguido su modificación genética, su tiempo de duplicación de más de 24 h limita el interés de esta cepa a nivel industrial. No obstante, la capacidad de *Anabaena* 7120 de fijar N₂ se ha empleado para la producción de H₂ (Tamagnini *et al.*, 2002).

Nostoc punctiforme PCC 73102 es otra especie relevante dentro del género *Nostoc* y también ha sido modelo de estudio en cuanto a diferenciación celular y metabolismo del nitrógeno. No obstante, la cantidad de genes asociados a simbiosis que presenta esta cianobacteria ha hecho que se emplee también en el estudio de relaciones con hongos y plantas (Hess, 2011). Además, en diferentes condiciones adversas, incluyendo la exposición a UV, *Nostoc punctiforme* es capaz de producir escitonemina (Derikvand *et al.*, 2017; S. Mishra y Sinha, 2022). También se ha estudiado la producción de hidrógeno en esta cianobacteria.

El género *Nostoc*, ha mostrado ser parcialmente resistente a desecación, en gran medida debido a la presencia de EPS. Es por ello, que se ha utilizado en diferentes estudios genómicos y transcriptómicos relacionados con la falta de agua (Kato *et al.*, 2003; Murik *et al.*, 2017; Shang *et al.*, 2019).

Por otra parte, una cepa del género *Leptolyngbya* (subsección III) ha comenzado a usarse en diferentes trabajos de biología sintética. La cepa *Leptolyngbya* sp. BL0902 (Figura I.3F), aislada en aguas residuales, ha sido transformada genéticamente mediante conjugación, aunque se requirieron dos antibióticos para evitar la aparición de mutantes espontáneos (Taton *et al.*, 2012). Esta cepa ha mostrado ser capaz de tolerar altas concentraciones de NaCl, pH extremo y diferentes condiciones de luz y temperatura. Por otro lado, a escala más industrial, el crecimiento en tanques abiertos es similar a ciertas especies de *Arthrospira*. Además de la transformación, se han caracterizado diferentes herramientas moleculares de expresión génica en esta cepa (Bishé *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2014; Taton *et al.*, 2014) y se ha empleado en la producción de ácidos grasos (Poole *et al.*, 2020).

3. MODIFICACIÓN GENÉTICA DE CIANOBACTERIAS

Existen varias especies de cianobacterias que pueden ser manipuladas genéticamente (Tabla I.2) y la facilidad de modificación genética de algunas de ellas ha permitido eliminar o cambiar genes nativos, así como introducir y expresar genes heterólogos con distintos fines (Gale *et al.*, 2019; Xia *et al.*, 2019).

3.1. Vectores empleados en cianobacterias

Como herramientas de transformación genética, los plásmidos son partes esenciales a la hora de diseñar una estrategia de ingeniería metabólica. Un aspecto importante en cianobacterias que debe considerarse es si el material genético introducido debe integrarse en el genoma mediante un vector integrativo o mantenerse en un plásmido replicativo.

3.1.1. Expresión en el cromosoma

En cuanto a la integración en el genoma, es importante considerar que las cianobacterias, en general, se caracterizan por presentar varias copias del genoma, como se ha comentado anteriormente. Si bien en *S. elongatus* 7942 se dan de 3 a 4 copias, *Synechocystis* 6803 puede presentar hasta 200 (Griese *et al.*, 2011; Zerulla *et al.*, 2016). Este comportamiento afecta directamente a la transformación, pues el ADN puede ser integrado solo en parte de las copias, por lo que para conseguir una completa segregación y que todas las copias presenten la modificación de interés, son necesarios numerosos ciclos de presión selectiva (Heidorn *et al.*, 2011).

Para incluir en el genoma el ADN de interés se emplean vectores integrativos, plásmidos que carecen de la habilidad de replicar en la cianobacteria. En general, estos plásmidos cuentan con el ADN de interés y una resistencia a antibiótico entre dos regiones de homología (300-1000 pb) de la región diana en el genoma (Figura I.4). Tras una doble recombinación, solo la construcción genética y la resistencia a antibiótico queda en el genoma (Xia *et al.*, 2019). En cuanto al sitio de inserción, normalmente los genes heterólogos se integran en regiones conocidas como “sitios neutrales”, lugares en el genoma sin función conocida y cuya modificación genética no tiene un efecto aparente en el fenotipo. Se han descrito y validado sitios neutrales de integración para las cianobacterias de más uso biotecnológico, como *Synechocystis* 6803 (Ng *et al.*, 2015), *Synechococcus* 7002 (Ruffing *et al.*, 2016; M. Wang *et al.*, 2019) o *S. elongatus* PCC 7942 (Kim *et al.*, 2017) (Tabla I.3).

Otra opción para facilitar la integración en el genoma son plásmidos que presentan una transposasa y un transposón. Los transposones son elementos de ADN móviles de amplio rango de huéspedes capaces de insertarse en nuevos sitios y se han utilizado ampliamente en cianobacterias. Un ejemplo de ello es la transformación de *Leptolyngbya* sp. BL0902 (Taton *et al.*, 2012) como punto de partida para obtener transformantes sin necesidad de un plásmido

específico o la creación de mutantes de transposición para el estudio genético de la producción de escitonemina en *N. punctiforme* (A. Mishra *et al.*, 2015) (Tabla I.3).

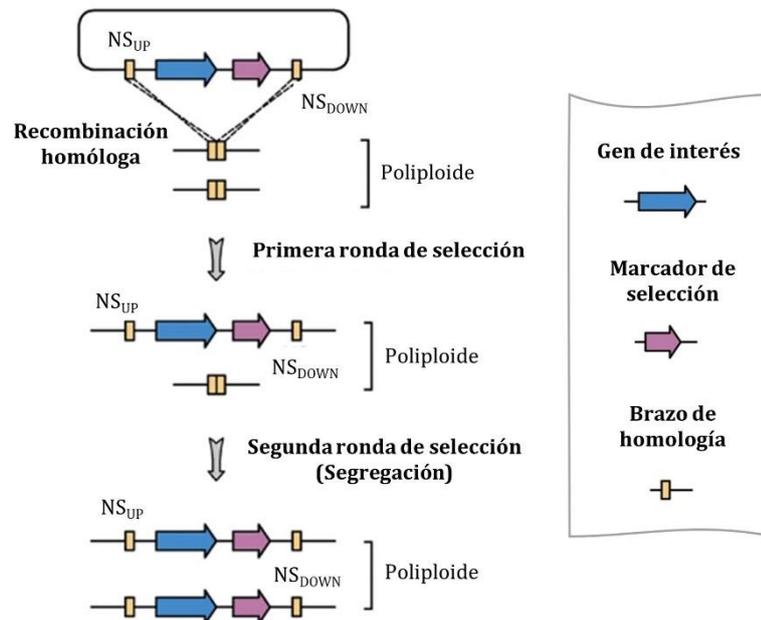


Figura I.4. Esquema de la integración de genes de interés en sitios neutros (NS) para la expresión en cromosoma. El plásmido inicial, que presenta los brazos de homología *upstream* (UP) y *downstream* (DOWN) a la zona de interés, es un diseño general de plásmido integrativo en cianobacterias. Tras una primera recombinación, por lo general, no todas las copias del genoma han sido modificadas. Suele ser necesario una o varias rondas de selección para conseguir la segregación completa. Figura adaptada de Xia *et al.*, 2019.

Las ventajas principales de la expresión en el cromosoma son la estabilidad y que, una vez conseguida la segregación, no es necesaria una presión selectiva continuada para mantener el transgén (Xia *et al.*, 2019). Por otro lado, la expresión también puede ser diferente en función de si el gen de interés se expresa en un plásmido replicativo o bien se ha insertado en el genoma. La expresión suele ser menor cuando el ADN heterólogo se expresa en el cromosoma y normalmente, puede variar con la fase de crecimiento (Ng *et al.*, 2015). No obstante, considerando los cambios en el número de cromosomas, a veces la integración no conlleva una reducción de la expresión (Heidorn *et al.*, 2011).

La integración en el genoma conlleva incorporar una resistencia a antibiótico, que en ocasiones es necesario eliminar tras introducir la modificación genética deseada. La eliminación de la resistencia a antibiótico puede realizarse mediante contraselección, como por ejemplo utilizando el gen *sacB*. Este gen expresa la enzima levansacarasa de *Bacillus subtilis*, que lleva a la producción de productos potencialmente tóxicos a partir de sacarosa. Un plásmido que contiene el gen de interés, un gen de resistencia a antibiótico, y *sacB* se integra primero en el sitio diana por recombinación simple, empleando el antibiótico para la selección. Posteriormente, el marcador y el *sacB* se eliminan en una segunda recombinación, empleando sacarosa para la contraselección, manteniéndose el gen de interés en el genoma (Andersson *et al.*, 2000; Ruffing, 2014). Este problema se ha resuelto en gran medida gracias a la incorporación de CRISPR-Cas como herramienta de edición génica en cianobacterias, que permite modificar

genéticamente los genomas sin dejar marca y que se comentará más adelante (3.4.1. Edición genética mediante CRISPR-Cas).

Tabla I.3. Plásmidos representativos empleados en cianobacterias

, 2011b VECTORES INTEGRATIVOS				
Replicón en <i>E. coli</i>	Integrón	Vectores	Cianobacteria	Referencia
pUC	Integración en sitio neutral (NS) ^a	pNS1, pNS2, pNS3	<i>S. elongatus</i> 7942, <i>Synechococcus</i> 7002	Choi y Woo, 2020; Gordon et al., 2016
pMB1	Integración en plásmido endógeno	pAQ	<i>Synechococcus</i> 7002	Nozzi et al., 2017
RK2	Tn5-1063	pRL1063a	<i>Anabaena</i> 7120	Elhai et al., 1997
pMB1	Tn5-692	pRL692	<i>Leptolyngbya</i> BL0902	Taton et al., 2012
VECTORES REPLICATIVOS				
Replicón en <i>E. coli</i>	Replicón en cianobacteria	Vectores	Cianobacteria	Referencia
RSF1010	RSF1010	pPMQAK1, pSL2680, pFC1, pSEVA, pAM4413	<i>Synechocystis</i> 6803 <i>Anabaena</i> 7120 <i>Synechococcus</i> 2973 <i>Cyanotheca</i> PCC 7425 <i>Leptolyngbya</i> BL0902	Ferreira et al., 2018; Huang et al., 2010; Ungerer y Pakrasi, 2016; Vasudevan et al., 2019
pUC	pCA2.4	pCA-UC118	<i>Synechocystis</i> 6803	Liu y Pakrasi, 2018
RK2	pDU1	pDUCA7	<i>Chroococcidiopsis</i> sp. 029 <i>Chroococcidiopsis</i> sp. 123	Billi, 2012; Billi et al., 2001
pMB1	pDU1	pRL1, pJL3, pRL489	<i>Anabaena</i> 7120 <i>Anabaena</i> 7118 <i>Chroococcidiopsis</i> sp. 029 <i>Chroococcidiopsis</i> sp. 123	Billi, 2012; Billi et al., 2001; Elhai et al., 1997; Lang y Haselkorn, 1991; Reaston et al., 1982
pMB1	pUH24	pSG111, pCB4	<i>Synechococcus</i> 7942	Golden y Sherman, 1984
pMB1	pAQ1	pAQE17	<i>Synechococcus</i> 7002	Lorimier et al., 1987
pMB1	pDC1	pSUN119/202	<i>Nostoc punctiforme</i>	Argueta et al., 2004

a. Los sitios neutrales de integración en el genoma de *S. elongatus* 7942 están definidos: NS1 (Synepcc7942_2497-2498), NS2 (Synepcc7942_0084-0085), NS3 (Synepcc7942_1428-1429). *Synechococcus* 7002 mantiene los mismos NS que *S. elongatus* 7942

3.1.2. Expresión episomal

Si bien la edición del genoma es esencial en algunas circunstancias, los genes también pueden introducirse en cianobacterias en plásmidos autoreplicativos. Puesto que los clonajes se realizan frecuentemente en *E. coli*, es necesario disponer de vectores lanzadera capaces de replicar tanto en *E. coli* como en la cianobacteria escogida. De los plásmidos empleados en cianobacterias existen dos tipos de vectores lanzadera: (1) plásmidos que presentan un replicón de amplio rango que es funcional tanto en cianobacterias como en *E. coli*, y (2) plásmidos quiméricos que presentan un replicón específico de cianobacteria y otro funcional en *E. coli*. En la Tabla I.3, se recoge una lista vectores replicativos empleados en cianobacterias.

Los plásmidos de uso más habitual en cianobacterias presentan el origen RSF1010, que es funcional en *E. coli* y que ha mostrado replicar en diferentes especies (Bishé *et al.*, 2019; Taton *et al.*, 2014; Xia *et al.*, 2019). Por lo general, los plásmidos con este origen presentan genes para una replicación independiente del hospedador (*repA*, *repB*, *repC*). Además, plásmidos como el pPMQAK1 incluyen también el gen de movilización *mobA*. En *Synechocystis* 6803, varios plásmidos pSEVA con este ori se mantuvieron en la cianobacteria en ausencia de antibiótico (Ferreira *et al.*, 2018). Por otro lado, en Higo *et al.*, 2018, incorporaron el gen *sacB* al plásmido replicativo empleado en *Anabaena* 7120 para curar el plásmido más rápido. Recientemente, el ori RK2 de amplio rango ha sido transformado con éxito en *Synechocystis* 6803 pero no en *Synechococcus* UTEX 2973 (Vasudevan *et al.*, 2019). La replicación de plásmidos con este ori requiere de proteínas codificadas en el plásmido (*trfA*, proteína de iniciación de replicación) y otras proteínas del huésped, por lo que su aplicación es más limitada que el ori RSF1010.

Además, existen varios ejemplos de vectores lanzadera de uso en cianobacterias. El plásmido pANS presenta un ori procedente de un plásmido endógeno de *S. elongatus* PCC 7942, al que se le ha añadido un origen de replicación funcional en *E. coli*. Este plásmido ha sido empleado en *Synechocystis* 6803 y *Anabena* 7120. Por otro lado, el ori pDU1 derivado de un plásmido de *Anabaena* sp. PCC 7529, o el plásmido pAQ1 de *Synechococcus* 7002 se han utilizado para obtener plásmidos lanzadera. Los plásmidos con ori pDU1 han sido empleados con éxito en cianobacterias géneros menos comunes como *Chroococcidiopsis* o *Fischerella* (Billi *et al.*, 2001; Stucken *et al.*, 2012) (Tabla I.3).

Los plásmidos replicativos superan la limitación de tiempo de la segregación de cepas y la dificultad de integrar insertos más grandes en el genoma, y la expresión génica a menudo es mayor en los plásmidos que en el cromosoma bacteriano (Hitchcock *et al.*, 2020). Sin embargo, existen otros problemas derivados, como la posible propagación del plásmido, su estabilidad, incompatibilidad con otros plásmidos, posibles modos de transferencia o número de copias.

3.1.3. Sistemas de vectores modulares para ingeniería genética de cianobacterias

En general, la mayor parte de vectores desarrollados para ingeniería genética y metabólica de cianobacterias se diseñaron para una especie concreta. Por esta razón, muchas de estas

herramientas biotecnológicas no son modulares frente a sistemas de vectores basados en el uso de partes estándar (<http://parts.igem.org>) o diferentes módulos de ensamblaje (por ejemplo, *BioBrick*) diseñados para organismos como *E. coli*, *B. subtilis* o levaduras (Santos-Merino *et al.*, 2019). La estandarización de partes biológicas y su ensamblaje es una idea central en biología sintética (Berla *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta que diferentes cepas de cianobacterias generalmente muestran una amplia variación con respecto a la funcionalidad y el rendimiento de diversas partes genéticas, la modularidad aumenta las posibilidades de cambiar y estudiar varias partes (promotores, RBS, etc.) facilitando la estandarización y caracterización de los componentes antes de su uso en ingeniería metabólica.

En los últimos años se han diseñado diferentes sistemas de vectores para trabajar en diferentes cianobacterias y/o para contener una organización modular, Taton *et al.*, 2014, describieron la plataforma CYANO-VECTOR, que incluye una amplia gama de plásmidos compatibles en diferentes cianobacterias (<http://golden.ucsd.edu/CyanoVECTOR/>). La plataforma cuenta tanto con plásmidos replicativos como integrativos y ha sido validada en *Anabaena* 7120, *Synechocystis* 6803, *Leptolyngbya* 7092 y *S. elongatus* 7942, entre otras cianobacterias (Bishé *et al.*, 2019; Taton *et al.*, 2014). Por otro lado, en la misma línea de facilitar los clonajes y la estandarización de partes, también se ha desarrollado un sistema llamado Cyanogate (Figura I.5) (Vasudevan *et al.*, 2019; Vasudevan *et al.*, 2019; Vasudevan *et al.*, 2019) (<https://www.addgene.org/kits/mccormick-cyanogate/>). Este sistema diseñado para cianobacterias se unifica con sistemas de plantas y algas y se basa en la sintaxis Golden Gate MoClo (Modular Cloning), bibliotecas de partes para plantas (Engler y Marillonnet, 2014) y el kit MoClo para la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (Crozet *et al.*, 2018). El kit de Cyanogate cuenta con 96 partes y vectores para la generación de plásmidos replicativos e integrativos para cianobacterias. El ensamblaje de las distintas partes (promotores, marcadores, terminadores, etc.) se basa en el corte con las enzimas de restricción de tipo IIS *BsaI* o *BpiI*. Estas enzimas cortan fuera de su secuencia de reconocimiento, creando extremos de 4 nucleótidos cohesivos con secuencias compatibles (Figura I.5). Puesto que dicha secuencia no forma parte de la región de reconocimiento, se pueden personalizar para dirigir el ensamblaje de fragmentos de ADN. Además, con un diseño adecuado los sitios de reconocimiento no aparezcan en la construcción final, lo que permite un clonaje preciso y sin cicatrices. La plataforma Cyanogate desarrollada en Vasudevan *et al.*, 2019 fue validada en *Synechocystis* 6803 y *Synechococcus* UTEX 2973. Para otras cianobacterias de interés industrial en las que es más frecuente la integración, como *Synechococcus* 7002 y *S. elongatus* PCC 7942, se han diseñado vectores integrativos que llevan las secuencias adecuadas para el clonaje basado en *BioBrick* (Kim *et al.*, 2017; Vogel *et al.*, 2017).

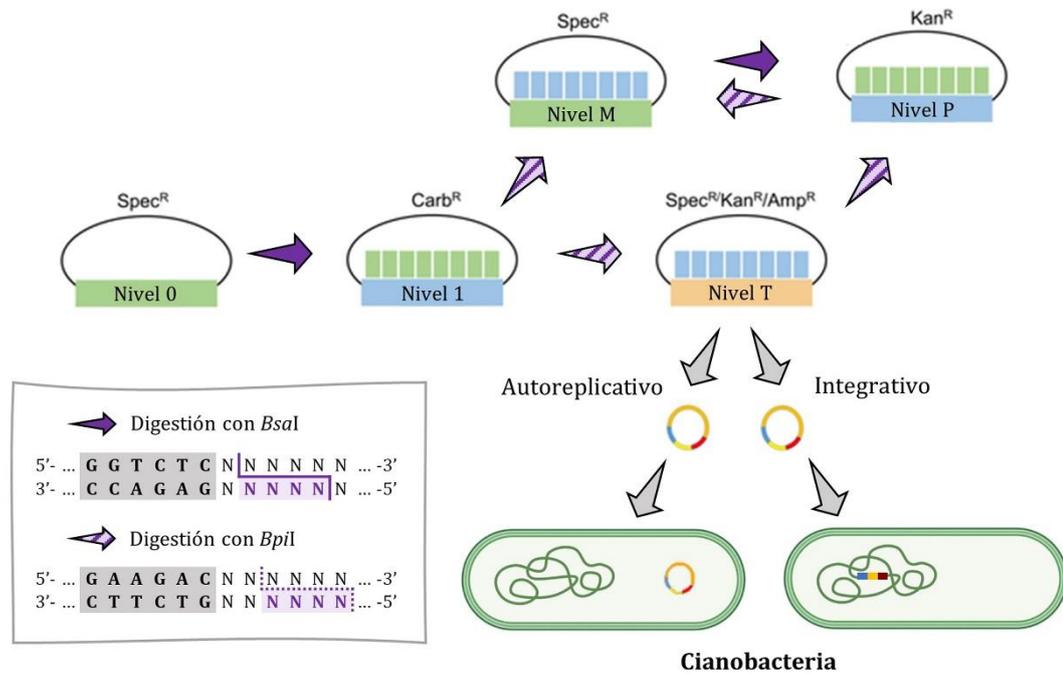


Figura I.5. Sistema Cyanogate. El sistema se basa en el uso de enzimas de restricción de tipo IIS, *BsaI* o *BpiI* (indicado con flechas). Las partes del nivel 0 se ensamblan en vectores de nivel 1. Se pueden llegar a ensamblar hasta 7 módulos en este nivel para dar un vector de transformación en cianobacterias (nivel T). Estos plásmidos pueden ser replicativos o integrativos. Alternativamente, se pueden construir vectores con más módulos ensamblando los módulos del nivel 1 al nivel M, posteriormente con el ensamblaje cíclico entre el nivel M y el nivel P, y finalmente la transferencia del nivel P al nivel T (transformación en la cianobacteria). En la imagen se muestran marcadores de selección de antibióticos para cada nivel. Spec, espectinomomicina; Carb, carbenicilina; Kan, Kanamicina; Amp, Ampicilina. Imagen adaptada de Vasudevan *et al.*, 2019.

Otro repositorio de plásmidos es la plataforma SEVA (Standard European Vector Architecture, <http://seva-plasmids.com/>, Silva-Rocha et al., 2013Silva-Rocha et al., 2013Silva-Rocha et al., 2013al., 2013al., 2013al., 2013). Los plásmidos SEVA están formados tres módulos: un marcador antibiótico, un origen de replicación y un cargo. Estos módulos están separados por tres regiones permanentes: una región de origen de transferencia (*oriT*) y dos terminadores transcripcionales designados como T1 y T0 (Figura I.6) (Silva-Rocha *et al.*, 2013). La base de datos SEVA (SEVA-DB) es un recurso para el ensamblaje físico de plásmidos y para su nomenclatura no ambigua, así como un repositorio de secuencias funcionales y construcciones reales disponibles. Si bien el diseño modular de los pSEVA ha permitido la creación de numerosos plásmidos que se han empleado principalmente en *E. coli* y *P. putida*, cada vez se está extendiendo más su uso a otros microorganismos (García-Gutiérrez *et al.*, 2020; Radeck *et al.*, 2017). Varios plásmidos de esta colección han sido empleados en la cianobacteria *Synechocystis* 6803 para la expresión de genes heterólogos (Ferreira *et al.*, 2018; Vasudevan *et al.*, 2019). Por otro lado, el plásmido pSEVA421 fue modificado para adaptarlo al sistema Cyanogate, mencionado anteriormente, y ha mostrado ser funcional también en *Synechocystis* (Vasudevan *et al.*, 2019).

Pese a la gran cantidad de cianobacterias presentes en diferentes colecciones son pocas en las que se indica la transformación natural. En parte, esto es debido a que la competencia natural, por lo general, no es una función constitutiva (H. H. Huang et al., 2010). Por ello, las condiciones para competencia natural en una especie o cepa pueden no ser las mismas que para otra. Uno de los principales factores que determina la competencia natural es la fase de crecimiento. Así, para *Synechococcus* 7002 y *Synechocystis* 6803, la competencia natural se da en la fase exponencial y se reduce drásticamente en la fase estacionaria (Schirmacher *et al.*, 2020; Zang *et al.*, 2007). La fase de crecimiento es importante para gran parte de las cianobacterias de uso en biotecnología, donde la eficiencia de transformación se reduce o se elimina cuando las células se encuentran en fase estacionaria.

Por otro lado, a pesar de una correlación entre la fase de crecimiento y el nivel de transformabilidad en varias especies, la fase de crecimiento en sí podría no ser el inductor real. Así, factores como la limitación de nutrientes o la detección de quórum que se dan en la fase estacionaria pueden ser el verdadero factor de variabilidad en los niveles de transformabilidad. Otros factores que pueden afectar a la competencia natural, observados en otros microorganismos, son la formación de biopelículas, el daño en el ADN o la presencia de ciertos sustratos (Schirmacher *et al.*, 2020).

Actualmente, la información genómica de cada vez más especies ha permitido establecer ciertas características para encontrar cianobacterias con esta propiedad, si bien son necesarios diversos estudios para encontrar las condiciones para que se dé esta competencia (Nies *et al.*, 2020). Recientemente, el reloj circadiano y la oscuridad han mostrado ser factores que controlan la competencia natural en *Synechococcus* 7942 (Taton *et al.*, 2012). Los cultivos crecidos en un ciclo de luz-oscuridad mostraron la mayor eficiencia de transformación al anoecer, debido a un incremento en la expresión de genes relevantes para la competencia en (Taton *et al.*, 2012). Otro ejemplo destacado de la importancia de conocer el proceso se ha dado en la cepa *Synechococcus* 2973, que ha sido modificada genéticamente para hacerla naturalmente transformable (Wendt *et al.*, 2022).

Finalmente, cabe señalar que la transformación natural favorece la doble recombinación que da como resultado el reemplazo de genes frente a la recombinación simple que permite la integración de un plásmido completo en el genoma, probablemente como resultado de la fragmentación del ADN durante el proceso de transformación (Elhai y Wolk, 1988). De este modo, si se requiere una recombinación simple o la transferencia de un plásmido replicativo, la conjugación o electroporación son métodos de transferencia de ADN más recomendables.

3.2.2. Conjugación

La conjugación es el método empleado con mayor frecuencia en la transformación de cianobacterias, desde unicelulares hasta filamentosas (Tabla I.2) (Gale *et al.*, 2019; Vioque, 2007). Este método se basa en la capacidad de plásmidos conjugativos de *E. coli* de ser transferidos. El ADN que se va a transferir debe presentar un origen de transferencia (*oriT*), lo que permite su movilización. Los genes necesarios para mediar en la transferencia (genes *mob*, de movilización) pueden encontrarse en otros plásmidos, conocidos como plásmidos conjugativos (Heidorn *et al.*, 2011).

En el proceso de conjugación, la cianobacteria se mezcla con dos cepas de *E. coli*, una que presenta los genes necesarios para la movilización de plásmidos y otra que contiene el plásmido de interés, ya sea para integración en el genoma o un plásmido replicativo (Elhai y Wolk, 1988). En ocasiones, esta segunda *E. coli* presenta también un plásmido auxiliar, como el pRL623, que contiene varias metiltransferasas que ayudan a incrementar la eficiencia de transformación en muchas cianobacterias (3.3.1. Sistemas de restricción-modificación). Un esquema detallado del proceso se resume en la Figura I.7.

3.2.3. Otras técnicas de transformación de cianobacterias

En cianobacterias, la electroporación es una alternativa cuando no se puede dar competencia natural (Heidorn *et al.*, 2011). Este método consiste en la transferencia de ADN mediante la permeabilización reversible de las membranas provocada por un pulso eléctrico (T. Thiel y Poo, 1989). Si bien una vez se optimiza, la electroporación puede presentar una eficiencia alta, no es compatible en todas las especies de cianobacterias (Tabla I.2). Por ejemplo, es eficiente en *Synechocystis* 6803 pero no en *Synechococcus* 7942 (Gale *et al.*, 2019). Entre los inconvenientes de esta técnica se encuentra la optimización para la cepa de trabajo, lo que incluye, entre otros, la concentración de ADN empleado, el voltaje o el tiempo de recuperación (A. Ludwig *et al.*, 2008; T. Thiel y Poo, 1989). Además, a diferencia de la conjugación, salvo que se proteja el ADN, este se encuentra expuesto a nucleasas extracelulares (Lin *et al.*, 2019).

Otros métodos empleados con frecuencia en microalgas eucariotas, que se han trasladado en ocasiones a ciertas cianobacterias son la conjugación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* o el bombardeo de ADN. A nivel molecular, la transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens* se basa en la capacidad de esta bacteria de transferir e integrar en el genoma de la planta una región de ADN (conocido como ADN-T) procedente de un plásmido presente en *A. tumefaciens* (Gelvin, 2003). Utilizando este proceso como base, se han desarrollado plásmidos que han permitido la modificación de plantas y otros microorganismos, como microalgas, hongos y células humanas (Lacroix y Citovsky, 2018). La ventaja de este método, al igual que la conjugación con *E. coli*, es que el ADN no se encuentra expuesto a exonucleasas extracelulares. En cianobacterias, esta técnica se ha empleado en la transformación de *A. platensis* UTEX LB 2340 (Dehghani *et al.*, 2018).

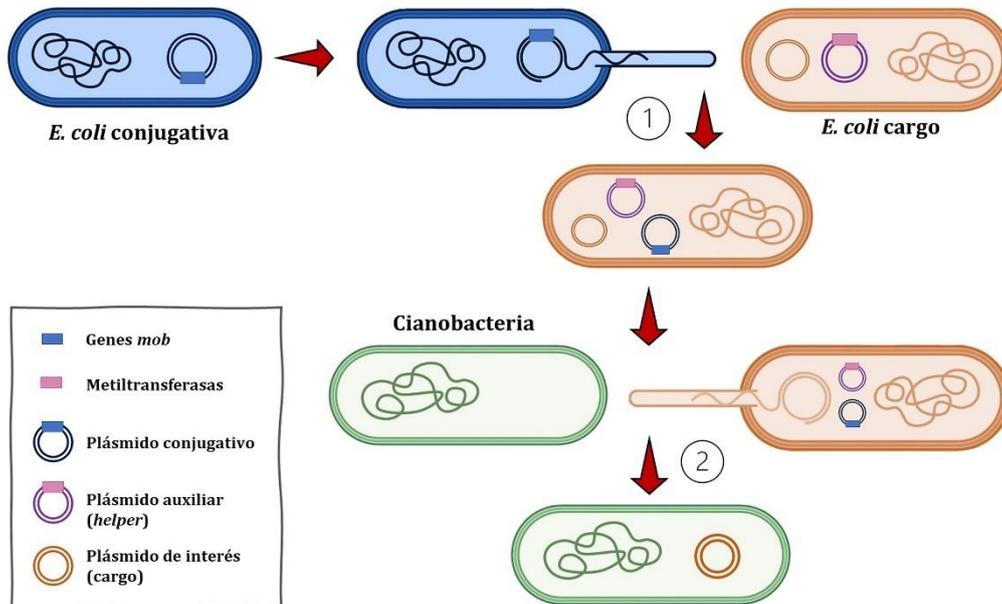


Figura I.7. Esquema del mecanismo de conjugación triparental en cianobacterias. La cepa de *E. coli* cargo presenta dos plásmidos, el plásmido de interés (carga), que se transferirá a la cianobacteria, y un plásmido auxiliar. Este plásmido presenta varias metiltransferasas específicas que actúan sobre el plásmido de interés para evitar o reducir su degradación una vez se transfiera a la cianobacteria. En algunas cianobacterias este plásmido no es esencial durante el proceso de conjugación. El plásmido conjugativo presenta los genes *mob*, que codifican para el aparato necesario para la conjugación. Para el proceso, las dos cepas de *E. coli* y la cianobacteria que quiere transformarse se mezclan. Primero (1), la *E. coli* conjugativa transfiere el plásmido conjugativo a la cepa cargo. Posteriormente (2), el plásmido de interés (metilado si se usa plásmido auxiliar) se conjuga a la cianobacteria receptora.

Por otro lado, el bombardeo de ADN es un sistema que acelera partículas recubiertas de ADN y que se desarrolló originariamente para la transferencia génica en plantas. No obstante, este método también se ha empleado en otros organismos eucariotas, como microalgas (Lin *et al.*, 2019) o cianobacterias (Matsunaga y Takeyama, 1995; Stucken *et al.*, 2012). Con esta técnica, las partículas se proyectan a elevada velocidad, con el fin de cruzar la pared celular. Una vez entran, las partículas se retrasan, dejando el ADN en el interior celular. Esta estrategia se ha empleado en la transformación de una cepa marina de *Synechococcus* (Matsunaga y Takeyama, 1995). Por otro lado, en Stucken *et al.*, 2012Stucken *et al.*, 2012Stucken *et al.*, 2012, se mostró la transformación de cianobacterias filamentosas de los géneros *Fischerella* y *Chlorogloeopsis* mediante biolística (Stucken *et al.*, 2012). Entre las ventajas de este método en cianobacterias filamentosas, los autores señalaron que no se requiere la disgregación celular o la eliminación de *E. coli*, necesarias en electroporación y/o conjugación (Stucken *et al.*, 2012).

3.3. Barreras para la transferencia de ADN exógeno en cianobacterias

Si bien existen diferentes cianobacterias que se han transformado con éxito, una de las principales dificultades en establecer la transferencia genética en ciertos géneros, especialmente cianobacterias filamentosas, es la presencia de varios sistemas de restricción-modificación. Además de estos, existen otras barreras que impiden o dificultan la transferencia genética en ciertas cianobacterias (Stucken *et al.*, 2013) (Figura I.8).

3.3.1. Sistemas de restricción-modificación (R-M)

Los sistemas de restricción-modificación (R-M) son sistemas de inmunidad que atacan el ADN exógeno que entra en la célula y que están presentes en la mayoría de los procariotas (Bernheim y Sorek, 2020; Oliveira, 2016). En cianobacterias, constituyen una barrera genética importante de cara a la transformación genética (Stucken *et al.*, 2013). Por lo general, los sistemas R-M presentan enzimas con dos actividades opuestas: una endonucleasa de restricción que reconoce y corta en una secuencia de ADN específica y una metiltransferasa análoga que confiere protección contra la escisión de la endonucleasa mediante metilación de bases de adenina o citosina dentro de la misma secuencia de reconocimiento. El ADN del hospedador se metila por la metiltransferasa después de la replicación y esta metilación confiere protección frente a la enzima de restricción que son capaces de digerir el ADN no propio, como el de fagos y plásmidos que no cuentan con el patrón de metilación característico de la cianobacteria en los sitios de reconocimiento (Figura I.8) (Bernheim y Sorek, 2020).

Los sistemas R-M se clasifican en cuatro grupos principales (Tipo I, II, III y IV) en función de la composición de las subunidades, la especificidad de reconocimiento, la posición del corte por la endonucleasa y los cofactores necesarios para su funcionamiento (Tock y Dryden, 2005). Los sistemas de tipo II son los más frecuentes en procariotas y son los sistemas que se han estudiado en mayor grado de cara a la transformación genética de cianobacterias. En los sistemas de tipo II, por lo general, la endonucleasa y la metiltransferasa constituyen enzimas diferentes. Además, la secuencia de reconocimiento es la misma para ambas enzimas y el corte por la enzima de restricción se encuentra dentro o adyacente a la región de reconocimiento. Algunos sistemas de tipo II incluyen también un gen regulador, adyacente a los genes codificantes del sistema R-M, cuya función principal es regular la transcripción de la endonucleasa, impidiendo su expresión hasta que los niveles de metilación del genoma sean adecuados (Tock y Dryden, 2005).

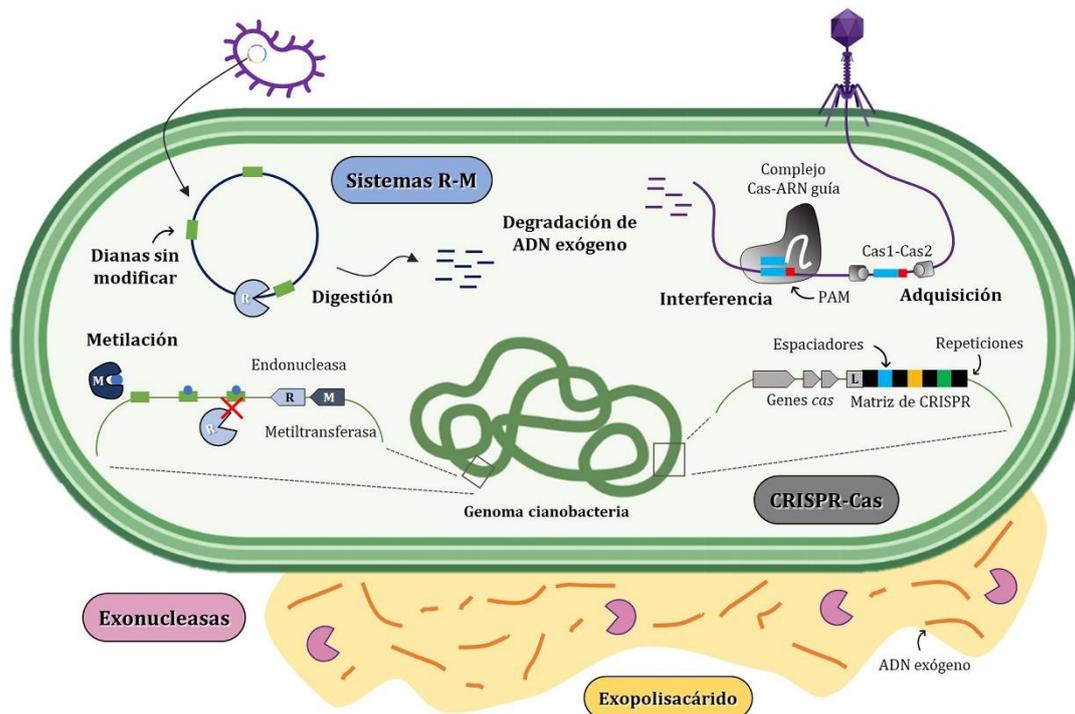


Figura I.8. Barreras físicas y genéticas para transferencia de ADN exógeno en cianobacterias. Los sistemas R-M (Restricción-Modificación) modifican secuencias específicas en motivos en el genoma del hospedador y se degradan las secuencias sin modificar procedentes de ADN extraño. En la figura se esquematizan los sistemas R-M de tipo II (ver texto). Los sistemas CRISPR-Cas funcionan principalmente en dos fases: adaptación, donde un complejo de proteínas Cas permite la adquisición de nuevos espaciadores derivados de bacteriófagos; e interferencia, donde las proteínas Cas forman un complejo con el ARN derivado del espaciador y degradan el ADN exógeno procedente de fagos. Las cianobacterias pueden presentar barreras físicas que dificultan el contacto ADN-célula y célula-célula, como una capa gruesa de EPS (amarillo) y vaina que encierra las células. También hay nucleasas extracelulares (rosa) secretadas por el huésped que se mantienen en la matriz de EPS y degradan el ADN extraño al entrar en contacto. Figura basada en Stucken *et al.*, 2013 y Bernheim y Sorek 2020.

Varios trabajos se han centrado en la presencia y evolución de estos sistemas en cianobacterias de diferentes secciones. En Stucken *et al.*, 2013, buscaron sistemas R-M en el genoma de 141 cepas de cianobacterias mediante predicción computacional. En este análisis, las cianobacterias filamentosas de los géneros *Arthrospira* (*Spirulina*) y *Oscillatoria*, junto con las unicelulares *Cyanothece* y todas las cepas de *Pleurocapsales*, mostraron la mayor cantidad de estos sistemas (Stucken *et al.*, 2013). Tanto *in silico* como *in vitro*, también se han estudiado estos sistemas de defensa en cepas de *Arthrospira* (Fujisawa *et al.*, 2010; Scharnagl *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2016). Estos trabajos dan una idea de las barreras genéticas presentes en este género, causa de la falta de protocolos efectivos para su transformación genética (Furmaniak *et al.*, 2017).

El análisis computacional e *in vitro* de los sistemas R-M y de los patrones de metilación de todo el genoma (metiloma) de las cepas de trabajo puede ayudar a mejorar los protocolos de transformación genética, así como entender su implicación fisiológica. En Elhai *et al.*, 1997, detectaron la presencia de tres enzimas de restricción en el genoma de *Anabaena* 7120 que impedían su transformación genética. La metilación del ADN a transferir con las metiltransferasas correspondientes permitió obtener transformantes (Elhai *et al.*, 1997). Por otro lado, el estudio del metiloma de *Synechocystis* 6803 ha permitido identificar metiltransferasas activas y estudiar su papel en el metabolismo de la cianobacteria, más allá de ser un sistema de defensa (Hagemann *et al.*, 2018; D. Wu *et al.*, 2020; Hagemann *et al.*, 2018; D. Wu *et al.*, 2020; Hagemann *et al.*, 2018; D. Wu *et al.*, 2020).

3.3.2. CRISPR-Cas y otras barreras presentes en cianobacterias

Los sistemas de modificación de restricción constituyen la barrera genética principal en la transformación de algunas cianobacterias, pero no es la única (Figura I.8). Otra barrera genética importante son los sistemas CRISPR-Cas (Stucken *et al.*, 2013). Los sistemas CRISPR-Cas consisten en Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente interespaciadas (del inglés, *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats* CRISPR) junto genes que codifican para proteínas asociadas a CRISPR (del inglés, *CRISPR-associated*, Cas). Estos sistemas se encuentran en la mayoría de los genomas bacterianos y consisten en un sistema inmunitario adaptativo en procariontes guiado por ARN frente a ácidos nucleicos invasivos, como plásmidos y virus (Swarts y Jinek, 2018).

3.3.2.1. Funcionamiento de los sistemas CRISPR-Cas

Los loci CRISPR-Cas funcionales comprenden: (i) un conjunto de repeticiones idénticas intercaladas con secuencias diferentes llamadas espaciadores, las cuales proceden de ADN invasores y (ii) un operón de genes *cas*, que codifican para las proteínas involucradas en el funcionamiento de este sistema de defensa (Figura I.8). Los sistemas CRISPR-Cas actúan en un proceso de tres etapas: adquisición, expresión e interferencia (Perez Rojo *et al.*, 2018). Brevemente, el sistema de defensa CRISPR-Cas funciona incorporando secuencias no propias del hospedador (espaciadores). Estas secuencias se transcriben formando el pre-ARcrN (precursor del ARN de CRISPR), que es procesado en pequeños ARN no codificantes (ARNcr, de CRISPR ARN) que, en conjunto con las proteínas Cas, llevan a la unión y degradación de material genético exógeno si presenta una secuencia semejante o igual a la del ARN pequeño transcrito (Bhaya *et al.*, 2011). Para evitar que el sistema CRISPR del hospedador reconozca los espaciadores de su genoma, las proteínas Cas reconocen secuencias cortas presentes en el ADN invasor y ausentes en el sistema CRISPR, conocidas como regiones PAM (Figura I.8 y Figura I.9A).

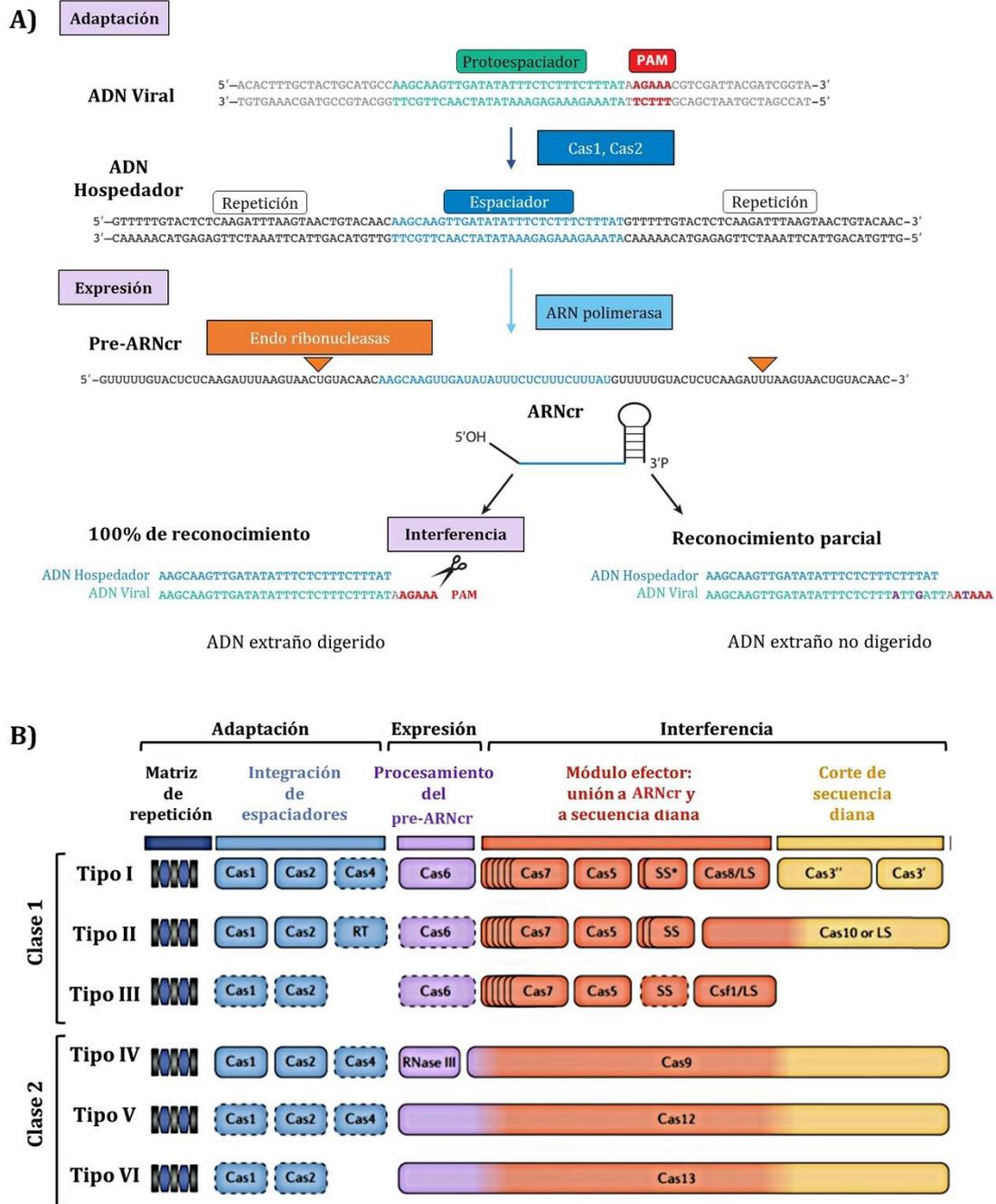


Figura I.9. Funcionamiento de los sistemas CRISPR-Cas. **A)** Detalle a nivel de secuencia de los diferentes pasos del funcionamiento de CRISPR-Cas como sistema de defensa. Se muestra la formación del pre-ARNcr y su procesamiento a ARNcr. Imagen modificada de Bhaya *et al.*, 2011. **B)** Tipos y componentes básicos funcionales de los sistemas CRISPR-Cas. El esquema representa la relación entre la organización genética y funcional de los seis tipos de sistemas CRISPR-Cas. Los sistemas de Clase 1 tienen módulos efectores compuestos por múltiples proteínas Cas, mientras que los sistemas de clase 2 tienen una sola Cas de unión a ARNcr multidominio. El asterisco en la subunidad pequeña (SS) indica que podría fusionarse con la subunidad grande en varios subtipos de tipo I. Los genes prescindibles se indican mediante una línea discontinua. Modificado de Makarova *et al.*, 2019.

En base a estudios de secuencia, filogenia, organización de loci y funcionamiento, se distinguen varios tipos de sistemas CRISPR, agrupados en dos clases (Perez Rojo *et al.*, 2018) (Figura I.9B). La principal diferencia entre las clases es cómo se componen los módulos efectores. En la Clase I, el efector está compuesto por un complejo formado por varias proteínas con diferentes funciones, mientras que en la Clase II, el efector está asociado con una única proteína de múltiples dominios (Perez Rojo *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta el módulo de integración (paso de adaptación), las proteínas involucradas en este proceso son Cas1 y Cas2, que integran un protoespaciador viral en el genoma bacteriano/arquea, y su función permanece conservada en todas las clases (Koonin y Makarova, 2019). Debido a que los sistemas de clase II se caracterizan por tener una única proteína que funciona como módulo efector, se han utilizado para el desarrollo de CRISPR-Cas como herramienta biotecnológica (ver 3.4.1. Edición mediante sistemas CRISPR-Cas y 4.2. CRISPRi). Si bien los sistemas de tipo II y V actúan frente a ADN, los de tipo VI actúan frente a ARN (Koonin y Makarova, 2019).

3.3.2.2. Presencia de CRISPR-Cas en cianobacterias

Diversos estudios han mostrado la presencia de sistemas CRISPR-Cas ampliamente distribuidos en los genomas de cianobacterias, incluyendo aquellas sujetas a una mayor infección por fagos (Cai *et al.*, 2013; Hou *et al.*, 2019; Stucken *et al.*, 2013). En Cai *et al.*, 2013, analizaron la presencia de estos sistemas en los genomas de 126 cianobacterias y encontraron una mayor presencia de estos en las secciones III y IV, que incluyen cianobacterias filamentosas de los géneros *Arthrospira* y *Anabaena*, entre otros. Si bien estos trabajos se han centrado en el análisis *in silico* de CRISPR-Cas en genomas de cianobacterias, otros se han centrado en estudiar sistemas activos, como en la cianobacteria *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120 (Hein *et al.*, 2013; Hou *et al.*, 2019; Scholz *et al.*, 2013). La presencia de estos sistemas permite la adaptación rápida a la entrada de ADN exógeno, incorporando este y adquiriendo inmunidad frente a nuevas infecciones (Marraffini, 2015). Pero a su vez, también constituyen una barrera frente a la transformación genética de algunas cepas pues también pueden identificar y degradar plásmidos exógenos (Marraffini y Sontheimer, 2008; Stucken *et al.*, 2013).

3.3.3. Otras barreras presentes en cianobacterias y estrategias para evitarlas

Otras barreras, además de las genéticas, deben tenerse en cuenta en el establecimiento de sistemas de transferencia génica en nuevas cianobacterias. Las barreras físicas incluyen la presencia de nucleasas inespecíficas extracelulares y la producción de exopolisacáridos, lo cual lleva a la degradación del ADN exógeno o bien dificulta su entrada en la célula (Figura I.8).

Existen diversas estrategias para incrementar la eficiencia de transformación evitando las barreras genéticas y físicas en cianobacterias. La estrategia más empleada es la metilación del ADN a transferir para evitar su degradación por enzimas de restricción endógenas (Stucken *et al.*, 2013; B. Wang *et al.*, 2015). En concreto, en la transformación de cianobacterias se ha extendido el uso de plásmidos auxiliares con metiltransferasas (Figura I.7), como el plásmido pRL623 que presenta las metiltransferasas *AvaI*, *AvaII*, and *AvaIII* de *Anabaena* 7120 y que ha

mostrado incrementar la eficiencia de transformación e incluso la integración del ADN no solo en esta cianobacteria, sino también en otras de diferentes géneros Billi *et al.*, 2001; Elhai *et al.*, 1997; Stucken *et al.*, 2012; B. Wang *et al.*, 2015). Este resultado puede ser debido a que la enzima de restricción *AvaI* se distribuye ampliamente en los genomas cianobacterianos (Stucken *et al.*, 2013).

Otra estrategia frente a la degradación por nucleasas, principalmente exonucleasas, es el empleo de sistemas de transferencia como la conjugación, en los cuales el ADN no queda expuesto directamente. Cuando se ha utilizado transformación natural o electroporación, se han empleado inhibidores de sistemas de R-M de tipo I, como la proteína fágica Ocr (Zavilgelsky *et al.*, 2009), y de inhibidores de ADNasas como el EDTA (Almeida *et al.*, 2017) o se ha encapsulado en liposomas para reducir su degradación (Jeamton *et al.*, 2017). Por otro lado, incluir en el protocolo de transformación procedimientos como la sonicación o lavados con NaCl ha mostrado reducir la presencia de polisacáridos y mejorar la eficiencia de transformación (Stucken *et al.*, 2012). Finalmente, si bien no se ha descrito su uso en cianobacterias, se han identificado proteínas procedentes de fagos conocidas como anti-CRISPR y que bloquean el funcionamiento de estos sistemas (Pawluk *et al.*, 2018).

3.4. Edición genética en cianobacterias

En los apartados anteriores se han indicado los vectores (Apartado 3.1) y métodos de transferencia de ADN (Apartado 3.2) empleados con frecuencia en la modificación genética de cianobacterias. Gran parte de las cianobacterias se ha modificado mediante la introducción de plásmidos replicativos, como se recoge en la Tabla I.3, que pueden expresar un gen de interés. En otros casos, se han diseñado plásmidos con brazos de homología para delecionar ciertos genes o integrar otros. El descubrimiento de los sistemas de defensa CRISPR permitió el desarrollo de estos como herramienta biotecnológica, que se ha aplicado ampliamente en la edición génica de microorganismos, incluyendo cianobacterias, como se detalla a continuación.

3.4.1. Edición génica mediante sistemas CRISPR-Cas

El uso de CRISPR-Cas como herramienta de modificación genética se basa principalmente en los sistemas CRISPR-Cas de tipo II con la Cas9 y de tipo V con la Cas12a/Cpf1 (Figura I.9A). Como se ha indicado anteriormente, estas proteínas actúan junto con un ARNcr y escanean secuencias de ADN. La presencia de la región PAM y la secuencia complementaria al ARNcr permiten la ruptura de la doble cadena del ADN diana (Figura I.9A).

A nivel biotecnológico, la Cas9 o la Cas12a se ha expresado en el genoma o bien en un plásmido replicativo en la cianobacteria de trabajo. Para dirigir la Cas a una región de interés, se diseña un ARN guía sintético (ARNgs, diseñado en el laboratorio) que se corresponde con ARNcr del sistema natural. Debido a la naturaleza de los sistemas CRISPR-Cas, la secuencia diana debe tener una región PAM reconocida por la Cas empleada mientras que el ARNgs diseñado no. La expresión en la cianobacteria de la Cas junto con el ARNgs da lugar al complejo ARNgs:Cas que

escanea el ADN presente en la cianobacteria hasta encontrar la secuencia diana, que se corresponde con la secuencia complementaria al ARNg y que presenta la región PAM específica para la Cas empleada (Figura I.10).

Tras el reconocimiento, la Cas produce una ruptura de doble cadena en la región diana. Debido a las diferencias existentes entre los sistemas de tipo II y tipo V, su funcionamiento es distinto y debe tenerse en cuenta en el diseño de los elementos necesarios para la modificación genética (Figura I.10A). En primer lugar, la región PAM difiere entre ambas, por ejemplo, es rica en G (5'-NGG-3') para la Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, y rica en T (5'-TTN-3') para la Cas12a de *Francisella novicida* (Swarts y Jinek, 2018; Ungerer y Pakrasi, 2016). En segundo lugar, el procesamiento del ARNg es diferente, mientras que en el sistema de CRISPR-Cas12a no es necesario ningún elemento más para el procesamiento del ARNg, sí que se necesita para CRISPR-Cas9. En estos sistemas participa el ARNtracr (ARN codificado en *trans*) que interviene en la formación del complejo final de ARNg:Cas9 (Bhaya *et al.*, 2011). En ocasiones, para simplificar este proceso, el ARNg se diseña incluyéndose la secuencia que formaría la horquilla de unión a la Cas9 tras el procesamiento (Swarts y Jinek, 2018). Una tercera diferencia es el corte, mientras que la Cas9 genera un corte en las dos hebras en el mismo punto, en la Cas12a produce un corte escalonado de 5 nucleótidos. Por otro lado, para la Cas9 el corte se produce a 3 pares de bases *upstream* de la región PAM, mientras que en la Cas12a se produce 19 pares de bases *downstream* de la región PAM (Figura I.10A).

El corte introducido por la Cas es letal salvo que actúen mecanismos de reparación del ADN, como la reparación no homóloga, que introduciría mutaciones puntuales en el genoma, o la recombinación homóloga si hay un molde de reparación adecuado. Teniendo esto en cuenta, para introducir los cambios de interés se utiliza un molde de reparación, que permite añadir, quitar o alterar la secuencia diana. La generación de diversos tipos de mutantes mediante CRISPR-Cas12a se muestra en Figura I.10B. Para evitar que el sistema CRISPR empleado actúe continuamente, el molde empleado para la reparación debe eliminar la región PAM de la secuencia diana.

El uso de la tecnología CRISPR ha mejorado la edición genética de cianobacterias y si bien no es estrictamente necesario su uso para la modificación genética, aporta ciertas ventajas (Behler *et al.*, 2018; Vijay *et al.*, 2019). Permite obtener mutantes sin tener que incluir un agente de selección en el genoma, evitando tener que recurrir a otras estrategias para eliminar por ejemplo una resistencia a antibiótico. Por otro lado, debido al diseño de los CRISPR array puede emplearse frente a más de una secuencia diana (multiplexación). Además, permite reducir el tiempo necesario para la segregación completa en los cambios introducidos en el genoma, pues el sistema CRISPR va a estar funcionando hasta que se elimine la región PAM de la secuencia diana. Esta herramienta se ha empleado en la introducción de mutaciones puntuales, generación de mutantes de delección e inserción en diversas cianobacterias, incluyendo *Synechocystis* 6803 (Xiao *et al.*, 2018), *Synechococcus* 2973 (Ungerer y Pakrasi, 2016; Wendt *et al.*, 2016), y *Anabaena* 7120 (Niu *et al.*, 2019; Ungerer y Pakrasi, 2016).

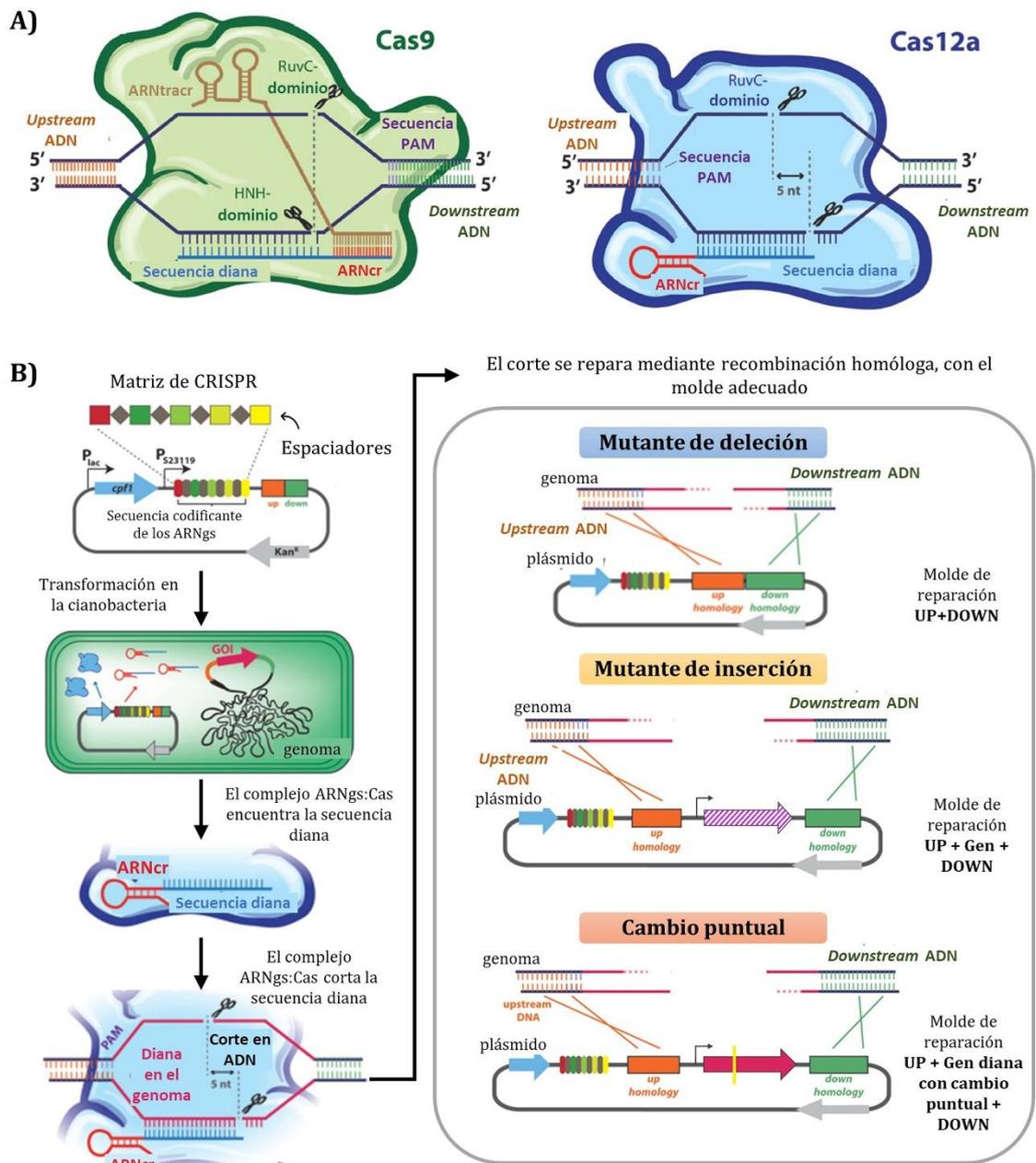


Figura I.10. CRISPR-Cas como herramienta biotecnológica de edición génica. A) Mecanismo de corte de Cas9 y Cas12a. **B)** Funcionamiento de CRISPR-Cas12a como herramienta de edición génica. Se muestran esquemas de plásmidos para generar mutantes de deleción, de inserción o cambios puntuales. Figura adaptada de Santos-Merino *et al.*, 2019.

No obstante, el uso de CRISPR-Cas para edición genética se encuentra en constante desarrollo, pues existen algunos problemas que son necesarios superar. La Cas9 ha mostrado ser tóxica en bacterias, incluyendo cianobacterias como *Synechococcus* 2973 (Wendt *et al.*, 2016). Para evitar esto, se ha empleado alternativamente la Cas12a, que no ha mostrado dichos problemas (Swarts y Jinek, 2018; Ungerer y Pakrasi, 2016). Por otro lado, la identificación de posibles secuencias no diana (*off-target*) es necesario en el uso de estas herramientas, pues pueden conducir a la malinterpretación de fenotipos (Behler *et al.*, 2018; Santos-Merino *et al.*, 2019). Por último, con el fin de obtener cambios sin marca es necesario poder eliminar (curar) el plásmido utilizado en la modificación genética. Este paso, dependiendo del plásmido, puede incrementar el tiempo necesario para la edición mediada por CRISPR-Cas (Behler *et al.*, 2018).

4. CONTROL DE LA EXPRESIÓN EN CIANOBACTERIAS

Las herramientas biotecnológicas y de biología sintética adaptadas al control de la expresión y bien caracterizadas en cianobacterias puede facilitar la expresión óptima de genes heterólogos o rutas metabólicas de interés. En comparación con microorganismos como *E. coli*, *P. putida* o *S. cerevisiae*, el número de herramientas de biología sintética en cianobacterias es aún limitado. Dado el interés biotecnológico de las mismas, en los últimos años se han realizado numerosos estudios para adaptar técnicas moleculares de otros organismos a las cianobacterias y así disponer de un mayor número herramientas biotecnológicas, con el fin de facilitar el control de la expresión (Santos-Merino *et al.*, 2019). En los siguientes apartados se explican algunas de las herramientas de biología sintética utilizadas en cianobacterias para el control de la expresión, tanto a nivel de transcripción como de proteínas.

4.1. Promotores y RBS

Los promotores son herramientas clave en biología sintética y aunque cada vez son más los promotores disponibles, los estudios de estas herramientas en cianobacterias son bastante inferiores a otros microorganismos de uso industrial. Además, gran parte de los promotores descritos para otras gran-negativas, como *E. coli*, no siempre funcionan adecuadamente en cianobacterias, o requieren ciertas modificaciones (Santos-Merino *et al.*, 2019). En general, los promotores pueden clasificarse comúnmente en dos grupos según sus diferencias funcionales, incluyendo promotores constitutivos y promotores inducibles (Tabla I.4) (Heidorn *et al.*, 2011).

Los promotores constitutivos se emplean para conseguir una expresión estable y continua de los genes diana, donde el control de la expresión no es necesario (F. Wang *et al.*, 2020). En cianobacterias, por lo general, los promotores empleados han sido de origen natural como PcpCB y PpsbA2, lo que en ocasiones puede dar problemas de interferencia o estar sujeto a otro tipo de control, como el ciclo circadiano (Englund *et al.*, 2016; Santos-Merino *et al.*, 2019; Taton *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2014). Para evitar este problema, se han desarrollado y validado diferentes promotores sintéticos, incluyendo versiones modificadas y mejoradas de promotores de origen cianobacteriano (Vasudevan *et al.*, 2019). Recientemente, se han construido variantes del

promotor P_{cpcB} (ficocianina) en *Synechocystis* 6803 and *Synechococcus* 7002, mostrando niveles de expresión entre moderados y altos (Vasudevan *et al.*, 2019; F. Wang *et al.*, 2020).

Por otra parte, los promotores inducibles son especialmente cruciales en biología sintética controlar de la expresión de genes implicados en rutas metabólicas de interés, especialmente en aquellas que pueden generar estrés celular o compuestos nocivos para el huésped. En general, cada vez son más los estudios de promotores inducibles en diferentes cianobacterias, si bien no siempre los promotores inducibles mantienen el mismo comportamiento entre especies (Tabla I.4). Aunque los promotores inducibles por IPTG han sido hasta ahora los más utilizados, actualmente se han desarrollado otros tipos de promotores adaptados a cianobacterias. En H.-H. Huang y Lindblad, 2013 se desarrolló una colección de promotores regulados por tetraciclina que han mostrado ser funcionales en *S. elongatus* 7942 (Kim *et al.*, 2017), *Synechococcus* 7002 (Gordon *et al.*, 2016) y *Synechocystis* 6803 (Yao *et al.*, 2016). No obstante, la fotosensibilidad de este inductor ha hecho necesario la búsqueda de otros promotores, como los inducibles azúcares como ramnosa, empleado en *Synechocystis* 6803 (Behle *et al.*, 2020; Kelly *et al.*, 2018) o por arabinosa, empleado en *Synechococcus* 7942 (Cao *et al.*, 2017). Por lo general, algunos de los factores limitantes en el desarrollo de promotores inducibles en cianobacterias han sido la toxicidad de los inductores, la falta de control estricto (sin inductor) de la expresión o la fotosensibilidad del inductor (Santos-Merino *et al.*, 2019).

Tabla I.4. Promotores relevantes caracterizados en cianobacterias

Promotor		Cianobacteria	Referencia
Constitutivo			
Nativo	nrsB	<i>Synechocystis</i> 6803	Englund <i>et al.</i> , 2016
	Cpc560	<i>Synechocystis</i> 6803	Vasudevan <i>et al.</i> , 2019; Zhou <i>et al.</i> , 2014
	psbA2 ^a	<i>Synechocystis</i> 6803	Englund <i>et al.</i> , 2016
Sintético	cpt	<i>Synechococcus</i> 7002	Markley <i>et al.</i> , 2015
	J23119	<i>Synechocystis</i> 6803, <i>Synechococcus</i> 2973	Vasudevan <i>et al.</i> , 2019
Inducible			
Sintético	trc	IPTG ^b	<i>Synechocystis</i> 6803, <i>Synechococcus</i> 7002 H. H. Huang <i>et al.</i> , 2010; Markley <i>et al.</i> , 2015H.
	BAD	Arabinosa ^b	<i>Synechocystis</i> 6803, <i>Synechococcus</i> 7942 Cao <i>et al.</i> , 2017; Immethun y Moon, 2018
	rhaBAD	Ramnosa ^b	<i>Synechocystis</i> 6803 Behle <i>et al.</i> , 2020; Kelly <i>et al.</i> , 2018
	rhaRWS	Ramnosa, teofilina ^b	<i>Synechococcus</i> 7002 Liu <i>et al.</i> , 2020
	PL03, L22	Tetraciclina ^b	<i>Synechocystis</i> 6803 H.-H. Huang y Lindblad, 2013
	VanCC	Vanilato ^b	<i>Synechocystis</i> 6803 Behle <i>et al.</i> , 2020

^a Activo en luz. ^b Molécula inductora del promotor inducible

Además del promotor, el sitio de unión a ribosoma (RBS) también controla la tasa de producción de proteína a partir de un ARNm. La posición y secuencia de un RBS dado influye significativamente en la eficiencia de la traducción (Santos-Merino et al., 2019; Santos-Merino et al., 2019). Diversos trabajos han caracterizado la expresión de genes reporteros empleando pequeñas colecciones de RBS tanto nativos como sintéticos en *Synechocystis* 6803 (Englund et al., 2016; D. Liu y Pakrasi, 2018). No obstante, si bien para otros microorganismos existen librerías de RBS, estas son más limitadas en cianobacterias. En este sentido, las herramientas bioinformáticas que actúan como “calculadores de RBS” (https://salislab.net/software/design_rbs_calculator) pueden contribuir al desarrollo de nuevos RBS. Actualmente, existen cada vez más trabajos en los que se emplean estas herramientas en el diseño de RBS sintéticos adaptados a la expresión de genes concretos en cianobacterias. Estos trabajos se han validado en cianobacterias de interés industrial como *Synechococcus* 7002 (Markley et al., 2015), *Synechocystis* 6803 (K. Thiel et al., 2018), o *S. elongatus* 7942 (Taton et al., 2014). No obstante, K. Thiel et al., 2018, han observado diferencias en la eficiencia de traducción entre el resultado predicho por calculadores de RBS y el resultado experimental en *Synechocystis* 6803. Asimismo, también mostraron que el gen reportero empleado afecta a la eficiencia de traducción para un mismo RBS. Todo ello muestra que, aunque el diseño de RBS puede ayudar en mejorar la expresión génica, la validación experimental es necesaria para cada caso.

4.2. CRISPRi

Otra de las herramientas que se ha desarrollado en los últimos años y que permite controlar la expresión génica a nivel de transcripción es la técnica de CRISPRi. Varios trabajos demostraron que la proteína Cas9 puede desactivarse enzimáticamente (dCas9) con mutaciones en los dominios RuvC-like (D10A) y HNH (H840A) nucleasa haciendo que la proteína tenga la capacidad de dirigirse y unirse a secuencias específicas de ADN, pero sin la actividad para cortarlo (Qi et al., 2013). Por tanto, la dCas9 puede unirse al ADN guiada por el ARNg pero no genera un corte en la doble cadena de ADN, convirtiéndose en un impedimento estérico para el inicio o la elongación de la transcripción (Figura I.11) (Larson et al., 2013; Qi et al., 2013). Esta herramienta fue validada primero en *E. coli* y más adelante en otras bacterias, incluyendo cianobacterias. Actualmente, también se ha desarrollado la versión inactivada de la Cas12a, indicada como dCas12a/dCpf1 (Meliawati et al., 2021). Una de las características relevantes observada con el CRISPRi es la posibilidad de reprimir varios genes al mismo tiempo empleando diferentes ARNGs (multiplexación). Por otro lado, en cuanto a expresión, a diferencia del sistema CRISPR, se busca la represión condicional, por lo que normalmente la dCas9 y el ARNg se expresan con promotores inducibles

En cianobacterias, el CRISPRi utilizando dCas9 fue empleado por primera vez en 2015 en *Synechocystis* 6803, mostrándose la capacidad de reprimir varios genes al mismo tiempo (Yao et al., 2016). Desde entonces, su uso se ha extendido a otras cianobacterias de uso biotecnológico como *Synechococcus* 7942 (Choi y Woo, 2020), *Synechococcus* 7002 (Gordon et al., 2016), *Synechococcus* UTEX 2973 (Knoet et al., 2019), *Synechococcus* 11801 (Sengupta et al., 2020) y

Anabaena 7120 (Higo *et al.*, 2018). Por otra parte, la herramienta CRISPRi, más allá del estudio de la función génica, se ha empleado para incrementar la producción de compuestos de valor industrial, al modificar el flujo metabólico hacia las rutas biosintéticas de interés mediante la represión de genes específicos. Así, CRISPRi se ha aplicado en la represión de genes que codifican para enzimas específicas que competían con el flujo metabólico para la producción de 1-butanol en *Synechocystis* 6803 (Shabestary *et al.*, 2018). En esta misma cianobacteria, CRISPRi se ha utilizado en todo el genoma para identificar mutantes potenciales con fenotipos industriales mejorados (Shabestary *et al.*, 2021; Yao *et al.*, 2020). La supresión de genes mediada por CRISPRi también se ha utilizado para redirigir el flujo de carbono celular y producir L-lactato en *Synechococcus* 7002, obteniéndose el doble de este compuesto (Gordon *et al.*, 2016). Por otro lado, mediante el diseño apropiado de ARNg, otros trabajos han utilizado CRISPRi multiplexado y han logrado reprimir varios genes al mismo tiempo para aumentar la producción de succinato en *S. elongatus* 7942 (C. H. Huang *et al.*, 2016) o ácidos grasos en *Synechocystis* 6803 (Kaczmarzyk *et al.*, 2018). Pese al éxito en varias cianobacterias, cabe señalar que, debido a la limitación de promotores inducibles robustos y estrictos en estos microorganismos, la mayor parte de los trabajos mencionados requirió comprobar diferentes promotores inducibles para las dCas y el ARNg.

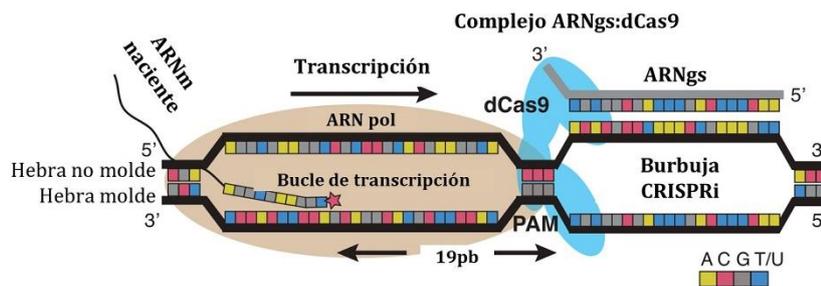


Figura I.11. CRISPRi como herramienta biotecnológica de represión transcripcional. Mecanismo propuesto de funcionamiento de CRISPRi basado en el bloqueo por impedimento estérico entre la ARN polimerasa y el complejo dCas9:ARNgs. Figura adaptada de Qi *et al.*, 2013.

4.3. Módulos basados en estructura de ARN

Los ribointerruptores (*riboswitches*) son elementos de regulación versátiles basados en ARN ampliamente distribuidos en bacterias, arqueas y eucariotas (Bastet *et al.*, 2011). El análisis computacional de estos elementos el conjunto de genomas secuenciados, así como su caracterización experimental han revelado su papel en regulación a niveles de la transcripción, traducción y procesamiento del ARN (Bastet *et al.*, 2011; Etzel y Mörl, 2017; Nudler y Mironov, 2004). Los ribointerruptores se localizan en la región no codificante de determinados ARNm y cambian su conformación con el reconocimiento de un ligando, produciendo cambios en la expresión génica (Etzel y Mörl, 2017). Por estas razones, los ribointerruptores se utilizan como herramientas biotecnológicas para el control de la expresión génica mediante la manipulación de la estructura secundaria del ARNm (Santos-Merino *et al.*, 2019; Xia *et al.*, 2019).

Si se comparan con los promotores inducibles, los ribointerruptores no requieren factores proteicos adicionales como la ARN polimerasa y pueden reconocer sus ligandos con alta especificidad cambiando su conformación. Esto hace que no dependan de factores específicos del hospedador para su regulación. El uso de ribointerruptores en el control de la expresión génica en cianobacterias ha crecido en los últimos años (Ma *et al.*, 2014; F. Wang *et al.*, 2020). Si bien estas estructuras pueden emplearse en controlar la transcripción mediante la formación de terminadores, en cianobacterias se han empleado esencialmente en el control de la traducción (Figura I.12). Dependiendo del diseño, los ribointerruptores pueden activar o reprimir la expresión del gen de interés vía traducción tras la adición del ligando (Figura I.12).

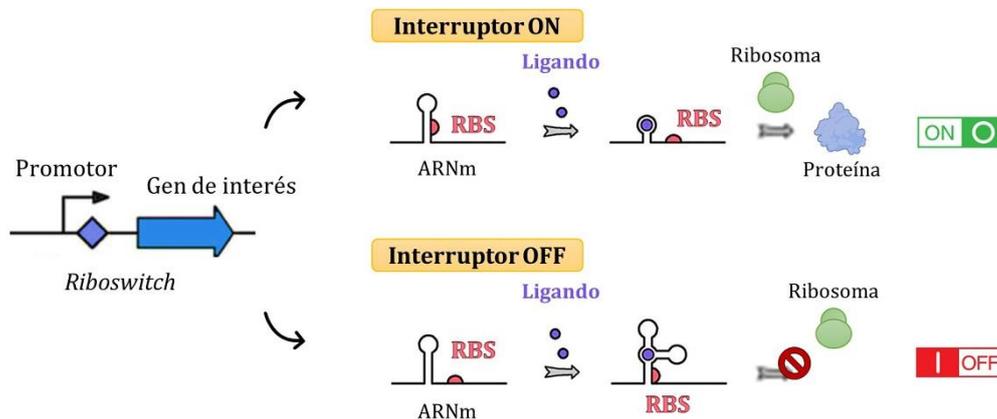


Figura I.12. Esquema de ribointerruptores ON y OFF para el control de la traducción. El promotor empleado en la expresión del gen de interés presenta un ribointerruptor que es reconocido por un ligando determinado. En los interruptores ON, la unión del ligando genera un cambio conformacional que expone el RBS, permitiendo la traducción. En los interruptores OFF, el reconocimiento del ligando esconde el RBS en una estructura secundaria que impide la unión del ribosoma, provocando el bloqueo de la traducción del gen de interés. Figura modificada de Xia *et al.*, 2019.

Varios trabajos han caracterizado ribointerruptores inducibles por teofilina para controlar la traducción de genes reporteros en cianobacterias como *S. elongatus* 7942, *Synechocystis* 6803, *Leptolyngbya* BL0902, *Anabaena* 7120, y *Synechocystis* sp. cepa WHSyn (Ma *et al.*, 2014; Svoboda *et al.*, 2021). Más recientemente, en *Anabaena* 7120, un ribointerruptor se añadió al promotor P_{L03} inducible por tetraciclina (Tabla I.4.) para controlar la expresión del sistema CRISPRi (Higo *et al.*, 2018). Asimismo, un ribointerruptor sensible a la teofilina se añadió al promotor P_{thaBAD} inducido por ramnosa (Tabla I.4.) para inducir la expresión del sistema CRISPRi en *Synechocystis* 6803 (Liu *et al.*, 2020). Estos diseños muestran que el uso combinado de promotores inducibles y ribointerruptores puede proporcionar un nuevo enfoque en el diseño de herramientas para ajustar la expresión del gen de interés.

4.4. Regulación post-traducciona

En cianobacterias, al igual que otros microorganismos de interés industrial, la mayoría de las herramientas de biología sintética se han desarrollado para controlar la expresión génica a nivel

transcripcional. Un ejemplo es el sistema CRISPRi comentado en el apartado anterior y aplicado en varios microorganismos biotecnológicamente relevantes. Sin embargo, cuando la proteína es estable, se necesita tiempo hasta que se puede observar el efecto de la represión transcripcional (Shabestary *et al.*, 2018). Curiosamente, la mayoría de las herramientas actualmente disponibles ponen su objetivo en modular la actividad de las proteínas y los ARNm diana o bien las tasas de síntesis de proteínas, mientras que el control condicional y dinámico de los niveles de proteínas *in vivo* ha recibido menos atención. Por tanto, el desarrollo de herramientas de biología sintética que permitan controlar la abundancia de proteínas de una manera espacio-temporal, es necesario y más especialmente dentro de la biotecnología de cianobacterias, que cuentan con crecimientos más lentos que *E. coli* o levaduras. También estas herramientas pueden ser útiles en algunas estrategias de ingeniería metabólica, cuando se desea un cambio rápido en el metabolismo para impulsar la producción de un compuesto.

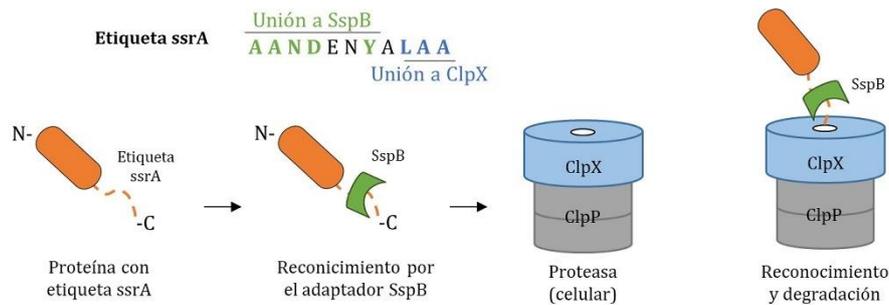
Las proteínas bacterianas se dirigen a los sistemas de proteólisis cuando se encuentran “marcadas” por degrones, unas secuencias de péptidos a menudo ubicadas en el extremo N- o C-terminal de la proteína cuya función es la de regular su tasa de degradación de manera específica (Figura I.13) (Izert *et al.*, 2021; Kahne y Darwin, 2021; Stein *et al.*, 2016). En *E. coli* y bacterias gram-negativas relacionadas, la degradación se produce a través del sistema de ARN mensajero de transferencia (ARN_{tm}) que utiliza la fusión C-terminal del péptido *ssrA* para dirigir las proteínas a las proteasas celulares para una rápida degradación. Esta secuencia es reconocida por las proteasas endógenas ClpXP (proteasoma), que rápidamente degradan la proteína diana (Figura I.13A). En bacterias, otra señal de degradación se une al extremo N-terminal de las proteínas diana y determina su vida media. Los N-degrones promueven directamente la degradación de proteínas mediante el reconocimiento por el adaptador ClpS, que dirige la proteína al complejo de proteasa ClpAP (Figura I.13B). La secuencia de aminoácidos del degrón y la estabilidad varían en función de la bacteria (Stein *et al.*, 2016). Por otro lado, un mecanismo proteolítico diferente se encuentra en las poliproteínas virales, donde las cadenas polipeptídicas se escinden en proteínas individuales funcionales en un proceso mediado por proteasas que actúan en secuencias de aminoácidos específicas.

Si bien existen trabajos donde se han empleado variantes de la etiqueta *ssrA* de *E. coli* para alterar la tasa de degradación de proteínas, la presencia de estas las etiquetas no proporciona un control inducible de la degradación. Por otra parte, el aislamiento y caracterización de los componentes del proteasoma bacteriano, así como de proteasas y sus secuencias de reconocimiento ha permitido desarrollar herramientas de biología sintética que controlan la degradación de proteínas combinando etiquetas o degrones y proteasas que actúan de manera ortogonal, es decir, sin que haya interferencia entre el sistema natural y sintético (de Lorenzo, 2014; Izert *et al.*, 2021).

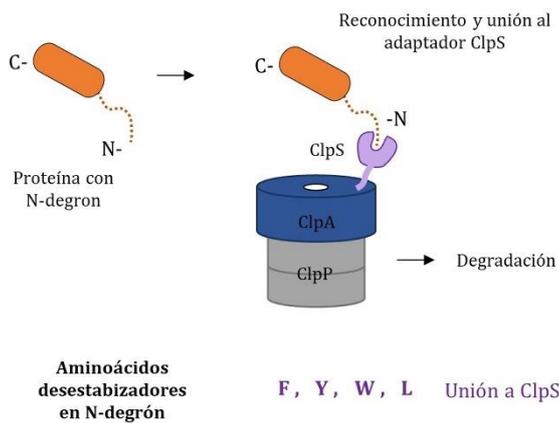
En Durante-Rodríguez *et al.*, 2018, combinaron el uso de la proteasa N1a y la etiqueta *ssrA* para controlar la degradación de proteínas en *E. coli* en una herramienta denominada sistema FENIX. En dicho sistema trabajo, la etiqueta *ssrA* se localiza después de la secuencia de reconocimiento de la proteasa N1a, en el C-terminal. Cuando se induce la proteasa, la etiqueta *ssrA* se escinde de la proteína, lo que permite su acumulación en la célula (Figura I.13C) (Durante-Rodríguez *et al.*, 2018). Por otro lado, también en *E. coli*, varios autores mostraron el

uso de la proteasa TEV y N-degrones de manera similar al sistema FENIX con el fin de controlar la acumulación de proteínas (Fernández-Rodríguez y Voigt, 2016; Martínez *et al.*, 2017). En Martínez *et al.*, 2017, la inducción de la proteasa TEV hace que el N-degrón se desproteja y quede expuesto en el N-terminal, dirigiendo la proteína hacia su degradación. Finalmente, la proteasa Lon procedente del sistema de degradación de *Mesoplasma florum* (*mf-lon*) también ha sido empleada para el control de proteínas en *E. coli* y *Lactococcus lactis* (Cameron y Collins, 2014).

A) Vías C-Degrón de degradación de proteínas



B) Vías N-Degrón de degradación de proteínas



C) Sistema FENIX

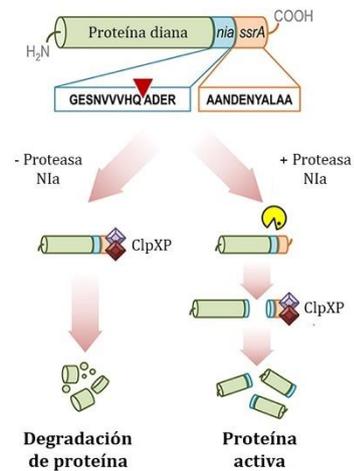


Figura I.13. Vías de degradación de proteínas en bacterias. A) Vía de degradación basada en etiqueta ssrA en C-terminal. La presencia de la etiqueta ssrA en el extremo C-terminal permite el reconocimiento de la proteína por el adaptador SspB, que dirige la proteína a degradación mediante el complejo proteasa ClpXP. Se muestra la secuencia de la etiqueta ssrA y los aminoácidos relacionados con el reconocimiento por los componentes celulares. Figura adaptada de McGinness *et al.*, 2006. **B)** Vía de degradación basada en etiqueta degrón en N-terminal. La presencia de determinados aminoácidos en el extremo N-terminal permite el reconocimiento de la proteína por el adaptador ClpS, que dirige la proteína a degradación mediante el complejo proteasa ClpAP. Se indican los aminoácidos que han mostrado desestabilizar la proteína cuando se encuentran en el N-terminal para *Synechococcus* 7942. Figura adaptada de Stein *et al.*, 2016. **C)** Sistema FENIX para la degradación dirigida y controlada de proteínas diana. El gen que codifica la proteína diana presenta una etiqueta híbrida sintética Nla/ssrA. La etiqueta ssrA es directamente reconocida por la proteasa ClpXP de la bacteria, degradando así la proteína. Cuando se expresa la proteasa Nla proteasa (el sitio de reconocimiento se indica con un triángulo rojo invertido), la etiqueta ssrA se libera y la proteína diana no se degrada. Figura adaptada de Durante-Rodríguez *et al.*, 2018.

5. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LAS CIANOBACTERIAS

Una de las características más relevantes del uso biotecnológico de cianobacterias es que los requisitos para su crecimiento son simples y baratos. Esta condición unida al conocimiento del genoma de multitud de cepas, y en varios casos, la posibilidad de manipularlas genéticamente ha permitido su uso en diferentes aplicaciones en el contexto de una economía circular. Si bien a lo largo de la introducción se han mencionado algunos ejemplos, en este apartado se describen brevemente varias aplicaciones de las cianobacterias a nivel biotecnológico o industrial (Figura I.14).

5.1. Alimentación, cosmética y farmacia

El uso de cianobacterias en alimentación tanto humana y animales es una de las aplicaciones cada vez más extendidas de este tipo de microorganismos (Furmaniak *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2019; Zahra *et al.*, 2020). Muchas especies de *Anabaena*, *Nostoc*, *Arthrospira*, *Aphanizomenon* y *Phormidium* se cultivan a gran escala en estanques o en fotobiorreactores con este fin. No obstante, la más destacada es *A. platensis*, que es la cianobacteria que más se cultiva en el mundo y un microorganismo considerado seguro para alimentación (GRAS, *Generally Recognized As Safe*, Sili *et al.*, 2012). La biomasa de *A. platensis* se ha empleado en alimentación en humanos, pero también como aditivo en piensos para mejorar el crecimiento, eficiencia de la alimentación, calidad del producto final, y la respuesta fisiológica frente a enfermedades en varias especies de peces (Zhang *et al.*, 2020). En los alimentos para aves, la adición de espirulina se ha empleado con el fin de incrementar la coloración naranja de los huevos y mejorar sus propiedades (Rey *et al.*, 2021). Por otra parte, también en relación con la industria alimentaria, el exopolisacárido producido por algunas cianobacterias también se ha empleado en como agentes emulsionantes, de recubrimiento, gelificantes e hidratantes de alimentos (Derikvand *et al.*, 2017; Zahra *et al.*, 2020). En especial cepas como *Aphanocapsa halophytica*, *Anabaena* sp. ATCC 33047, y *Cyanothece* sp. ATCC 51142 se han empleado en la producción de exopolisacáridos (Kumar *et al.*, 2019).

En cuanto a utilidad en cosmética y farmacia, la biomasa de cianobacterias también se emplea en la producción de compuestos de valor añadido (Ragusa *et al.*, 2021; Soule *et al.*, 2016). Así, las cianobacterias son fuente de muchos compuestos con diversas actividades que se sintetizan a través de rutas metabólicas secundarias (Jeong *et al.*, 2020). Los metabolitos secundarios de las cianobacterias constituyen un grupo diverso de compuestos, principalmente péptidos, terpenos, poliquétidos, alcaloides, lípidos y otros. En lo que respecta a la actividad, se han descrito antivirales, antibacterianos, antifúngicos y anticancerígenos (Kumar *et al.*, 2019). Las cepas más eficientes en cuanto a la cantidad de metabolitos producidos son las cianobacterias pertenecientes a *Oscillatoriales*, *Nostocales*, *Chroococcales* y *Synechococcales* (Ślizewska y Żymaniak-Duda, 2021).

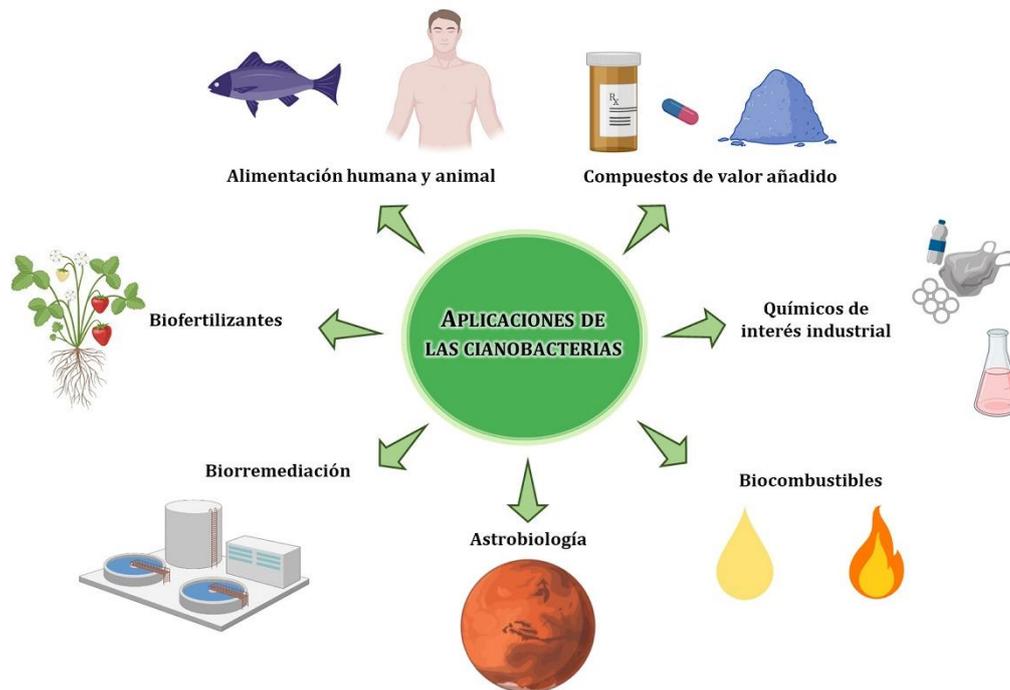


Figura I.14. Diagrama esquemático sobre las aplicaciones de las cianobacterias. Adaptado de Fabris *et al.*, 2020.

Además de los compuestos anteriores, las cianobacterias también son interesantes desde el punto de vista de la producción de pigmentos. La ficocianina, parte del complejo de fotosintético de las cianobacterias, se emplea como colorante y como compuesto antioxidante (Q. Liu *et al.*, 2016; H.-L. Wu *et al.*, 2016). Si bien *A. platensis* es una fuente habitual para la producción de este compuesto (Ragusa *et al.*, 2021), otros trabajos se han centrado en producirlo en cianobacterias con mayor facilidad de modificación genética. Un ejemplo de ello es el trabajo de Puzorjov *et al.*, 2022, en el que para la producción de ficocianina se utiliza la cianobacteria de amplio uso industrial *Synechocystis* 6803 (Puzorjov *et al.*, 2022). Aparte de la ficocianina, otros compuestos de gran valor son los pigmentos fotoprotectores, algunos producidos exclusivamente por cianobacterias (X. Gao *et al.*, 2021; Rastogi *et al.*, 2014). Las cianobacterias producen una amplia gama de pigmentos fotoprotectores que se utilizan ampliamente en la formulación de cosméticos, con el objetivo de reducir los riesgos de cáncer de piel y envejecimiento, siendo los aminoácidos similares a micosporinas (MAA), la escitonemina y los carotenoides son los más comunes (Kumar *et al.*, 2019; Rastogi *et al.*, 2014). De estos tres, la escitonemina se produce exclusivamente en cianobacterias y se ha estudiado principalmente desde un punto de vista ecológico, evolutivo y económico (Derikvand *et al.*, 2017; S. Mishra y Sinha, 2022). La producción de estos pigmentos está asociada en muchos casos a la exposición a estrés abiótico, incluidas altas dosis de radiación UV (Kumar *et al.*, 2019). Las cepas que producen estos compuestos se encuentran entre los géneros *Nostoc*, *Scytonema*, *Calothrix*, *Lyngbya*, *Chroococcidiopsis* y *Chlorogloeopsis* (X. Gao *et al.*, 2021).

5.2. Industria y biorremediación

Debido al agotamiento de los combustibles fósiles y la tendencia hacia una economía circular, el uso de cianobacterias para la producción de biocombustibles ha recibido enorme atención. Biocombustibles como el etanol y butanol se han producido en varias especies de cianobacterias modificadas genéticamente para obtener buenos rendimientos (Shabestary *et al.*, 2018; Velmurugan y Incharoensakdi, 2020). Así, cepas como *Synechocystis* 6803, *S. elongatus* 7942; *Synechococcus* 7002 se han empleado en la producción de compuestos biocombustibles (Angermayr *et al.*, 2015). Por otra parte, la producción de H₂ mediante cianobacterias es otra de las aplicaciones de estos microorganismos a nivel industrial. Cianobacterias de los géneros *Anabaena*, *Calothrix*, *Aphanocapsa*, *Nostoc*, *Microcystis* y *Oscillatoria* se han estudiado en la producción de hidrógeno en determinadas condiciones de crecimiento (Kumar *et al.*, 2019; Leino *et al.*, 2012; Tamagnini *et al.*, 2002). Además de la producción fotobiológica de H₂, de manera natural muchas especies de cianobacterias acumulan lípidos en gran cantidad como material de reserva, los cuales pueden extraerse para la obtención de biodiesel (Kaczmarzyk *et al.*, 2018). En la síntesis de este biocombustible se han empleado cepas con altos porcentajes de producción tanto de biomasa como de lípidos como *M. aeruginosa*, *Synechococcus* sp. y *Trichormus* sp. Por otro lado, la biomasa de cianobacterias puede tratarse mediante fermentación o digestión anaeróbica para la producción de biogás. En este sentido, el crecimiento de cianobacterias que acumulen una gran cantidad de biomasa permite una mayor producción de biocombustibles. Entre las cianobacterias empleadas en la producción de este biocombustible destacan cepas de los géneros *Arthrospira*, *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Pseudanabaena* y *Synechocystis* (Cuellar-Bermudez *et al.*, 2015).

Aparte de las implicaciones industriales de la producción de biocombustibles, las cianobacterias también se han empleado en aplicaciones ambientales. Un ejemplo de ello es el empleo de cianobacterias como biofertilizantes (Kumar *et al.*, 2019; Zahra *et al.*, 2020). En este caso, el interés deriva en que varias especies de cianobacterias son capaces de fijar N₂ atmosférico. Algunas de ellas pertenecen a los géneros *Anabaena*, *Nostoc*, *Calothrix*, y *Plectonema* (Zahra *et al.*, 2020). No obstante, además de esta característica metabólica, algunas especies de cianobacterias son capaces de promover el crecimiento vegetal mediante la liberación de metabolitos como hormonas, vitaminas y quelantes de hierro, la mejora de la solubilidad de nutrientes, la eliminación de metales tóxicos o protección frente a otros microorganismos patógenos (Kumar *et al.*, 2019). Especies de los géneros *Anabaena*, *Chroococcidiopsis*, *Oscillatoria* y *Phormidium* han mostrado asociaciones con las raíces de la planta de trigo, estimulando su crecimiento (Hussain y Hasnain, 2011; Kumar *et al.*, 2019). Otras aplicaciones de las cianobacterias relacionadas con la aplicación medioambiental son el tratamiento de aguas residuales o la regeneración de suelos (Gonçalves, 2021; Rossi *et al.*, 2022; Tsolcha *et al.*, 2021). En concreto, el crecimiento de cianobacterias del género *Arthrospira* en aguas residuales permite la limpieza del agua y a la vez la obtención de biomasa que puede emplearse en la producción de combustibles y compuestos de valor añadido (Sánchez-Bayo *et al.*, 2020).

5.3. Otras aplicaciones

Finalmente, otra aplicación menos abundante de las cianobacterias es su uso en Astrobiología, en especial aquellas cepas que resisten condiciones extremas de irradiación o escasez de agua (Bothe, 2019; Fagliarone *et al.*, 2017). El crecimiento de cianobacterias en el espacio u otros planetas permitiría incrementar los niveles de oxígeno e incluso sustentar otras formas de vida (Bothe, 2019).

Algunas cepas del género *Chroococcidiopsis* son extremadamente resistentes a desecación, radiación ultravioleta y alta temperatura y se han adaptado a sobrevivir a ambientes como desiertos (Baque *et al.*, 2013). Varios estudios han mostrado la supervivencia de estas cianobacterias en condiciones análogas a las presentes en Marte o en sondas espaciales (Baque *et al.*, 2013; Billi *et al.*, 2019; Mosca *et al.*, 2021). De hecho, se propuso que *Chroococcidiopsis* podría usarse como microorganismo fotosintético pionero en la “terraformación de Marte”, si se inocula en el desierto apropiado y se rehidrata periódicamente (Verseux *et al.*, 2016).

Otro género relevante en este campo es *Nostoc*, del cual también se han descrito cepas resistentes a desecación y capaces de sobrevivir en medios con composición análoga a la que se encontraría en Marte y también dentro y fuera de la estación espacial internacional (Kimura *et al.*, 2015; Shang *et al.*, 2019; Tomita-Yokotani *et al.*, 2021). La especie *Nostoc* sp. HK01 descrita en Katoh *et al.*, 2003 se ha propuesto como fuente de alimento para crecer en Marte (Kimura *et al.*, 2015).

Finalmente, otros autores han propuesto combinaciones de cianobacterias para su crecimiento en Marte. Entre los candidatos se encuentran especies resistentes como las ya comentadas, así como otras de interés por su elevada generación de biomasa, rápido crecimiento o capacidad de fijar N₂ como *Arthrospira*, *Synechococcus/Synechocystis* y *Cyanothece* (Verseux *et al.*, 2016).

IV. Objetivos

Como se ha comentado en la introducción, las cianobacterias se encuentran entre los organismos vivos más antiguos del planeta y se pueden hallar en todos los ecosistemas de la Tierra, desde océanos, ríos y lagos de agua dulce hasta fuentes termales y desiertos. Aparte de su papel ecológico en los ciclos globales del carbono y el nitrógeno, las cianobacterias se están convirtiendo en un chasis cada vez más atractivo en la producción biotecnológica de compuestos de alto valor añadido, pues los requerimientos para su crecimiento, luz y CO₂, son mínimos, gratuitos y abundantes. Si bien diversas cianobacterias, sobre todo *Synechocystis* spp. y *Synechococcus* spp., han sido ya caracterizadas para su aplicación industrial, muchas de ellas crecen en condiciones muy concretas, principalmente en condiciones controladas de laboratorio. Por este motivo, continuamente se buscan nuevas cianobacterias que puedan utilizarse como chasis o bien aporten genes de interés en biotecnología. Estudiar la diversidad de cianobacterias es importante para explorar y desarrollar su potencial para beneficio humano. Por otro lado, aunque cada vez se describen más, las herramientas moleculares de las que se dispone para modificar el metabolismo de las cianobacterias aún son limitadas, en comparación con las desarrolladas para otros microorganismos de uso industrial y biotecnológico.

Con estos antecedentes, el objetivo principal esta tesis doctoral consistió en el aislamiento y caracterización de nuevas cianobacterias extremófilas, así como el desarrollo y optimización de diferentes herramientas moleculares para mejorar las aplicaciones de las cianobacterias. Para abordar este objetivo general se marcaron los siguientes objetivos parciales (entre paréntesis se especifican los Capítulos que lo abordan dentro del apartado de Resultados):

1. Caracterización de nuevas cianobacterias extremófilas (Capítulo 1)

Con el objeto de obtener nuevas cepas de cianobacterias extremófilas o caracterizar genes que pueden ser de interés para posteriores aplicaciones biotecnológicas, se planteó aislar cianobacterias procedentes de un ambiente extremo, un panel solar. Los objetivos parciales son:

- 1.1. Aislamiento e identificación de cianobacterias procedentes de un panel solar.
- 1.2. Caracterización de cepas extremófilas que puedan ser de interés biotecnológico.
- 1.3. Identificación *in silico* de clústeres génicos procedentes de cianobacterias extremófilas de interés.

2. Desarrollo de herramientas de Biología Sintética en cianobacterias de interés industrial y biotecnológico.

No obstante, aparte de caracterizar nuevas cepas de cianobacterias para posibles aplicaciones biotecnológicas, también es esencial disponer de herramientas genéticas que permitan manipularlas genéticamente o modificar la expresión génica. De este modo, se planteó el desarrollo y evaluación de diferentes herramientas de modificación genética y control de la expresión. Los objetivos parciales para este apartado son:

IV. OBJETIVOS

- 2.1. Estudio de protocolos de transformación en *Arthrospira platensis* PCC 9108 (Capítulo 2)
- 2.2. Desarrollo de herramientas biotecnológicas usando plásmidos pSEVA en cianobacterias (Capítulo 3).
- 2.3. Desarrollo de herramientas de expresión génica y control de proteínas en *Synechococcus* sp. PCC 11901 (Capítulo 4).

V. Resultados

Capítulo 1.

Aislamiento y caracterización de cianobacterias procedentes de un panel solar

Parte de los resultados de este capítulo se ha enviado para su publicación como:

Baldanta, S., Arnal R., Blanco-Rivero A., Guevara G., Navarro-Llorens J.M. Characterization of *Chroococcidiopsis* sp. strains from a solar panel.

Grupo de Ingeniería Metabólica, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid.

1. ANTECEDENTES: CIANOBACTERIAS EN AMBIENTES EXTREMOS

Los microorganismos colonizan una amplia variedad de entornos, tanto naturales como artificiales. Aunque algunos ambientes extremos son nichos ideales para la bioprospección de organismos extremófilos con propiedades únicas para aplicaciones biotecnológicas, la mayoría de los microorganismos identificados mediante estudios metagenómicos no se pueden cultivar en condiciones de laboratorio ordinarias (Steen *et al.*, 2019). En los últimos años, los avances en técnicas ómicas y bioinformáticas han permitido el estudio de la diversidad biológica y funcional microbiana presente en una gran variedad de ambientes, en particular en los hábitats más extremos. La caracterización de las comunidades microbianas presentes en estos ambientes extremófilos tiene, además de una relevancia a nivel ecológico, importantes implicaciones por sus potenciales aplicaciones biotecnológicas.

Un ambiente extremo de interés y del que hay pocos trabajos de las comunidades microbianas que viven en ellos son los paneles solares, un hábitat creado por el hombre (Dorado-Morales *et al.*, 2016; Porcar *et al.*, 2018; Tanner *et al.*, 2018). El estudio de la ecología microbiana de los paneles solares de diferentes partes del mundo muestra que las comunidades presentes pertenecen a géneros adaptados a la sequía, al calor y a la radiación, incluidos hongos y bacterias, y que las interacciones microbianas en esas comunidades podrían desempeñar un papel importante en la supervivencia bacteriana (Dorado-Morales *et al.*, 2016). Los perfiles taxonómicos derivados de los datos metagenómicos de los paneles solares situados en Berkeley y Valencia, que comparten un clima mediterráneo similar, resultaron ser muy similares siendo los taxones más abundantes: Actinobacteria (16%), Bacteroidetes (23%), Cianobacteria (<3%), Deinococcus (6%), Firmicutes (<3%), Proteobacteria (15%) y Ascomycota (32%) (Porcar *et al.*, 2018).

Como se ha comentado en la introducción, las cianobacterias se pueden encontrar en todos los ecosistemas de la Tierra (Friedmann, 1980; Singh, 2018; Urrejola *et al.*, 2019; Wierzchos *et al.*, 2006). Aparte de su función ecológica en los ciclos globales del carbono y el nitrógeno, las cianobacterias se están convirtiendo en un chasis cada vez más atractivo en la producción biotecnológica de compuestos de alto valor añadido. Ya se han caracterizado diversas cepas de los géneros *Synechocystis* y *Synechococcus* para su aplicación industrial, pero muchas de ellas crecen en condiciones muy concretas, y requieren factores muy controlados. Por este motivo, continuamente se buscan nuevas cianobacterias que puedan utilizarse como chasis o bien que aporten genes de interés en biotecnología. Por lo tanto, conocer la diversidad de cianobacterias es importante para poder explorar y desarrollar su potencial. Los miembros del género *Chroococcidiopsis* son cianobacterias frecuentemente aisladas de diversos hábitats extremos. Su capacidad de resistencia hace que sean interesantes para estudiar los mecanismos responsables, además de aplicaciones en astrobiología.

Por otra parte, muchas bacterias aisladas de ambientes extremos producen metabolitos secundarios como respuestas al estrés, mecanismos de defensa, transporte de metales, y señalización (Jeong *et al.*, 2020), y estos tienen alto valor a nivel industrial, farmacéutico o alimentario. El género *Chroococcidiopsis* es resistente a diferentes tipos de estrés, por lo que es una fuente valiosa de compuestos bioactivos. Por ejemplo, según se ha observado en algunas cepas, para evitar daños asociados a la exposición UV, las cianobacterias aumentan la expresión de sistemas antioxidantes y la síntesis de compuestos protectores, como la escitonemina (Billi, 2009; Casero *et al.*, 2021; X. Gao *et al.*, 2021). Además, también se ha observado una mayor acumulación de escitonemina en *Chroococcidiopsis* sp. frente a otros estreses y en ausencia de exposición a UV, como estrés osmótico (Dillon *et al.*, 2002) o desecación (Singh, 2018). Frente a desecación, la acumulación de azúcares como la trehalosa y la sacarosa también se ha estudiado en *Chroococcidiopsis* sp. CCMEE 029 (Fagliarone *et al.*, 2020). También cabe señalar que, muchas cianobacterias se encuentran en la naturaleza formando asociaciones con otros organismos y sintetizan compuestos con actividad antimicrobiana. Así cianobacterias del género *Leptolyngbya*, *Arthrospira*, *Nostoc* o *Gloeotheca* y *Chroococcidiopsis* se han estudiado con la finalidad de obtener estos compuestos de interés farmacéutico (Jeong *et al.*, 2020; Rasooli, 2013).

El proyecto HELIOS (BIO2015-66960-C3-3-R) ha tenido como propósito principal conocer la biodiversidad y los mecanismos moleculares de bacterias extremófilas resistentes a la radiación y a la desecación para desarrollar distintas aplicaciones biotecnológicas. Concretamente, el hábitat escogido fue un panel solar de la ciudad de Valencia, puesto que se caracteriza por ser un ambiente más o menos “extremo”, con oscilaciones de temperatura, radiación y desecación. La comunidad microbiana encontrada en este particular hábitat, descrita en Dorado-Morales *et al.*, 2016, es el punto de partida de este capítulo de la Tesis. En este capítulo, los objetivos específicos planteados son: (i) el aislamiento e identificación de cianobacterias cultivables procedentes de un panel solar, (ii) selección y caracterización de cianobacterias con interés biotecnológico, (iii) estudio de sus propiedades extremófilas y (iv) búsqueda en el genoma de clústeres génicos con posible interés biotecnológico.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas bacterianas junto con su procedencia y características más relevantes empleados en este capítulo se recogen en la Tabla R.1.1. Todas las cepas utilizadas presentaban genotipo WT.

Tabla R.1.1. Cepas bacterianas y eucariotas empleadas en este trabajo

Cepa	Referencia
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Cedida por Dr. Luis López-Maury (IBVF-CSIC)
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	Cedida por Dr. Juan Nogales (CNB, CSIC)
<i>E. coli</i> DH10B	Colección del laboratorio
<i>Oculatella</i> sp. B1	Aislado en este trabajo
<i>Oculatella</i> sp. B2	Aislado en este trabajo
<i>Oculatella</i> sp. B5	Aislado en este trabajo
<i>Oculatella</i> sp. B6	Aislado en este trabajo
<i>Diplosphaera chodatii</i> B7	Aislado en este trabajo
Aislado B10	Aislado en este trabajo
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. B11	Aislado en este trabajo
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. B13	Aislado en este trabajo
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. B14	Aislado en este trabajo
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. B15	Aislado en este trabajo
<i>Myxocorys californica</i> B16	Aislado en este trabajo
Aislado B17	Aislado en este trabajo
Aislado B19	Aislado en este trabajo
<i>Coelastrella</i> sp. D14	Aislado en este trabajo
<i>Leptolyngbya</i> sp. UTEX1	Aislado en este trabajo

La síntesis de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fue encargada a la empresa Conda. El nombre, la secuencia y la aplicación de los oligonucleótidos se detallan en la Tabla R.1.2.

Tabla R.1.2. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Condiciones de PCR	Referencia
Identificación de cianobacterias, amplificación 16S rARN			
CYA106-Fw	CGGACGGGGAGTAACGCGTGA	Tm 55°C, 30 s, 1:30 72°C	Neilan, 1995
CYA359-Fw	GGGGAATYTTCCGCAATGGG		
CYA781-Rv(a)	GACTACTGGGGTATCTAATCCCAT		
CYA781-Rv(b)	GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT		
27-Fw	AGAGTTTGACTMTGGCTCAG	Tm 55°C, 30 s, 1:30 72°C	Drugă <i>et al.</i> , 2009
ITE-Rv	CTCTGTGTGCCTAGGTATCC		
Identificación de cianobacterias, amplificación del operón de la ficocianina			
PCβ-Fw	GGCTGCTTGTTTACGCGACA	Tm 55°C, 30 s, 1:30 72°C	Neilan, 1995
PCβ-Rv	CCAGTACCACCAGCAACTAA		
Identificación de microorganismos eucariotas, amplificación 18S rARN			
ss5-Fw	GGTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTG	Tm 55°C, 30 s, 1:30 72°C	Matsumoto <i>et al.</i> , 2010
ss3-Rv	GATCCTTCCGAGGTTCCACCTACGGAAACC		
18S-Fw	GTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTA	Tm 55°C, 30 s, 1:30 72°C	Gross <i>et al.</i> , 2001
18S-Rv	AGGGCAGGGACGTAATCAACG		

Y, degeneración de nucleótidos C/T. El oligonucleótido CYA781R fue una mezcla equimolar de CYA781R (a) y CYA781R (b).

2.2. Medios y condiciones de cultivo

Todas las soluciones y medios de cultivo utilizados en este trabajo se esterilizaron por calor húmedo en una autoclave a 121°C y 1 atm de presión o mediante filtración utilizando filtros estériles Millipore de 0.2 µm de diámetro. Los antibióticos se prepararon acorde a las instrucciones del fabricante, se esterilizaron por filtración y se conservaron a -20°C.

2.2.1. Medios y condiciones de cultivo empleados para bacterias.

El cultivo de *E. coli* se realizó en el medio rico Luria Bertani (LB) a 37°C y 250 rpm (Green y Sambrook, 2012). El crecimiento del cultivo en medio líquido se determinó en base a la medida de la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 600 nm con un espectrofotómetro (Ultrospect® 1000E).

Para la evaluación de la viabilidad de las muestras tomadas en Dorado-Morales *et al.*, 2016 y guardadas en el laboratorio, se emplearon los medios R2A (en g/L: peptona 0.5, casaminoácidos 0.5, extracto de levadura 0.5, dextrosa 0.5, almidón 0.5, K₂HPO₄ 0.3, MgSO₄ 0.05, piruvato sódico 0.3) y medio marino (en g/L: peptona 5.0, extracto de levadura 1.0, citrato férrico 0.1, NaCl 19.45, MgCl₂ 5.9, Na₂SO₄ 3.24, CaCl₂ 1.8, KCl 0.55, NaHCO₃ 0.16, KBr 0.08, SrCl₂ 0.034, H₃BO₃ 0.022, Na₄O₄Si 0.004, NaF 0.024, NH₄NO₃ 0.0016, Na₂HPO₄ 0.008).

2.2.2. Medios y condiciones de cultivo empleados para las cianobacterias

Los cultivos líquidos de cianobacterias se crecieron a 30°C con (150 rpm) o sin agitación e iluminancia constante de 60-80 o 100 µmol fotón/m²s en medio BG11 (Tabla R.1.3). El crecimiento de cianobacterias unicelulares se determinó en base a la medida de la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 750 nm con un espectrofotómetro (Ultrospect® 1000E). Para las cianobacterias crecidas formando agregados no se midió la DO, sino que 1 mL de cultivo se transfirió a 50 mL de medio fresco cuando el cultivo se veía muy denso. Para el cultivo sólido se usaron placas de agar purificado (Conda) al 1.5% (p/v), que se mantuvieron a 30°C con e iluminancia constante de 60-80 µmol fotón/m²s.

2.2.2.1. Aislamiento de cianobacterias

La toma de muestras se realizó durante el solsticio de verano de 2013 y 2014 en un conjunto de paneles solares situados en varios lugares de Valencia (España) por Dorado-Morales *et al.*, 2016. Brevemente, se vertió PBS estéril en el panel y se recogió el líquido raspando la superficie con un limpiador de ventanas estéril. Durante el proceso de muestreo, la temperatura promedio de la superficie de los paneles fue de 51°C. La irradiancia solar promedio en Valencia es de 461.3 W/m². Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso. Se proporciona más información detallada sobre colecciones de campo y muestras en Dorado-Morales *et al.*, 2016.

Para el aislamiento y el cultivo de las cepas, se utilizaron métodos estándar de crecimiento, sobre los diferentes medios de cultivo, cuya composición se recoge en la Tabla R.1.3. El medio BG11 (Rippka *et al.*, 1979) se tamponó con HEPES 10 mM a pH 7.5. El medio de cultivo de *Spirulina* (en adelante medio UTEX, Starr y Zeikus, 1987) presenta un pH de 9.5, el medio Castenholz-D (Mühlenhoff y Chauvat, 1996) de 7.5 y el medio MDM (Watanabe, 1960) de 8.

Además, también se emplearon los medios BG11₀ y MDM₀ (sin nitrógeno combinado). Para algunas placas se agregó 20 µg/mL de cicloheximida, 10 µg/mL de nistatina y 15 µg/mL de ácido nalidíxico para evitar el crecimiento de levaduras, hongos, otros microorganismos eucarióticos y bacterias gram-negativas de rápido crecimiento.

Tabla R.1.3. Composición de los medios empleados en el aislamiento y cultivo de cianobacterias

	UTEX	BG11	Castenholz-D	MDM
Macronutrientes (g/L)				
NaHCO ₃	13.61	-	-	-
Na ₂ HPO ₄	-	-	0.11	-
Na ₂ CO ₃	4.03	0.02	-	-
NaNO ₃ *	2.50	1.50	0.70	-
NaCl	1.00	-	0.008	0.01
K ₂ HPO ₄	0.50	0.03	-	0.025
K ₂ SO ₄	1.00	-	-	-
KNO ₃ *	-	-	0.10	-
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0.20	0.075	0.10	0.025
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0.04	0.036	-	0.001
CaSO ₄ * 2 H ₂ O	-	-	0.06	-
Ácido nitrilotriacético	-	-	0.10	-
Micronutrientes (mg/L)				
Vitamina B12	0.135	-	-	-
Na ₂ EDTA * 2 H ₂ O	4.550	1.00	-	-
FeCl ₃	0.350	-	2.28	-
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	-	-	-	0.0002
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	0.258	1.81	-	-
MnSO ₄ * H ₂ O	-	-	11.4	0.25
ZnCl ₂	0.030	-	-	-
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0.024	0.050	0.0125	-
Na ₂ MoO ₄ * H ₂ O	0.036	0.039	0.0125	0.002
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0.020	0.080	0.0125	0.008
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0.044	0.220	0.25	0.022
H ₃ BO ₃	0.620	2.86	0.25	0.286
H ₂ SO ₄	-	-	0.5 µL	-
Ácido cítrico	-	6	-	-
Citrato férrico de amonio	-	6	-	-

* Para los medios BG11₀ and MDM₀ (sin nitrógeno combinado) se omite este componente

Los cultivos puros de los aislados de mejor crecimiento finalmente se obtuvieron estriando repetidamente sobre BG11 solidificado con agar y BG11 suplementado con 5% (v/v) LB. Se realizó una prueba de pureza de esos cultivos, como se describe en Rippka *et al.*, 1979 y Taton *et al.*, 2012, con alguna modificación. Brevemente, 50 µL de cultivos crecidos se sembraron en 4 medios sólidos diferentes: (1) BG11 con 5% LB (v/v), (2) BG11 con 5% LB (v/v) y 0.04% (p/v) glucosa, (3) BG11 con glucosa al 0.01%, extracto de levadura al 0.01% (p/v) y triptona al 0.01% (p/v), y (4) LB. Las placas se incubaron a 30°C o 37°C en oscuridad durante 1 mes. Si no se

observó crecimiento de bacterias heterótrofas en las placas y mediante un microscopio óptico (Leica), los cultivos se consideraron axénicos.

2.2.2.2. Caracterización del crecimiento de *Chroococidiopsis* sp. Helios

Con el objetivo de caracterizar las cianobacterias *Chroococidiopsis* sp. axénicas se realizaron diferentes ensayos de crecimiento en un rango de condiciones de temperatura, salinidad (concentración de NaCl), pH, fuentes de nitrógeno y fuentes de carbono (crecimiento heterotrófico). Excepto para el ensayo de fuentes de carbono, que se realizó en placa, los crecimientos se realizaron en medio líquido BG11. Los experimentos se llevaron a cabo siempre con al menos tres réplicas biológicas.

Las cianobacterias se crecieron de manera rutinaria en BG11 pH 7.5, a 30°C, 150 rpm y luz continua 100 $\mu\text{mol fotón/m}^2\text{s}$. En estas condiciones, la definición de la relación entre la densidad celular por unidad de DO a una longitud de onda de 750 nm se realizó empleando un hemocitómetro para contar las células. Para los crecimientos en diferentes condiciones de NaCl y pH, las cepas se inocularon en 20 mL de medio en matraces Erlenmeyer de 100 mL a una $\text{DO}_{750\text{nm}}$ inicial de 0.05. El crecimiento celular se evaluó midiendo el $\text{DO}_{750\text{nm}}$ durante un período de 10 días. Para evaluar el crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl, se preparó el medio BG11 con concentraciones finales de 0.1, 0.25, 0.5 y 1 M de NaCl. La influencia del pH sobre el crecimiento se exploró en BG11 tamponado a pH 4, 9 y 11 con Tris 10 mM ajustado a cada pH. El efecto de la temperatura sobre el crecimiento se evaluó a 4°C, 40°C y 50°C, utilizando 30°C como control. En los ensayos de temperatura, las cepas se inocularon en 20 mL de medio en matraces Erlenmeyer de 100 mL a una $\text{DO}_{750\text{nm}}$ inicial de 0.2 y realizó la medida de crecimiento solo a los 7 días, para alterar lo menos posible la temperatura a la que se crecían los cultivos.

Para examinar el crecimiento de las distintas cepas en diferentes fuentes de nitrógeno, el BG11 se modificó reemplazando la fuente de NaNO_3 (control, 16mM) con NH_4Cl 16 mM, urea 16 mM o sin añadir fuente de nitrógeno (BG11₀). Además, se estudió la tolerancia a la urea mediante la adición de esta a concentraciones finales de 8 y 16 mM sobre BG11 completo (con NaNO_3). Las cianobacterias se inocularon en 20 mL de medio en matraces Erlenmeyer de 100 mL a una $\text{DO}_{750\text{nm}}$ inicial de 0.05 y el crecimiento celular se evaluó midiendo el $\text{DO}_{750\text{nm}}$ durante un período de 10 días. Por otro lado, en cuanto al crecimiento heterotrófico, se decidió evaluar de manera cualitativa mediante crecimiento en placa, para así evitar problemas asociados a la contaminación por otras bacterias. Se prepararon placas de BG11 agar con diferentes fuentes de carbono a una concentración final de 10 mM: glucosa, sacarosa, lactosa, arabinosa, maltosa, fructosa, galactosa, manosa y glicerol. Las pruebas se realizaron con gotas de 10 μL a una $\text{DO}_{750\text{nm}}$ de 1. Las placas se incubaron a 30°C en la oscuridad durante 30 días. Además, se añadió el inhibidor de la fotosíntesis DCMU (3- (3,4-diclorofenil) -1,1-dimetilurea) a una concentración final de 10 μM para asegurarse de que el crecimiento observado fuera heterotrófico. Se comprobó que las cepas estaban libres de bacterias contaminantes antes de los experimentos.

Puesto que algunas cepas de *Chroococidiopsis* sp. crecen en agregados celulares, en las que fue necesario, los cultivos líquidos se sonicaron antes de medir la DO, hasta que se separaron los agregados, y luego se verificaron por microscopía para garantizar que se hubiera producido un daño mínimo durante el proceso de sonicación.

2.2.3. Conservación de las cepas bacterianas

Las cianobacterias se conservaron 3-4 semanas en matraces o en placas en una estufa a 30°C con una iluminancia constante de 30 $\mu\text{mol fotón/m}^2\text{s}$, debido a la imposibilidad de conservación en congelación de la mayoría de ellas. Solo aquellas en las que fue viable la congelación, se conservaron en el medio de cultivo correspondiente a -80°C con DMSO 5% (v/v). Las bacterias se guardaron en glicerol al 20% en LB (v/v) a -80°C.

2.3. Técnicas que manipulación de ADN

Las técnicas de manipulación de ADN, así como otras técnicas de biología molecular utilizadas en este capítulo se describen en Green y Sambrook, 2012. Las enzimas se emplearon siguiendo las especificaciones del fabricante, salvo que se indique lo contrario.

2.3.1. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, se recogieron 2-5 mL de cada uno de los cultivos en tubos de 15 mL y se realizaron 3 lavados con agua estéril. El *pellet* fue guardado a -20°C hasta su procesamiento. Para la extracción de ADN, se raspó un poco del *pellet* congelado y se resuspendió en 200 μL de agua estéril. Posteriormente, se añadieron otros 200 μL , y se usó vórtex durante 30 s. Las muestras se centrifugaron a máxima velocidad durante 10 min para separar las dos fases. Finalmente, tras la centrifugación, la fase acuosa superior se pasó a un nuevo tubo y 2-5 μL se emplearon en la identificación molecular.

2.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de fragmentos de ADN utilizados en la identificación molecular se empleó la polimerasa de alta fidelidad *NZYProof 2x Green Master Mix* (Nzytech), en 20-50 μL de volumen final. Los oligonucleótidos y las condiciones de PCR se recogen en la Tabla R.1.2. Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf). Los productos amplificados se purificaron mediante el *kit* comercial *NZYGelpure* (NZYtech).

2.3.3. Electroforesis en geles de agarosa

Para visualizar los fragmentos de ADN se utilizaron geles 1% o 2% (p/v) de agarosa en tampón TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 7.6), utilizando el mismo tampón como electrolito. Para visualizar el ADN se empleó *GreenSafe Premium* (NZYtech) a una dilución de 1:10000, añadido previamente a la gelificación de la agarosa. A las muestras se les añadió 1/10 de su volumen de tampón de carga (Takara). La electroforesis se realizó a 100 V durante 20-30 min y, una vez finalizada, los fragmentos de ADN se visualizaron con radiación ultravioleta en un transiluminador UV Enduro GDS (Labnet International). El tamaño de los fragmentos se estimó por su movilidad electroforética utilizando como marcador de tamaño *GeneRuler 1 Kb DNA Ladder* de ThermoFisher o *NZYDNA Ladder III* de Nzytech.

2.3.4. Secuenciación y análisis de ADN

Los genomas de las cianobacterias *Chroococcidiopsis* sp. B11, B13, B14 y B15 se secuenciados mediante secuenciación Illumina y ensamblado *de novo* por Microbes NG (<https://microbesng.com/>) a partir de cultivo fresco. La secuenciación de ADN procedente de las amplificaciones se llevó a cabo de la empresa Eurofins Genomics. Los análisis de secuencias de ADN se realizaron utilizando el paquete de programas LASERGENE.

Para el análisis de los genomas, y la comparación de secuencias nucleotídicas para identificación de los distintos aislados se realizó mediante el uso de los algoritmos BLAST, a través del servidor del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). La anotación de los genomas se llevó a cabo utilizando el servicio en línea RAST (<http://rast.nmpdr.org/>). Para identificar los grupos involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios, se analizó el genoma anotado aplicando antiSMASH 6.0 (<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>) (Blin *et al.*, 2021). La actividad de alguno de los péptidos encontrados fue comprobada en la plataforma Norine (<https://bioinfo.lifl.fr/norine/>).

Para el análisis filogenético se utilizaron las secuencias de 16S rARN de los aislados de cianobacterias identificados y las 4-5 secuencias más similares encontradas en BLAST. Se realizaron alineamientos de todas las secuencias y se añadió *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 como grupo externo. El árbol filogenético se construyó con el método de *Neighbor-Joining* empleando las secuencias alineadas en el programa Geneious (<https://www.geneious.com/>). Se realizó un análisis de *bootstrap* con 1000 árboles de remuestreo.

2.4. Otros ensayos con las cianobacterias aisladas

2.4.1. Cuantificación de carbohidratos

Para determinar el contenido total de carbohidratos en los diferentes cultivos, se aplicó el método de fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), que se modificó a un formato de microplaca (Masuko *et al.*, 2005). Muestras de 5 mL de cultivos de 1 mes de cada cepa de *Chroococcidiopsis* cultivada sin agitación, se utilizó para la cuantificación de carbohidratos, que fue realizada por el Laboratorio de Biotecnología para Bioproductos y Energía – BIOOPEN (<https://www.energia.imdea.org/el-instituto>).

2.4.2. Capacidad de formación de biopelículas

Para evaluar la capacidad de formación de biopelículas se modificó el protocolo descrito en Allen *et al.*, 2019. Tres mililitros de *Chroococcidiopsis* sp a una DO_{750nm} inicial de 0.2 se mantuvieron a 30°C, luz continua 100 $\mu\text{mol fotón/m}^2\text{s}$ sin agitación durante 3 días en placas M6 de 3 cm de diámetro. Las células no adheridas fueron eliminadas por aspiración del medio. Cada pocillo se lavó dos veces con 2 mL de PBS y luego se añadió violeta cristal al 0.3% (p/v) durante 10 min para teñir las células adheridas. Después de eliminar la tinción, las células se lavaron con 2 mL de PBS al menos tres veces. A continuación, las células se resuspendieron en 10 mL de

etanol al 95% (v/v) durante 30 min y se midió la DO_{588nm} . Todos los ensayos se replicaron al menos tres veces.

2.4.3. Ensayo de resistencia a desecación

En una primera aproximación para estudiar la resistencia a desecación de las cianobacterias, se realizaron varios ensayos de desecación añadiendo un pequeño volumen de cultivo (50 μ L, DO_{750nm} 0.5) sobre membranas que se mantenían a 37°C, O/N para someterlas a desecación. Se variaron los tiempos mantenidos a 37°C, entre 1 y 7 días. Posteriormente, las membranas fueron rehidratadas con 1 mL de agua estéril durante 1 hora con luz tenue, se hicieron diluciones decimales seriadas y se plaquearon en BG11 agar para contabilizar la supervivencia de las cianobacterias. El mantenimiento de las membranas con los cultivos desecados se probó tanto en presencia como ausencia de luz. En los ensayos realizados, la humedad fue del 12-15%. Puesto que no se recuperaron cianobacterias, se varió la forma de realizar el ensayo a un método cualitativo (Kato *et al.*, 2003). Los aislados de cianobacterias se cultivaron en placas de BG11-agar (6 cm de diámetro) bajo 60-80 μ mol de fotón/ m^2s de luz y a 30°C durante 15 días. Después, las placas se dejaron secar (sin *parafilm*) durante 3, 7, 12 a 30°C, 20 μ mol de fotón/ m^2s y 30% de humedad relativa. Para las muestras en desecación de 1 año, también se mantuvieron algunas muestras en condiciones de crecimiento rutinarias a 30°C, 80 μ mol de fotón/ m^2s y 30% de humedad relativa. Después de ese tiempo, las muestras se hidrataron con 1 mL de agua estéril durante 15 minutos a la luz ambiente, se estriaron sobre una placa BG11 y se incubaron a 60-80 μ mol fotón/ m^2s y 30°C, durante 3 semanas. Como control sin desecación se emplearon cultivos frescos de cada aislado. Por otro lado, como control negativo para la tolerancia a la desecación se utilizó *Synechocystis* sp. PCC 6803.

2.4.4. Ensayo de resistencia a radiación UV-C

Para evaluar la viabilidad de las cianobacterias a la radiación, los cultivos axénicos de cianobacterias fueron expuestos a diferentes dosis de UV-C. Cultivos en la fase exponencial de crecimiento se prepararon a una DO_{750nm} de 0.5 en medio BG11 para cianobacterias, DO_{600nm} de 0.5 en PBS para *E. coli*. Se utilizaron *Synechococcus elongatus* PCC 7942 y *E. coli* como bacterias modelos de moderada y baja resistencia a la radiación UV-C, respectivamente. Como control de viabilidad (100%) se emplearon muestras no sometidas a irradiación UV-C. Alícuotas de 2 mL en placas M6 descubiertas (3 cm de diámetro) se irradiaron con una lámpara UV-C de 460 mW/m^2 , que emite también 32.88 mW/m^2 de UV-A y 27.87 mW/m^2 de UV-B. Los ensayos de irradiación se realizaron en condiciones de luz ambiente y las dosis se ajustaron a 250, 500, 750 y 1000 J/m^2 , variando el tiempo de exposición. Se ha establecido que la absorbancia del medio BG11 a 254 nm es de 0.09 (Tao *et al.*, 2010). La supervivencia después de la exposición a UV-C se evaluó mediante la capacidad de formación de colonias de las distintas bacterias y cianobacterias. Después de la irradiación, se recogió 1 mL de cada muestra; luego, se prepararon diluciones decimales y 10 μ L se sembraron en placas sobre BG11 agar para cianobacterias y LB agar para *E. coli*. Las colonias cianobacterianas y bacterianas se contaron después de 2 semanas y 1-2 días de incubación, respectivamente.

3. RESULTADOS

3.1. Aislamiento e identificación de cianobacterias de un panel solar

Durante el desarrollo del proyecto HELIOS, se obtuvieron dos muestras procedentes de un panel solar situado en la Universidad de Valencia (Dorado-Morales *et al.*, 2016), una cruda (RAW) y una filtrada. Ambas se mantuvieron a -80°C hasta el inicio de los experimentos (Figura R.1.1A). Antes de comenzar con el aislamiento de cianobacterias, para comprobar la viabilidad de las muestras almacenadas, se plaquéó 50 μL de cada una de ellas en medios habituales para el crecimiento bacteriano: medio LB, R2A y medio marino. Las placas se incubaron durante tres días a temperatura ambiente, observándose crecimiento de microorganismos en los 3 medios. Se comprobó que las muestras eran bastante complejas, puesto que había una gran cantidad de bacterias y hongos. Posteriormente, se procedió al aislamiento en diferentes medios para el crecimiento de cianobacterias (Tabla R.1.3).

El medio BG11 (Rippka *et al.*, 1979) posee concentraciones de nitrato altas y de fósforo en menor medida, y presenta un pH de 7.5. Por otro lado, se empleó un medio utilizado en el cultivo de *Spirulina* (UTEX, Starr y Zeikus, 1987), el cual presenta mayor concentración de NaCl, carbonatos y nitratos que el BG11, además de un pH básico de 9.5. También se emplearon otros dos medios más pobres en nutrientes, el medio Castenholtz-D (Mühlenhoff y Chauvat, 1996) y el medio MDM (Watanabe, 1960), con un pH de 7.5 y 8 respectivamente. Los medios BG11₀ y MDM₀ (sin nitrógeno combinado) se emplearon con el fin de favorecer el crecimiento de cianobacterias fijadoras de N₂ atmosférico.

Se obtuvieron un total de 39 colonias que parecían crecer bien en los medios de cianobacterias (Figura R.1.1B), aunque únicamente crecieron en las placas procedentes de la muestra cruda, y en ausencia de cicloheximida, nistatina y ácido nalidíxico. Sólo se obtuvo 1 colonia en presencia de los antifúngicos y el antibiótico para el medio Castenholtz-D. Tampoco crecieron colonias en las placas de los medios sin fuente de nitrógeno combinado. En el resto de las placas, el número de aislados fue variado: 17 colonias en el medio Castenholtz-D, 20 colonias en medio BG11, 1 colonia en el medio UTEX. Para facilitar el trabajo con los distintos aislados, las colonias se nombraron en referencia al medio en el que aparecieron (UTEX se mantuvo completo en el nombre, B para medio BG11, D para medio Castenholtz-D) y el número que se registró en las placas iniciales (Figura R.1.1B).

Posteriormente, las colonias obtenidas se sembraron en 10 mL del medio en el que crecieron (sin agitación) y también en medio sólido. Después de un mes aproximadamente, algunas de las colonias empezaron a crecer en medio líquido, en medio sólido o en las dos. Tras varios pases, se observó que los cultivos crecían con tasas de crecimiento muy bajas, y apenas se generaba biomasa. La identificación molecular de los distintos aislados dio muy malos resultados por la dificultad de extraer el ADN de las colonias y la calidad de las secuencias. Finalmente, solo quedaron viables 15 de los 39 aislados iniciales: UTEX1, D14 y 13 aislados

procedentes del medio BG11. Se observó que el aislado D14 también era capaz de crecer en BG11, por lo que se comenzó a crecer en este medio, si bien se mantuvo identificado como D14.

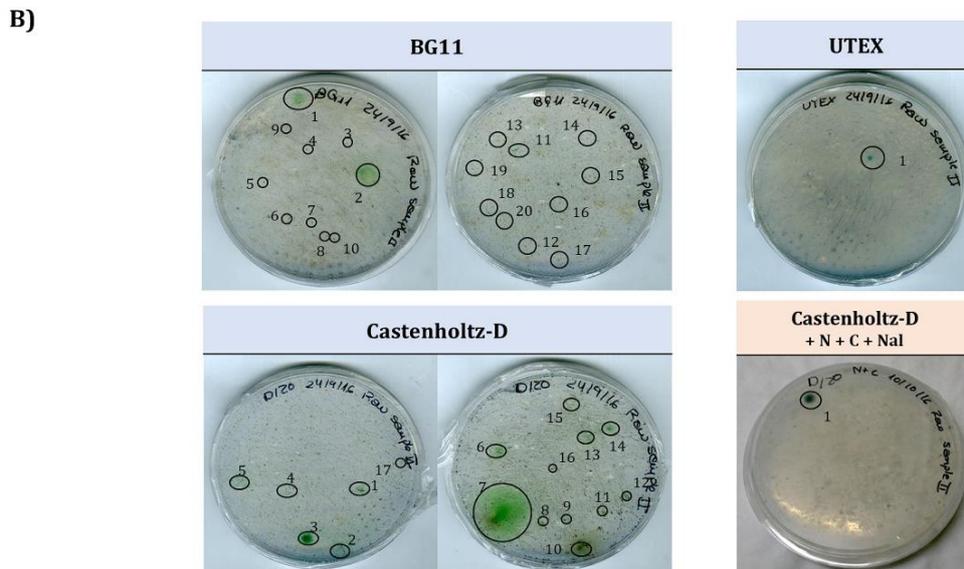


Figura R.1.1. Cianobacterias aisladas del panel solar. A) Representación esquemática del procedimiento seguido para el aislamiento inicial de cianobacterias. **B)** Microorganismos crecidos en medios de cultivo de cianobacterias a partir de la muestra RAW. Abreviaturas: N, nistatina; C, cicloheximida; Nal, Nalidíxico.

3.1.1. Optimización del crecimiento de los aislados

Tras la muerte de algunos de los aislados que se obtuvieron inicialmente, se comprobó la presencia de al menos otras 2 bacterias además de la cianobacteria en los cultivos. Por otro lado, la falta de luz suficiente para un mejor crecimiento de las cianobacterias pudo ser otro de los motivos de la pérdida de viabilidad. Para tratar de mantener la mayor cantidad de aislados posibles, se realizaron cambios en el mantenimiento. En primer lugar, para reducir la cantidad de las otras bacterias (no cianobacterias) presentes, se realizaron varios lavados con agua estéril antes de refrescar los cultivos. En el caso de las placas, se trató de ir aislando progresivamente las cianobacterias de otras bacterias presentes o al menos reducir la cantidad de estas últimas. Por otro lado, todos los cultivos se pasaron a mantener en matraces más grandes, de al menos 50 mL de cultivo. Por último, se incrementó la intensidad de luz, de 10 a 60-80 $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2\text{s}$, para favorecer más el crecimiento de la cianobacteria. Con estos cambios se redujo en gran medida la presencia de otras bacterias en los aislados de cianobacterias y todos continuaron siendo viables, obteniéndose mayor biomasa para poder realizar posteriores estudios. Aunque todos los aislados aún contenían bacterias, sí que se comprobó que al menos solo se tenía un tipo de cianobacteria por aislado.

3.1.2. Descripción microscópica e identificación molecular de los aislados

Con mayor biomasa y menor contaminación de otras bacterias, se pudo llevar a cabo la identificación molecular de los diferentes aislados. Tras la extracción del ADN, se realizó una PCR utilizando oligonucleótidos específicos para secuenciar el 16S/18S rARN y parte del operón de la ficocianina (Tabla R.1.2), con el fin de clasificar, en la medida de lo posible, las especies aisladas del panel solar. Los mejores resultados identificados con BLAST se obtuvieron con el 16S/18S rARN (Figura R.1.2, Tabla R.1.4) para cada uno de los aislados. En muchos de ellos no fue posible establecer la especie ya que se obtuvieron en el análisis del BLAST varias secuencias con una similitud equivalente. Por otro lado, los aislados B10, B17 y B19 no pudieron ser identificados, debido principalmente a la presencia de otras bacterias. Además de cianobacterias, se encontraron varias microalgas (Tabla R.1.4). Las cianobacterias encontradas pertenecían principalmente a 2 órdenes, *Chroococciopsidales* y *Synechococcales*. Los miembros del orden *Synechococcales* eran de diferentes géneros, incluidos *Leptolyngbya* (1), *Oculatella* (4) y *Myxacorys* (1). Todos los aislados pertenecían a géneros descritos de ambientes de desecación, tal como se observa de las zonas de aislamiento de las cianobacterias que mejor resultado dan en BLAST para cada aislado (Tabla R.1.5).

Por otro lado, se visualizó al microscopio cada uno de los aislados de cianobacterias. Se observaron diferentes tipos de cianobacterias, en concordancia con los géneros determinados en la Tabla R.1.4. Los aislados identificados como *Oculatella* sp. (B1, B2, B5, B6), *Myxacorys californica* B16, *Leptolyngbya* sp. UTEX1 y el aislado B10 tenían forma filamentosa (Figura R.1.3 y Figura R.1.4A). Por otro lado, aunque también el aislado B17 formaba filamentos, estos eran más grandes que en los otros aislados. Las microalgas *Diplosphaera chodatii* B7 y *Coelastrella* sp. D14 son unicelulares. Para las cianobacterias B11, B13, B14, B15 y B19, se observa que crecen

formando tétradas, tal como se ha descrito para el género identificado en BLAST (forma de crecimiento típica de *Chroococidiopsis*).

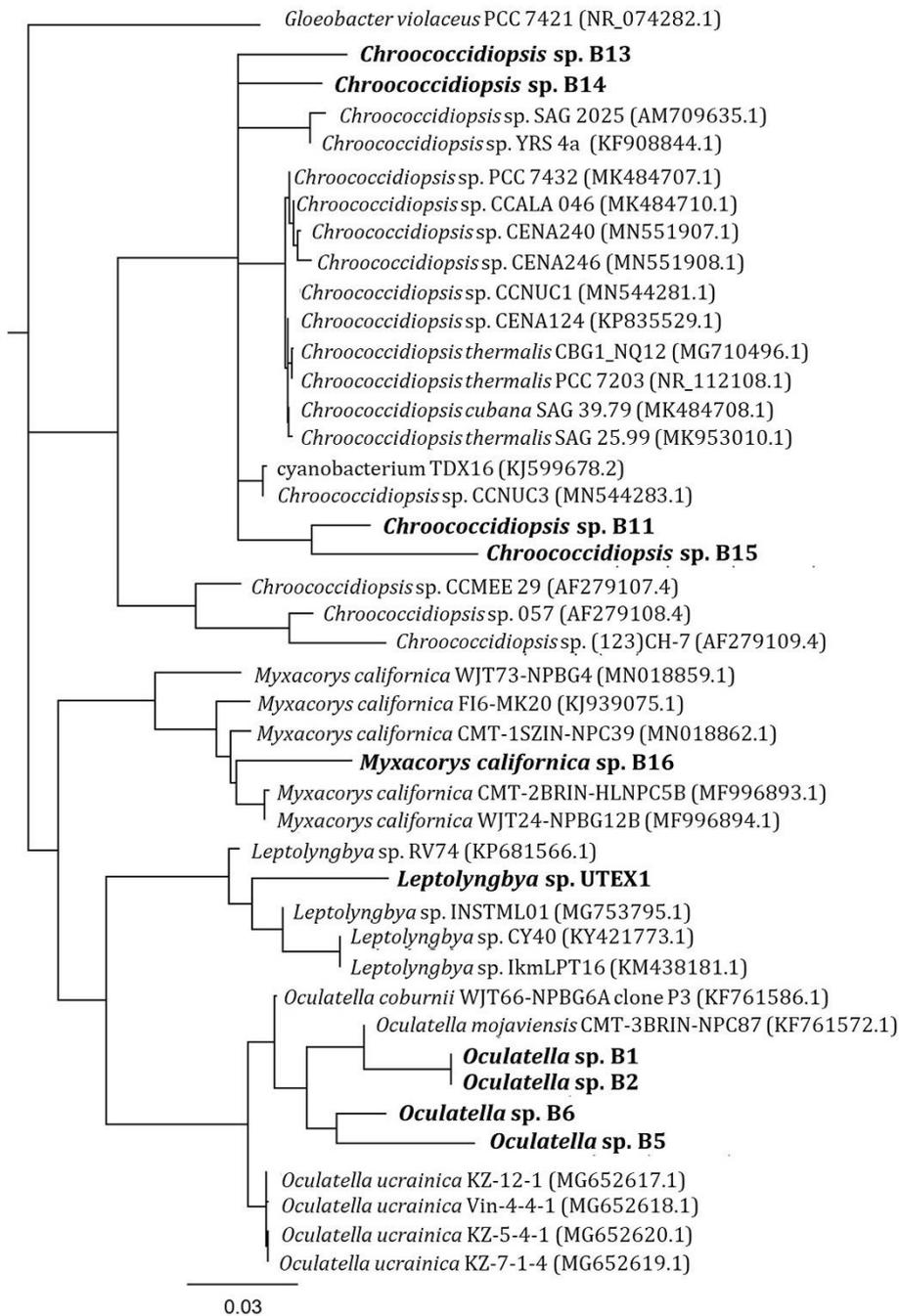


Figura R.1.2. Árbol filogenético inferido de las secuencias de 16S rARN de las cianobacterias aisladas del panel solar. Los aislados identificados en este trabajo se muestran en negrita.

Tabla R.1.4. Resultados de BLAST de los resultados obtenidos al comparar las secuencias de 16S/18S de los aislados del solar panel con Genbank.

Aislado	Secuencia en BLAST más cercana	Identidad %	Nº Acceso
B1	<i>Oculatella coburnii</i> WJT66-NPBG6A	99.73	KF761586.1
	<i>Oculatella mojaviensis</i> CMT-3BRIN-NPC87	99.73	KF761572.1
B2	<i>Oculatella coburnii</i> WJT66-NPBG6A	100.00	KF761586.1
	<i>Oculatella mojaviensis</i> CMT-3BRIN-NPC87	100.00	KF761572.1
B5	<i>Oculatella coburnii</i> WJT66-NPBG6A	100.00	KF761586.1
	<i>Oculatella ucrainica</i> KZ-5-4-1	90.89	MG652620.1
B6	<i>Oculatella coburnii</i> WJT66-NPBG6A	99.73	KF761586.1
	<i>Oculatella mojaviensis</i> CMT-3BRIN-NPC87	99.73	KF761572.1
B7	<i>Diplosphaera chodatii</i> SAG 49.86	98.85	MT078182.1
	<i>Diplosphaera chodatii</i> SAG 9.82	98.85	MT078181.1
B11	<i>Chroococciopsis</i> sp. CENA240	99.82	MN551907.1
	<i>Chroococciopsis</i> sp. CCNUC3	99.33	MN544283.1
	<i>Chroococciopsis</i> sp. CENA246	100.00	MN551908.1
B13	<i>Chroococciopsis</i> sp. CENA240	100.00	MN551907.1
	<i>Chroococciopsis</i> sp. CCNUC1	100.00	MN544281.1
	<i>Chroococciopsis</i> sp. CENA246	100.00	MN551908.1
B14	<i>Chroococciopsis</i> sp. CENA240	100.00	MN551907.1
	<i>Chroococciopsis</i> sp. CCNUC1	100.00	MN544281.1
B15	<i>Chroococciopsis</i> sp. YRS 4a	95.33	KF908844.1
	<i>Chroococciopsis</i> sp. SAG 2025	95.33	AM709635.1
B16	<i>Myxacorys californica</i> WJT24-NPBG12	99.10	MF996894.1
	<i>Myxacorys californica</i> FI6-MK20	99.10	KJ939075.1
	<i>Myxacorys californica</i> CMT-1FSIN-NPC23	99.10	KJ939073.1
D14	<i>Coelastrella</i> sp. QW-2019b	99.00	MH176108.1
UTEX1	<i>Leptolyngbya</i> sp. RV74	98.81	KP681566.1

3.1.3. Selección de cianobacterias de interés biotecnológico

Las diferencias observadas a nivel microscópico se correspondían con los distintos crecimientos de los aislados. Los filamentosos crecían formando un césped en placa y agregaban en medio líquido. En cambio, los observados como unicelulares o formando tétradas crecían en colonias separadas y sin agregar en medio líquido. Por otro lado, puesto que se había observado sin problema el crecimiento de los aislados en placa y en medio líquido en estático, con el objetivo de reducir los tiempos de cultivo, se realizaron pruebas de crecimiento en medio líquido con agitación por si la aireación mejorase el crecimiento (Tabla R.1.6). Los cultivos identificados dentro del género *Chroococciopsis* crecían sin problemas en agitación. Además, el cultivo B19, similar a nivel morfológico al género *Chroococciopsis*, pero sin identificar molecularmente, tuvo un patrón de crecimiento similar al resto de aislados de este género.

Tabla R.1.5. Origen ecológico y geográfico de las cianobacterias que dieron los resultados de BLAST más cercanos a los aislados procedentes del panel solar.

Resultado BLAST	en	Localización	Descripción del lugar	Referencia
<i>Oculatella coburnii</i> WJT66-NPBG6A		Parque Nacional Joshua Tree, Desierto de Mojave, California, EE.UU.	Costra de suelo biológica bien desarrollada con algas, líquenes y musgos. Plena luz solar y suelo desértico.	Osorio-Santos <i>et al.</i> , 2014
<i>Oculatella mojaviensis</i> 3BRIN-NPC87	CMT-	Parque Nacional Joshua Tree, Desierto de Mojave, California, EE.UU.	Costra de suelo biológica bien desarrollada con algas, líquenes y musgos. Plena luz solar y suelo desértico.	Osorio-Santos <i>et al.</i> , 2014
<i>Oculatella ucrainica</i> KZ-5-4-1		Costa del Mar de Azov, Reserva Natural de Kazantip, cordón litoral del Lago Aqtash, Ucrania	Playa Coquina, a 10 m de la orilla del agua, costras de cianobacterias-algas.	Mikhailyuk <i>et al.</i> , 2016
Cyanobacterium WJT24-NPBG12B / <i>Myxacorys californica</i> WJT24-NPBG12B		Parque Nacional Joshua Tree, California, EE.UU.	Suelo arenoso y pedregoso de afloramientos graníticos, plantas y costras de algas bien desarrolladas.	Pietrasiak <i>et al.</i> , 2019
<i>Pseudophormidium</i> sp. FI6-MK20 / <i>Myxacorys californica</i> FI6-MK20		Fort Irwin, California, EE.UU.	Comunidad no perturbada de <i>Larrea</i> y <i>Ephedra</i> , lugar seco con suelos graníticos.	Johansen <i>et al.</i> , 2001
<i>Pseudophormidium</i> sp. CMT-1FSIN-NPC23/ <i>Myxacorys californica</i> CMT-1FSIN-NPC23		Reserva Nacional de Mojave, EE. UU.	Suelos arenosos y pedregosos con algunas costras biológicas, pocas plantas.	Pietrasiak <i>et al.</i> , 2019
<i>Leptolyngbya</i> RV74	sp.	No disponible	No disponible.	No disponible
<i>Chroococidiopsis</i> sp. CENA240		Agua dulce, Cisterna Canindé, Ceará, Brasil	Caatinga, region semiárida.	Costa <i>et al.</i> , 2016
<i>Chroococidiopsis</i> sp. CENA246		Agua dulce, Cisterna Canindé, Ceará, Brasil	Caatinga, region semiárida.	Costa <i>et al.</i> , 2016
<i>Chroococidiopsis</i> sp. CCNUC1		Universidad Normal de China Central (CCNU), China	Musgo árido y húmedo en la piedra caliza del bosque	Z. Zhang <i>et al.</i> , 2019
<i>Chroococidiopsis</i> sp. CCNUC3		Universidad Normal de China Central (CCNU), China	Musgo árido en piedra caliza del bosque.	Z. Zhang <i>et al.</i> , 2019
<i>Chroococidiopsis</i> sp. SAG 2025		Ewa Plain, Hawaii	Endolítico de una roca de coral.	Schlösser y Friedl, 2000
<i>Chroococidiopsis</i> sp. YRS 4a		Sri Lanka	No disponible.	Wanigatunge <i>et al.</i> , 2014

Para los aislados de los géneros *Oculatella*, *Leptolyngbya* y *Myxacorys* el crecimiento fue mejor o solo se llegó a apreciar en estático. Para el aislado B1 y B6 se observó crecimiento en agitación, aunque no fue mejor que en estático. Por otro lado, el crecimiento de estas cianobacterias requería disgregar un poco el cultivo para observar crecimiento, lo que dificultaba en gran medida su manejo. En cuanto a las microalgas, *Coelastrella* sp. D14 y *Diplosphaera chodatii* B7 ambas crecieron bien en agitación.

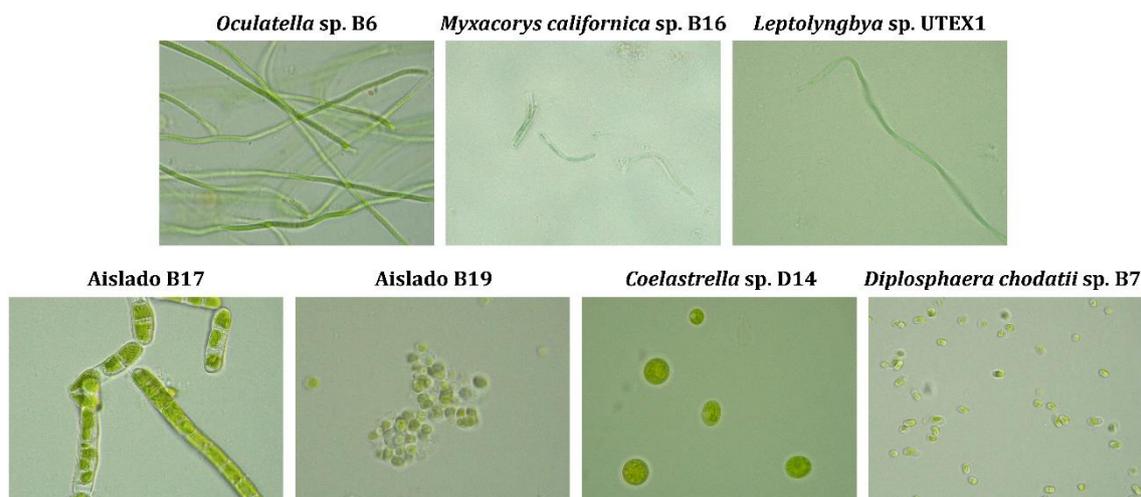


Figura R.1.3. Fotografías al microscopio (100X) de algunos de los aislados procedentes del panel solar.

A raíz de todos los estudios de crecimiento, se observó que prácticamente todos los aislados que formaban agregados, no crecían en agitación y las tasas de crecimiento eran muy bajas. Esto, sumado a la formación de césped en placa, limitaba en gran medida el trabajo con estos aislados. En cambio, los aislados unicelulares crecieron prácticamente todos en agitación. Teniendo todo esto en cuenta, y las características deseables para trabajar en el laboratorio (Introducción, Tabla I.1) se decidió trabajar con los aislados *Chroococcidiopsis* sp. B11, B13, B14 y B15, capaces de crecer formando colonias (Figura R.1.4). Aunque en cuanto a morfología y comportamiento el aislado B19 parecía tratarse de *Chroococcidiopsis*, no se pudo llegar a establecer el género. Por otro lado, *Coelastrella* sp. D14 y *Diplosphaera chodatii* B7 tenían un crecimiento rápido y también formaban colonias, pero se dejaron fuera del estudio en más detalle en esta Tesis Doctoral por tratarse de algas, y no de cianobacterias.

Tabla R.1.6. Condiciones de crecimiento de los aislados cianobacterianos.

Aislado	Crecimiento			
	Forma al microscopio	Tipo	Sin agitación	Agitación
B1	Filamentosa	Agregación	++	+/-
B2	Filamentosa	Agregación	++	-
B5	Filamentosa	Agregación	++	-
B6	Filamentosa	Agregación	++	+/-
B7	Unicelular	No agrega	+	+
B10	Filamentosa	Agregación	+/-	+/-
B11	Coco	No agrega	+	++
B13	Coco	No agrega	+	++
B14	Coco	No agrega	+	++
B15	Coco	No agrega	+	++
B16	Filamentosa	Agregación	+/-	+/-
B17	Filamentosa	Agregación	+	-
B19	Coco	No agrega	+	++
D14	Unicelular	No agrega	+	++
UTEX1	Filamentosa	Agregación	+/-	-

++: muy bueno, + bueno, +/- aceptable, - no crece

Puesto que estos aislados de cianobacterias presentaban otras bacterias contaminantes, se realizó un aislamiento exhaustivo en placas de BG11, realizándose varios pases sin éxito. Aunque en un primer momento se pensó en la posibilidad de que se tratase de una asociación bacteria-cianobacteria obligada, en la bibliografía se ha destacado la dificultad de aislamiento de las cianobacterias como consecuencia de la diferencia de tasas de crecimiento y por la presencia de compuestos en la membrana de éstas que pueden servir de sustrato a las bacterias contaminantes. Por otro lado, también se observó que en medio LB y TGY las contaminaciones tenían color, mientras que en BG11 lo perdían, haciendo difícil su observación a la hora de aislar las cianobacterias. Por este motivo, se pasó a realizar el aislamiento en placas de BG11 con 5% de LB. Tras 6 pases, se consiguieron obtener de forma axénica *Chroococidiopsis* sp. B11, B13, B14, B15; mientras que para el aislado B19 no se consiguió eliminar todas las bacterias presentes. Finalmente, tras verificar que los aislados eran axénicos (2.2.2.1. Aislamiento de cianobacterias), se continuó el trabajo posterior de caracterización y posible aplicación biotecnológica con estas cuatro cepas (en adelante, cepas Helios o *Chroococidiopsis* sp. Helios).

3.2. Caracterización fisiológica del crecimiento de *Chroococcidiopsis* sp. Helios

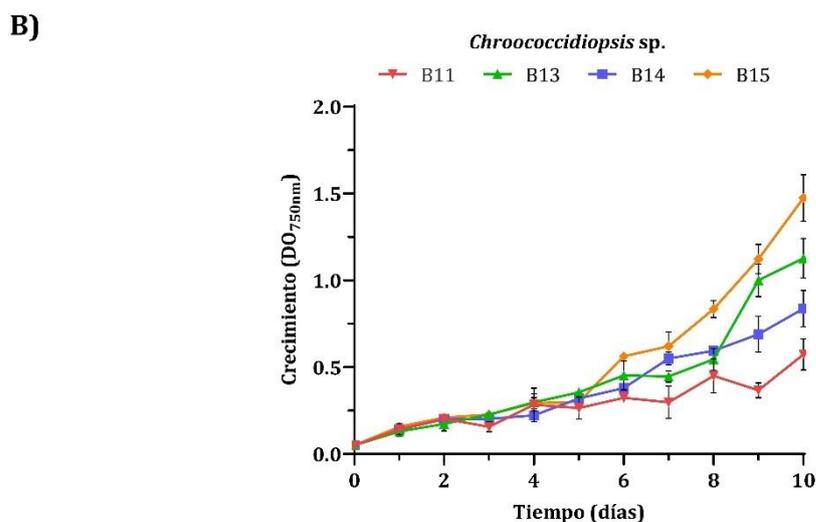
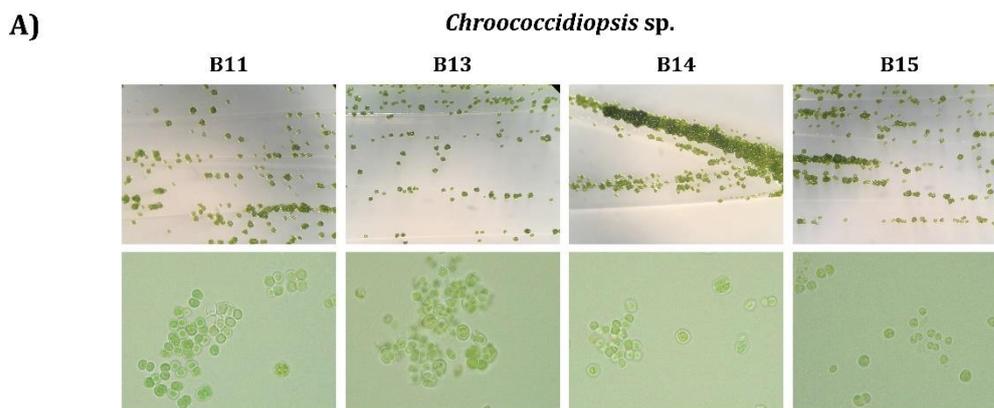
Una vez obtenidas las cianobacterias axénicas se llevó a cabo una caracterización fisiológica de las mismas en diferentes condiciones de crecimiento (Figura R.1.4). En primer lugar, se midió la DO_{750nm} de cultivos de *Chroococcidiopsis* sp. B11, B13, B14 y B15 durante 10 días en las condiciones habituales de mantenimiento; esto es: medio BG11 a pH 7.5, 30°C, agitación de 150rpm e iluminancia constante de 100 $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2\text{s}$ (Figura R.1.4B). Las 4 cepas tuvieron un crecimiento más o menos similar entre sí, siendo la cepa B11 la de crecimiento más lento y un tiempo de duplicación de 6.7 días. *Chroococcidiopsis* sp. B15 tuvo una tasa de crecimiento menor a las otras, con tiempos de duplicación de 2.4 días. En todos los casos, la fase de latencia fue de 6 días (Figura R.1.4B).

En cuanto a la morfología al microscopio, no se observó una variación notable en tamaño y morfología entre las diferentes *Chroococcidiopsis* (Figura R.1.4A). Todas las cepas presentaban un color verde pálido, eran redondeadas y tendían a agruparse principalmente en pares o tétradas. *Chroococcidiopsis* sp. B13 fue el aislado que tuvo más tendencia a agregarse, formando siempre tétradas durante su crecimiento. Fue necesario someter a sonicación el cultivo antes de medir el crecimiento.

3.2.1. Crecimiento en diferentes condiciones de NaCl, pH y temperatura

La concentración de sales, el pH y la temperatura son factores claves en el crecimiento bacteriano. De cara a la posible aplicación biotecnológica de estas cianobacterias es importante determinar su capacidad de crecer en rangos más extremos a los utilizados de manera rutinaria en el laboratorio. Por este motivo, se realizaron ensayos de crecimiento de las cianobacterias con diferentes concentraciones de NaCl, pH y temperatura. Se midió la DO_{750nm} de cultivos de las cepas Helios durante 10 días en diferentes concentraciones de NaCl y pH en medio líquido.

En cuanto a los ensayos con NaCl, cabe señalar que el medio BG11 no contiene a esta sal (Tabla R.1.3). La adición de diferentes cantidades de NaCl en el medio no afectó a todas las cepas por igual, mostrándose diferencias (Figura R.1.5). En *Chroococcidiopsis* sp. B15, el crecimiento se vio claramente afectado incluso en las concentraciones de NaCl más bajas ensayadas. En *Chroococcidiopsis* sp. B11, el crecimiento no se vio afectado cuando se añadió 0.1 M y 0.25 M de NaCl al BG11. Por otro lado, la adición de NaCl al medio afectó el crecimiento de *Chroococcidiopsis* B13 y B14, que mostraron una reducción al aumentar la concentración de NaCl, especialmente a más de 0.25 M. No se observó el crecimiento de ninguna de las cepas a 1 M.



Aislado	Tiempo de duplicación (días)	Fase de latencia (días)	Relación nº células/mL y DO _{750nm}
<i>Chroococidiopsis</i> sp. B11	6.66 ± 1.55	6	Nºcel/mL = 8.199*10 ⁶ DO ₇₅₀ ; R ² = 0.95
<i>Chroococidiopsis</i> sp. B13	3.24 ± 0.30	6	Nºcel/mL = 1.017*10 ⁷ DO ₇₅₀ ; R ² = 0.97
<i>Chroococidiopsis</i> sp. B14	3.32 ± 0.30	6	Nºcel/mL = 4.025*10 ⁶ DO ₇₅₀ ; R ² = 0.93
<i>Chroococidiopsis</i> sp. B15	2.39 ± 0.21	6	Nºcel/mL = 1.058*10 ⁷ DO ₇₅₀ ; R ² = 0.90

Figura R.1.4. Crecimiento de las cepas Helios. **A)** Fotografías de las colonias en placas de BG11 (imágenes superiores) y fotografías al microscopio (imágenes inferiores). **B)** Curvas de crecimiento en BG11 a pH 7.5, 30°C y 100 μmol fotón/m²s. Las gráficas presentan el promedio de de DO_{750nm} correspondiente a tres réplicas biológicas junto con la desviación estándar. En la parte inferior se muestran los parámetros de crecimiento de cada *Chroococidiopsis* sp.

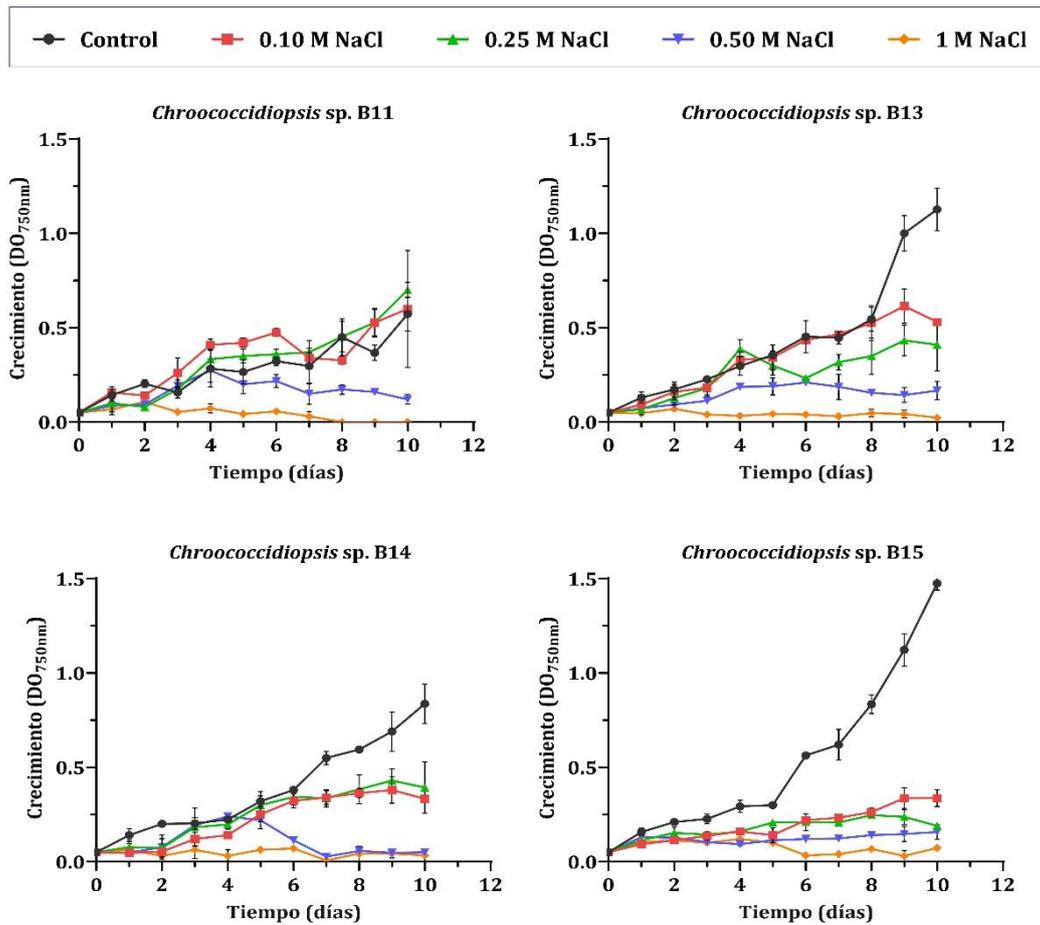


Figura R.1.5. Efecto de la concentración de NaCl en el crecimiento de las cepas de *Chroococidiopsis* sp. Como control, se utilizó el crecimiento en medio BG11, que no tiene NaCl. Las gráficas presentan el promedio de DO_{750nm} correspondiente a tres réplicas biológicas junto con la desviación estándar.

Por otra parte, el mejor pH para crecer las distintas cianobacterias fue 7.5 (control), ya que el tiempo de duplicación fue menor en esas condiciones (Figura R.1.6). *Chroococidiopsis* sp. B13 toleró un pH 9, aunque la DO_{750nm} alcanzada fue más baja que el control. Para *Chroococidiopsis* sp. B11, B14 y B15 no se detectó crecimiento cuando se cambió el pH, aunque algunos cultivos no perdieron el color (Figura R.1.6).

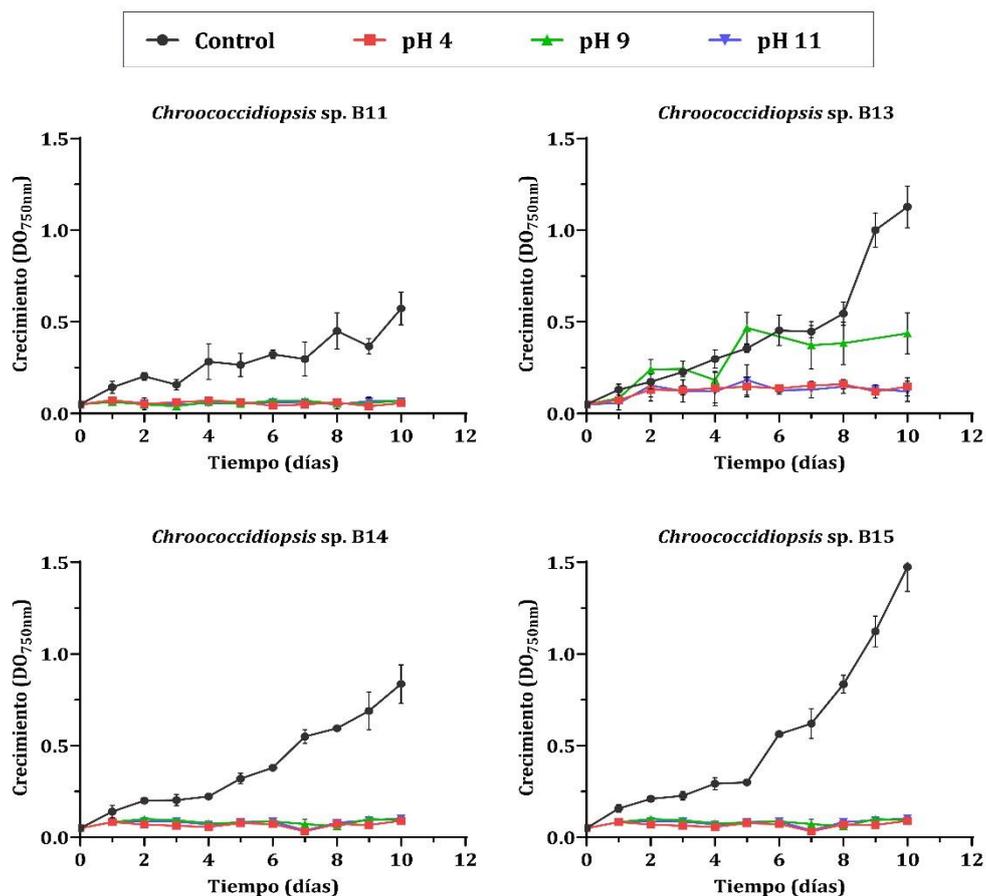


Figura R.1.6. Efecto del pH en el crecimiento de las cepas de *Chroococidiopsis* sp. Se usó BG11 tamponado con Tris 10 mM pH 4, pH 9 y pH 11 en lugar de HEPES 7.5 10 mM (Control). Las gráficas presentan el promedio de DO_{750nm} correspondiente a tres réplicas biológicas junto con la desviación estándar.

Otro de los aspectos de interés de estas cianobacterias es su posibilidad de crecer o mantenerse viables a temperaturas altas y bajas, ya que en el ambiente del que provienen, la temperatura fluctúa bastante. Se midió la DO_{750nm} de cultivos las cepas Helios tras 7 días de crecimiento a 4°C, 40°C y 50°C, empleando 30°C como control y una DO_{750nm} inicial de 0.2 (Figura R.1.7). El cambio de temperatura afectó mucho al crecimiento de las distintas cepas de *Chroococidiopsis* sp. Ninguna de las cepas pudo crecer a 50°C y los cultivos perdieron el color y quedaron blancos al segundo día del experimento. Sin embargo, a 40°C, aunque no se observó un aumento notable de la DO_{750nm} a los 7 días, los cultivos se mantuvieron verdes. A 4°C, los cultivos se mantuvieron viables, pero no se observó crecimiento (Figura R.1.7).

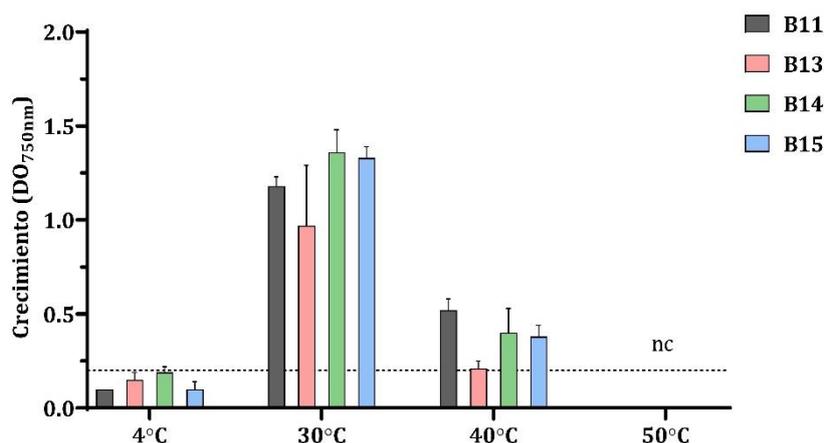


Figura R.1.7. Crecimiento de las cepas de *Chroococcidiopsis* sp. a diferentes temperaturas. DO_{750nm} observada después de 7 días de crecimiento. La DO_{750nm} inicial utilizada fue de 0.2 (línea discontinua). nc: sin crecimiento. Las gráficas presentan el promedio de DO_{750nm} correspondiente a tres réplicas biológicas junto con la desviación estándar.

3.2.2. Crecimiento con diferentes fuentes de nitrógeno y heterotrófico

Como fuente de nitrógeno para cultivar las diferentes cepas de *Chroococcidiopsis* sp., se empleó inicialmente nitrato (BG11, Tabla R.1.3). Si bien algunas *Chroococcidiopsis* sp. pueden obtener el nitrógeno mediante fijación en condiciones de laboratorio microaeróbicas (Boison *et al.*, 2004; Bothe, 2019), otras cepas requieren de una fuente de nitrógeno combinada como NO_3^- , NH_4^+ o nitrógeno orgánico (Billi y Caiola, 1996). Por este motivo, en este trabajo, se evaluaron otras fuentes de nitrógeno alternativas al $NaNO_3$, presente en el medio BG11. Además, poder utilizar otras fuentes de nitrógeno distintas a $NaNO_3$ es relevante desde el punto de vista industrial, ya que abre la posibilidad al crecimiento de estas cianobacterias en aguas ricas en otros compuestos nitrogenados, como por ejemplo la urea.

La Figura R.1.8 muestra la DO_{750nm} final después de 10 días usando fuentes alternativas de nitrógeno. Ninguno de los aislamientos pudo crecer sin ninguna fuente de nitrógeno ($BG11_0$), lo que puede deberse a que la capacidad de fijar N_2 atmosférico no sea posible en las condiciones probadas. El crecimiento detectado en amonio también es muy bajo, similar al observado en N_2 . Sin embargo, aunque todas las cepas alcanzan la mayor DO_{750nm} con nitrato, parece que también se puede utilizar urea como fuente de nitrógeno para algunos *Chroococcidiopsis* sp. ya que en la cepa B13, la DO_{750nm} observada en urea fue similar a cuando se utiliza $NaNO_3$.

Por otro lado, considerando que la urea puede ser abundante en algunas aguas residuales, probamos el crecimiento de las diferentes cepas en BG11 con diferentes concentraciones de este compuesto (Figura R.1.9). En *Chroococcidiopsis* sp. B15, la adición de urea afectó el crecimiento, pero este efecto no se observó en *Chroococcidiopsis* sp. B11, B13 y B14. Estos resultados muestran que, aunque la urea no puede reemplazar al $NaNO_3$ como fuente de nitrógeno, para las cepas B11 y B14 no es tóxico, mientras que para la B15 sí lo es.

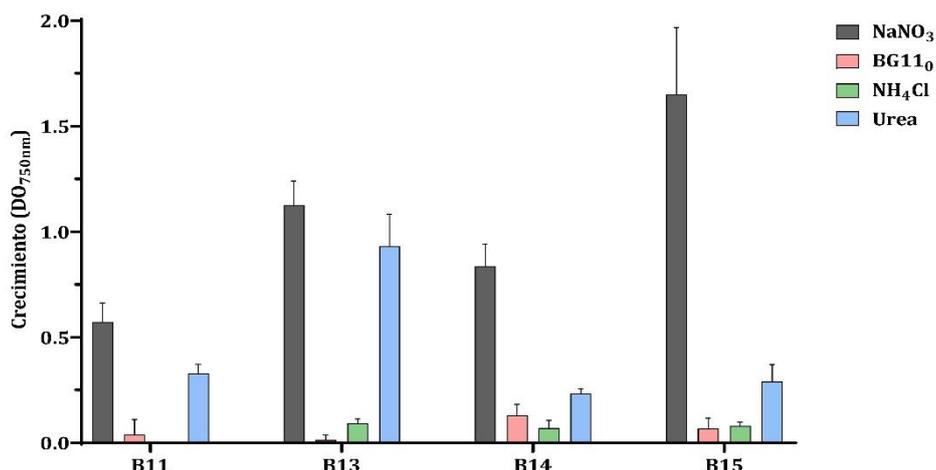


Figura R.1.8. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento de las cepas de *Chroococidiopsis* sp. Medida de la DO_{750nm} después de 7 días de crecimiento utilizando diferentes fuentes de nitrógeno. El NaNO₃ en BG11 (16 mM) se sustituyó por urea o NH₄Cl (16 mM), o no se añadió nitrógeno (BG11₀). La gráfica presenta el promedio de DO_{750nm} correspondiente a tres réplicas biológicas junto con la desviación estándar.

En resumen, como se ha mostrado en las [Figura R.1.8](#) y [R.1.9](#), las cepas Helios necesitan una fuente de nitrógeno para crecer que se puede obtener a partir de nitratos, urea o ambos combinados y el tipo de fuente afecta al crecimiento de diferente modo según la cepa considerada.

Finalmente, se probó el crecimiento heterotrófico de las cepas Helios. Se empleó glicerol y ocho azúcares diferentes a 10 mM en medio BG11 agar, en oscuridad completa y con el inhibidor de la fotosíntesis DCMU a una concentración final de 10 μM durante 30 días ([Tabla R.1.7](#)). Con respecto a la glucosa, se observa un crecimiento débil en todas las cepas. Para la fructosa se observaron algunas colonias en *Chroococidiopsis* sp. B13 y B14, pero no en B11 y B15. Por otro lado, todas las cepas Helios pudieron crecer heterotróficamente en presencia de los disacáridos sacarosa y maltosa. Por el contrario, no se detectó crecimiento en manosa, galactosa, arabinosa y glicerol para todas las cepas probadas.

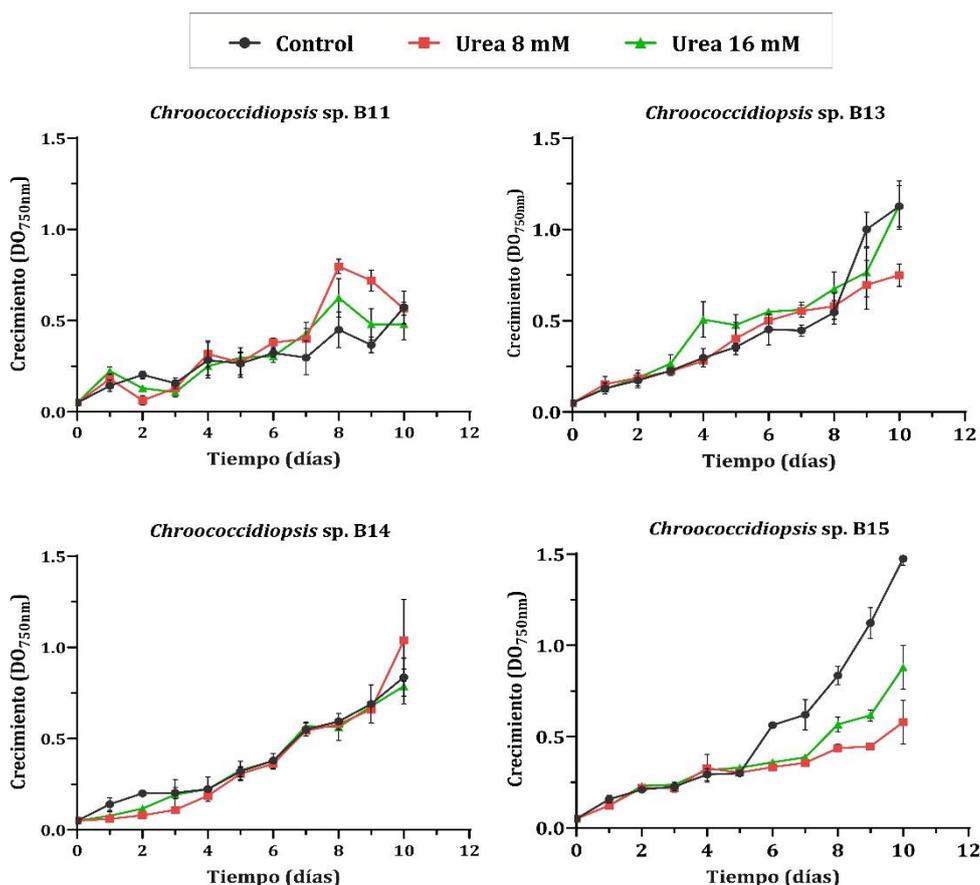


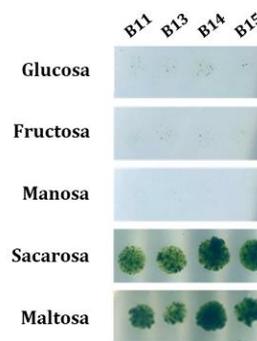
Figura R.1.9. Tolerancia a la urea sobre el crecimiento de las cepas de *Chroococcidiopsis* sp. Se añadió urea a 8 y 16 mM al medio completo BG11. Las gráficas presentan el promedio de DO_{750nm} correspondiente a tres réplicas biológicas junto con la desviación estándar.

Tabla R.1.7. Crecimiento heterotrófico de las cepas de *Chroococcidiopsis* sp.

Fuente de carbono	<i>Chroococcidiopsis</i> sp.				
	B11	B13	B14	B15	
Monosacáridos	Glucosa	+/-	+/-	+/-	+/-
	Fructosa	-	+/-	+/-	-
	Manosa	-	-	-	-
	Galactosa	-	-	-	-
	Arabinosa	-	-	-	-
Disacáridos	Sacarosa	+	+	+	+
	Maltosa	+	+	+	+
	Lactosa	-	-	-	-
Alcohol	Glicerol	-	-	-	-

+: crecimiento robusto; +/- pequeñas colonias; - no hay crecimiento

La imagen representa el crecimiento obtenido para cada cianobacteria tras un mes.



3.2.3. Composición en polisacáridos y formación de biopelículas

Uno de los aspectos llamativos en el aislamiento inicial de las cianobacterias de la muestra del panel solar fue la producción de sustancias extracelulares. En el caso de algunos aislados, la producción era muy llamativa haciendo difícil su disgregación y manejo. Por otra parte, las dificultades en el aislamiento de las cepas escogidas también pudieron ser debidas a la producción y presencia extracelular de estas sustancias.

Con la finalidad de comparar entre las cepas escogidas, se realizó una cuantificación de los polisacáridos en crecimiento estático de las distintas cepas de *Chroococcidiopsis* sp. (Figura R.1.10). Hubo pocas diferencias entre los aislados, aunque *Chroococcidiopsis* sp. B15 presentó un 6.22% de contenido en polisacáridos, lo que suponía casi la mitad que en *Chroococcidiopsis* sp. B11, B13 y B14 (10.32-12.43%) (Figura R.1.10A). Por otro lado, se midió la capacidad de las cepas de *Chroococcidiopsis* sp. para formar biopelículas (Figura R.1.10B). La única cepa que formaba biopelículas en las condiciones ensayadas fue *Chroococcidiopsis* sp. B11, que dio valores similares al control y *S. elongatus* 7942. Las otras cepas fueron capaces de formar biopelículas después de 3 días sin agitación.

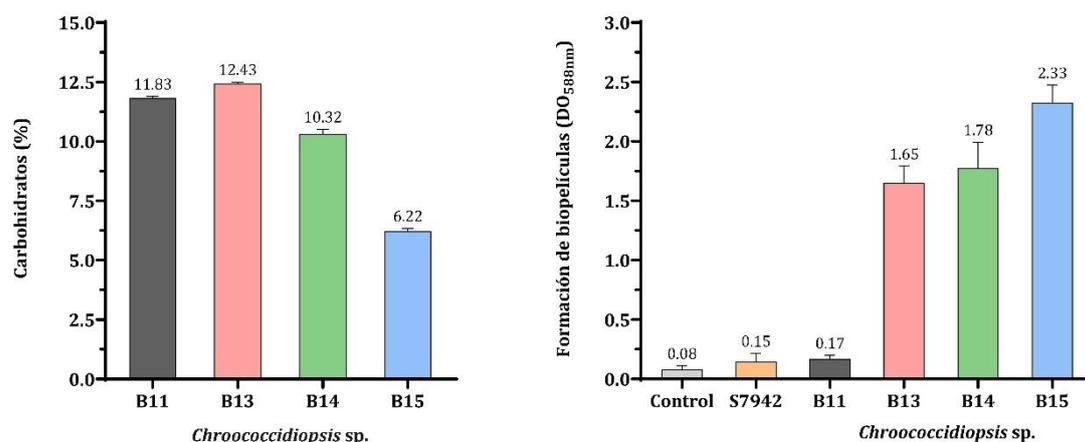


Figura R.1.10. Contenido de carbohidratos (A) y producción de biopelículas (B) de las cepas de *Chroococcidiopsis* sp. En A), las barras muestran el total de carbohidratos sobre el peso seco (%). En ambas gráficas se presenta el promedio y desviación estándar correspondiente a tres réplicas técnicas (A) y biológicas (B).

3.3. Estudio de propiedades extremófilas asociadas al panel solar

El interés en el aislamiento de microorganismos procedentes de un panel solar se centraba en buscar bacterias resistentes a radiación y a desecación para poder desarrollar distintas aplicaciones biotecnológicas. A diferencia de gran cantidad de trabajos que estudian y caracterizan bacterias procedentes de comunidades microbianas presentes en desiertos, en Dorado-Morales *et al.*, 2016 y durante el proyecto HELIOS, se estudiaron las bacterias presentes en paneles solares.

3.3.1. Ensayo de resistencia a desecación

Teniendo en cuenta que un panel solar está sujeto a una falta periódica de agua, investigamos la tolerancia a la desecación de las cepas Helios y otros aislados de la placa solar. En una primera aproximación para estudiar la resistencia a desecación de las cianobacterias, se realizaron varios ensayos sobre membranas mantenidas a 37°C y con una humedad de 12-15%. No obstante, no se recuperaron cianobacterias de las membranas (datos no mostrados). Dado que los géneros aislados se han descrito como resistentes a desecación por mucho tiempo, y que los ensayos descritos en la bibliografía suelen realizar la desecación más lentamente y con porcentajes de humedad superiores, se realizó un ensayo de desecación similar al descrito en Katoh *et al.*, 2003 (2.4.3. Ensayo de resistencia a desecación).

Los cultivos de *Chroococidiopsis* sp. se sembraron y se sometieron a deshidratación durante 3 meses, 7 meses y 1 año. Para este último tiempo, las placas se mantuvieron con luz tenue (10 $\mu\text{mol fotón/m}^2\text{s}$) o con la luz habitual de crecimiento (100 $\mu\text{mol fotón/m}^2\text{s}$). Pasado el tiempo de desecación, las placas se rehidrataron y las cianobacterias se cultivaron en BG11, empleándose como control de no desecación, cultivos frescos (Figura R.1.11A y B). En cuanto a su supervivencia a desecación, en términos de capacidad para formar colonias y crecer, las cepas de *Chroococidiopsis* sp. Helios rehidratadas diferían poco de los controles no sometidos a desecación incluso en los tiempos más largos. Estos resultados indicaron que todas las cepas son resistentes a la desecación. Por el contrario, el control negativo en el ensayo, *Synechocystis* sp. PCC 6803, no creció tras 3 meses de desecación (Figura R.1.11C). Por otro lado, el efecto de la luz fue negativo para los cultivos secos, ya que las placas mantenidas en las condiciones utilizadas para el mantenimiento del crecimiento mostraron colonias azules, que no crecieron después de la rehidratación (Figura R.1.11D).

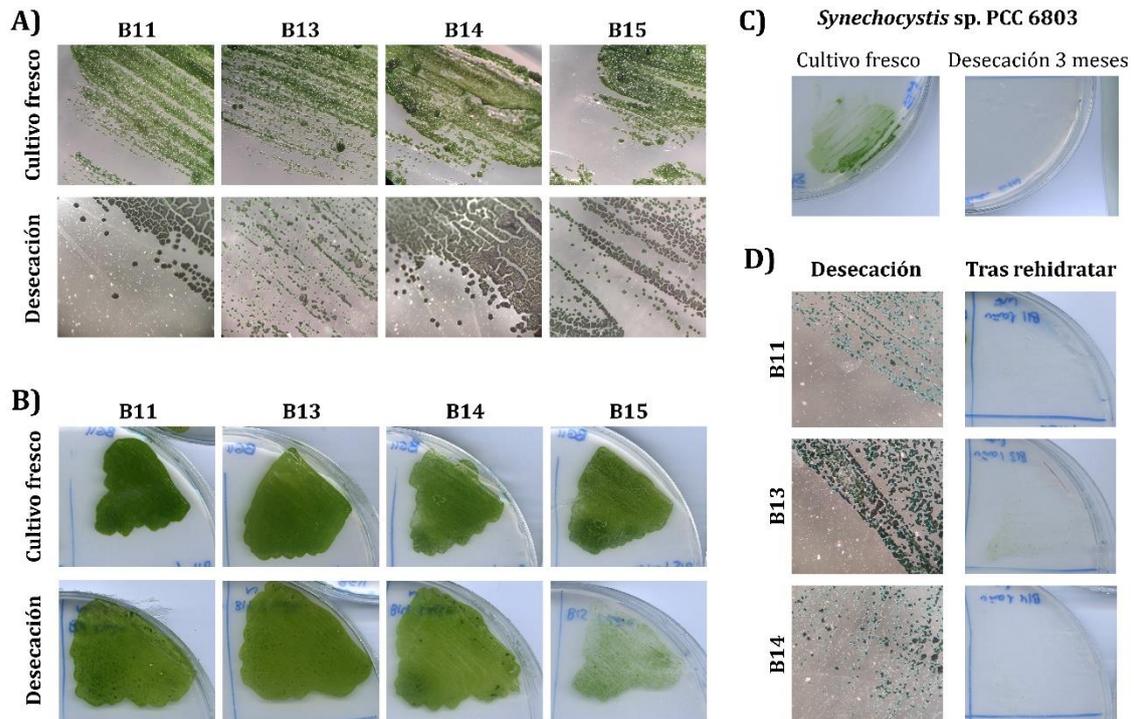


Figura R.1.11. Tolerancia a la desecación a largo plazo en cepas de *Chroococcidiopsis* sp. **A)** Colonias frescas y en desecación 1 año de las cepas Helios. **B)** Crecimiento observado 2 semanas después de rehidratar los cultivos desecados (1 año) de las cepas Helios. **C)** *Synechocystis* 6803 como control negativo de la desecación (3 meses). **D)** Supervivencia de varias cepas de *Chroococcidiopsis* sp. mantenidas en desecación en condiciones de luz normal ($100 \mu\text{mol fotón}/\text{m}^2\text{s}$) durante 1 año.

Para el primer tiempo de desecación ensayado, de 3 meses, además de las cepas de *Chroococcidiopsis* sp., se probaron todos los demás aislados que se tenían del panel solar. Se observó el mismo resultado para casi todos los aislamientos del panel solar, incluidas las microalgas *Diplosphaera chodatii* B7 y *Coelastrella* sp. D14 (Figura R.1.12). Cabe señalar que además de las cepas de *Chroococcidiopsis* sp. solo las dos microalgas se mantenían de manera axénica. Por lo que, en el resto de aislados del panel solar, la resistencia a desecación podía deberse a la cianobacteria, a las bacterias asociadas, o a la interacción entre los distintos microorganismos en consorcio.

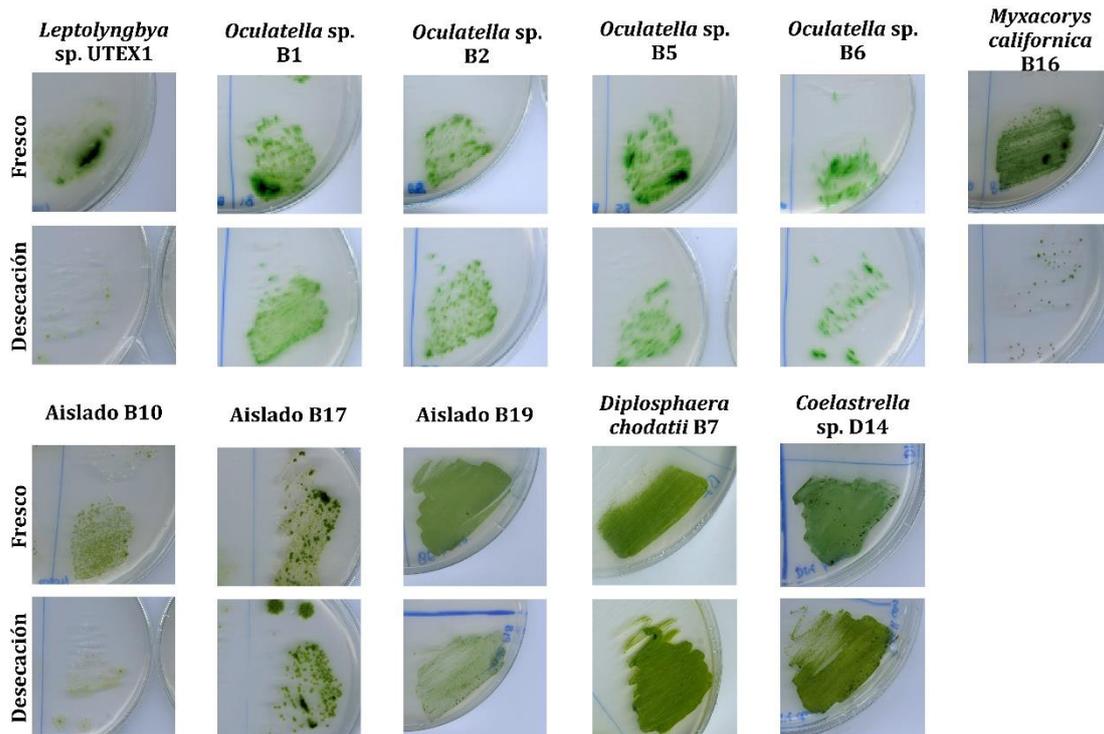


Figura R.1.12. Crecimiento tras 3 meses de desecación del resto de los aislados del panel solar. Como control, se sembraron cultivos frescos al mismo tiempo que se sembraron las muestras rehidratadas. Los resultados muestran el crecimiento obtenido 3 semanas después de la rehidratación.

3.3.2. Ensayo de resistencia a exposición UV-C

Al igual que la resistencia a desecación, también se estudió la supervivencia de estas cianobacterias a altas dosis de radiación. Para evaluar la resistencia a radiación de las cepas de *Chroococidiopsis* sp. se empleó radiación UV. Por lo general en cianobacterias la resistencia a radiación UV suele ser superior a muchos microorganismos, ya que habitan hábitats con iluminación constante por lo que suelen presentar mecanismos para evitar o contrarrestar el daño producido (Singh, 2018). La radiación UV se puede dividir en radiación UV-A (320-400 nm), UV-B (280-320 nm) y UV-C (100-280 nm). Esta última no llega a la superficie de la Tierra debido a la presencia de la capa de ozono, por lo que la mayor parte de microorganismos carece de mecanismos de defensa frente a ella. No obstante, esta radiación es de importante interés de cara a aplicaciones en astrobiología.

Se realizaron ensayos de resistencia a radiación UV-C con las cuatro cepas *Chroococcidiopsis* sp., utilizando *E. coli* como control negativo y *S. elongatus* 7942 como control positivo de resistencia moderada (Figura R.1.13). Todas las cianobacterias exhibieron tasas de supervivencia similares, superiores al 20% para B14 e incluso por encima del 50% para el resto. Por otro lado, las cepas empleadas como control exhibieron tasas de supervivencia a UV-C menores que las *Chroococcidiopsis* sp. Helios. Para *S. elongatus* 7942 fue más moderada, manteniéndose en 1% para 500 J/m². En cambio, para *E. coli*, la viabilidad cayó a menos de un 0.1% para la dosis ensayada más baja (250 J/m²) (Figura R.1.13). Los datos obtenidos con *Chroococcidiopsis* sp. Helios demostraron que, en las condiciones empleadas, las cepas Helios tienen un comportamiento similar a otras cianobacterias y resisten dosis más altas que *E. coli* y *S. elongatus* 7942.

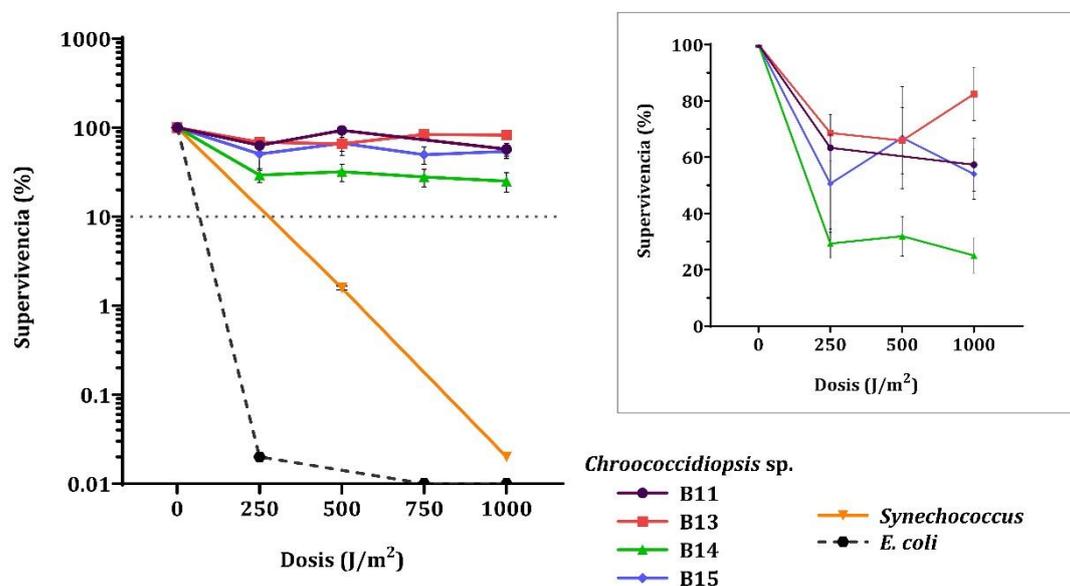


Figura R.1.13. Viabilidad de los cultivos de cianobacterias tras la exposición a radiación UV-C. Las gráficas presentan el promedio de tres réplicas biológicas junto con la desviación estándar. *Synechococcus*: *S. elongatus* 7942.

3.4. Análisis *in silico* de clústeres génicos con posible interés biotecnológico

3.4.1. Propiedades generales de los genomas de *Chroococcidiopsis* sp. Helios

El género *Chroococcidiopsis* se aísla frecuentemente de desiertos y hábitats terrestres en los que la escasez de agua es característica. Con el objetivo de buscar clústeres de interés biotecnológico se secuenciaron los genomas de las cuatro cepas de *Chroococcidiopsis* sp. aisladas. Los datos de anotación preliminares para los diferentes genomas se enumeran en la Tabla R.1.8.

Tabla R.1.8. Características generales de los genomas de *Chroococidiopsis* sp. Helios

Características ^a	B11	B13	B14	B15
Tamaño	6,949,445	7,947,295	7,003,109	6,921,170
Contenido en GC (%)	44.7	47.4	44.9	44.6
N ^o N50	117881	90885	106742	84852
L50	18	20	19	26
N ^o de <i>contigs</i>	243	1893	392	208
N ^o de subsistemas	305	315	304	301
N ^o de secuencias codificantes (CDS)	7291	9479	7458	7218
N ^o de ARN	50	57	50	49
Secuencias no hipotéticas ^b	3455 (47.39%)	3672 (38.74%)	3470 (46.52%)	3259 (45.15%)
Secuencias hipotéticas ^b	3836 (52.61%)	5807 (61.26%)	3988 (53.48%)	3956 (54.85%)

^aDatos proporcionados por RAST, <https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>, ^b Considerando 100% el N^o de secuencias codificantes.

El tamaño de los genomas preliminar fue similar para las cuatro cepas, de entre 6.9-7.9 Mb, con un contenido en GC de entre 44.6-47.4%. En cuanto al número de *contigs*, la cepa B13 dio el mayor número, 1893 *contigs*; mientras que para las otras tres se obtuvieron valores inferiores de 392 *contigs* para *Chroococidiopsis* sp. B14, y poco más de 200 *contigs* para las cepas B11 y B15. El análisis RAST para *Chroococidiopsis* sp. B13 mostró la presencia de 9479 secuencias codificantes, de los cuales 3672 estaban relacionados con proteínas no hipotéticas (38.74%) y 5807 con proteínas hipotéticas (61.26%). Para las otras tres cepas, el número de secuencias codificantes fue entre 7200-7450, con una media de 46.35% de secuencias relacionadas con proteínas no hipotéticas (Tabla R.1.8). Por otro lado, el análisis realizado en RAST encontró que las secuencias codificantes estaban asociadas con varios subsistemas, alrededor de 300 en todas las cepas. Finalmente, los resultados visualizados en RAST mostraron que, en general para las cuatro cepas, los subsistemas con mayor número de genes están relacionados con la producción de cofactores, vitaminas, grupos protésicos, pigmentos, metabolismo de proteínas, aminoácidos y carbohidratos (Figura R.1.14).

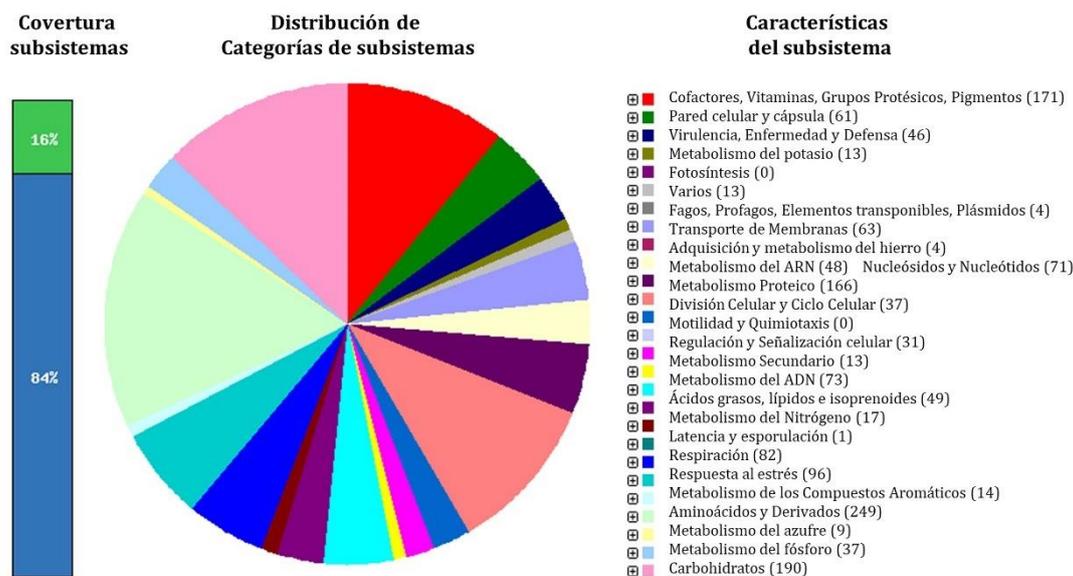


Figura R.1.14. Categorías de subsistemas del genoma de *Chroococcidiopsis* sp. B15 anotadas por RAST.

En la base de datos del NCBI existen un total de 6 genomas de cepas de *Chroococcidiopsis*, de los cuales solo uno está completamente cerrado; el resto está constituido por más de un *contig* (Tabla R.1.9). Los resultados obtenidos en cuanto a tamaño y % en GC de *Chroococcidiopsis* sp. Helios son similares a los observados en este género.

Tabla R.1.9. Características generales de los genomas de *Chroococcidiopsis* spp. secuenciados presentes en bases de datos

Cianobacteria	Tamaño (Mb)	%GC	Contigs	CDS
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. CCALA 051	6.67	44.5	260	6047
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. FACHB-1243	6.92	44.4	125	6268
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. TS-821	5.23	43.4	74	4626
<i>Chroococcidiopsis cubana</i> CCALA 043	7.57	44.4	917	7133
<i>Chroococcidiopsis cubana</i> SAG 39.79	8.10	44.5	295	7520
<i>Chroococcidiopsis thermalis</i> PCC 7203	6.32	44.4	1	5784

^aLos números de acceso y las referencias de cada cepa se indican en la Tabla 1.

A partir de los datos de secuencias obtenidos, se realizó una búsqueda de diferentes genes de interés biotecnológico o implicados en posibles mecanismos de resistencia de *Chroococcidiopsis* sp. en el contexto del nicho ecológico en el que fueron aislados.

3.4.2. Identificación de genes responsables de la síntesis de pigmentos absorbentes de UV

Una de las propiedades más interesantes de las cianobacterias, especialmente de las especies extremófilas, es su capacidad para superar los efectos perjudiciales de la radiación ultravioleta. Un mecanismo clave en esta protección es la producción de compuestos absorbentes de rayos ultravioleta como el pigmento escitonemina y los aminoácidos tipo micosporinas (MAA) que sirven como fotoprotectores naturales (Derikvand *et al.*, 2017; Richa y SINHA, 2011). Ambos compuestos se encuentran en la matriz de exopolisacáridos y constituyen la primera línea de defensa contra la penetración de los rayos ultravioleta y el daño subsiguiente (Derikvand *et al.*, 2017; S. Wu *et al.*, 2021).

Los genes responsables de la biosíntesis de escitonemina se identificaron por primera vez en *Nostoc punctiforme* PCC 73102 por mutagénesis y comprende un clúster génico de 18 genes, divididos en cuatro módulos: *scy* (I), *trp* (II), *ebo* (III) y un módulo regulador (IV) (Ferreira *et al.*, 2018; Soule *et al.*, 2009). Brevemente, el proceso de síntesis de escitonemina implica (1) la formación del monómero a partir de aminoácidos aromáticos, (2) la oxidación y dimerización del monómero para formar el dímero de escitonemina en el periplasma, y (3) el transporte o difusión de este desde el periplasma a la matriz de exopolisacáridos (Figura R.1.15A) (X. Gao *et al.*, 2021; Soule *et al.*, 2009). Si bien en las reacciones comentadas participa el módulo *scy*, el clúster también presenta genes cuya función parece ser reguladora, así como otros que pueden estar involucrados en la síntesis de aminoácidos aromáticos (módulos *trp* y *ebo*), que se emplean como componentes básicos de este pigmento (A. Mishra *et al.*, 2015).

Se identificaron en las cepas Helios los genes responsables de la biosíntesis de escitonemina, empleando los genes descritos en *Nostoc punctiforme* PCC 73102 (Soule *et al.*, 2009). Prácticamente los componentes de los cuatro módulos se encuentran presentes en *Chroococcidiopsis* sp. Helios (Figura R.1.15B) (módulos *scy*, *trp*, *ebo* y regulador). Solo uno de los genes asociados a regulación (HH en Figura R.1.15B), que forman parte del módulo IV en *N. punctiforme* no se encontró en ninguna de las cepas Helios. Por otro lado, la organización genética de los diferentes módulos también cambió con respecto a *N. punctiforme*. Los módulos I y II, que aparecen consecutivos en el genoma de *N. punctiforme*, en *Chroococcidiopsis* sp. Helios se encontraban alternados con los genes del clúster *ebo* (módulo III). Esta disposición es la misma que en *Chroococcidiopsis thermalis* PCC 7203 (Figura R.1.15B). La escitonemina tiene diferentes aplicaciones, tanto a nivel cosmético como biomédico, por lo que es interesante disponer de cepas productoras o que puedan ser objeto de estudio (X. Gao *et al.*, 2021). Se debería realizar un estudio en profundidad para determinar la posible síntesis de este pigmento en las cepas Helios, así como las condiciones óptimas de producción.

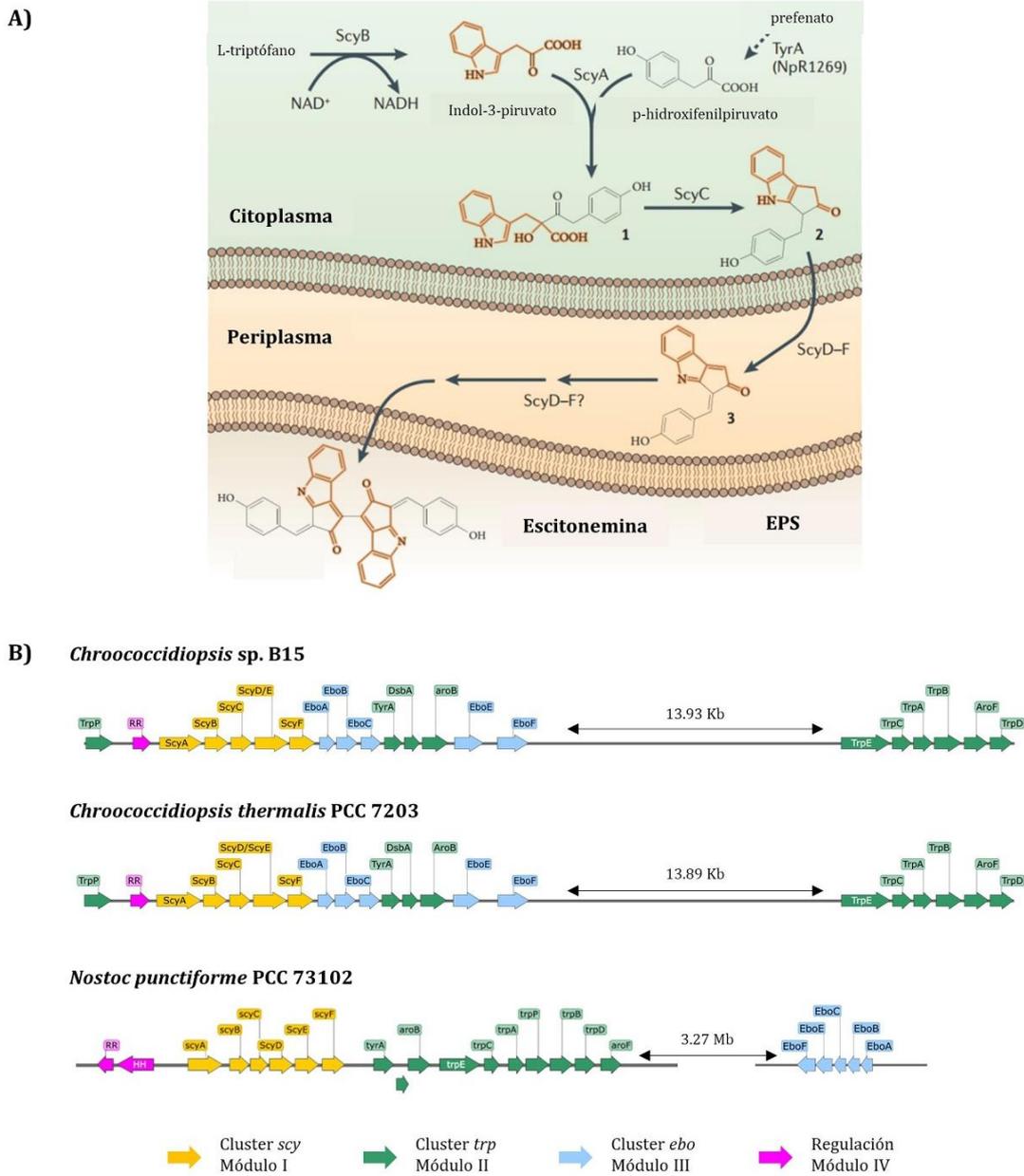


Figura R.1.15. Clústeres génicos asociados a la síntesis de la escitonemina en *Chroococcidiopsis* sp. Helios. A) Modelo de biosíntesis de la escitonemina. La síntesis comienza en el citoplasma a partir de triptófano y p-hidroxifenilpiruvato, catalizada por los productos de los genes *scyABC*. Los números en negrita se indican compuestos intermediarios. Las reacciones posteriores ocurren en el periplasma e incluyen la dimerización, produciendo finalmente escitonemina, que se acumula en la extracelularmente. Los mecanismos de transporte molecular aún no se han definido totalmente. Figura adaptada de Q. Gao y Garcia-Pichel, 2011. **B)** Organización genética de los genes responsables de la biosíntesis de la escitonemina y su regulación en diferentes cianobacterias. La organización de *Chroococcidiopsis* sp. B15 se ha escogido de manera representativa. El resto de las *Chroococcidiopsis* sp. Helios mantiene la misma organización.

Otros pigmentos frente a exposición UV, generalmente de tipo B, son los MAA, de los que existen varios tipos en función de la estructura que presenten. En las cianobacterias, se han caracterizado dos tipos de grupos de genes conservados para la síntesis de un MAA, la shinorina. En la síntesis de shinorina, están implicados los genes del clúster *mysABCD*. En el genoma de *Chroococcidiopsis* sp. Helios se encontraron los genes *mysA*, *mysB* y *mysC*, pero no *mysD*, tal como se ha descrito en *Chroococcidiopsis thermalis* (Derikvand *et al.*, 2017; Q. Gao y Garcia-Pichel, 2011; Shang *et al.*, 2019).

3.4.3. Identificación de genes relacionados con la síntesis de azúcares

Otro aspecto interesante desde el punto de vista de la resistencia a desecación es la producción de azúcares no reductores para combatir el estrés por falta de agua. La acumulación de trehalosa incrementa la tolerancia a desecación en varios microorganismos como algunas cepas de *Rhizobacterium*, *Microbacterium*, *Arthrobacter* o *Saccharomyces cerevisiae* (Esbelin *et al.*, 2018; Vílchez *et al.*, 2016). En cianobacterias tolerantes a la desecación también se ha observado una acumulación de altas cantidades de trehalosa y/o sacarosa en comparación con las cepas sensibles a la desecación en cepas de los géneros *Nostoc*, *Anabaena* y *Gloeocapsopsis*, entre otros (Azua-Bustos *et al.*, 2014; Shang *et al.*, 2019).

Si bien en otras cianobacterias resistentes a desecación se han llevado a cabo estudios de expresión y acumulación de trehalosa y sacarosa, estos ensayos son muy limitados en el género *Chroococcidiopsis*. Los genes relacionados con la síntesis de estos azúcares se han identificado en *Chroococcidiopsis* sp. CCMEE 029, cepa que ha mostrado ser resistente a irradiación, desecación y en condiciones similares a las encontradas en Marte (Baque *et al.*, 2013; Mosca *et al.*, 2021; Verseux *et al.*, 2017b). En Fagliarone *et al.*, 2020, realizaron estudios de acumulación de trehalosa y sacarosa en *Chroococcidiopsis* sp. CCMEE 029 y mostraron una mayor expresión de estos clústeres en desecación, dando como resultado una acumulación de 33 y 5 veces frente al control sin desecar de trehalosa y sacarosa, respectivamente (Fagliarone *et al.*, 2020).

En cianobacterias, la trehalosa se sintetiza a partir del glucógeno a través de α -1,1-maltooligosiltrehalosa, una reacción que puede ser catalizada por la maltooligosil trehalosa sintasa (EC 5.4.99.15), que está codificada por el gen *treY* y maltooligosil trehalosa trehalohidrolasa (EC 3.2.1.141), que está codificado por el gen *treZ* (Figura R.1.16) (Shimura *et al.*, 2015). Se realizó una búsqueda en el genoma de *Chroococcidiopsis* sp. Helios de los genes *treY* y *treZ*. El grupo de genes *treYZ* se encontró en todas las cepas, con una distribución similar a la encontrada en presentes en *Chroococcidiopsis thermalis*. Por otro lado, no se encontró el gen α -trehalasa (EC 3.2.1.28), que hidroliza una trehalosa a dos glucosas (*treH*) y que está presente en otras cianobacterias resistentes a desecación que acumulan este azúcar, como *Nostoc flagelliforme* o *Anabaena* 7120 (Murik *et al.*, 2017; Shimura *et al.*, 2015). De hecho, esta organización del clúster *treYZH* se conserva entre las especies de cianobacterias formadoras de heterocistos. No obstante, la ausencia del gen *treH* también se observó en dos cepas de *Leptolyngbya* tolerantes a la desecación (Shimura *et al.*, 2015). Por otro lado, especies aisladas del desierto pertenecientes al género *Scytonema*, también carecen de trehalasa, pero poseen

trehalosa fosforilasa (*treP*) (EC 2.4.1.64) que convierte la trehalosa en glucosa y glucosa 1-fosfato. Este gen se encuentra también en todos los genomas de *Chroococcidiopsis* sp. Helios.

Además del grupo de genes *treZY* para la síntesis de trehalosa, se identificaron en *Chroococcidiopsis* sp. Helios dos genes homólogos para trehalosa sintasa (*treS*) (EC 5.4.99.16) (Figura R.1.16. TreS puede convertir maltosa en trehalosa, y viceversa mediante transglucosilación intramolecular; no obstante, la función exacta de la proteína codificada por el homólogo *treS* no se conoce en cianobacterias (Shimura *et al.*, 2015). No obstante, se han encontrado homólogos en *Chroococcidiopsis thermalis* y *Chroococcidiopsis* sp. CCME 029, encontrándose una mayor expresión en desecación en esta última cepa (Fagliarone *et al.*, 2020). Por último, el análisis *in silico* no identificó ningún gen implicado en la vía TPS/TPP para la biosíntesis de trehalosa en *Chroococcidiopsis* sp. Helios, al igual que se observó en *Chroococcidiopsis* sp. CCME 029 (Fagliarone *et al.*, 2020).

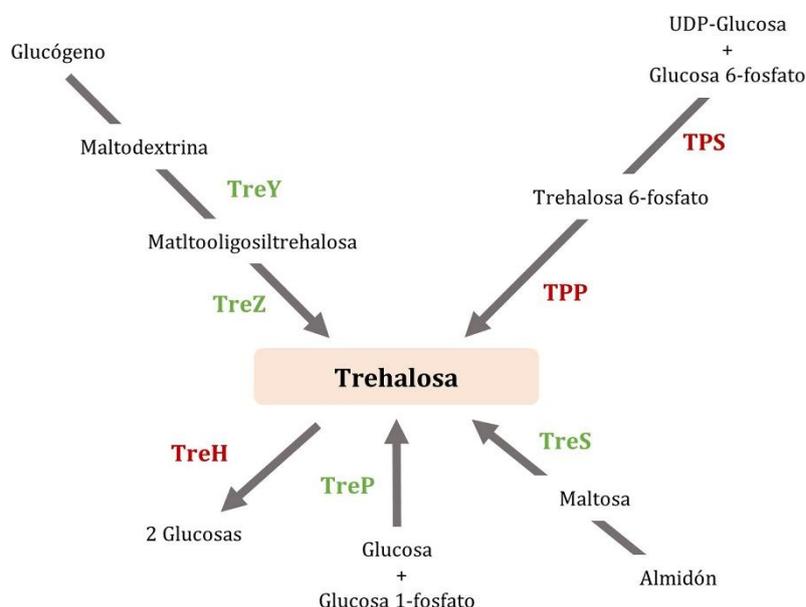


Figura R.1.16. Genes implicados en la síntesis de trehalosa en *Chroococcidiopsis* sp. Helios. Se muestran diversas rutas metabólicas que confluyen en la acumulación de trehalosa. Para cada paso se indican las enzimas implicadas, en verde y en rojo en función de si se han encontrado los genes responsables en *Chroococcidiopsis* sp. Helios o no, respectivamente. Abreviaturas: TreY, maltooligosil trehalosa sintasa; TreZ, maltooligosil trehalosa trehalohidrolasa; TreH, trehalosa hidrolasa; TS, trehalosa sintasa; TreP, trehalosa fosforilasa; TPS, trehalosa 6-fosfato sintasa; TPP, trehalosa 6-fosfato fosfatasa.

El análisis *in silico* del genoma de *Chroococcidiopsis* sp. CCME 029 identificó genes para la síntesis de sacarosa (Fagliarone *et al.*, 2020). Este azúcar se forma solo en plantas y cianobacterias y los últimos pasos están catalizados por la sacarosa 6-fosfato sintasa (*sps*) y la sacarosa 6-fosfato fosfatasa (*spp*). Por otro lado, la enzima sacarosa sintasa permite la síntesis de sacarosa a partir de fructosa y UDP-glucosa. En el genoma de *Chroococcidiopsis* sp. CCME 029 se encontraron los genes *sps*, *spp* y dos sacarosa sintasa (Fagliarone *et al.*, 2020); mientras que en *Chroococcidiopsis* sp. Helios, solo se encontraron los genes *spp* y una sacarosa sintasa. No obstante, empleando la sacarosa 6-fosfato sintasa de *Chroococcidiopsis* sp. CCME 029 (QJY30851.1) se encontraron en los genomas de las cuatro cepas, ORF con el dominio glucosiltransferasa de tipo 1 conservado de esta enzima (Coutinho *et al.*, 2003). Las similitudes entre estos genes hipotéticos para *sps* y el gen identificado en *Chroococcidiopsis* sp. CCME 029, fue del 86%. Resultados similares a los observados en el análisis de las cepas Helios y en *Chroococcidiopsis* spp. se han encontrado en otras cianobacterias resistentes a desecación como *Gloeocapsopsis* sp. ABB1 (Azua-Bustos *et al.*, 2014) y *Anabaena* y *Nostoc* spp. (Murik *et al.*, 2017; Shang *et al.*, 2019).

3.4.4. Identificación de genes implicados en la fijación de nitrógeno

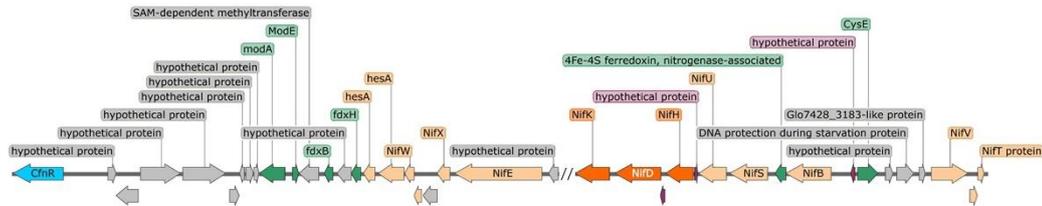
Como se ha comentado en la introducción, existen cianobacterias capaces de llevar a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico en unas células especializadas llamadas heterocistos. Estas células proporcionan condiciones microóxicas para la fijación por la nitrogenasa (Shimura *et al.*, 2015). No obstante, otras cianobacterias que no forman heterocistos también son capaces de fijar nitrógeno en condiciones determinadas como *Leptolyngbya*, *Gloeotheca* y *Chroococcidiopsis* (Bothe, 2019; Shimura *et al.*, 2015; Tomatsu *et al.*, 2018).

A nivel genético, en cianobacterias, los genes relacionados con la fijación de nitrógeno molecular y su regulación se encuentran en un clúster, con el nombre de *nif*. Las cianobacterias en las que se ha caracterizado mejor este clúster son *Anabaena variabilis* ATCC 29413, *Leptolyngbya boryana* cepa dg5 y *Cyanothece* sp. ATCC 51142, siendo las dos últimas cianobacterias no formadoras de heterocistos (T. Thiel, 2019). La enzima responsable de la fijación de nitrógeno es la nitrogenasa, que consiste en dos componentes proteicos separables: la proteína Fe formados por un dímero NifH y la proteína MoFe, formada por un heterotretámero NifF-NifK. El resto de genes del clúster están implicados en la formación de la nitrogenasa (*nifS*, *nifU*, *nifB*, *nifEN*, *nifV*, *nifZ*, *nifT*), codifican para ferredoxinas o proteínas en el transporte de molibdato, y en la regulación del clúster (T. Thiel, 2019; Tomatsu *et al.*, 2018).

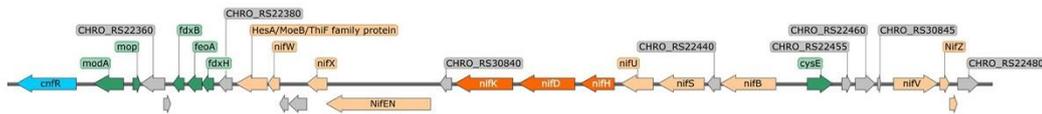
Se identificaron en las cepas Helios los genes del clúster *nif*, empleando los genes descritos en *Chroococcidiopsis thermalis* y *Leptolyngbya boryana* (Shimura *et al.*, 2015; Tsujimoto *et al.*, 2014) (Figura R.1.17). Los genes centrales *nifK-nifH-nifD* se encontraron en las cuatro cepas procedentes del panel solar, al igual que otros genes *nif* accesorios incluyendo el regulador *cnfR*. Este ha mostrado participar como factor de transcripción en la fijación del nitrógeno en varias cianobacterias (T. Thiel, 2019). No obstante, al igual que para *Chroococcidiopsis thermalis*, el regulador *clhR* no se encuentra, como sí ocurre en *Leptolyngbya boryana* dg5 (Tomatsu *et al.*, 2018) y otras cianobacterias (Shimura *et al.*, 2015). La organización observada para el clúster

en las cepas Helios es similar al identificado en *Chroococcidiopsis thermalis* (Shimura *et al.*, 2015), aunque ha quedado separado en diferentes *contigs* en todas las cepas Helios (indicado como // en la Figura R.1.17). Además de los genes *nif*, en las cepas Helios se encuentran también genes implicados en el transporte del molibdato y ferredoxinas, genes que intervienen de manera más indirecta en la fijación de nitrógeno (Figura R.1.17) (T. Thiel, 2019).

***Chroococcidiopsis* sp. B15**



***Chroococcidiopsis thermalis* PCC 7302**



***Leptolyngbya boryana* dg5**

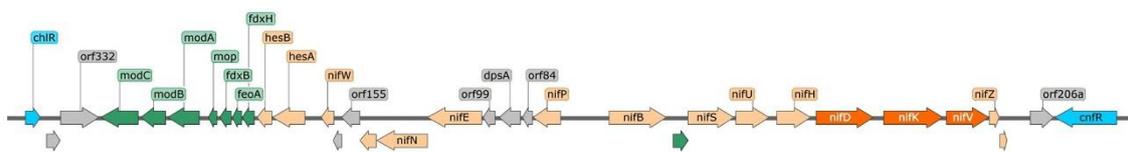


Figura R.1.17. Clúster génico asociados a la fijación de nitrógeno en *Chroococcidiopsis* sp. Helios. Organización genética en diferentes cianobacterias. La organización de *Chroococcidiopsis* sp. B15 se ha escogido de manera representativa. El resto de las *Chroococcidiopsis* sp. Helios mantiene la misma organización. En naranja oscuro se señalan los genes que forman la nitrogenasa, mientras que en naranja claro, se indican aquellos relacionados con su síntesis. En verde se indican los genes asociados al transporte del molibdeno y ferredoxinas, en azul genes implicados en la regulación del clúster y en gris ORF hipotéticas o sin función conocida dentro del *cluster*.

3.4.5. Búsqueda de clústeres implicados en la síntesis de metabolitos secundarios

La búsqueda de compuestos de valor farmacéutico es cada vez más frecuente en microorganismos extremófilos. En los últimos años diferentes cianobacterias se han estudiado con esta finalidad, tanto a nivel genómico como bioquímico (Jeong *et al.*, 2020). En este contexto, con el fin de investigar el potencial bioactivo de las cepas Helios, los genomas se analizaron más a fondo utilizando la herramienta antiSMASH para búsqueda de genes relacionados con metabolitos secundarios y la plataforma Norine para comprobar la actividad de alguno de los péptidos encontrados.

El análisis mediante antiSMASH reveló 8 clústeres de genes relacionados con biosíntesis de metabolitos secundarios en *Chroococcidiopsis* sp. B11, B13 y B14, y 9 clústeres en la cepa B15 (Tabla R.1.10). En las cuatro *Chroococcidiopsis* sp. se encontraron dos grupos de genes biosintéticos tipo NRP (péptidos no ribosomales) con similitudes del 37% y 50% con el clúster para la síntesis del compuesto Nostopeptolido A2 en *Nostoc* sp. GSV224 ([AF204805.2](#), Golakoti *et al.*, 2001; Hoffmann *et al.*, 2003). Este compuesto se ha descrito como toxina, con actividad frente a líneas celulares de cáncer nasofaríngeo humano y cáncer de adenocarcinoma colorrectal humano (Golakoti *et al.*, 2001). En cambio, en otros *Nostoc* spp., los nostopeptólidos están implicados en relaciones simbióticas con plantas (Liaimer *et al.*, 2015, 2016). Para la cepa *Chroococcidiopsis* sp. B15 además, se encontró un clúster tipo NRPS que mostró una similitud del 100% con los genes implicados en la síntesis de Rizamidas A, B y C de *Paraburkholderia rhizoxinica* HKI 454 ([NC_014718.1](#), X. Wang *et al.*, 2018). Estos compuestos, cuya actividad es parcialmente desconocida, han sido aislados de diferentes especies de *Burkholderiales* (X. Wang *et al.*, 2018). Por otro lado, la búsqueda en la base de datos Norine revelaron que las estructuras químicas más cercanas para los supuestos productos de este grupo de genes a menudo eran compuestos con actividad frente la aterosclerosis (Heneberg *et al.*, 2020). Un análisis similar con los clústeres tipo *microviridin* mostró similitud con compuestos con actividad antimicrobiana.

En lo que respecta a ensayos bioquímicos, extractos de *Leptolyngbya* sp. han mostrado tener capacidad antimicrobiana principalmente frente a bacterias gram-positivas (Rasooli, 2013). Por otro lado, entre los metabolitos bioactivos de las cianobacterias, los carotenoides se consideran compuestos bastante valiosos por su aplicación como antioxidantes. La producción de estos compuestos se ha estudiado en cianobacterias extremófilas del género *Chroococcidiopsis* (Antonopoulou *et al.*, 2005; Assunção *et al.*, 2021). Con estos antecedentes, un estudio más profundo de los clústeres encontrados en *Chroococcidiopsis* sp. Helios, así como el análisis bioquímico de los extractos podrían ser relevantes en la búsqueda de actividad antimicrobiana o antioxidante.

Tabla R.1.10. Clústeres génicos codificantes de metabolitos secundarios en *Chroococcidiopsis* sp. Helios.

Cepa	Contig	Tipo de clúster	Clúster conocido más similar
B11	28	NRPS	-
	24	NRPS, microviridin	-
	33	NRPS, T1PKS	Nostopeptolido A2, 50% (<i>Nostoc</i> sp. GSV224)
	11	lanthipeptide-class-v	-
	18	terpene	-
	2	ranthipeptide	-
	2	NRPS	Nostopeptolido A2, 37% (<i>Nostoc</i> sp. GSV224)
	12	proteusin	-
B13	1	ranthipeptide	-
	1	NRPS	Nostopeptolido A2, 37% (<i>Nostoc</i> sp. GSV224)
	13	proteusin	-
	30	NRPS, T1PKS	Nostopeptolido A2, 50% (<i>Nostoc</i> sp. GSV224)
	3	NRPS, microviridin	-
	12	lanthipeptide-class-v	-
	16	terpene	-
	23	NRPS	-
B14	21	NRPS, microviridin	-
	1	ranthipeptide	-
	1	NRPS	Nostopeptolido A2, 37% (<i>Nostoc</i> sp. GSV224)
	16	terpene	-
	10	lanthipeptide-class-v	-
	26	NRPS	-
	11	proteusin	-
	33	NRPS, T1PKS	Nostopeptolido A2, 50% (<i>Nostoc</i> sp. GSV224)
B15	2	NRPS	Nostopeptolido A2, 37% (<i>Nostoc</i> sp. GSV224)
	6	lanthipeptide-class-v	-
	15	terpene	-
	20	NRPS, microviridin	-
	34	NRPS	Nostopeptolido A2, 50% (<i>Nostoc</i> sp. GSV224)
	27	NRPS	-
	44	ranthipeptide	-
	44	NRPS	Rizomida, 100% (<i>Paraburkholderia rhizoxinica</i> HKI 454)
7	proteusin	-	

^a. Descripción de los tipos de metabolitos secundarios según antiSMASH. La similitud hace referencia al porcentaje de genes homólogos del clúster predicho que están presentes en el clúster más próximo.

Tras el análisis fisiológico y genómico realizado con las *Chroococcidiopsis* sp. Helios, es relevante comentar que el uso estas cianobacterias como plataformas de producción o bien como modelos de estudio de posibles mecanismos de resistencia frente a los estreses descritos anteriormente requiere de poder manipularlos genéticamente. La transformación genética del género fue descrita inicialmente en Billi *et al.*, 2001, y se comentará en el Capítulo 3 de esta Tesis Doctoral.

En resumen, en este Capítulo 1 se han aislado y caracterizado en condiciones de laboratorio, *Chroococidiopsis* sp. cultivables procedentes de un panel solar de una ciudad mediterránea. Las diferentes cepas fueron capaces de crecer con concentraciones moderadas de NaCl y con diversas fuentes de nitrógeno y carbono. Además, las cepas Helios mostraron ser resistentes a desecación a largo plazo y exposición UV-C. Por otro lado, se han identificado genes implicados en la síntesis de pigmentos frente a UV y genes relacionados con la producción de trehalosa, mecanismo que puede mejorar la resistencia a desecación. Por otro lado, el clúster responsable de la fijación de nitrógeno se ha encontrado también en las distintas *Chroococidiopsis* sp. Helios. Finalmente, la herramienta antiSMASH encontró diferentes clústeres para la síntesis de metabolitos secundarios presumiblemente con actividad antimicrobiana y antiinflamatoria. La resistencia a diferentes estreses hace que este género sea atractivo para la producción de compuestos valiosos de aplicación biotecnológica. La realización de más estudios permitirá en un futuro ampliar las aplicaciones básicas y biotecnológicas de este género.

Capítulo 2.

Estudios de transformación genética en *Arthrospira platensis*

PCC 9108

1. ANTECEDENTES: MODIFICACIÓN GENÉTICA DE LA ESPIRULINA

Arthrospira platensis (comúnmente conocida como espirulina) es una de las cianobacterias que más se cultiva en todo el mundo y, por tanto, presenta una destacada relevancia económica. Como se ha comentado en la Introducción, la espirulina y los productos derivados de ella se emplean en alimentación, biomedicina e industria química (Furmaniak *et al.*, 2017; Sili *et al.*, 2012).

No obstante, la aplicación industrial de la espirulina se ve limitada por la escasez de protocolos para su transformación genética. Existen varios trabajos en los que mediante mutagénesis química o física se han obtenido mutantes de *Arthrospira* sp. para diferentes aplicaciones. Por ejemplo, Guan *et al.*, 2017, emplearon el mutágeno etil metanosulfonato (EMS) para obtener cepas capaces de generar una cantidad de biomasa relevante a bajas temperaturas, mientras que el agente químico N-metil-N-Nitro-nitrosoguanidinio (NTG) ha permitido generar mutantes con mayor producción de ficocianina (Shirnalli *et al.*, 2018). La radiación UV también ha sido empleada como mutágeno, obteniéndose mutantes de *A. platensis* PCC 9108 con mejor tasa de crecimiento y mayor producción de ácido γ -limnoleico (G. Choi *et al.*, 2008). Por otro lado, Fang *et al.*, 2013, obtuvieron mutantes con un alto contenido en carbohidratos y altas tasas de crecimiento empleando el método físico de “plasma atmosférico a temperatura ambiente”. Este método se empleó también en An *et al.*, 2017 para obtener mutantes que acumulasen mayor cantidad de astaxantina, pigmento de gran aplicación en alimentación e industria farmacéutica.

Mientras existen técnicas de manipulación genética ampliamente utilizadas en otras cianobacterias, existen muy pocos trabajos en los que se haya modificado genéticamente (sin que sea por los métodos mencionados anteriormente) alguna especie del género *Arthrospira* (Dehghani *et al.*, 2018; Jeamton *et al.*, 2017; Kawata *et al.*, 2004; Toyomizu *et al.*, 2001). En estos trabajos se ha empleado principalmente la electroporación para la transferencia de ADN y una transposasa para insertar este al azar en el genoma de *A. platensis*, excepto en Dehghani *et al.*, 2018, que emplearon *Agrobacterium tumefaciens*. No obstante, la transformación descrita en estos trabajos no parece ser reproducible o estable y solo se ha descrito hasta el momento la introducción de un gen de resistencia a antibiótico y el gen de la GFP en el genoma de *A. platensis*.

Por otra parte, una de las desventajas de obtener mutantes con los métodos presentados anteriormente es que el cambio se produce al azar, con lo que encontrar mutantes de interés depende del método de *screening* posterior al tratamiento. Para algunas modificaciones el *screening* puede llevar demasiado tiempo o bien no ser viable con un número elevado de mutantes. Es por ello, que hace falta desarrollar mecanismos que permitan el uso de plásmidos integrativos o/y replicativos. En este contexto, se ha publicado una patente para la transformación de *Arthrospira* en la que se emplea la electroporación y la recombinación homóloga como estrategia de modificación genética (*Arthrospira platensis* NIES-39 o *Arthrospira* sp. PCC 8005, Takeuchi y Roberts, 2018). En esta patente se resalta el uso de uno o varios estabilizadores osmóticos y ADN circular o lineal, de cadena simple o doble para crear inserciones y deleciones.

Una de las principales barreras para la transformación de este género es de tipo genético (Introducción, 3.3. Barreras para la transferencia de ADN exógeno en cianobacterias). Varias especies de este género han mostrado tener numerosos sistemas de restricción-modificación, que degradan el ADN exógeno. Por otro lado, en los genomas de *A. platensis* es frecuente encontrar secuencias repetitivas, incluyendo elementos de inserción y sistemas CRISPR-Cas (F. Cai *et al.*, 2013; Furmaniak *et al.*, 2017). Además, otro impedimento para la transferencia horizontal de genes es la barrera física que supone su vaina mucilaginosa envolvente. Todo ello dificulta los procesos de transferencia de ADN (Stucken *et al.*, 2013).

Dado el potencial industrial de la espirulina, dentro del marco del proyecto S2013/ABI2783 (INSPIRA1-CM) en el que comenzó esta tesis doctoral, se analizaron cuatro cepas diferentes de *A. platensis*: *A. platensis* BIO1, *A. platensis* PCC 9108, *A. platensis* PCC 9223 y *A. platensis* PCC 7345 para ver cuál podría ser la cepa de estudio más idónea. Se seleccionó para este trabajo la cepa *A. platensis* PCC 9108 (en adelante *A. platensis* 9108), obtenida de la colección de cianobacterias del instituto Pasteur (Pasteur Collection of Cyanobacteria, PCC), por ser un cultivo axénico con una producción alta de biomasa (Algibe, 2021). El objetivo perseguido en este Capítulo 2 de esta tesis doctoral, es la optimización y aplicación en *A. platensis* 9108 de los protocolos de transformación actuales para cianobacterias y probar otros nuevos para tratar de obtener mutantes de interés industrial. Como subobjetivos, planteamos (i) la caracterización fisiológica previa de *A. platensis* 9108 y (ii) la optimización de protocolos de transformación genética.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla R.2.1 junto con su procedencia y características genotípicas y fenotípicas relevantes.

Tabla R.2.1. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo.

Cepa	Descripción	Referencia
<i>Arthrosira platensis</i> PCC 9108	Cepa Silvestre	Instituto Pasteur
<i>Arthrosira platensis</i> C1	Cepa Silvestre	Jeamton <i>et al.</i> , 2017
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA 105	Cepa Silvestre	Colección del laboratorio
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	Cepa Silvestre	Colección del laboratorio
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	Cepa Silvestre	Colección del laboratorio
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA 4404	Cepa Silvestre	Colección del laboratorio
<i>E. coli</i> DH5 α	Cepa de clonaje; F' <i>endA1 hsdR17 (r_K m_K⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^R) relA1 Δ(argF-lac) U169 deoR (ϕ80dlacΔ(lacZ)M15)</i>	Colección del laboratorio
<i>E. coli</i> CC118	Cepa de clonaje; D(<i>ara-leu</i>) <i>araD DlacX174 galE galK phoA thiE1 rpsE rpoB</i> (Rif ^R) <i>argE</i> (Am) <i>recA1</i>	Colección del laboratorio
<i>E. coli</i> CC118 lamda pir	Cepa para plásmidos con origen de replicación R6K; Δ (<i>ara-leu</i>) <i>araD ΔlacX174 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE</i> (Am) <i>recA1</i> , λ pir lysogen	Colección del laboratorio
<i>E. coli</i> HB101	Cepa para conjugación; F- λ - <i>hsdS20(rB- mB-)</i> <i>recA13 leuB6</i> (Am) <i>araC14 Δ(gpt-proA)62 lacY1 galK2</i> (Oc) <i>xyl-5 mtl-1 thiE1 rpsL20 glnX44B</i> (AS)B	Colección del laboratorio

Los plásmidos empleados en este trabajo, junto con sus características más relevantes se muestran en la Tabla R.2.2.

2.2. Medios y condiciones de cultivo

Todas las soluciones y medios de cultivo utilizados en este trabajo se esterilizaron por calor húmedo en un autoclave a 121°C y 1 atm de presión o mediante filtración utilizando filtros estériles Millipore de 0.2 μ m de diámetro (Merck).

Tabla R.2.2. Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Descripción	Referencia
pRK2013	Plásmido para conjugación, proporciona los genes <i>tra</i> y función de corte de RK2, Km ^R	Elhai y Wolk, 1988.
pRL623	Plásmido auxiliar, lleva los genes para las metilasas <i>M.AvaI</i> , <i>M.Eco47II</i> y <i>M.EcoT22I</i> y los genes <i>mob</i> de ColK. Cm ^R , ColK oriV	Elhai <i>et al.</i> , 1997
pCAMBIA 1301	Plásmido para transformación mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	Colección del laboratorio
pAG44	Plásmido con un casete para transposición. Amp ^R , Sm ^R	Jeamton <i>et al.</i> , 2017
pSEVA 421	Plásmido replicativo, Sm ^R /Spt ^R ori RK2	Silva-Rocha <i>et al.</i> , 2013
pSEVA 431	Plásmido replicativo, Sm ^R /Spt ^R , ori pBBR1	Silva-Rocha <i>et al.</i> , 2013.
pSEVA 441	Plásmido replicativo, Sm ^R /Spt ^R , ori pR01600/colE1	Silva-Rocha <i>et al.</i> , 2013.
pSEVA 451	Plásmido replicativo, Sm ^R /Spt ^R , ori RSF1010	Silva-Rocha <i>et al.</i> , 2013
pBAMD1-4	Plásmido con Mini-Tn5 y casete de integración, Amp ^R , Sm ^R /Spt ^R , ori R6K	Martínez-García <i>et al.</i> , 2014
pSEVA 351	Plásmido replicativo, Cm ^R , ori RSF1010	Silva-Rocha <i>et al.</i> , 2013

2.2.1. Medios y condiciones de cultivo empleados para *E. coli* y *A. tumefaciens*.

El cultivo de *E. coli* y *A. tumefaciens* se realizó en el medio rico Luria Bertani (LB) a 250 rpm, a 37°C y 30°C, respectivamente (Green y Sambrook, 2012). Los cultivos en medio sólido se realizaron con medio LB con 1.5% de agar (Conda). Cuando fue necesario, se añadieron antibióticos a las siguientes concentraciones finales: ampicilina (Amp) (100 µg/mL), kanamicina (Km) (50 µg/mL), cloranfenicol (Cm) (34 µg/mL), estreptomina (Sm) (50 µg/mL) y rifampicina (Rif) (50 µg/mL). El crecimiento del cultivo en medio líquido se determinó en base a la medida de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm con un espectrofotómetro (Ultrospect® 1000E).

2.2.2. Medios y condiciones de cultivo empleados para *Arthrospira platensis*.

Habitualmente, los cultivos líquidos de *Arthrospira platensis* (PCC 9108 y C1) se crecieron en medio Zarrouk modificado, en adelante medio "UTEX" (medio para *Spirulina*, <https://utex.org/>, Starr y Zeikus, 1987), a 30°C bajo agitación de 150 rpm e iluminancia constante de 100 µmol fotón/m²s. El crecimiento del cultivo se determinó en base a la medida de la DO a 560 nm con un espectrofotómetro (Ultrospect® 1000E), ya que esta fue la longitud de onda observada en otros trabajos con *Arthrospira* spp. (Jeamton *et al.*, 2017; Tunca *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2021). Cuando fue necesario, los antibióticos se añadieron a las siguientes concentraciones: espectinomicina (Spt) (25 µg/mL), cloranfenicol (Cm) (25 µg/mL). También se probaron otros medios de cultivo para cianobacterias: el medio BG11 (Rippka *et al.*, 1979), un medio de composición mínima, descrito en Cogne *et al.*, 2003 (medio mínimo, MM) y el medio AD7 (Włodarczyk *et al.*, 2020). Para el cultivo sólido se usaron placas de agar purificado (Conda) al

1.5% (p/v) en medio UTEX. Para los experimentos de transformación por conjugación se emplearon placas de UTEX con agar y 5% (v/v) de LB o 15 mM de glucosa. La composición de todos los medios se recoge en la Tabla R.2.3.

Tabla R.2.3. Medios de cultivo utilizados con *A. platensis*

Componente	Medio UTEX	Medio Mínimo	Medio BG11	Medio AD7
Macronutrientes (g/L)				
NaHCO ₃	13.61	10.50	-	-
Na ₂ CO ₃	4.03	7.60	0.02	-
NaNO ₃	2.50	2.50	1.50	1.00
NaCl	1.00	1.00	-	18.00
K ₂ HPO ₄	0.50	0.50	0.03	-
KH ₂ PO ₄	-	-	-	0.05
K ₂ SO ₄	1.00	1.00	-	-
KCl	-	-	-	0.06
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0.20	0.08	0.075	5.00
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0.04	0.04	0.036	0.037
Tris-HCl	-	-	-	1.25
Micronutrientes (mg/L)				
Vitamina B12	0.135	-	-	0.004
Na ₂ EDTA * 2 H ₂ O	4.550	80	1	30
FeCl ₃	0.350	-	-	-
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	0.258	0.23	1.81	1.81
ZnCl ₂	0.030	-	-	-
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0.024	-	0.050	0.040
Na ₂ MoO ₄ *H ₂ O	0.036	-	0.039	1.26
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0.020	0.030	0.080	0.080
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0.044	0.110	0.220	0.220
H ₃ BO ₃	0.620	-	2.86	2.86
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	-	10	-	-
Ácido cítrico	-	-	6	-
Citrato férrico de amonio	-	-	6	-

2.2.3. Conservación de las cepas bacterianas

Las cianobacterias se conservaron 3-4 semanas en matraces o en placas en una estufa a 30°C con una iluminancia constante de 30 µmol fotón/m²s, debido a la imposibilidad de poder congelarse a -80°C. El resto de las bacterias se conservaron a -80°C, en LB con glicerol al 20% (v/v).

2.3. Experimentos de transferencia génica

2.3.1. Transformación de *E. coli* y *A. tumefaciens*

Las células de *E. coli* fueron modificadas genéticamente por choque térmico tras hacerlas competentes mediante cloruro de cálcico (Green y Sambrook, 2012). Los cultivos de *A. tumefaciens* se transformaron mediante electroporación, tal como se describe en Hellens *et al.*, 2000. La selección de los transformantes se llevó a cabo en placas de LB agar suplementadas con el antibiótico apropiado.

2.3.2. Transformación de *A. platensis*

2.3.2.1. Transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens*

Para la transformación de *A. platensis* 9108 mediante *A. tumefaciens*, se variaron distintos parámetros del protocolo general de transformación, como se esquematiza en la Figura R.2.1. Por un lado, 200 μ L de cultivos de *A. platensis* a una DO_{560nm} de 2 se sembraron sobre placas de UTEX. El tiempo de crecimiento de la cianobacteria se varió en los experimentos de transformación desde 5 a 11 días en placa. Por otro lado, *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105, LBA 4404, GV 1301 y C58 transformados con el pCAMBIA 1301 se crecieron O/N a 30°C y 250 rpm en LB con 50 μ g/mL de rifampicina y kanamicina. Posteriormente, los cultivos de *A. tumefaciens* fueron lavados tres veces con 2 mL de medio UTEX centrifugando a 5000 rpm durante 2 min. Se resuspendió el *pellet* con 1 mL de UTEX, se prepararon diluciones a DO_{600nm} 0.4 y 0.7 de cada cepa de *A. tumefaciens* y 300 μ L se sembraron sobre placas de UTEX con *A. platensis* 9108 crecida. A continuación, el co-cultivo se realizó en oscuridad a 30°C durante 2 días, tras lo cual, se recogió con 1 mL de UTEX, se lavó tres veces con medio con tetraciclina 100 μ g/mL para eliminar las células de *A. tumefaciens* y se resuspendió en un volumen final de 1 mL. De este volumen, 0.8 mL se pasaron a medio líquido UTEX con higromicina B y tetraciclina 100 μ g/mL a 30°C y agitación, mientras que 0.2 mL se crecieron en las mismas condiciones sin higromicina B, como control.

Para los experimentos de inducción de *A. tumefaciens*, se incubó de distintas maneras el cultivo de *A. tumefaciens* tras el crecimiento O/N. Dos mililitros del cultivo se utilizaron para inocular 20 mL de medio durante 4 horas a 25°C. Se probó la incubación en UTEX con pH 6 y la incubación en LB con acetosiringona 100 μ M. Posteriormente, los cultivos se lavaron con UTEX y se ajustó la DO_{600nm} a 0.4.

Para los experimentos de pre-cultivo líquido de *A. platensis*, se utilizaron cultivos de 4 días (DO_{560nm} = 1.5-2) y se prepararon con diversos tratamientos. Por un lado, se sonicaron los cultivos con dos tiempos distintos, dejando los filamentos de varios tamaños. Por otro lado, cultivos de *A. platensis* sin sonicar se trataron 1 hora con NaCl a 0.5 M y se dejaron recuperar durante 4 horas. En todos los casos, tras la recuperación del tratamiento, se lavaron con medio UTEX y se ajustó la DO_{560nm} =1. Paralelamente, *A. tumefaciens* sin inducir se preparó a DO_{600nm} =0.4. Se mezcló 50 μ L de cada cultivo en una placa estéril y los 100 μ L finales se sembraron sobre un filtro colocado en placas de UTEX. El co-cultivo se llevó a cabo en las mismas

condiciones anteriormente mencionadas. Finalmente, los filtros se pusieron a crecer en presencia de tetraciclina e higromicina B 100 µg/mL.

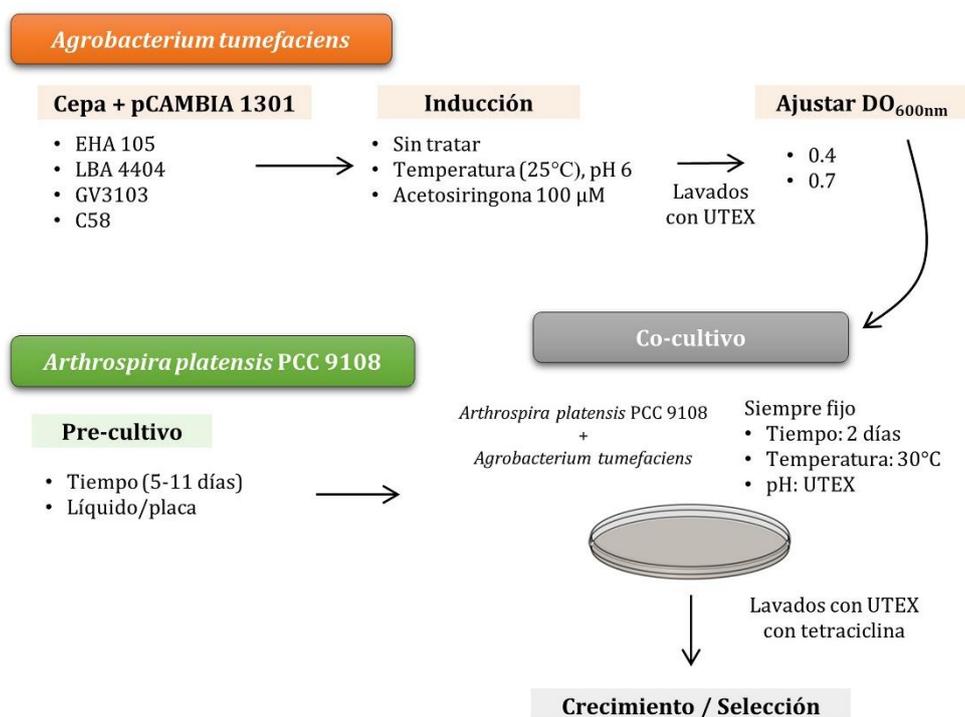


Figura R.2.1. Transformación de *A. platensis* PCC 9108 mediante infección con *A. tumefaciens*.

2.3.2.2. Conjugación triparental

La transformación mediante conjugación triparental de *A. platensis* 9108 fue realizada de acuerdo con el protocolo descrito en Elhai y Wolk, 1988, con ligeras modificaciones. *E. coli* con los plásmidos de interés (cepa Cargo) y *E. coli* HB101 con el plásmido pRK2013 (cepa conjugativa) se crecieron O/N en 4 mL de LB con los antibióticos correspondientes. Por otro lado, *A. platensis* 9108 crecida hasta una DO_{560nm} de 1-2 en medio UTEX se empleó para la conjugación. En primer lugar, los cultivos de *E. coli* se centrifugaron a 5000 rpm durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante. Los *pellets* se resuspendieron en LB fresco sin antibióticos. Tras realizar dos lavados, se mezclaron ambas cepas utilizando 0.75 mL de cepa conjugativa por cada 1 mL de cepa cargo, y se centrifugaron 1 min a 12000 rpm en tubos de 1.5mL. El sobrenadante se descartó y el *pellet* se resuspendió en 60 µL de LB. La mezcla de *E. coli* se incubó 1 hora a 37°C. Simultáneamente, los cultivos de *A. platensis* 9108, tanto el control como el sometido a diferentes tratamientos, se recogieron centrifugando durante 20 min a 5000 rpm y 20°C. Seguidamente, el *pellet* se resuspendió en 1 mL de medio UTEX y se prepararon diluciones a diferentes DO_{560nm} (0.8, 0.08). Entonces, 10 µL de la mezcla de *E. coli* y 10 µL de cianobacterias se mezclaron en una placa de plástico estéril, y posteriormente, 10 µL se sembraron sobre un filtro (*Immobilon-NC Transfer Membrane*, Millipore), colocado sobre placas de UTEX sólido suplementado con 5% LB o 15 mM de glucosa. Las placas con las mezclas

conjugativas se incubaron a 30°C, en condiciones de luz normal. A las 48 h, los filtros se traspasaron a placas de UTEX con antibióticos.

Además de utilizar un cultivo crecido de *A. platensis* 9108, se realizaron otros tratamientos previamente a la realización de la conjugación triparental, de manera similar a Stucken *et al.*, 2012: la sonicación y/o incubación en medio con mayor concentración de NaCl. En primer lugar, la sonicación fue realizada según se indica más adelante, en la preparación de células competentes (apartado 2.3.2.2.B). Tras el tiempo de recuperación de la sonicación, los cultivos se lavaron con medio UTEX y la mitad del cultivo se sometió a una incubación con NaCl 0.5M durante 1 hora (agitación cada 15 min). El resto de cultivo se mantuvo en las mismas condiciones, pero sin NaCl. Por otro lado, el cultivo no sonicado se utilizó también para el tratamiento con NaCl. Tras la hora de incubación, los cultivos se lavaron 4 veces con medio UTEX y se incubaron 4 horas en estático a 30°C. Pasado este tiempo, se emplearon las distintas muestras en la conjugación triparental descrita anteriormente, esto es: cultivo no sonicado tratado o sin tratar con NaCl y cultivo sonicado tratado o sin tratar con NaCl.

2.3.2.3. Electroporación de *A. platensis*

El proceso de electroporación de *A. platensis* 9108 fue optimizado en diferentes parámetros, como se resume en la Figura R.2.2.

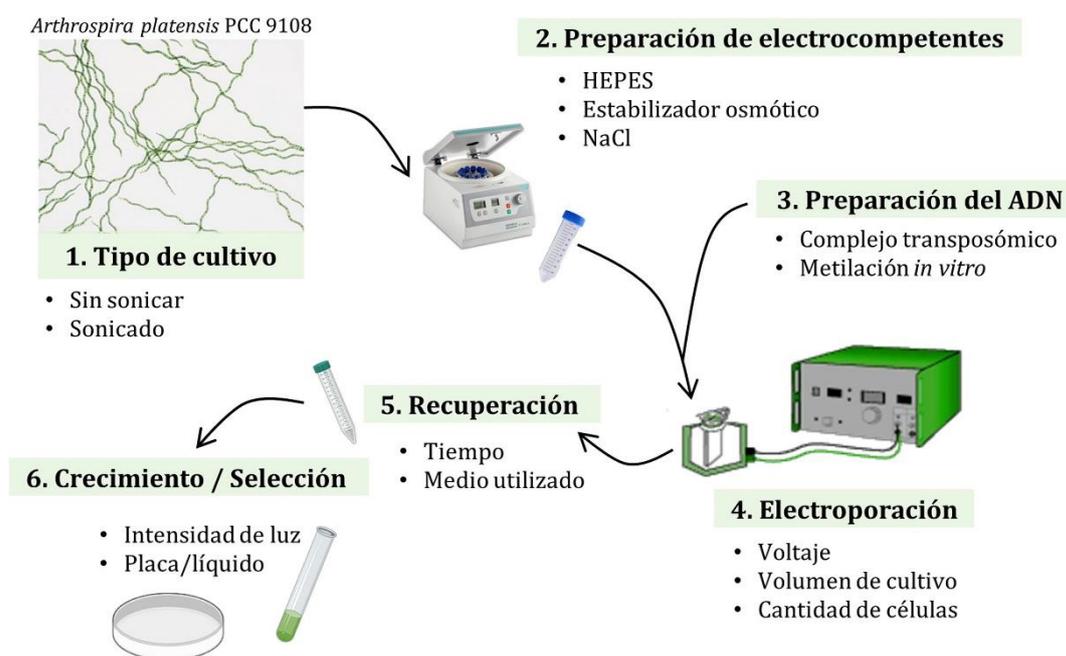


Figura R.2.2. Esquema de optimización de las condiciones del protocolo de transferencia génica mediante electroporación en *A. platensis* 9108.

A. Sonicación de *A. platensis* 9108

Para la sonicación de los cultivos se empleó un baño de ultrasonidos (J.P. Selecta® Ultrasons) en el cual la intensidad era constante. Se probaron diferentes condiciones de sonicación, incluyendo el tiempo de sonicación (30 s hasta 4 min), edad del cultivo (DO_{560nm} de 1 a 3) y

recuperación tras la fragmentación, tanto en tiempo (4 h y O/N) como iluminancia (8 o 100 $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2\text{s}$). En cada condición probada, el resto de los parámetros se mantenía como se ha indicado anteriormente. 50 mL de cultivo se sonicaron durante ciclos de 30 segundos, manteniendo el cultivo otros 30 segundos en hielo entre cada ciclo. Tras la sonicación, los cultivos se recuperaron sin agitación y a 30°C. Después, 1 mL de cultivo se transfirió a un matraz con 10 mL medio UTEX y se mantuvo en condiciones normales de crecimiento para observar la viabilidad de las muestras tras la sonicación.

Tras ensayar diferentes condiciones, para los experimentos de optimización de la electroporación en *A. platensis* 9108 (2.3.2.2.B. Preparación de células electrocompetentes), cultivos de 50 mL de $\text{DO}_{560\text{nm}}$ de 0.8-1.2 se sonicaron hasta obtener filamentos de 5-6 células. La recuperación del cultivo se llevó a cabo en estático a 30°C, O/N y 8 $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2\text{s}$.

B. Preparación de células electrocompetentes

Las células electrocompetentes de *A. platensis* se prepararon de acuerdo con el protocolo descrito en Kawata *et al.*, 2004 y Jeamton *et al.*, 2017, con algunas modificaciones. La preparación de células competentes se llevó a cabo el mismo día que se iba a realizar la electroporación. Los cultivos sonicados o no sonicados se recogieron a 5000 rpm durante 30 min a 20°C, y se lavaron con tampón 1 ó 20 mM HEPES pH 7. Tras la centrifugación, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el cultivo en tampón, realizándose 3 lavados reduciendo progresivamente el volumen (50 mL, 20 mL y 5 mL). Para los experimentos con diferentes estabilizadores osmóticos (glicerol 1-25%, polietilenglicol 600 1-20% y glucosa 5-25%) o sales (sin y con 10 mM de NaCl), los lavados se hicieron con dichos compuestos preparados en tampón HEPES 1 mM pH 7 tras retirar el medio de cultivo en la primera centrifugación. Finalmente, las células se resuspendieron en el mínimo volumen posible y se midió su $\text{DO}_{560\text{nm}}$. Para los experimentos de electroporación, se utilizaron alícuotas de 40-300 μL a una $\text{DO}_{560\text{nm}}$ de 15-30.

C. Electroporación

Para la puesta a punto de la electroporación, se emplearon solo las células competentes (sin ADN), con el fin de comprobar la viabilidad del cultivo tras el pulso eléctrico y las condiciones necesarias para su recuperación. Así, las células competentes se incubaron 10 min en hielo, se introdujeron en una cubeta de electroporación (Cell Projects) y se electroporaron (Gene Pulser, Biorad), probándose dos parámetros de electroporación: 0.8 kV, 25 μF y 20 0Ω y 2.5 kV, 25 μF y 200 Ω . Tras la electroporación, el volumen de medio UTEX (13.61 g/L NaHCO_3) o UTEX modificado (5 g/L NaHCO_3) necesario para llegar a 1 mL se añadió a la cubeta y las células se recogieron en un Falcon de 15 mL. Se probaron 2 y 7 días de recuperación sin agitación a 30°C, a una iluminancia constante de 8 $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2\text{s}$. Tras la recuperación, el cultivo se pasó a medio líquido para comprobar si era viable.

Cuando se trató de transformar *A. platensis* mediante electroporación, 1 μg del ADN (metilado o no) o bien la mezcla del complejo transposómico liposomal (explicado en 2.4.2. Preparación del complejo transposoma) se añadió a la mezcla de células competentes. En una primera electroporación, una alícuota de 40 μL de células competentes preparadas en HEPES 1 mM pH 7.2 frío y una $\text{DO}_{560\text{nm}}$ ajustada a 3 (2.8×10^6 cél/mL), se mezcló con 3 μL de la mezcla

transposómica y se mantuvo 10 min en hielo. Posteriormente, se aplicó un pulso eléctrico a 0.8kV o 2.5kV, manteniendo en ambos casos 200 Ω y 25 μ F. Se probaron dos tiempos de recuperación tras la electroporación, de 2 y 7 días. En un segundo intento de transformación, se emplearon 100 μ L *A. platensis* a DO_{560nm} de 16, con glucosa 12% como estabilizador osmótico. La electroporación se realizó a 2.5kV, 25 μ F y 200 Ω , medio UTEX y 2 días sin agitación para recuperar. Tras este tiempo, se pasaron 0.8 mL a medio líquido, en presencia de los antibióticos correspondientes, mientras que 0.2 mL se mantuvieron solo con medio UTEX, a modo de control.

2.4. Técnicas de manipulación de ADN

Las técnicas de manipulación de ADN, así como otras técnicas de biología molecular utilizadas en esta tesis se describen en Green y Sambrook, 2012. Las enzimas y otros reactivos se emplearon siguiendo las especificaciones del fabricante, salvo que se especifique lo contrario.

2.4.1. Extracción de ADN

El ADN plasmídico de *E. coli* se extrajo mediante el *kit* de *miniprep mi-Plasmid Miniprep* (Metabion International AG), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Para determinar la concentración y la pureza de las muestras de ADN se utilizó un NanoDrop ND-1000 de ThermoFisher.

Para la extracción de ADN de *A. platensis*, se recogieron 20 mL de cultivo y se realizaron 3 lavados con agua estéril. Posteriormente, el *pellet* fue guardado a -20°C hasta su procesamiento. El ADN se extrajo siguiendo un protocolo de aislamiento de genómico descrito en Morin *et al.*, 2010, con ligeras modificaciones. El *pellet* se resuspendió en tampón TE (Tris 10 mM, pH 8.0, con 1 mM de EDTA) y se dejó incubar a 80°C durante 20 min. Tras dejar enfriar, se añadió lisozima a una concentración final de 1 mg/mL y se dejó O/N a 37°C. Al día siguiente, se añadió SDS y proteinasa K a una concentración final de 0.5% y 0.1 mg/mL, respectivamente, y se incubó 10 min a 65°C. A continuación, se añadió una mezcla de CTAB/NaCl a una concentración final de 1% y 0.7 M, respectivamente y se dejó otros 10 min a 65°C. Posteriormente, se añadió 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se incubó en hielo 30 min y se centrifugó 10 min 10000 rpm a 4°C. La fase acuosa se recogió y el paso anterior se repitió hasta que el sobrenadante quedó transparente. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se añadió un volumen equivalente de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), se mezcló con vórtex y se centrifugó 5 min a 15000 rpm. Se recuperó la fase acuosa, se transfirió a un nuevo tubo y el ADN se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente durante 30 min, y se recogió centrifugando durante 15 min a 14000 rpm y a 4°C. El *pellet* se lavó un par de veces con etanol al 70% y se resuspendió en 40-100 μ L de H₂O estéril.

2.4.2. Preparación del complejo transposoma

La preparación del complejo transposoma se realizó siguiendo el protocolo descrito en Jeamton *et al.*, 2017. La región entre las secuencias reconocidas por la transposasa se amplificó mediante PCR, utilizando como ADN el plásmido pAG44 y también una construcción sintética, para obtener el casete de transposición para la transformación. Para ello se emplearon los

oligonucleótidos AP01 (5'-ATTCAGGCTGCGCAACTGT-3') y AP02 (5'-GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG-3') y la enzima polimerasa *KOD Xtreme™ Hot Start DNA polimerase*. La mezcla de PCR para 100 ng de ADN en un volumen de 50 µL fue: 0.3 µM de cada oligonucleótido, 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgSO₄ y 1 µL de polimerasa. El programa de amplificación fue 95°C 2 min, (95°C 20 s, 53°C 1 0s, 70°C 40 s) x 30 ciclos, 72°C 4min. Los fragmentos amplificados se purificaron utilizando el *kit* de extracción de fragmentos de ADN *GelPure* (NzyTech), y la concentración se ajustó a 250 ng/µL en tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA). Posteriormente, una alícuota de 2 µL de ADN se mezcló con 4 µL de *EZ-Tn5 Hyper transposase* (Lucigen Cat. No. TNP92110) y 2 µL de glicerol al 100%. La mezcla de reacción fue incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente para formar el complejo de transposoma. Después, 1 µL de complejo para cada electroporación se combinó con 1 µL de *DOTAP (Liposomal Transfection Reagent, Roche, 1 µg/ µL)*. La mezcla del complejo transposomal y el *DOTAP* se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, antes de electroporar, se añadió 1 µL de Inhibidor Tipo I (Lucigene, 5 µg/µL), a los complejos formados y se añadió a las células competentes.

2.4.3. Ensayos de metilación *in vitro*

En experimentos previos del grupo, la metilación de ADN de *A. platensis* fue evaluada tras la extracción de genómico y posterior digestión con las enzimas de restricción que forman parte de los sistemas de restricción modificación de tipo II encontrados en la cepa *A. platensis* 9108. Por otro lado, en esta tesis se realizaron ensayos de metilación de plásmidos *in vitro* con las metiltransferasas comerciales *M.SssI* y *M.CviPI* (New England Biolabs). La optimización de la metilación y las diferentes pruebas realizadas se llevaron a cabo sobre el plásmido pSEVA351, utilizando como control el ADN del fago Lambda. Las metilaciones fueron realizadas a 37°C y 1.2 U enzima por cada µg, variándose la concentración de DTT (solo la que viene en el tampón o añadiendo 10 mM), concentración de S-adenosil metionina (SAM 16 ó 32µM) y el tiempo de incubación (4 horas y O/N). Tras la metilación, el ADN se purificó utilizando un *kit* para lavado de ADN *GelPure* (NzyTech) en agua. Posteriormente, ADN sometido y no sometido a metilación fue expuesto a digestión con diferentes enzimas de restricción. La protección frente a esta digestión fue evaluada como metilación del ADN. La comprobación de protección se realizó digiriendo 300 ng de ADN metilado y control con la misma enzima, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN sin digerir se empleó como control de protección a digestión.

2.4.4. Electroforesis en geles de agarosa

Para visualizar los fragmentos de ADN se utilizaron geles 1% o 2% (p/v) de agarosa en tampón TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 7.6), utilizando el mismo tampón como electrolito. Para visualizar el ADN se empleó *GreenSafe Premium* (NZYtech) a una dilución de 1:10000, añadido previamente a la gelificación de la agarosa. A las muestras se les añadió 1/10 de su volumen de tampón de carga (Takara). La electroforesis se realizó a 100 V durante 20-30 min y, una vez finalizada, los fragmentos de DNA se visualizaron con radiación ultravioleta en un transiluminador UV Enduro GDS (Labnet International). El tamaño de los fragmentos se

estimó por su movilidad electroforética utilizando como marcador de tamaño *GeneRuler 1 Kb DNA Ladder* de ThermoFisher o *NZYDNA Ladder III* de Nzytech.

2.4.5. Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN se llevó a cabo a cargo de la empresa Eurofins Genomics. Las secuencias y mapas de plásmidos fueron analizados con software SnapGene (<http://www.snapgene.com/>).

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización fisiológica de *A. platensis* PCC 9108

3.1.1. Crecimiento de *A. platensis*

En primer lugar, antes de proceder a los estudios de transformación genética, se determinaron las condiciones de crecimiento de *A. platensis* 9108 en varios medios de cultivo (Figura R.2.3A): BG11, habitual en el cultivo de cianobacterias de uso en laboratorio (Rippka *et al.*, 1979), un medio propio para el cultivo de espirulina (en adelante medio UTEX, Starr y Zeikus, 1987), un medio mínimo optimizado para otra cepa de espirulina (Cogne *et al.*, 2003) y el medio AD7, empleado en el crecimiento de una cianobacteria marina (Włodarczyk *et al.*, 2020) (Tabla R.2.3). El crecimiento del cultivo se determinó en base a la medida de la densidad óptica tras 10 días de crecimiento, a una longitud de onda de 560 nm, ya que esta era la habitual en trabajos con *Arthrospira* sp. En cuanto a las condiciones de luz, para la prueba de medio se fijaron en 20 $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2\text{s}$. En las condiciones de cultivo ensayadas, *A. platensis* no creció en BG11, pero fue capaz de crecer en el medio mínimo, el medio AD7 y en el medio UTEX. La adición de vitamina B12 a la concentración final del medio UTEX a los medios BG11 y AD7 no fue suficiente para mejorar el crecimiento con respecto al medio original. En cambio, en el medio mínimo, la adición de vitamina B12 incrementó el crecimiento, pero sin llegar a la DO obtenida con el medio UTEX. Por esta razón, se decidió emplear este medio para el cultivo de *A. platensis* (Figura R.2.3B).

En segundo lugar, para establecer las condiciones de luz adecuadas para *A. platensis*, se realizaron estudios de crecimiento variando la intensidad de luz entre 20, 35 y 100 $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2\text{s}$. En cuanto a los resultados obtenidos, se observa que el mejor crecimiento se obtiene para 100 $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2\text{s}$, mientras que para las otras dos condiciones el tiempo de duplicación es mayor (Figura R.2.3C). En estas condiciones, se hizo una curva de crecimiento durante 12 días, distinguiéndose: viaras fases: fase de latencia (días 1 - 2), fase lineal (días 3 - 7), fase estacionaria (8 - 11) y fase de muerte (se inicia el día 10) (Figura R.2.3D).

3.1.2. Estudio del crecimiento en medio salino

La aclimatación de cianobacterias al estrés salino se considera cada vez más importante debido a la aplicación de cianobacterias en la producción de biocombustibles y otros metabolitos de interés industrial. El poder utilizar agua de mar permite minimizar el crecimiento de organismos competidores y depender en menor medida de los recursos de agua dulce (Pade y Hagemann, 2014). Si bien el término salinidad se suele referir a la concentración de distintos iones inorgánicos disueltos, puesto que muchas especies viven en ecosistemas en los que el NaCl es la sal predominante, normalmente los estudios de adaptación se suelen hacer sobre diferentes concentraciones de este compuesto.

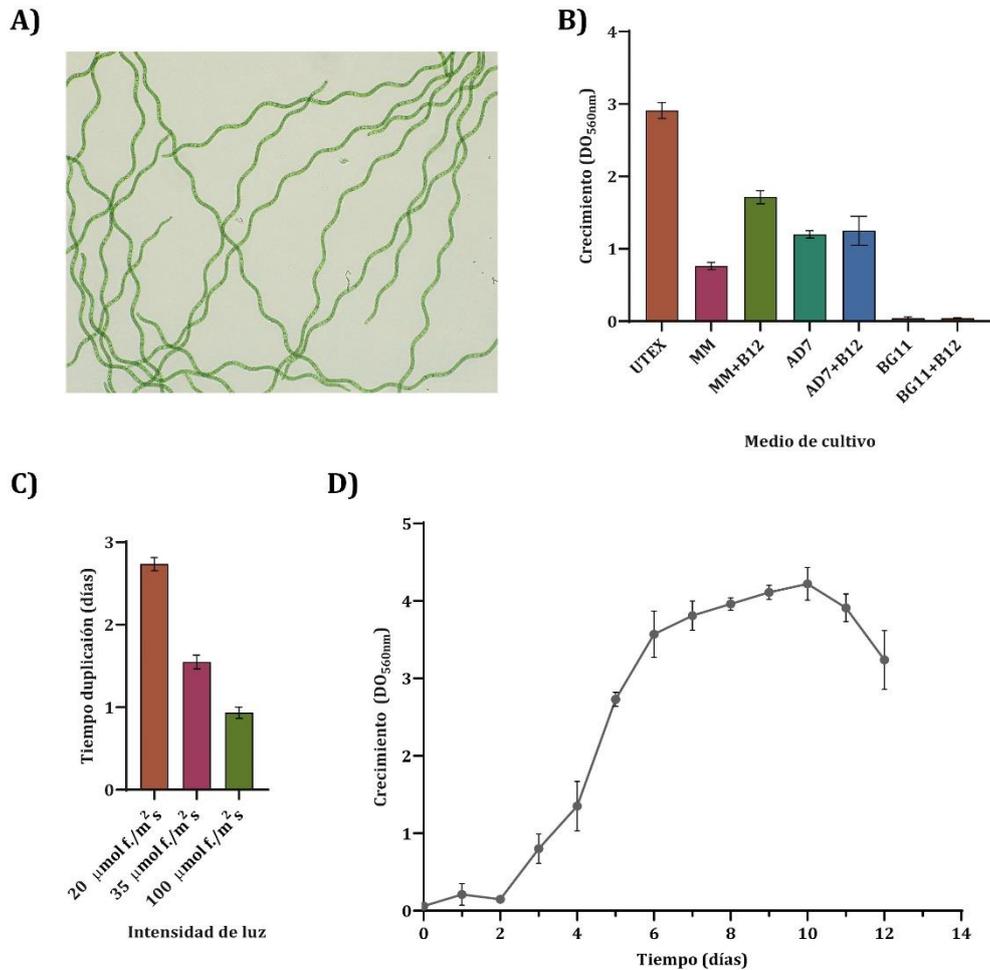


Figura R.2.3. Crecimiento de *A. platensis* 9108. A) Microfotografía de *A. platensis* 9108 (aumento 20X). B) Crecimiento en distintos medios de cultivo. C) Efecto de la intensidad de luz en el tiempo de duplicación. D) Curva de crecimiento en condiciones óptimas: medio UTEX y 100 $\mu\text{mol f./m}^2\text{s}$. En las tres gráficas se muestra el resultado de tres réplicas biológicas.

Para estudiar la viabilidad del cultivo en medios con mayor concentración de NaCl que el medio UTEX (0.017 M), *A. platensis* se cultivó en medio UTEX (control), UTEX con 0.5 M y UTEX con 1 M de NaCl (concentraciones finales). En las condiciones de cultivo ensayadas, a los 7 días de crecimiento, se observó que el cultivo era capaz de crecer a 0.5 M ($\text{DO}_{560\text{nm}}=2.85$) pero no a 1 M ($\text{DO}_{560\text{nm}}=0.10$), observándose que lo que había en el cultivo eran en filamentos más cortos y gran muerte celular (Figura R.2.4A). El cultivo de *A. platensis* creció a 0.5 M, pero no a la misma velocidad que el crecido en medio UTEX (control, $\text{DO}_{560\text{nm}}=3.80$).

En la bibliografía existen varios trabajos en los que *A. platensis* y otras cianobacterias se han modificado para crecer en agua marina (Cui *et al.*, 2020; Pade y Hagemann, 2014). Una de las estrategias para conseguirlo es mediante adaptación evolutiva en el laboratorio (ALE), aplicando una fuerza de selección. Por esta razón, se pensó que podía mejorarse el crecimiento de *A. platensis* 9108 llevando a cabo una evolución adaptativa en el laboratorio utilizando concentraciones crecientes de NaCl.

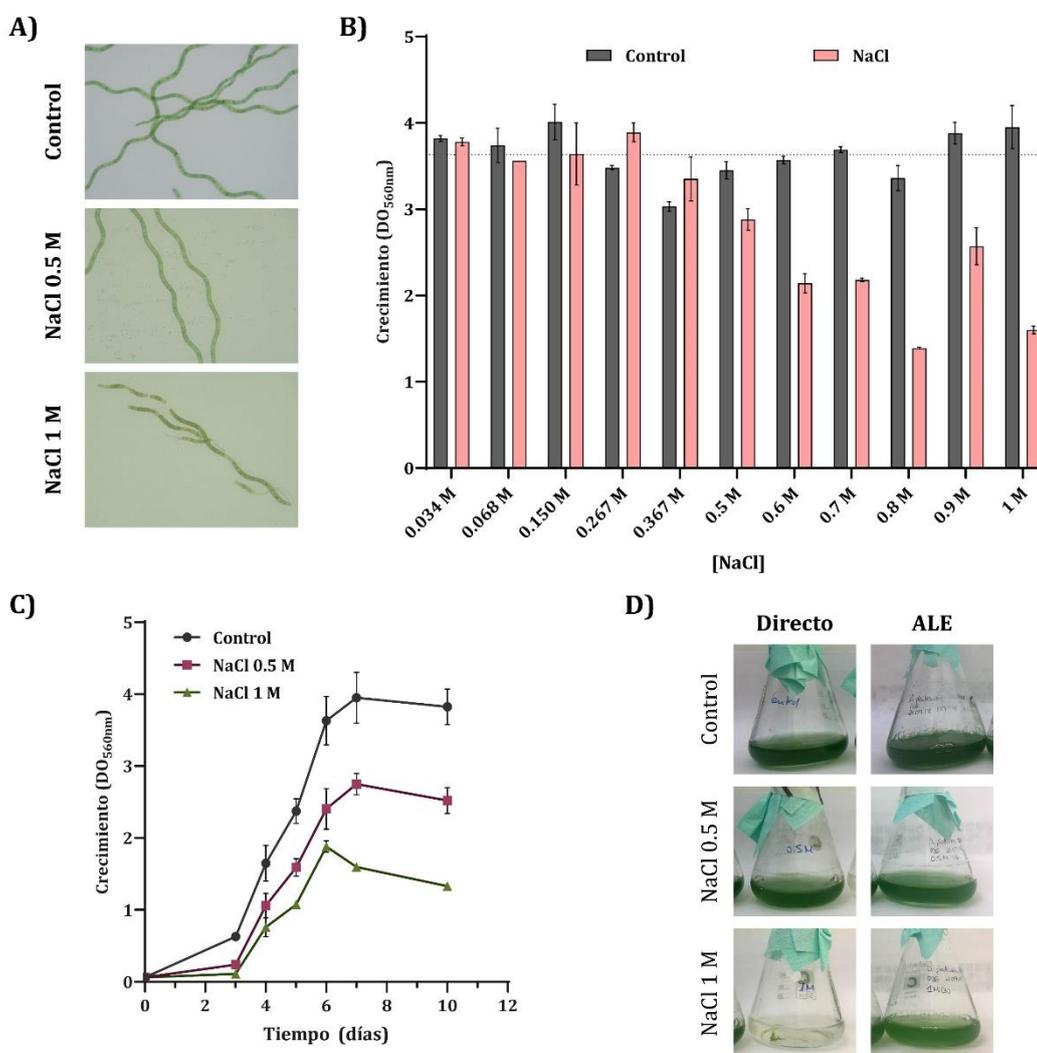


Figura R.2.4. Crecimiento de *A. platensis* 9108 en presencia en concentraciones crecientes de NaCl. A) Microfotografías de cultivos de *A. platensis* 9108 crecidos en concentraciones distintas de NaCl. **B)** Adaptación evolutiva en el laboratorio (ALE) frente a concentraciones crecientes de NaCl. Se muestra la DO_{560nm} de los cultivos control y aquellos crecidos con mayor concentración de NaCl tras 7 días de crecimiento. La línea discontinua representa la media de crecimiento para el control (UTEX). **C)** Crecimiento en diferentes concentraciones de sal tras ALE. **D)** Comparación de los cultivos de *A. platensis* 9108 antes (Directo) y después de ALE en distintas concentraciones de NaCl. Las gráficas muestran el resultado de tres réplicas biológicas. En todos los casos, Control hace referencia al crecimiento en medio UTEX, sin añadir NaCl extra.

Los experimentos se iniciaron a una DO_{560nm} de 0.05 y las bacterias se tuvieron creciendo a 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ y 150 rpm. Cada 7 días, se medía la DO de los cultivos y el cultivo crecido con mayor cantidad de NaCl se pasaba a una concentración superior, mientras que el cultivo normal

se mantenía en UTEX (cultivo control). Se comenzó duplicando la concentración de NaCl hasta llegar a 367 mM, y luego de 0.5 M a 1 M en escalones de 0.1 M de diferencia. Se observó que, aunque a partir de una concentración de 0.5 M el cultivo alcanzaba una DO menor, se obtuvo crecimiento en todas las concentraciones de NaCl probadas (Figura R.2.4B). Este crecimiento fue superior al obtenido cuando *A. platensis* se ponía directamente en UTEX con 1 M de sal (Figura R.2.4C). Para concentraciones elevadas de sal, la densidad óptica alcanzada a los 7 días es menor, y los cultivos son capaces de mantenerse viables durante menos tiempo. No obstante, consiguió obtenerse un cultivo capaz de crecer a 1 M de NaCl (Figura R.2.4D), lo que permitiría crecer la cianobacteria sin problemas en agua de mar.

3.1.3. Sensibilidad a antibióticos

En la bibliografía se encuentran referencias a posibles resistencias/sensibilidades a antibióticos en diferentes especies de *Arthrospira*, aunque también existe mucha variabilidad entre distintas cepas. En varias *Arthrospira* spp. se ha observado resistencia kanamicina y neomicina. El cloranfenicol, la espectinomicina y la eritromicina son antibióticos que mayoritariamente son útiles por la sensibilidad de otras cepas del género *Arthrospira* a los mismos, y por ello parecen candidatos ideales como marcadores de selección tras la transformación (J. Cao *et al.*, 1999; Gaogen *et al.*, 2001).

Se realizó un *screening* inicial con los antibióticos que se tenían en el laboratorio, a una concentración fija de 100 µg/mL para todos ellos (Figura R.2.5). Los resultados del antibiograma mostraron que *A. platensis* 9108 es resistente a parte de los antibióticos probados. Solamente en presencia de cloranfenicol, ampicilina, estreptomina y espectinomicina se encontró un efecto bactericida claro. En el caso de la gentamicina, si bien parecía que había un crecimiento durante los primeros días, a los 7 días el cultivo parecía gravemente afectado. Se refrescó el cultivo a medio UTEX para comprobar la viabilidad del cultivo. No se observó crecimiento, por lo que se determinó que *A. platensis* es sensible a gentamicina. Por otra parte, aunque *A. platensis* 9108 es resistente a la ampicilina, este antibiótico junto con la tetraciclina no es utilizado como agente de selección en la transformación de cianobacterias, ya que es sensible a la luz (Heidorn *et al.*, 2010). Debido al uso extendido del cloranfenicol y la espectinomicina como agentes de selección, se decidió probar un rango de concentraciones de estos, para determinar si pudiera usar una concentración menor en futuras transformaciones. Se determinó que las concentraciones de uso fueran de 25 µg/mL para cloranfenicol y espectinomicina.

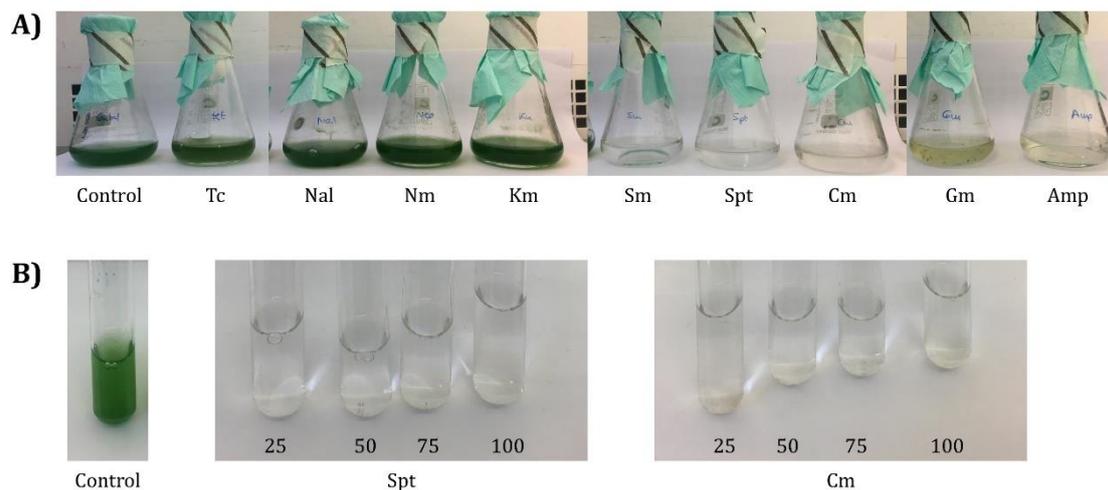


Figura R.2.5. Evaluación de la sensibilidad a antibióticos en *A. platensis* PCC 9108. A) Cultivos tras 7 días de crecimiento en presencia de 100 µg/mL de distintos antibióticos. B) Cultivos de 4 días de crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de espectinomicina y cloranfenicol (µg/mL). Abreviaturas: Cont, Control; Sm, Estreptomicina; Spt, espectinomicina; Gm, Gentamicina; Km, Kanamicina; Nal, Ácido Nalidíxico; Tet, Tetraciclina; Amp, Ampicilina; Cm, Cloranfenicol; Nm, Neomicina.

3.1.4. Estudios de disgregación de los filamentos

Otro aspecto que es necesario controlar antes de poder transformar *A. platensis* es la obtención de células aisladas. En la transformación de cianobacterias filamentosas, la sonicación contribuye a reducir la aparición de quimeras, en las que no todas las células presentan el ADN recombinante. Por otro lado, la sonicación también contribuye a reducir las nucleasas y la presencia de polisacáridos externos, favoreciendo la entrada del ADN (Stucken *et al.*, 2013). Se realizaron diversos experimentos de sonicación con el fin de estimar el tiempo y condiciones de recuperación necesarias para que la viabilidad del cultivo no quedase comprometida tras la fragmentación.

Si bien en un principio se pretendía obtener células aisladas, cuando el cultivo quedaba total o en gran medida disgregado, no sobrevivía. Los resultados obtenidos mostraron que para cultivos de $DO_{560nm}=1$, dos ciclos de 30 s eran suficientes para producir la fragmentación del cultivo sin comprometer su viabilidad. Para cultivos de mayor DO_{560nm} , de 2 y 3, se observó la necesidad de emplear más ciclos, 4-5 ciclos de 30 s, para obtener fragmentos del tamaño deseado. Por otro lado, en cuanto al tiempo de recuperación, el cultivo recuperado 4 horas fue capaz de crecer sin problemas, aunque el crecimiento fue menor que el recuperado O/N. Por último, en cuanto a la luz empleada durante la recuperación, fue un factor importante, obteniéndose mayor viabilidad del cultivo a 8 µmol fotón /m²s frente a luz habitual de crecimiento.

Teniendo en cuenta los diversos factores estudiados y que el tiempo del cultivo afecta en el número de ciclos de sonicación necesarios, para cada experimento se ajustaron los ciclos hasta obtener cultivos de 4-5 células aproximadamente (Figura R.2.6). Por otro lado, se mantuvo constante una etapa de recuperación O/N a $8 \mu\text{mol fotón /m}^2\text{s}$ para todos los cultivos sonicados.



Figura R.2.6. Ensayo de sonicación en *A. platensis* PCC 9108. Se muestra la sonicación de cultivos de $\text{DO}_{560\text{nm}}$ de 1.

3.2. Optimización de los sistemas de transferencia genética en *A. platensis* PCC 9108

Varias cianobacterias se han conseguido transformar mediante diferentes técnicas. Si bien algunas cianobacterias presentan transformación natural, los mecanismos genéticos no se conocen en gran medida. Además, la optimización de las condiciones en que esta se da y la baja eficiencia de transformación llevan al uso de otras técnicas. Las condiciones ensayadas en este apartado se han escogido en base a diferentes problemas observados en la transformación de cianobacterias mencionados en la bibliografía (Stucken et al., 2013). Entre estos se encuentra la degradación del ADN exógeno por endonucleasas que forman parte de los sistemas de restricción modificación o exonucleasas presentes en la capa externa de la cianobacteria, así como la dificultad de entrada del ADN por presencia de una capa de polisacáridos (Introducción, 3.3. Barreras para la transferencia de ADN exógeno).

3.2.1. Sistemas de RM de tipo II en *A. platensis* PCC 9108

Como parte de un trabajo previo de otros miembros del laboratorio, se buscaron sistemas de restricción-modificación (RM) de tipo I, II, III y IV en el genoma de *A. platensis* PCC 9108. Como se comentó en la introducción (3.3.1. Sistemas de restricción-modificación), los sistemas de RM se caracterizan por una actividad ADN-metiltransferasa (MTasa) que modifica los mismos sitios que reconocen endonucleasas, protegiendo así estas regiones de ser digeridas y formando, un mecanismo de protección frente a entrada de ADN exógeno (Mruk y Kobayashi, 2014; Stucken et al., 2013; Tock y Dryden, 2005). Si bien en *A. platensis* 9108 se encontraron sistemas de tipo I, II y IV, se estudió en mayor detalle los sistemas de tipo II, por ser lo más habitual en bacterias (la MTasa y REasa son proteínas diferentes) y tener un impacto elevado en eficiencias de transformación de cianobacterias (Elhai et al., 1997; Elhai y Wolk, 1988).

En *A. platensis* 9108, se encontraron 13 sistemas de restricción modificación de tipo II. En la Tabla R.2.4. Metilinas asociadas a sistemas de RM de tipo II. se indican las metilinas que forman parte de los sistemas de tipo II, junto con la secuencia de reconocimiento esperada para la MTasa y para la enzima de restricción pareja. Como parte del trabajo paralelo a esta Tesis, se estudió la expresión y funcionalidad de estos sistemas observados en el análisis *in silico*. En cuanto a la funcionalidad, se evaluó extrayendo el ADN genómico de *A. platensis* 9108 y someténdolo a digestión para cada una de las enzimas de restricción que forman parte de los RM de tipo II. La protección a la digestión fue considerada como funcionalidad de la metilina correspondiente. La digestión con *EcoRV* fue empleada como control de no protección, mientras que el genómico sin digerir se empleó como control positivo a metilación. Como se muestra en la Figura R.2.7, todos los sistemas fueron funcionales. En el caso de *AvaI* la protección no parece ser total, pero aun así es mayor que el control digerido con *EcoRV* (sin protección). Por otra parte, en estudios previos del grupo, también se ensayó la actividad de las enzimas de restricción empleando extractos de *A. platensis* 9108. Para extractos celulares de 6 µg o más se observó degradación de 50 ng de plásmido. Todo ello demuestra que los sistemas de RM de *A. platensis* 9108 estos sistemas son importantes de considerar a la hora de establecer un método de transferencia génica.

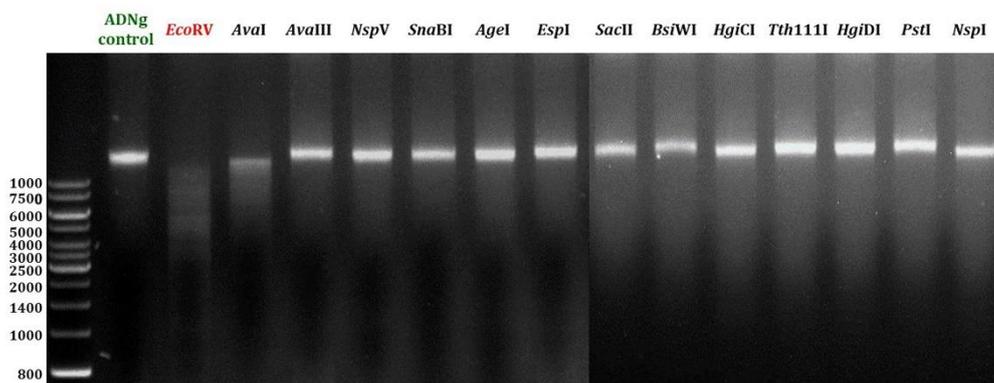


Figura R.2.7. Funcionalidad de las metilinas de los sistemas de RM de tipo II en *A. platensis* 9108. La metilación fue evaluada como protección frente a digestión. Se muestra un control positivo de protección, el ADN genómico sin digerir (ADNg control), y un control negativo, el ADN digerido una enzima frente a la que el ADN de *A. platensis* 9108 no se encuentra protegida (*EcoRV*).

3.2.2. Transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens*

Dehghani *et al.*, 2018 ha descrito la transformación de una cepa de *Spirulina platensis* (*S. platensis* UTEX LB 2340) mediante *Agrobacterium tumefaciens*, de manera similar a los protocolos descritos en plantas y en microalgas. En cuanto al mecanismo, la base molecular de la transformación genética por *Agrobacterium*, es la transferencia desde esta bacteria y la integración en el genoma de una región de un plásmido presente en *Agrobacterium* (el ADN transferido o T-ADN). El procesamiento del T-ADN y su posterior exportación de la bacteria a la célula vegetal o microalga resultan en gran parte de la actividad de los genes de virulencia (*vir*) presentes en un plásmido auxiliar (Hellens *et al.*, 2000; Lacroix y Citovsky, 2018).

Tabla R.2.4. Metilasas asociadas a sistemas de RM de tipo II.

Metiltransferasa	MTasa identificada ^a	Locus ^b	Secuencia de reconocimiento y corte por enzima de restricción ^c
MTasa I	M. <i>Ava</i> I	AP9108_03600	5'...C YCGRG...3' 3'...GRGCY C...5'
MTasa II	M. <i>Ava</i> III (<i>Eco</i> T22I)	AP9108_30655	5'...ATGCA T...3' 3'...T ACGTA...5'
MTasa III	M. <i>Nsp</i> V	AP9108_31225	5'...TT CGAA...3' 3'...AAGC TT...5'
MTasa IV	M. <i>Sna</i> BI	AP9108_04400	5'...TAC GTA...3' 3'...ATG CAT...5'
MTasa V	M. <i>Age</i> I	AP9108_27710	5'...A CCGGT...3' 3'...TGGCC A...5'
MTasa VI	M. <i>Esp</i> I (<i>Bpu</i> 1102I)	AP9108_20450	5'...GC TNAGC...3' 3'...CGANT CG...5'
MTasa VII	M. <i>Sac</i> II	AP9108_02700	5'...CCGC GG...3' 3'...GG CGCC...5'
MTasa VIII	M. <i>Bsi</i> WI	AP9108_04100	5'...C GTACG...3' 3'...GCATG C...5'
MTasa IX	M. <i>Hgi</i> CI (<i>Ban</i> I)	AP9108_16900	5'...G GYRCC...3' 3'...CCRYG G...5'
MTasa X	M. <i>Tth</i> 111I	AP9108_24525	5'...GACN NNGTC...3' 3'...CTGNN NCAG...5'
MTasa XI	M. <i>Hgi</i> DI (<i>Hin</i> 1I)	AP9108_01515	5'...GR CGYC...3' 3'...CYGC RG...5'
MTasa XII	M. <i>Ap</i> II (<i>Pst</i> I)	AP9108_20760	5'...CTGCA G...3' 3'...G ACGTC...5'
MTasa XIII	M. <i>Nsp</i> I	AP9108_21810	5'...RCATG Y...3' 3'...Y GTACR...5'

^aLas metilasas forman junto con enzimas de restricción del mismo nombre los sistemas RM de *A. platensis* PCC 9108. ^b Número de acceso del genoma de *A. platensis* 9108: CP066886. ^c Se indica entre paréntesis el isoesquizómero utilizado en el laboratorio y reconocido en programas de análisis de secuencias. Y: C/T; R: A/G; N: A/C/G/T.

Para transformar *A. platensis* 9108 mediante esta técnica se empleó el plásmido pCAMBIA 1301, muy parecido al utilizado en Dehghani *et al.*, 2018. El T-ADN (entre las regiones LB y RB del pCAMBIA) que se transferiría e integraría en *A. platensis* se esquematiza en la Figura R.2.8A. Este ADN presenta el gen de resistencia a higromicina B bajo el promotor CaMV35S, frecuente en la transformación de microalgas (Doron *et al.*, 2016). Usando el protocolo descrito en Dehghani *et al.*, 2018 y en otros de transformación de microalgas mediante *A. tumefaciens*, se puso a punto para la *A. platensis* 9108 (Figura R.2.1).

Si bien en Dehghani *et al.*, 2018 se describe el protocolo utilizando *A. tumefaciens* GV3101, se probó con varias cepas para la puesta a punto de la transformación, manteniendo siempre el mismo plásmido. Se emplearon las cepas de *A. tumefaciens*: EHA 105 (tipo agropina), GV 3101 y C58 (tipo nopalina) y LBA 4404 (tipo octopina) (Hellens *et al.*, 2000). La selección de transformantes de *A. platensis* se realizó por resistencia a higromicina B, gen que se encuentra entre los T-bordes (Figura R.2.8A) (Lacroix y Citovsky, 2018). Para definir la concentración de higromicina B se realizó un antibiograma sobre cultivos DO_{560nm} de 2. Una concentración de 100 µg/mL o superior resultó en la reducción la viabilidad del cultivo. Al microscopio, se apreció una reducción de los filamentos y un cambio en la coloración de estos, que se veían claramente afectados por la higromicina B (Figura R.2.8B).

Además de la selección por higromicina B, en Dehghani *et al.*, 2018, se emplea un antibiótico para eliminar *A. tumefaciens* tras el co-cultivo con la cianobacteria. En este artículo y en otros trabajos con microalgas (Cha *et al.*, 2012; Kathiresan y Sarada, 2009; Pratheesh *et al.*, 2014), es habitual el uso de cefotaxima a 500 µg/mL, por lo que se comprobó la sensibilidad de *A. platensis* 9108 a este compuesto (Figura R.2.8C). Se probaron diferentes concentraciones de cefotaxima, haciéndose un seguimiento de la DO_{560nm} durante días. No obstante, la DO no reflejó adecuadamente la viabilidad del cultivo ya que, pese a no observarse una disminución elevada de esta a los 4 días, al microscopio se apreciaba un acortamiento o ruptura de los filamentos, incluso a las concentraciones más bajas ensayadas, de 50 µg/mL (Figura R.2.8C). Este efecto fue semejante cuando en lugar de utilizar cefotaxima en el medio de cultivo, se realizaban lavados con el mismo. Por otro lado, la timentina, antibiótico empleado en la transformación de plantas con *A. tumefaciens*, tampoco resultó adecuado para la selección, pues también afectaba a la viabilidad de *A. platensis*. Teniendo en cuenta estos resultados, se buscó otro antibiótico para eliminar *A. tumefaciens* partiendo de la sensibilidad observada en el antibiograma realizado con *A. platensis* 9108 (Figura R.2.5). Así, se probó el uso de tetraciclina, nalidíxico y apramicina a 100 µg/mL para la selección de *A. platensis* frente a *A. tumefaciens*. Solo la tetraciclina mostró un claro efecto bactericida en las cuatro cepas de *A. tumefaciens*, por lo que se eligió usar tetraciclina 100 µg/ml para eliminar *A. tumefaciens* tras el co-cultivo.

Se realizaron varios intentos de transformación con cultivo de *A. platensis* y co-cultivo en placa y posterior selección en medio líquido. En dichos experimentos se varió la cantidad de *A. tumefaciens* (DO_{600nm} 0.4 y 0.7) y el tiempo de pre-cultivo de *A. platensis* (5, 8 y 11 días), manteniendo fijo el volumen de *A. tumefaciens* (300 µL) y las condiciones de co-cultivo (Figura R.2.1). De los ensayos realizados, se observaron diferentes resultados con las distintas cepas de *A. tumefaciens*. En la mayor parte de transformaciones, tras el co-cultivo con *A. tumefaciens*, la agregación de filamentos de *A. platensis* en las placas era bastante evidente, aunque variaba en función de la cepa. En todos los ensayos, tras el co-cultivo y los consecutivos lavados con tetraciclina, parte del volumen recogido se creció en ausencia de higromicina B para comprobar la viabilidad de *A. platensis*. Para *A. tumefaciens* EHA 105, se observó supervivencia de *A. platensis* utilizando DO_{600nm} de 0.7 y placas de *A. platensis* de 5 días. No se apreciaron transformantes, aunque a los 6 días se observaba crecimiento en presencia de higromicina B. No obstante, claramente al microscopio se vio que los cultivos de *A. platensis* 9108 estaban afectados por la higromicina B (Figura R.2.9A). En el caso de las otras tres cepas, en general, sólo

se observó supervivencia de *A. platensis* utilizando placas de 11 días y una DO_{600nm} para *A. tumefaciens* de 0.4. En estas infecciones, tampoco se apreciaron transformantes tras 14 días de selección en presencia de higromicina B (Figura R.2.9B).

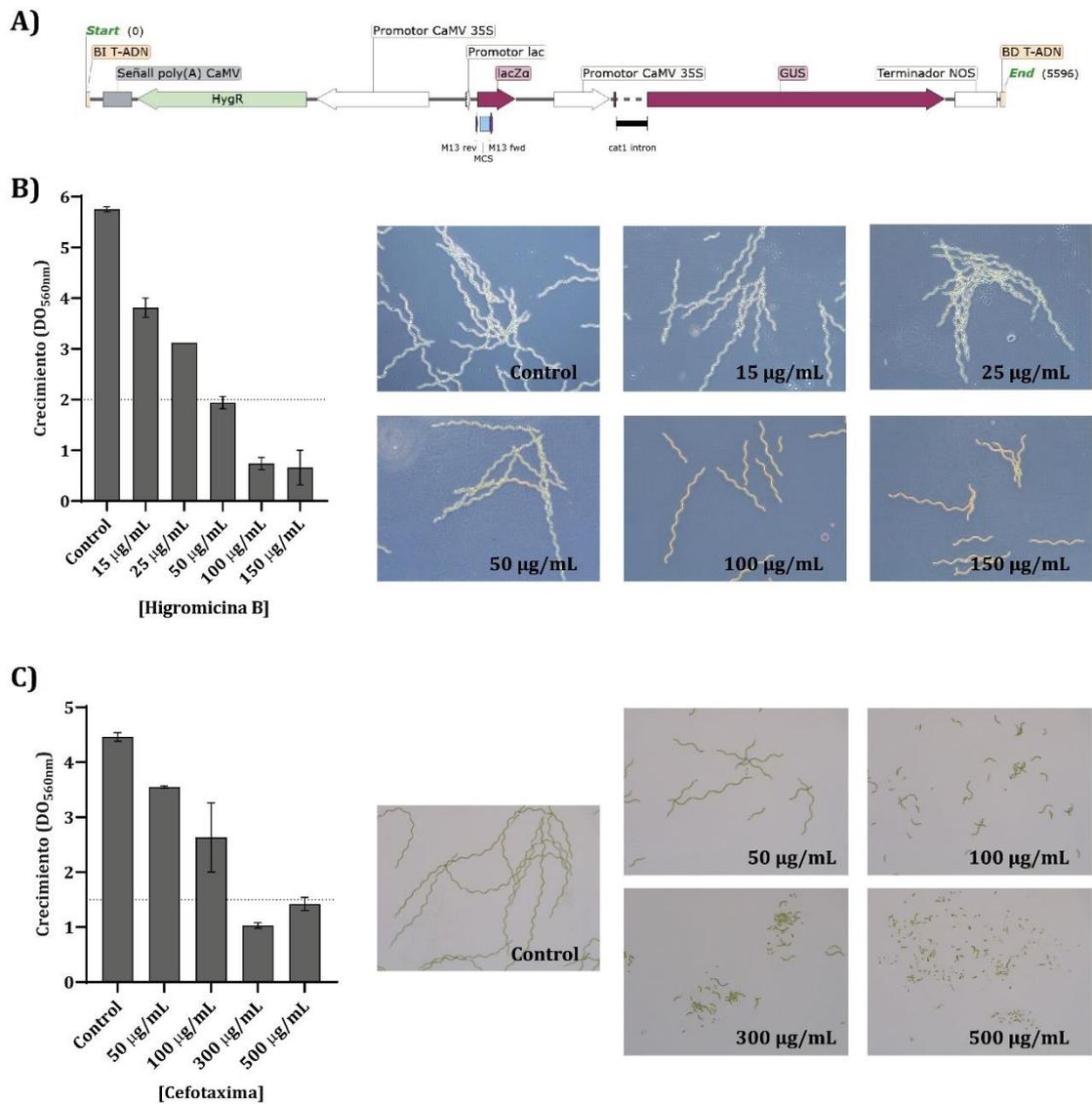


Figura R.2.8. Condiciones para la transformación de *A. platensis* 9108 mediante *A. tumefaciens*. A) T-ADN del pCAMBIA 1301 para la transferencia durante la infección con *A. tumefaciens*. BI, borde izquierdo; BD, borde derecho. B) Sensibilidad de *A. platensis* a Higromicina B, tras 6 días. C) Sensibilidad de *A. platensis* 9108 a cefotaxima. La línea punteada en B y C marca la DO_{560nm} de los cultivos al iniciar el experimento.

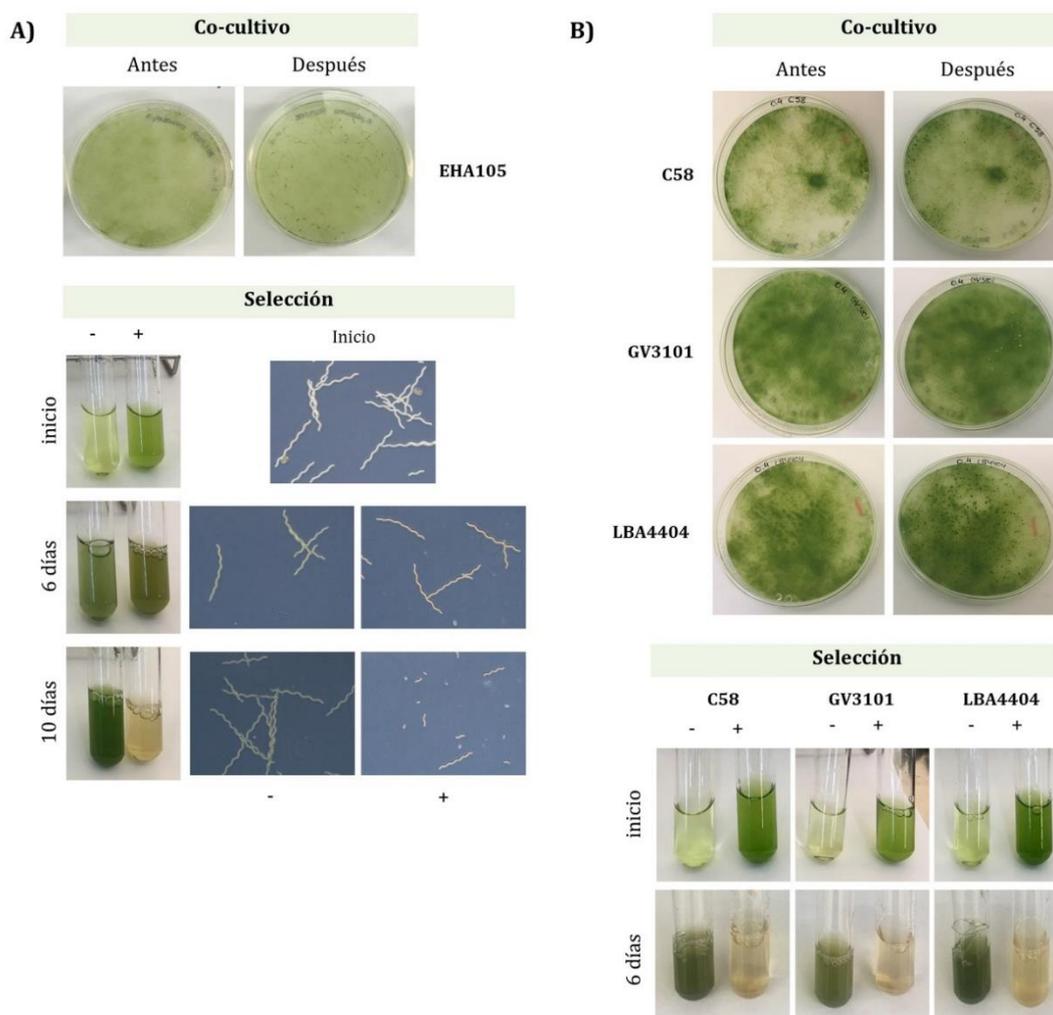


Figura R.2.9. Transformación de *A. platensis* 9108 mediante *A. tumefaciens*. **A)** Transformación con *A. tumefaciens* EHA 105 a DO_{600nm} de 0.7 en placas de *A. platensis* 9108 de 5 días. **B)** Transformación con *A. tumefaciens* C58, GV3101 y LBA4404 a DO_{600nm} de 0.4 en placas de *A. platensis* 9108 de 11 días. Los signos + y - de las imágenes hacen referencia a la presencia de higromicina B en el medio.

Los resultados anteriores mostraron las condiciones para la supervivencia de *A. platensis* tras la infección, pero no se consiguieron transformantes, por lo que se realizaron algunos cambios en el proceso de transformación antes del co-cultivo. Dado que en otros trabajos se había observado un mejor resultado incubando *A. tumefaciens* a un pH más bajo, temperatura inferior a 30°C o el uso de acetosiringona (inductor de los genes de infección de *A. tumefaciens*), se decidió incorporar estos cambios a la transformación de *A. platensis* (Kathiresan y Sarada, 2009; Prasad *et al.*, 2014). Así, se probó la transformación incubando *A. tumefaciens* a 25°C en presencia de UTEX a pH 6 o incubando a 25°C en LB con acetosiringona 100 μ M, en ambos casos durante 4 horas. Posteriormente, el cultivo fue lavado con medio UTEX, se ajustó la DO_{600nm} en función de la cepa de *A. tumefaciens* y se añadió a cultivos de *A. platensis* 9108. En ninguna de las transformaciones, el co-cultivo de la cianobacteria resultó viable en ausencia de higromicina B.

Por último, dado que *A. platensis* presenta fototaxia (habilidad para realizar movimientos orientados en respuesta a la intensidad de la luz), se observó que el crecimiento en placa dificultaba recoger todo el cultivo tras la infección con *A. tumefaciens*. Por este motivo, se creció *A. platensis* 9108 sobre filtros de nitrocelulosa durante 7 días o bien se añadió *A. platensis* crecida en medio líquido a filtros en el momento del co-cultivo con *A. tumefaciens*. En este caso, además de cultivo sin sonicar, adicionalmente se empleó cultivo sonicado o incubado 1 hora con NaCl 0.5 M. En todos estos experimentos, durante el co-cultivo, el filtro se mantuvo en placas de UTEX y se añadió *A. tumefaciens*. En todos los casos, los filtros con los diferentes tratamientos de *A. platensis* 9108 no co-cultivados con *A. tumefaciens*, crecieron en medio UTEX con tetraciclina, indicando que el tratamiento no afectaba a la viabilidad de *A. platensis*. En cambio, en ninguno de los ensayos se apreció supervivencia del cultivo control (co-cultivo con *A. tumefaciens*, crecido en ausencia de higromicina B) ni transformantes. A raíz de todos estos resultados, la conjugación mediante *A. tumefaciens* y el plásmido pCAMBIA no parecen ser idóneos para la transformación de *A. platensis* 9108.

3.2.3. Transformación por conjugación triparental

La conjugación triparental es un método de transferencia muy establecido en la transformación de cianobacterias (Gale *et al.*, 2019; Vioque, 2007, Introducción, 3.2.2. Conjugación). Para realizar la conjugación, se emplearon el plásmido pRK2013 como conjugativo y el plásmido pRL623 como auxiliar (Tabla R.2.2) Este último plásmido presenta tres metilasas de la cianobacteria *Anabaena* sp., y se emplea con frecuencia en la transformación de cianobacterias. En cuanto a los plásmidos a transferir, se probaron 5 plásmidos de la colección pSEVA (Tabla R.2.2, Silva-Rocha *et al.*, 2013, <http://seva-plasmids.com/>). Los plásmidos pSEVA421, 431, 441 y 451 son plásmidos replicativos, en los que lo único que cambia entre ellos es el origen de replicación: RK2 para el pSEVA421 y RSF1010 para el pSEVA451 que han mostrado ser funcionales en diferentes géneros de cianobacterias (Ferreira *et al.*, 2018; Vasudevan *et al.*, 2019, Capítulo 3). Por otro lado, el plásmido pBAMD1-4, a diferencia de los anteriores, presenta una transposasa hiperactiva modificada codificada por el gen *tnpA* que se encuentra adyacente a un segmento de ADN flanqueado por las secuencias terminales de la transposasa Tn5 (minitransposón) (Martínez-García *et al.*, 2014). Este módulo se integra en el genoma del hospedador, pero no la transposasa, que se encuentra fuera del módulo de transposición (Figura R.2.10).

En un primer intento, se probó la conjugación triparental en *spot* sobre membranas de nitrocelulosa con los plásmidos mencionados utilizando o no el plásmido pRL623, de acuerdo con el protocolo descrito en Materiales y métodos (2.3.2.2. Conjugación triparental). Se emplearon placas de medio UTEX con 5% de LB (v/v) para incubar la mezcla de *E. coli* con *A. platensis* 9108 durante dos días. Posteriormente, las membranas se transfirieron a placas de UTEX con espectinomicina 25 µg/mL. En este ensayo, aunque no se observaron transformantes, se vio que la cianobacteria sin conjugarse moría en placas con UTEX y 5% de LB. Se comprobó que el LB afectaba negativamente a la viabilidad de *A. platensis*, por lo que se pasó a emplear glucosa 15 mM como alternativa para mantener las mezclas conjugativas.

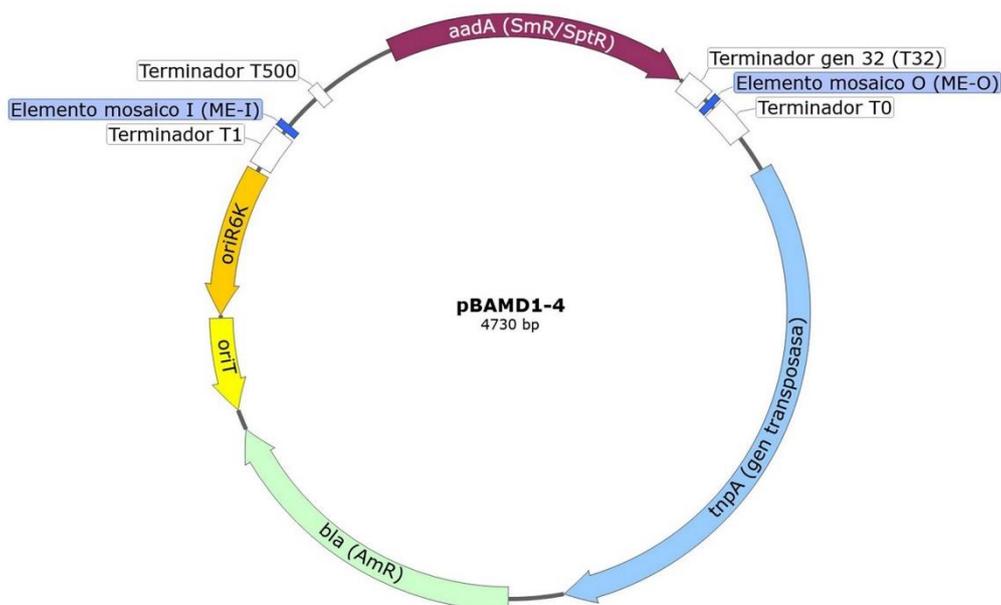


Figura R.2.10. Mapa del plásmido pBAMD1-4. *tnpA*, gen transposasa, los elementos mosaico son los bordes para transposición; *aadA*, gen de resistencia a estreptomicina y espectinomicina

En un segundo intento, empleando los mismos plásmidos que los mencionados anteriormente, se realizaron diversos intentos de transferencia génica cambiando algunas de las condiciones. En concreto, además de emplear el cultivo en fase exponencial, se realizaron varios tratamientos al cultivo de *A. platensis* 9108 para reducir la presencia de la capa de polisacáridos y mejorar la transferencia génica (Stucken *et al.*, 2012). En estos tratamientos se incluyó: la sonicación del cultivo y/o el tratamiento de los cultivos con NaCl 0.5 M durante 1 hora, previamente a la conjugación (Stucken *et al.*, 2012). Si bien los cultivos sometidos a sonicación y/o tratamiento con NaCl fueron capaces de crecer (control sin conjugar) en medio de cultivo sin antibióticos, no se observó crecimiento de transformantes. Todos estos resultados muestran que la conjugación triparental o bien los plásmidos empelados no son viables para la transformación de *A. platensis* 9108.

3.2.4. Transferencia génica mediante electroporación

3.2.4.1. Primera transformación mediante complejo transposómico

En un primer intento de transformación, se realizó una prueba siguiendo las condiciones indicadas en Jeamton *et al.*, 2017, con ligeras modificaciones diseñadas en base a lo descrito en Kawata *et al.*, 2004. En estos dos trabajos, se describe la transformación de *A. platensis* C1 utilizando la electroporación para introducir el ADN. Si bien en Kawata *et al.*, 2004 consiguieron la transformación de *A. platensis* C1 mediante la transposasa Tn5, este resultado no parecía ser reproducible y estable, por lo que en Jeamton *et al.*, 2017, los autores incluyeron algunos cambios. En este último trabajo, la transformación de *A. platensis* C1 se consiguió utilizando una transposasa comercial, incluyendo el ADN en liposomas (*DOTAP Liposomal Transfection*

Reagent, Roche) y utilizando un inhibidor de los sistemas de restricción modificación de tipo I (*Type One Inhibitor*, Epicentre). Además, el ADN utilizado se amplifica por PCR para evitar los sistemas de restricción de tipo IV.

En el primer ensayo, para la electroporación, se tomaron cultivos de *A. platensis* PCC 9108 a una DO_{560nm} de 0.45 – 0.65 y parte de los cultivos se sonicaron dos ciclos de 30 s. Tras la recuperación, cultivos sonicados y no sonicados, se recogieron y se prepararon células electrocompetentes a DO_{560nm} de 3 (2.8×10^6 cél/mL). Para la transformación se empleó el ADN transposómico presentado en Jeamton *et al.*, 2017 y un fragmento transposómico sintético diseñado en el laboratorio (Figura R.2.11). En paralelo, se llevó un control sin transposasa y ADN. Se aplicó un pulso eléctrico a 0.8 kV o 2.5 kV, manteniendo en ambos casos 200 Ω y 25 μ F y se probaron 2 y 7 días de recuperación. Para evitar perder cultivo en centrifugaciones, el volumen obtenido tras la recuperación de 2 o 7 días (1 mL), se sembró en varias placas con antibiótico, excepto un volumen de 100 μ L que plaqueó en UTEX sin antibiótico como control de la electroporación. Todos los cultivos se mantuvieron, tanto en recuperación como después (selección), a luz tenue de 8 μ mol fotón/m²s, similar a lo descrito en Kawata *et al.*, 2004 y Jeamton *et al.*, 2017. Tras un mes de incubación en dichas condiciones, no se observaron supervivientes en los controles sin y con ADN crecidos en ausencia de antibiótico, ni para los 2 ni para la muestra de 7 días de recuperación. Tampoco se observaron transformantes en ninguna de las placas. Por otro lado, cabe señalar que, en el caso de la recuperación de 7 días, se decidió poner el cultivo directamente en medio líquido. De esta forma se pensó que se podría determinar mejor si se obtenían o no transformantes. Además, se reducían también los problemas de desecación de placas durante la selección. En medio líquido, el cultivo no creció, ni tampoco se observaron transformantes al microscopio. Tras estos resultados se pensó que las condiciones de electroporación empleadas con *A. platensis* 9108 debían ser distintas a las utilizadas en Jeamton *et al.*, 2017 y que habría por tanto que optimizarlas.

3.2.4.2. Optimización de condiciones de electroporación

Teniendo en cuenta los resultados negativos anteriores y en base a los artículos publicados en los que se lleva a cabo la transformación de cepas de este género, se trató de desarrollar y aplicar un protocolo de transformación para nuestra cepa. Dentro del género *Arthrospira*, se ha encontrado disparidad en varios aspectos del proceso, como la cantidad de células, la intensidad del pulso empleado en la electroporación, la recuperación tras esta o la necesidad de sonicación previa del cultivo. Por esta razón, se realizaron experimentos en los que simplemente se buscó la supervivencia del cultivo, cualitativamente, por lo que no se utilizó ADN y los cultivos se crecieron en medio líquido sin antibiótico tras la electroporación. En la Tabla R.2.5 se resumen los parámetros optimizados durante los ensayos de electroporación.

Construcción de Jeamton et al., 2017



Construcción del laboratorio



Figura R.2.11. ADN utilizado en la transformación de *A. platensis* 9108 mediante transposición. Se muestra en ambos casos el casete de transposición amplificado por PCR, flanqueado por las regiones reconocidas por la Tn5 en azul. Se indican las enzimas de los sistemas de RM de tipo II de *A. platensis* que tienen secuencias de corte. PCp, promotor de gen de la ficocianina; Spt^R, resistencia a espectinomicina; Cm^R, resistencia a cloranfenicol; Ter, terminador.

En primer lugar, se ajustó el tipo de cultivo (sonicado o no), los lavados del cultivo previos a la electroporación, tiempo de recuperación, el medio de recuperación, y las condiciones de luz tras la recuperación. Los cultivos lavados con HEPES se ajustaron a una DO_{560nm} de 20, se tomaron alícuotas de 100 μ L y se electroporaron a 2.5 kV, 200 Ω y 25 μ F. Se escogió esta DO, más elevada a lo probado en el apartado anterior, por ser más cercana a lo descrito en Kawata *et al.*, 2004. Si bien tanto el cultivo sonicado como el no sonicado eran capaces de sobrevivir a la electroporación, los cultivos sonicados permitían un mejor manejo y mayor facilidad a la hora de preparar las células electrocompetentes. El uso de HEPES 1 ó 20 mM (pH 7.2) fue indiferente para la supervivencia del cultivo, por lo que se fijó el uso de HEPES 1 mM para los lavados durante la preparación de electrocompetentes. Por otro lado, en cuanto a la recuperación, no se observaron diferencias de viabilidad entre 2 y 7 días. Teniendo en cuenta posibles transformaciones futuras, 7 días podrían hacer demasiado complicada la selección de transformantes, por lo que se estableció dos días para recuperar el cultivo tras la electroporación. En lo que respecta al medio, para *A. platensis* PCC 9108 la recuperación se dio en mejor medida en medio UTEX, alcanzándose mayor una DO frente al UTEX modificado con 5 g $NaHCO_3$. Por último, cabe señalar que el crecimiento de los cultivos tras la recuperación sólo se dio a la intensidad de luz habitual (100 μ mol fotón / m^2s). Apenas se observaron filamentos cuando la luz utilizada para el crecimiento fue de 8 μ mol fotón / m^2s .

A la luz de los resultados anteriores, se hicieron variaciones en la DO_{560nm} de las células electrocompetentes (entre 12 y 30) y el volumen utilizado en las electroporaciones. Así, se probó también un volumen inferior (40 μ L) y una intensidad de electroporación menor (0.8 kV). Los cultivos sobrevivieron sin problemas. Además, tampoco se apreció un efecto negativo en la supervivencia a la electroporación en el uso de medio líquido o agar y tipo de agar para el crecimiento del cultivo electroporado (Tabla R.2.5). Por tanto, el principal aspecto a considerar en la electroporación fue el crecimiento posterior del cultivo, que debe realizarse en las mismas condiciones de crecimiento habitual, esto es 100 μ mol fotón / m^2s .

Tabla R.2.5. Parámetros optimizados en la electroporación de *A. platensis* PCC 9108.

Parámetro	Cambios	Mejor condición
Tipo de cultivo	Sin sonicar Sonicado	Sonicado
Lavado del cultivo	HEPES 1 mM HEPES 20 mM	HEPES 1 mM
Intensidad de electroporación	0.8 kV, 200 Ω , 25 μ F 2.5 kV, 200 Ω , 25 μ F	2.5 kV, 200 Ω , 25 μ F
Volumen de electroporación y concentración de células	40-300 μ L, de DO _{560nm} 12-30	100 μ L, DO _{560nm} indiferente
Uso de estabilizadores osmóticos y sales	<u>Sal</u> : NaCl 10 mM <u>Estabilizadores</u> : Glucosa (5, 12 y 25%); Glicerol (1, 10, 25%) y PEG600 (1, 10, 20%)	Glucosa 12%
Medio de recuperación	UTEX (13.61 g NaHCO ₃) UTEX modificado (5 g NaHCO ₃)	UTEX
Tiempo de recuperación	2 y 7 días, estático 8 μ mol fotón/m ² s	2 días
Crecimiento recuperación	tras Luz normal 100 μ mol fotón /m ² s, Luz reducida 8 μ mol fotón /m ² s Placa, líquido	Luz normal, medio líquido o placa

Por otra parte, aunque se había conseguido un buen resultado para la supervivencia como consecuencia de una primera optimización, se decidió estudiar también el uso de estabilizadores osmóticos y sales durante los lavados del cultivo de *A. platensis* 9108 y su efecto en la supervivencia tras la electroporación. Se escogieron la glucosa, el polietilenglicol y el glicerol como agentes estabilizadores y el NaCl como sal, en base a lo descrito en la patente Takeuchi y Roberts, 2018, en la cual se describe la transformación de *A. platensis*. En estos experimentos, se emplearon cultivos con y sin sonicación, así como se llevó paralelo un control sin electroporar de los cultivos lavados con estabilizadores y/o sal. Se escogieron tres concentraciones de cada estabilizador, tomando la mínima y máxima, y una concentración intermedia de acuerdo con el rango de concentraciones indicadas en la patente Takeuchi y Roberts, 2018. En cuanto al uso de NaCl, si bien se comenzó probando 50 mM, esta concentración interfería con la electroporación. Por ello, se disminuyó el uso de concentración de sal hasta que el tiempo de electroporación fuese igual a lo obtenido anteriormente, escogiéndose una concentración de 10 mM.

Los resultados con NaCl y estabilizadores osmóticos mostraron que el uso de NaCl es negativo para la supervivencia del cultivo independientemente del uso de estabilizador osmótico, con excepción de la glucosa al 12% (Figura R.2.12). Cabe señalar que ningún control sin electroporar se vio afectado por los lavados en presencia de NaCl 10 mM. Por tanto, puesto que incluso el cultivo lavado solo con NaCl en HEPES no sobrevive, la sal afecta negativamente a la supervivencia tras la electroporación.

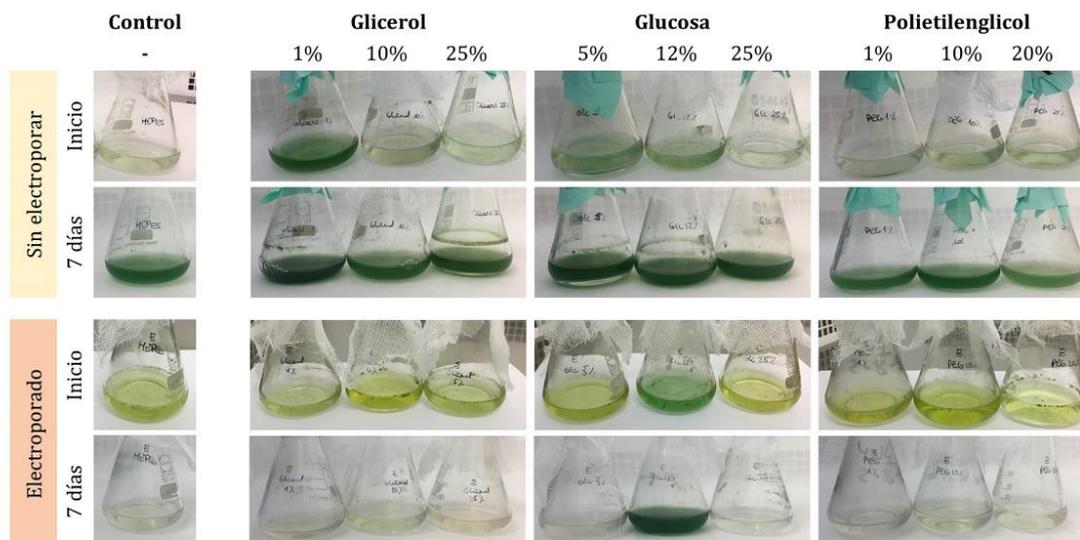


Figura R.2.12. Supervivencia de *A. platensis* 9108 tras electroporación utilizando estabilizadores osmóticos y NaCl 10 mM. En el panel superior se muestran cultivos sin electroporar, pero lavados con los agentes estabilizadores y el NaCl. Los porcentajes indicados expresan la cantidad en v/v para el glicerol y el polietilenglicol, y como p/v para la glucosa.

Dados los resultados obtenidos para el uso de estabilizador osmótico y NaCl, se probó únicamente utilizar los primeros, manteniendo las concentraciones seleccionadas. En la Figura R.2.13 se muestran los resultados obtenidos para cultivos sonicados, en los que se vio que *A. platensis* crecía mejor tras la electroporación utilizando estabilizadores osmóticos frente al uso únicamente de HEPES 1 mM (control). El glicerol al 25% afectó al crecimiento del cultivo, por lo que este puede ser el motivo por el que tampoco se aprecia crecimiento tras la electroporación. En el resto de los casos, el uso de un agente estabilizador durante los lavados no afectó al cultivo sin electroporar. En lo que respecta a la electroporación, la glucosa al 25% y PEG al 10% no funcionaron. En este último caso, el resultado parece indicar más un problema al electroporar que un efecto negativo del mismo, ya que se observa supervivencia a una concentración superior. Se escogió la glucosa al 12% como estabilizador osmótico para llevar a cabo las electroporaciones.

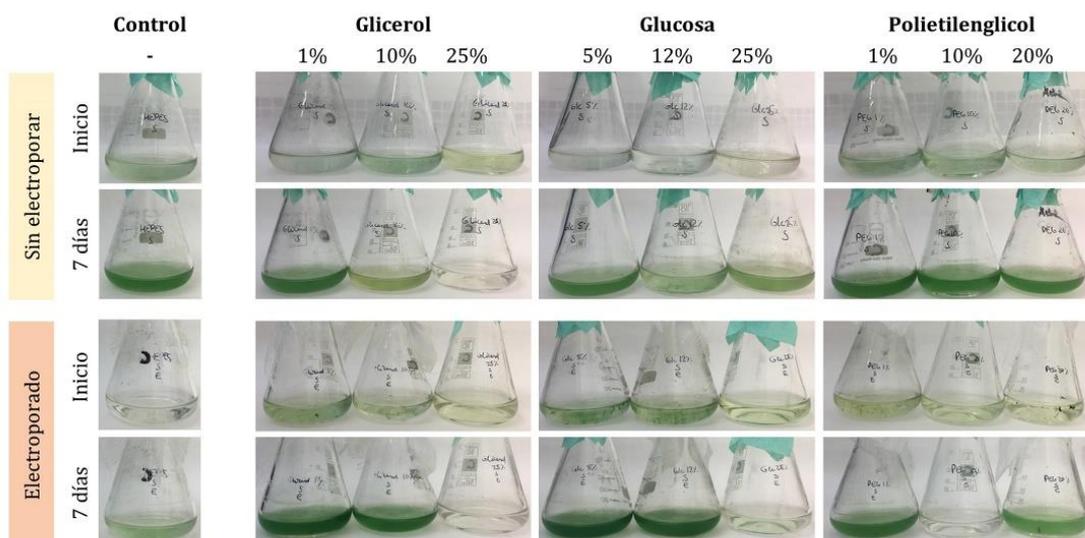


Figura R.2.13. Supervivencia de *A. platensis* 9108 tras electroporación utilizando estabilizadores osmóticos. En el panel superior se muestran cultivos sin electroporar pero lavados con los agentes estabilizadores. Los porcentajes indicados expresan la cantidad en v/v para el glicerol y el polietilenglicol, y como p/v para la glucosa.

3.2.4.3. Segunda transformación mediante complejo transposómico

Tras la optimización de la electroporación, se intentó una segunda transformación de *A. platensis* 9108. Para esta segunda prueba, de nuevo se empleó el ADN transposómico del trabajo de Jeamton *et al.*, 2017 (pAG44) y el fragmento transposómico sintético diseñado en el laboratorio para los experimentos de transformación (Figura R.2.11). Además, se incluyó como control la cepa referenciada en el artículo, *A. platensis* C1.

Teniendo en cuenta la optimización realizada, para electroporar *A. platensis* 9108 se escogieron las condiciones que mejor resultado dieron, esto es sonicando el cultivo y empleando glucosa al 12% en HEPES 1 mM en los lavados. En cambio, para *A. platensis* C1 se emplearon las condiciones indicadas en Jeamton *et al.*, 2017 las cuales fueron comprobadas previamente a la transformación con la transposasa. En la Figura R.2.14, se muestra el resultado obtenido para esta prueba. Pese a que los controles de sonicación y de electroporación sobrevivieron (no se añade antibiótico), no se observaron resultados positivos para la integración de la resistencia a antibiótico.

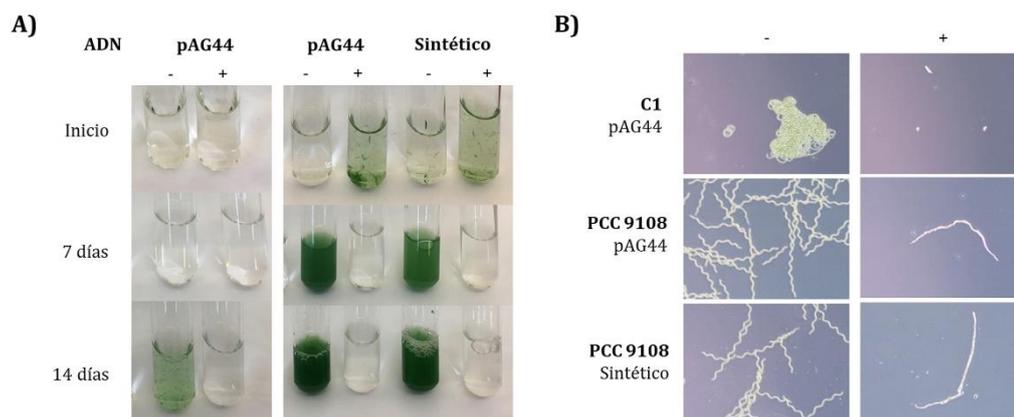


Figura R.2.14. Transformación de *A. platensis* 9108 mediante transposición. A) Resultado de electroporación. **B)** Microfotografías de los cultivos electroporados. Los signos + y - indican el uso de antibiótico de selección. En el caso del pAG44 es espectinomicina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y para el sintético (construcción de laboratorio), cloranfenicol (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Más información sobre el ADN empleado se muestra en la Figura R.2.11.

3.2.5. Transformación utilizando metilasas comerciales

Además de intentar transformar *A. platensis* 9108 mediante transposición y ADN en liposomas, se estudió el uso de metilasas comerciales para modificar el ADN *in vitro* y aumentar así las probabilidades de evadir los sistemas de restricción-modificación de esta cianobacteria (Tabla R.2.4). Se escogió el plásmido pSEVA351 con origen RSF1010, ampliamente usado en cianobacterias para las pruebas de metilación *in vitro*. Sobre este plásmido se buscaron las dianas de las enzimas de restricción de los sistemas RM de tipo II de *A. plantesis* (Tabla R.2.6). Posteriormente, se hicieron estudios de metilación *in vitro* con las metiltransferasas M.SssI y M.CviPI, optimizando la metilación del plásmido y utilizando como control el ADN del fago Lambda. Estas dos enzimas metilan todos los residuos de citosina dentro de la secuencia de reconocimiento 5'...CG...3' (M.SssI) o 5'...GC...3' (M.CviPI). Si bien esta metilación no es la misma que ocurriría de manera natural en la cianobacteria, es probable que la adición de grupos metilo en esas secuencias ayude a bloquear el ataque de las enzimas de restricción de *A. platensis*.

El plásmido pSEVA 351 y el ADN del fago Lambda fueron sometidos a metilación con M.SssI y M.CviPI por separado y posteriormente, el ADN se sometió a digestión con enzimas de restricción. Se consideró metilación positiva cuando el plásmido mantenía el mismo patrón que el plásmido sin digerir. En cambio, si tras la metilación, la digestión daba el mismo patrón que el plásmido sin metilar y digerido, se consideraba que la metilación no estaba protegiendo de la digestión. Las mejores condiciones para la metilación fueron 37°C, 10 mM DTT, 32 μM de SAM y 1.2 U de enzima, por cada 1 μg de DNA. En cuanto al tiempo de metilación, no se observó gran diferencia entre un tratamiento de 1 hora y O/N.

Tabla R.2.6. Dianas de enzimas de restricción de los RM de *A. platensis* 9108 sobre el pSEVA351.

Enzima	Secuencia de reconocimiento	Nº dianas	Secuencia en pSEVA351	Metiltransferas a protectora (NEB)
<i>AvaI</i>	5'...C/YCGRG...3' 3'...GRGCV/C...5'	2	5'...CCCGGG...3', 5'...CTCGGG...3'	M. SssI
<i>EspI</i> (<i>Bpu1102I</i>)	5'...GC/TNAGC...3' 3'...CGANT/CG...5'	1	5'...GCTAAGC...3'	M. CviPI
<i>SacII</i>	5'...CCGC/GG...3' 3'...GG/CGCC...5'	1*	5'...CCGCGG...3'	M. CviPI o M. SssI
<i>HgiDI</i> (<i>Hin1I</i>)	5'...GR/CGYC...3' 3'...CYGC/RG...5'	6	5'...GGCGTC...3', 5'...GGCGCC...3', 5'...GGCGTC...3', 5'...GGCGTC...3', 5'...GCGTC...3', 5'...GACGCC...3'	M. CviPI o M. SssI
<i>HgiCI</i> (<i>BspT107I</i>)	5'...G/GYRCC...3' 3'...CCRYG/G...5'	6	5'...GGTACC...3'**, 5'...GGCGCC...3', 5'...GGCACC...3', 5'...GGCACC...3', 5'...GGTGCC...3', 5'...GGTGCC...3'	M. CviPI y M. SssI
<i>ApII</i> (<i>PstI</i>)	5'...CTGCA/G...3' 3'...G/ACGTC...5'	1	5'...CTGCAG...3'	M. CviPI
<i>NspI</i>	5'...RCATG/Y...3' 3'...Y/GTACR ...5'	3	5'...GCATGC...3', 5'...ACATGC...3', 5'...ACATGC...3'	M. CviPI

AvaIII, *NspV*, *SnaBI*, *AgeI*, *BsiWI* y *Tth111I* identificadas en los sistemas de restricción-modificación de *A. platensis*, no cortan en este plásmido. Entre paréntesis se muestra el isoesquímico disponible en el laboratorio. * La enzima de restricción requiere dos sitios para la digestión. ** Presenta en 5' C, previo a la secuencia de reconocimiento. Y: C/T; R: A/G; N: A/C/G/T.

Durante los ensayos anteriores, se observó que se obtenía poco ADN tras la purificación del plásmido, pues más de un 50% se perdía. Además, de las dos metilasas comerciales, *CviPI* era la que más dianas protegía (Tabla R.2.6). Por esta razón, se metiló el pSEVA351 únicamente con la metiltransferasa mencionada. Los resultados obtenidos de metilación para el pSEVA351 con la metiltransferasa *CviPI* se muestran en la Figura R.2.15. Si bien el análisis *in silico* mostraba que la protección no sería completa utilizando una sola metiltransferasa (Tabla R.2.6), gran parte de las dianas de digestión quedan protegidas, lo que podría incrementar las posibilidades de éxito en una transformación. No obstante, pese a que para algunas de las enzimas mostradas el plásmido metilado no era digerido, no se obtuvieron transformantes cuando se electroporó el mismo en *A. platensis* 9108.

Si bien la electroporación parece la manera más frecuente de transformación de esta cianobacteria, en *A. platensis* 9108 no ha resultado favorable.

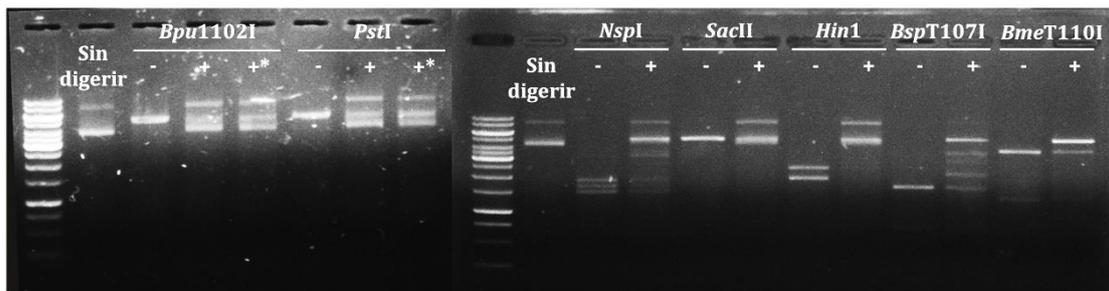


Figura R.2.15. Ensayo de metilación *in vitro* del pSEVA351. Protección de pSEVA351 frente a digestión tras metilar únicamente con *M.Cvi*PI (New England Biolabs). * Metilación con menor cantidad de enzima, 1.2U/ μ g ADN. El resto se metiló con 4U/ μ g ADN.

En resumen, en este Capítulo 2 se ha caracterizado el crecimiento de la cianobacteria *A. platensis* 9108 en diferentes condiciones. Por otro lado, la transferencia de ADN ya sea como plásmidos replicativos o para integrarse en el genoma de la cianobacteria, fue evaluada mediante conjugación con *Agrobacterium tumefaciens*, conjugación triparental con *E. coli* y electroporación. En la transformación con *A. tumefaciens* se emplearon diferentes cepas, mientras que para la conjugación triparental se utilizaron plásmidos con diferentes orígenes de replicación. Además, se han definido las mejores condiciones para la electroporación de esta cianobacteria empleando estabilizadores osmóticos y se han utilizado metiltransferasas comerciales para tratar de proteger el ADN frente a los sistemas RM de *A. platensis* 9108. No se consiguieron transformantes para ninguno de los protocolos ensayados, por lo que son necesarios más estudios, principalmente sobre los sistemas genéticos de defensa en esta cianobacteria, para desarrollar protocolos de transformación genética.

Capítulo 3.

Desarrollo de herramientas moleculares en cianobacterias de interés biotecnológico

Parte de los resultados de este capítulo se ha publicado como:

Baldanta, S.#, Guevara, G. # & Navarro-Llorens, J.M. SEVA-Cpf1, a CRISPR-Cas12a vector for genome editing in cyanobacteria. *Microbial Cell Factories* 21, 103 (2022).

<https://doi.org/10.1186/s12934-022-01830-4>

Grupo de Ingeniería Metabólica, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,
Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid.

Estos autores han contribuido igualmente

1. ANTECEDENTES

Tanto si las cianobacterias se emplean para un fin biotecnológico o de investigación básica, la manipulación genética y la expresión heteróloga de genes son etapas esenciales. Si bien para algunas cianobacterias se emplean plásmidos integrativos, para ciertas aplicaciones la modificación genética se lleva a cabo mediante plásmidos replicativos. La colección de plásmidos SEVA (3.1.3. Sistemas de vectores modulares para ingeniería genética de cianobacterias) es particularmente interesante debido a la estructura modular e intercambiable de sus plásmidos (García-Gutiérrez *et al.*, 2020; Silva-Rocha *et al.*, 2013), lo que ha permitido la creación de numerosos plásmidos empleados principalmente en *E. coli* y *P. putida*, aunque cada vez se está extendiendo más su uso a otros microorganismos, como *Streptomyces* sp. y *Bacillus* sp. (García-Gutiérrez *et al.*, 2020; Radeck *et al.*, 2017). En cuanto a cianobacterias, *Synechocystis* 6803 admite los plásmidos pSEVA con ori RSF1010 y RK2, introducidos con éxito mediante transformación natural, electroporación y conjugación para expresar genes heterólogos (Ferreira *et al.*, 2018; Vasudevan *et al.*, 2019). Por esta razón, la existencia de esta plataforma SEVA puede ser prometedora en el desarrollo de herramientas en cianobacterias.

A nivel de modificación genética, la tecnología CRISPR-Cas se ha desarrollado con éxito en cianobacterias para una edición precisa del genoma en diferentes géneros incluyendo especies de *Synechococcus* y *Synechocystis* sp., empleando tanto la Cas9 como la Cpf1 (Cas12a) (Behler *et al.*, 2018; Niu *et al.*, 2019; Wendt *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2018). En la actualidad, la ingeniería genómica basada en CRISPR en cianobacterias se encuentra todavía en pleno desarrollo, ya que aún existen algunos desafíos que superar, por ejemplo, la necesidad de aumentar el repertorio de plásmidos para aplicaciones CRISPR que podrían permitir una expresión episomal adecuada para la nucleasa CRISPR (Xia *et al.*, 2019).

En concreto, Ungerer y Pakrasi, 2016 aplicaron el sistema CRISPR-Cpf1 en tres cianobacterias diferentes, *Synechococcus*, *Synechocystis* y *Anabaena*, expresando los componentes de CRISPR en el plásmido replicativo pSL2680 (*Addgene* #85581) (Ungerer y Pakrasi, 2016). Aunque estos investigadores lograron editar las cianobacterias usando plásmidos derivados del pSL2680, también indicaron que el 90% de la preparación del plásmido es ADN de cadena simple (ssADN, *single strand DNA*) y, por lo tanto, no se puede clonar (*Addgene* #85581 material complementario). En el laboratorio, se ha visto que es un plásmido con el que es difícil trabajar en comparación con otros y para cada paso es necesario preparar una gran cantidad. Otros autores también han indicado ciertos problemas a la hora de trabajar con este plásmido, lo que los ha llevado a realizar algunas modificaciones en el mismo (Niu *et al.*, 2019). La técnica CRISPR requiere varios pasos de clonaje, y por eso es necesario contar con un plásmido que pueda producir una gran cantidad, con buena estabilidad y que sea fácil de manejar, lo que acortaría el tiempo necesario para el clonaje y para la construcción de una cepa de cianobacteria mutante.

Dada la necesidad de incrementar las herramientas biotecnológicas en cianobacterias se comenzó a trabajar con diferentes especies. Así, en el Capítulo 3 de esta Tesis Doctoral, se desarrollaron diferentes herramientas moleculares empleando principalmente la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803, pero también *Anabaena* sp. PCC 7120 y *Chroococcidiopsis* sp. B13 (obtenida en el Capítulo 1) (en adelante *Synechocystis* 6803, *Anabaena* 7120 y *Chroococcidiopsis* B13). Los objetivos específicos contemplados en este Capítulo 3, todos ellos empleando plásmidos SEVA, son: (i) la evaluación de la transferencia de plásmidos en diferentes cianobacterias, (ii) el estudio de promotores y (iii) el desarrollo de CRISPR-Cas12a.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla R.3.1 junto con su procedencia y características genotípicas y fenotípicas relevantes.

Tabla R.3.1. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo.

Cepa	Descripción	Referencia
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Cepa Silvestre	Cedida por Dr. Luis López-Maury (IBVF-CSIC)
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	Cepa Silvestre	Cedida por Dr. Luis López-Maury (IBVF-CSIC)
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. B11	Cepa Silvestre	Colección del laboratorio (Capítulo 1)
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. B13	Cepa Silvestre	Colección del laboratorio (Capítulo 1)
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. B14	Cepa Silvestre	Colección del laboratorio (Capítulo 1)
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. B15	Cepa Silvestre	Colección del laboratorio (Capítulo 1)
<i>E. coli</i> DH5 α	Cepa de clonaje; F' <i>endA1 hsdR17 (r_K m_K⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^R) relA1 Δ(argF-lac) U169 deoR (ϕ80dlacΔ(lacZ)M15)</i>	Colección del laboratorio
<i>E. coli</i> CC118	Cepa de clonaje; D(<i>ara-leu</i>) <i>araD DlacX174 galE galK phoA thiE1 rpsE rpoB(Rif^R) argE(Am) recA1</i>	Colección del laboratorio
<i>E. coli</i> CC118 lamda pir	Cepa para plásmidos con origen de replicación R6K; Δ (<i>ara-leu</i>) <i>araD DlacX174 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE (Am) recA1, λpir lysogen</i>	Colección del laboratorio
<i>E. coli</i> HB101	Cepa para conjugación; F- λ - <i>hsdS20(rB- mB-) recA13 leuB6(Am) araC14 Δ(gpt-proA)62 lacY1 galK2(Oc) xyl-5 mtl-1 thiE1 rpsL20 glnX44B(AS)B</i>	Colección del laboratorio

Los plásmidos empleados en este trabajo, junto con sus características más relevantes se muestran en la Tabla R.3.2.

Tabla R.3.2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Referencia
pRK2013	Plásmido para conjugación, proporciona los genes <i>tra</i> y función de corte de RK2, Km ^R	Elhai y Wolk, 1988
pRL623	Plásmido auxiliar, lleva los genes para las metilasas M.AvaI, M.Eco47II y M.EcoT22I y los genes <i>mob</i> de ColK. Cm ^R , ColK oriV	Elhai <i>et al.</i> , 1997
pSEVA 421	Plásmido replicativo, Sm ^R /Spt ^R ori RK2	Silva-Rocha <i>et al.</i> , 2013
pSEVA 431	Plásmido replicativo, Sm ^R /Spt ^R , ori pBBR1	Silva-Rocha <i>et al.</i> , 2013
pSEVA 441	Plásmido replicativo, Sm ^R /Spt ^R , ori pRO1600/colE1	Silva-Rocha <i>et al.</i> , 2013
pSEVA 451	Plásmido replicativo, Sm ^R /Spt ^R , ori RSF1010	Silva-Rocha <i>et al.</i> , 2013

pBAMD1-4	Plásmido con Mini-Tn5 y Cassete de integración, Amp ^R , Sm ^R /Spt ^R , ori R6K	Martínez-García <i>et al.</i> , 2014
pSEVA 351	Plásmido replicativo, Cm ^R , ori RSF1010	Silva-Rocha <i>et al.</i> , 2013
pCRISPomyces-2	pSG5 ori, Apra ^R , CRISPR (<i>cas9</i> and plataforma para clonar ARNg)	Cobb <i>et al.</i> , 2015
pSL2680	RSF1010 ori, Km ^R , CRISPR (<i>cpf1</i> y matriz de CRISPR)	Ungerer y Pakrasi, 2016
pSEVA351-Cpf1	pSEVA351 con la maquinaria CRISPR de pSL2680.	Este trabajo
pSEVA451-Cpf1	pSEVA451 con la maquinaria CRISPR de pSL2680	Este trabajo
pSEVA-Cpf1-nbIA	pSEVA351Cpf1 con la matriz de CRISPR con un ARN guía frente a <i>nbIA</i> , con brazos de homología para generar un <i>knock-out</i> .	Este trabajo
pSEVA351-Pc223-YFP	<i>yfp</i> expresada bajo el promotor P _{c223} (Markle <i>et al.</i> , 2015), en pSEVA351. Cm ^R	Este trabajo

La síntesis de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fue encargada a la empresa Conda. El nombre, la secuencia y la aplicación de los oligonucleótidos en el presente trabajo se detallan en la Tabla R.3.3.

Tabla R.3.3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Uso
CH610	CTCGAGACTAGTGGATCCTCGATGTAACCCACTCGTGC	Amplificación del Casete de CRISPR de pSL2680. Los sitios de restricción están marcados en negrita
CH611	TACGTAAGTACTAGGCCTTCTAGAGTCGACGGTACCAA	
AL001	5P-AGATGCTTGCTGTCTTAGCCATTA	ARN guía frente a <i>nbIA</i>
AL002	5P-AGACTAATGGCTAAGACAGCAAGC	
AL004	GATGCCATAAACCTAGAGTTGAGCTGTTGCCCTCCAAGG	Cebadores para PCR solapada para la delección de <i>nbIA</i>
AL005	CCTTGAGGGCAACAGCTCAACTCTAGGTTTAGGCATC	
AL015	ACTCTAGAAGGGACCCACCCAAGGAAATGCATTACTTAC	Clonaje por <i>kit In-fusion</i> en pSEVA. La región homóloga se muestra en negrita.
AL016	GCAAGCTTGCATGCCGATAGCCCTGAGCACCAGAAG	
AL034	GGTAGCGTTGCCAATGATGT	Verificación de pSL2680 (Gen Km ^R)
AL035	GGCAAGATCCTGGTATCGGT	
Oligo 7	TGATCGGCACGTAAGAGGTTCC	Verificación pSEVA351 (Gen Cm ^R)
Oligo 8	TTACGCCCCGCCCTGCCACT	
AL040	ATGCCTCGGCATCCAAGCA	Verificación pSEVA451 (Gen Spt ^R)
AL041	TCAGCAAGATAGCCAGATCA	
AL036	CAATCTCTACCTAGCTCTGACA	Verificación delección <i>nbIA</i>
AL037	TTGTTGGGATGTATAACCCTGG	
SB69	GCAAACGAAGACAGTCGACTGCAGCAGACTCATTAAACA TACGCT	Amplificación promotor y <i>yfp</i> de plásmido pNS2-Pc223-YFP (Capítulo 4, Tabla R.4.3)
SB72	AGATGCCACGTGCAAATAGCTAGCTCACTCGGTC	
SB80	ATAAGATCACTACCGGGCGT	Verificación pSEVA351 (Amplificación parcial del Cm ^R)
SB81	GTGTAGAAACTGCCGAAATC	

2.2. Medios y condiciones de cultivo

Todas las soluciones y medios de cultivo utilizados en este trabajo se esterilizaron por calor húmedo en un autoclave a 121°C y 1 atm de presión o mediante filtración utilizando filtros estériles Millipore de 0.2 µm de diámetro (Merck).

2.2.1. Medios y condiciones de cultivo empleados para *E. coli*

El cultivo de *E. coli* se realizó en el medio rico Luria Bertani (LB) a 250 rpm, a 37°C (Green y Sambrook, 2012). Los cultivos en medio sólido se realizaron con medio LB con 1.5% de agar (Conda). Cuando fue necesario, se añadieron antibióticos a las siguientes concentraciones finales: Amp 100 µg/mL, Sm 50 µg/mL, Km 50 µg/mL, Cm 34 µg/mL. El crecimiento del cultivo en medio líquido se determinó en base a la medida de la DO_{600nm} con un espectrofotómetro (Ultrospect® 1000E).

2.2.2. Medios y condiciones de cultivo empleados para las cianobacterias

Habitualmente, los cultivos líquidos se crecieron a 30°C con agitación 150 rpm e iluminancia constante (100 µmol fotón/m²s) en medio BG11 tamponado con HEPES 10 mM a pH 7.5 (Rippka *et al.*, 1979; Capítulo 1, Tabla R.1.3). El crecimiento del cultivo se determinó en base a la medida de DO_{750nm} con un espectrofotómetro (Ultrospect® 1000E). Cuando fue necesario, los antibióticos fueron añadidos a las concentraciones adecuadas: Km 50 µg/mL y Cm 10 µg/mL para *Synechocystis* 6803 y *Chroococcidiopsis* sp., y Nm 50 µg/mL y Spt 10 µg/mL para *Anabaena* 7120. Para el cultivo sólido se usaron placas de agar purificado (Conda) al 1.5% (p/v) y se incubaron a 30°C y 60-80 µmol fotón /m²s. Para los experimentos de transformación por conjugación se emplearon placas de BG11 con agar y 5% (v/v) de LB.

2.2.3. Sensibilidad a antibióticos

La sensibilidad a antibióticos se evaluó probándose diferentes concentraciones para cada antibiótico, considerando las comúnmente utilizadas en nuestro laboratorio. Para las *Chroococcidiopsis* sp. se analizó: 7.5 - 75 µg/mL Cm, 20-150 µg/mL Km, 25-250 µg/mL Nm, 2-20 µg/mL Spt, 2-20 µg/mL Spm, 2-20 µg/mL Gm, 20-200 µg/mL eritromicina (Em) y Apra 10-100 µg/mL ácido nalidíxico. Los ensayos se realizaron en placas de BG11 agar, sobre las que se añadieron gotas de 10 µL a DO_{750nm}=1 de cada uno de los cultivos cianobacterianos. Las placas se incubaron a 30°C durante 7 días a 60-80 µmol fotón/m²s. En el caso de *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120, se probaron los antibióticos en concentraciones ya empleadas en la bibliografía para estas dos cianobacterias en medio líquido, a una DO_{750nm} inicial de 0.05.

2.2.4. Conservación de las cepas bacterianas

Las cianobacterias y las bacterias se conservaron a -80°C, en DMSO al 5% (v/v) en BG11 y LB con glicerol al 20% (v/v), respectivamente.

2.3. Experimentos de transferencia génica

2.3.1. Transformación de *E. coli*

Las células de *E. coli* fueron modificadas genéticamente por transformación tras hacerlas competentes mediante el método de cloruro de cálcico y choque térmico (Green y Sambrook, 2012). La selección de los transformantes se llevó a cabo en placas de LB agar suplementadas con el antibiótico apropiado.

2.3.2. Transformación de cianobacterias

2.3.2.1. Transformación natural de *Synechocystis* sp. PCC 6803

Para la transformación natural, un cultivo *Synechocystis* 6803 en fase exponencial temprana ($DO_{750nm} \approx 0.7$) se centrifugó a 4000 rpm 20°C durante 5 min. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 100 μ L de BG11 por cada 10 mL de cultivo. Para cada transformación natural, se emplearon 100 μ L de células competentes y 1 μ g de ADN. La DO_{750nm} de las células competentes fue siempre de ~ 40 . Después de 5 h de incubación a 30°C, las células se sembraron en membranas de nitrocelulosa (*Immobilon-NC*, Millipore) sobre BG11 sin antibióticos y se incubaron a 30°C durante 2 días. Luego, los filtros se transfirieron a BG11 con los antibióticos apropiados. Después de aproximadamente 7 días, los transformantes se inocularon en medio líquido con antibiótico, se dejaron crecer durante una semana y se seleccionaron para detectar la presencia de plásmido usando PCR.

2.3.2.2. Electroporación de *Synechocystis* sp. PCC 6803

Para la electroporación de *Synechocystis* 6803 se utilizó el protocolo de Ferreira *et al.*, 2018 ligeramente modificado. Brevemente, los cultivos de *Synechocystis* 6803 se cultivaron hasta una DO_{750nm} de 0.6-0.7. Las células se recogieron por centrifugación a 4000 rpm 20°C durante 5 minutos y se lavaron tres veces con 10 mL HEPES 1 mM, pH 7.5. Las células se suspendieron luego en 1 mL de tampón HEPES por cada 50 mL de cultivo. Para la electroporación, se emplearon 60 μ L de células competentes con 1 μ g de ADN plasmídico (en agua). El pulso se ajustó a 25 μ F y la resistencia a 400 Ω , con un campo eléctrico de 2.5 kV/cm utilizando un electroporador Gene PulserTM (Bio-Rad). Inmediatamente después del pulso eléctrico, las células se transfirieron a 0.4 mL de medio BG11 y sembraron en membranas (*Immobilon-NC*, Millipore) sobre BG11 agar sin antibióticos. Las placas se mantuvieron dos días a 30°C bajo luz reducida (8 μ mol fotón /m²s). Luego, las membranas se transfirieron a placas de BG11 agar con el antibiótico correspondiente. Tras 7 días, los transformantes se pasaron a medio nuevo con antibiótico, se dejaron crecer durante una semana y se seleccionaron para detectar la presencia de plásmido mediante PCR.

2.3.2.3. Conjugación triparental de cianobacterias

La transformación mediante conjugación triparental fue realizada de acuerdo con el protocolo descrito en Elhai y Wolk, 1988 para conjugación concentrada (en *spot*) con ligeras modificaciones. *E. coli* HB101 con los plásmidos de interés y, en algunos casos, un plásmido

auxiliar pRL623 (cepa cargo) y *E. coli* HB101 con el plásmido pRK2013 (cepa conjugativa) se crecieron O/N en 4 mL de LB con los antibióticos correspondientes. Por otro lado, las cianobacterias crecidas hasta una DO_{750nm} de 1-2 en medio BG11 se emplearon para la conjugación. Para la conjugación de *Anabaena* 7120, cultivos de DO_{750nm} de 1-2 se fragmentaron mediante sonicación con un baño sonicador P-Selecta Ultrasens hasta que la longitud promedio de los filamentos fue de 6-8 células, determinada por evaluación visual con un microscopio. Posteriormente, las células sonicadas se incubaron a 30°C sin agitación en condiciones de poca luz durante 6 h, luego el cultivo se recogió por centrifugación a 4000 rpm durante 10 min a 15°C. El pellet se resuspendió en el mismo volumen inicial de cultivo y con él se siguió el protocolo de conjugación de la misma manera que para *Chroococcidiopsis* sp. Helios y *Synechocystis* 6803.

En primer lugar, los cultivos de *E. coli* se centrifugaron a 5000 rpm durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante. Los *pellets* se resuspendieron en LB fresco sin antibióticos. Tras realizar dos lavados, se mezclaron ambas cepas utilizando 0.75 mL de cepa conjugativa por cada 1 mL de cepa cargo, y se centrifugaron 1 min a 12000 rpm en tubos de 1.5mL. El sobrenadante se descartó y el *pellet* se resuspendió en 60 μ L de LB. La mezcla de *E. coli* se incubó 1 hora a 37°C. Simultáneamente, los cultivos de cianobacterias se recogieron centrifugando durante 10 min a 4000 rpm y 20°C. Seguidamente, el *pellet* se resuspendió en 1 mL de medio BG11 y se prepararon diluciones a diferentes DO_{750nm} (8-0.008). Entonces, 10 μ L de la mezcla de *E. coli* y 10 μ L de cianobacterias se mezclaron en una placa de plástico estéril, y posteriormente, 10 μ L se sembraron sobre una membrana (*Immobilon-NC*, Millipore), colocada sobre placas de BG11 agar suplementado con 5% de LB (v/v). Las placas con las mezclas conjugativas se incubaron a 30°C, en condiciones de luz normal. A las 48 h, las membranas se traspasaron a placas de BG11 con antibiótico. La presencia de transformantes se observó tras 7-10 días de crecimiento, se pasaron a placas de BG11 con antibiótico, se dejaron crecer y se evaluó la presencia de los plásmidos mediante PCR.

2.4. Técnicas que manipulación de ADN

Las técnicas de manipulación de ADN, así como otras técnicas de biología molecular utilizadas en este capítulo se describen en Green y Sambrook, 2012. Los diferentes reactivos se emplearon siguiendo las especificaciones del fabricante, salvo que se indique lo contrario.

2.4.1. Extracción de ADN

El ADN plasmídico de *E. coli* se extrajo mediante el *kit* de *miniprep mi-Plasmid Miniprep* (Metabion International AG), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Para determinar la concentración y la pureza de las muestras de ADN se utilizó un NanoDrop ND-1000 de ThermoFisher. Por otro lado, para todas las transformaciones de cianobacterias, se realizó una extracción rápida de ADN con cloroformo y se realizó una PCR para verificar la presencia del plásmido o la modificación genética realizada.

2.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la comprobación de los transformantes se empleó la polimerasa *NZYTaq II 2x Green Master Mix* y para los clonajes la polimerasa *NZYProof 2x Green Master Mix*, en ambos casos siguiendo las instrucciones del fabricante (NZYtech) para 20-50 μL de volumen final. Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf). Los productos amplificados se purificaron mediante el *kit* comercial *NZYGelpure* (NZYtech).

2.4.3. Digestión y ligación de ADN

Las digestiones enzimáticas se llevaron a cabo con enzimas de restricción de Takara, empleando 1 μL de enzima por cada μg de ADN en un volumen de 20 μL de reacción y realizando la incubación durante 1-2 h a 30 o 37°C, según la enzima. Posteriormente, los insertos y los plásmidos digeridos (tras correr un gel de agarosa) se purificaron con el *kit* *NZYGelpure* (NZYtech). Las ligaciones se realizaron con la enzima ligasa *T4 DNA ligase* de Takara, utilizando proporciones en ng inserto:vector 5:1 en un volumen de reacción de 20 μL . Las reacciones de ligación se llevaron a cabo a 16°C O/N. Finalmente, 10 μL de la mezcla de ligación se utilizó para transformar 100 μL de células competentes.

2.4.4. Electroforesis en geles de agarosa

Para visualizar los fragmentos de DNA se utilizaron geles 1% o 2% (p/v) de agarosa en tampón TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 7.6), utilizando el mismo tampón como electrolito. Para visualizar el ADN se empleó *GreenSafe Premium* (NZYtech) a una dilución de 1:10000, añadido previamente a la gelificación de la agarosa. A las muestras se les añadió 1/10 de su volumen de tampón de carga (Takara). La electroforesis se realizó a 100 V durante 20-30 min y, una vez finalizada, los fragmentos de DNA se visualizaron con radiación ultravioleta en un transiluminador UV Enduro GDS (Labnet International). El tamaño de los fragmentos se estimó por su movilidad electroforética utilizando como marcador de tamaño *GeneRuler 1 Kb DNA Ladder* de ThermoFisher o *NZYDNA Ladder III* de Nzytech.

2.4.5. Preparación de plásmidos para CRISPR

2.4.5.1. Clonaje de Cas en plásmidos pSEVA

Para construir los plásmidos pSEVA con Cpf1, el casete de CRISPR del plásmido pSL2680, que incluye el gen *cpf1* junto con la matriz de CRISPR se amplificó por PCR (CH610, CH611) y se clonó en el pSEVA351 o pSEVA 451 entre *Bam*HI y *Hinc*II, obteniéndose los plásmidos pSEVA-Cfp1.

2.4.5.2. Diseño y clonaje del ARN guía

El ARN guía frente al gen de interés fue diseñado utilizando la herramienta online *Blenchling* (<https://www.benchling.com/>), utilizando el genoma de *Synechocystis* 6803 (GCA_000009725.1) para el cálculo de las *off-targets*. En el caso de la delección de *nblA*, se buscó en el genoma de *Synechocystis* 6803 las copias del gen *nblA*. Para el diseño del ARN guía (ARNg),

en *Blenchling*, se emplearon las regiones codificantes de las dos copias de *nblA* (BAA17954.1, BAA17955.1) y la región intergénica entre ellas, y se definió TTN como PAM.

Para el clonaje del ARNg, los plásmidos pSL2680 y pSEVA351-Cpf1 se digirieron con la enzima *AarI* empleando 4 U/ μ g y 1 μ M del oligonucleótido proporcionado (ThermoFisher) durante 4h a 37°C. Por otro lado, el ARNg se obtuvo mediante el anillamiento de dos oligonucleótidos diseñados frente a la región intergénica entre las dos copias de *nblA*. Los oligonucleótidos se diseñaron con secuencias complementaria entre sí, extremos compatibles con la digestión por *AarI* en los plásmidos pSL2680 y pSEVA351-Cpf1 y fosforilados (Tabla R.3.3). El ARNg se construyó hibridando los cebadores 5'-fosforilados AL001 y AL002 en tampón de ligación (Takara) enfriando la reacción lentamente usando el siguiente programa: 95°C 3 min, 95°C 2 min, enfriar a 55°C a 0.1°C/s, 50°C 5 min, enfriar a 22°C a 0.1°C/s, 22°C 2 min. El ARNg se diluyó 1/20 y se ligó al plásmido digerido con *AarI* para producir pSEVACpf1ARN.

2.4.5.3. Clonaje de los brazos de homología para CRISPR

El molde de reparación tras el corte que se obtiene mediante CRISPR consistió en brazos de homología de \sim 1000 pb *upstream* de *nblA1* y *downstream* de *nblA2*. Sobre el genoma de *Synechocystis* 6803, se realizaron dos PCRs con el par de cebadores AL004/AL016 y AL005/AL015, seguida de una PCR solapada con AL015/AL016, para obtener los brazos de homología. Los fragmentos de PCR resultantes se clonaron usando el kit de clonaje *In-fusion* HD en pSEVACpf1ARN digerido con *PstI* para producir el plásmido pSEVACpf1nblA.

2.4.5.4. Evaluación de la pérdida del plásmido empleado en CRISPR

La pérdida del plásmido se evaluó de dos maneras diferentes. La primera consistió en pases sucesivos de 10 clones editados (Δ *nblA*) en placas de BG11 sin antibióticos. Las placas se dejaban crecer 1 semana. Cada dos pases, todos los clones se reestriaron en placas de BG11Cm10 para detectar aquellos clones sensibles a cloranfenicol. La segunda manera de obtener mutantes de *Synechocystis* 6803 sin plásmido fue similar al protocolo descrito en Ungerer y Pakrasi, 2016. Brevemente, se reestrió en una placa de BG11 sin antibióticos una colonia editada con el plásmido pSEVA-Cpf1nblA, se creció durante una semana y posteriormente se pasó a cultivo líquido sin antibióticos (4 mL). El cultivo se creció hasta una DO_{750nm} de 1 para permitir la pérdida espontánea del plásmido. Para obtener células individuales, el cultivo se diluyó y se sembró en placas de BG11. De las colonias obtenidas, se cogieron 60 al azar y se estriaron en placas BG11Cm10 y BG11 para identificar las colonias que se habían vuelto sensibles al cloranfenicol y, por lo tanto, habían perdido el plásmido de edición. Posteriormente, las colonias sensibles a cloranfenicol se evaluaron mediante PCR para comprobar la pérdida del plásmido.

2.4.6. Preparación de pSEVA reportero

El gen de la *yfp* bajo el promotor constitutivo P_{c223} se amplificó por PCR usando como molde un plásmido empleado en el Capítulo 4 (Tabla R.4.3) y los oligonucleótidos SB072 y SB69. La PCR se realizó con la polimerasa de alta fidelidad Phusion (*New England Biolabs*) y con oligonucleótidos 0.5 μ M, dNTPs 0.2 mM y 0.25 ng de molde. El inserto fue digerido con *PmlI* y *PstI* y clonado en el pSEVA351 entre *SmaI* y *PstI*. Los productos de PCR antes y después de digerir

se purificaron con el kit *GeneJET PCR Purification Kit* (Thermofisher) mientras que el plásmido digerido, se purificó con el kit *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermofisher).

2.4.7. Secuenciación y análisis de ADN

La secuenciación de ADN se llevó a cabo de la empresa Eurofins Genomics. Las secuencias y mapas de plásmidos fueron analizados con software SnapGene (<http://www.snapgene.com/>). Para el análisis filogenético se utilizaron las secuencias de 16S rARN de diferentes cianobacterias, obtenidos de la base de datos de NCBI. Se realizaron alineamientos de todas las secuencias y se añadió *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 como grupo externo. El árbol filogenético se construyó con el método de *Neighbor-Joining* empleando las secuencias alineadas en el programa Geneious (<https://www.geneious.com/>). Se realizó un análisis de *bootstrap* con 1000 árboles de remuestreo.

2.5. Medida y visualización de fluorescencia

La fluorescencia de los distintos cultivos se midió transfiriendo 100 μ L ajustados a $DO_{750nm} = 0.1$ en placas negras con el fondo transparente de 96 pocillos y se midió con un lector Varioskan o Tecan Spark, utilizando filtros de 485/20 y 535/25 nm para excitación y emisión, respectivamente. La fluorescencia relativa se normalizó a DO_{730nm} (Fluorescencia/ DO_{730nm}).

La visualización de mutantes fluorescentes se realizó en un microscopio de fluorescencia Leica Microsystems. Cultivos crecidos en medio BG11 con Cm10 se visualizaron en contraste de fases, y empleando los filtros de 485 y 525 nm de excitación y emisión para la fluorescencia en verde y filtros de 577 y 603 nm de excitación y emisión, para la fluorescencia en rojo. Para la toma de fotografías se emplearon los parámetros establecidos por defecto. Las composiciones entre fotografías se realizaron mediante el programa Fiji (<https://fiji.sc/>).

2.6. Ensayo de clorosis en *Synechocystis* sp. PCC 6803

En *Synechocystis* 6803, el WT y los mutantes para el *nblA* se inocularon en 4 mL de BG11 a 30°C en BG11 en condiciones normales de crecimiento. Tras una semana, los cultivos se lavaron 3 veces con 30 mL de BG11₀ (BG11 sin NaNO₃) y se utilizaron para iniciar cultivos frescos en BG11₀ a una $DO_{750nm}=2$. Se cultivaron durante 7 días antes de registrar diferencias cualitativas de color.

3. RESULTADOS

3.1. Evaluación plásmidos de la colección SEVA en cianobacterias

Teniendo en cuenta las ventajas de los plásmidos de la colección pSEVA se decidió probar estos vectores en cianobacterias filogenéticamente diversas con diferentes morfologías, crecimiento, características metabólicas y posibles aplicaciones biotecnológicas (Figura R.3.1). Las cianobacterias escogidas fueron *Synechocystis* 6803, *Anabaena* 7120 y *Chroococcidiopsis* sp. Helios (las cuatro cepas caracterizadas en el Capítulo 1) y que, como se muestra en la Figura R.3.1, son filogenéticamente diversas y pertenecen a diferentes subsecciones (2.2. Clasificación de las cianobacterias) (Boone *et al.*, 2001). En cuanto a sus aplicaciones también hay diferencias. La cianobacteria unicelular *Synechocystis* 6803 fue el primer organismo fotosintético del que se obtuvo el genoma secuenciado y rápidamente se convirtió en una cepa de cianobacteria modelo para diversos estudios. Actualmente, *Synechocystis* 6803 se utiliza ampliamente como chasis fotoautótrofo para la producción de una gran variedad de compuestos de interés industrial. En cambio, *Anabaena* 7120 es una cianobacteria filamentosa interesante como modelo en laboratorio debido a su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico utilizando las células especializadas llamadas heterocistos cuando crece en un medio que carece de nitrógeno combinado. Finalmente, también elegimos para nuestros experimentos las cianobacterias del género *Chroococcidiopsis* aisladas del panel solar (Capítulo 1), referidas en conjunto como cepas Helios o *Chroococcidiopsis* sp. Helios, (Tabla R.3.1). Como se comentó en la introducción y en el Capítulo 1, este género incluye cepas extremófilas que son referencia en el estudio de la resistencia a la desecación, irradiación y reparación del ADN en cianobacterias, entre otras condiciones extremas.

En lo que respecta a la manipulación genética, *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120 se han utilizado ampliamente y existen protocolos estandarizados de transformación ya sea natural, electroporación o conjugación triparental (Elhai y Wolk, 1988; Ferreira *et al.*, 2018). Por otro lado, varias cianobacterias del género *Chroococcidiopsis* se han transformado por electroporación o conjugación, siendo capaces de mantener la replicación del plásmido (Billi *et al.*, 2001).

Previamente a las pruebas de transferencia génica, se realizó un antibiograma para las distintas *Chroococcidiopsis* sp. aisladas (Capítulo 1). Los antibióticos escogidos fueron los habituales en el laboratorio y para los que se tenían plásmidos con resistencia a dichos antibióticos (Tabla R.3.4). En general se necesitaron concentraciones altas de kanamicina, estreptomycinina y gentamicina para los cuatro aislados. Por otro lado, todas las cepas fueron sensibles al cloranfenicol, espectinomycinina y eritromycinina incluso a las concentraciones más bajas ensayadas. Estos datos proporcionan un panel de antibióticos que podrían usarse como marcadores selectivos en manipulaciones genéticas. Se eligió el cloranfenicol como antibiótico de selección pues ninguna de las *Chroococcidiopsis* sp. mostraba resistencia basal en su presencia.

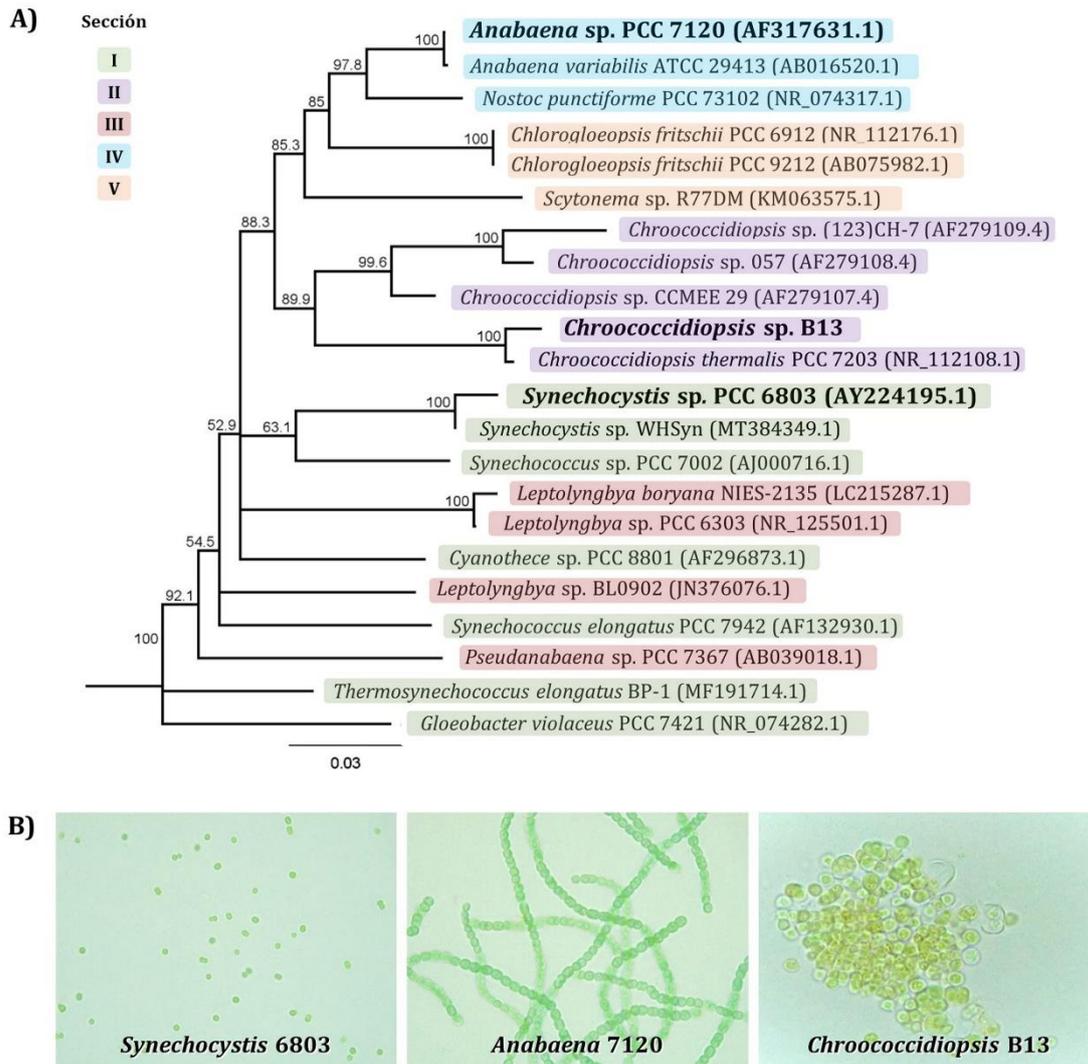


Figura R.3.1. Diversidad de cianobacterias empleadas en este estudio. A) Árbol filogenético de las cianobacterias seleccionadas. Las cepas empleadas se muestran en negrita. En color se muestra la subsección a la que pertenecen las diferentes especies escogidas, de acuerdo con la clasificación realizada en Boone y Castenholz, 2001. Excepto *Syctonema* sp. R77DM y *Leptolyngbya boryana* NIES-2135, todas las cepas incluidas han mostrado ser susceptibles a transformación genética. Los números de acceso se indican entre paréntesis. **B)** Fotografías al microscopio de las especies de cianobacterias utilizadas. Todas las fotografías están tomadas con el mismo aumento (100X).

Para *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Anabaena* sp. PCC 7120, se ensayaron antibióticos descritos en la bibliografía para estas cianobacterias (Heidorn *et al.*, 2011). Para *Synechocystis* 6803, Cm10, Km50 y Apra10 mostraron ser concentraciones adecuadas para la selección de transformantes, en cambio para *Anabaena* 7120, se empleó Nm50, Spt10 y Apra10.

Tabla R.3.4. Sensibilidad a antibióticos de las distintas cepas de *Chroococcidiopsis* sp.

CEP A	Km				Cm				Stm				Apra			
	20	50	75	100	7.5	15	30	75	2	4	8	20	10	25	50	100
B11	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
B13	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
B14	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
B15	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-

CEP A	Em				Gm				Spt				Nm			
	20	40	80	200	2	4	8	20	2	4	8	20	25	50	100	250
B11	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
B13	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
B14	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
B15	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-

Las concentraciones mostradas para cada antibiótico corresponden a $\mu\text{g/ml}$. +: crecimiento robusto; -: sin crecimiento. Antibióticos: Kanamicina (Km), Cloranfenicol (Cm), Estreptomycin (Spm), Apramicina (Apra), Eritromicina (Em), Gentamicina (Gm), Espectinomicina (Spt), y Neomicina (Nm).

A continuación, se llevaron a cabo estudios de transferencia génica mediante conjugación triparental utilizando una batería de plásmidos pSEVA (Tabla R.3.2) en las cianobacterias *Synechocystis* 6803, *Anabaena* 7120 y *Chroococcidiopsis* sp. Helios (Figura R.3.2, Figura R.3.3 y Figura R.3.4). Elegimos cuatro plásmidos derivados de SEVA con diferentes orígenes: el replicón RK2 (2), el pBBR1 (3), los orígenes pRO1600/ColE (un híbrido del origen pRO1600 y la secuencia de replicación ColE1) (4) y el replicón RSF1010 (5) (entre paréntesis se indica el número de cada ori, que se refiere a la segunda posición del pSEVA, ver Figura I.6). Para las tres cianobacterias se observaron colonias 7-10 días después de la conjugación, aunque los resultados variaron entre ellas. Solo el pSEVA351, con ori RSF1010, funcionó en *Synechocystis* 6803, que pudo ser transformado mediante competencia natural, electroporación y conjugación (Figura R.3.2). El origen de replicación funcionó para *Anabaena* 7120, aunque con otra resistencia a antibiótico (Figura R.3.3). Para *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120, el pSEVA 251 también funcionó (datos no mostrados). En *Chroococcidiopsis* sp. Helios se detectó la presencia de todos los plásmidos probados (Figura R.3.4). No obstante, se observaron ligeras diferencias entre cepas, pues se obtuvieron menos colonias para la cepa B15.

Además de los plásmidos replicativos, en la colección pSEVA existen otros que también pueden ser interesantes como herramientas biotecnológicas. En Martínez-García *et al.*, 2014 se describen los plásmidos pBAMD1-X, plásmidos con la estructura pSEVA que llevan un módulo que se integra en el genoma del hospedador (Capítulo 2, Figura R.2.10). Estos plásmidos presentan un módulo que se integra en el genoma del hospedador, pero no la transposasa que permite dicha integración, que se encuentra fuera del módulo de transposición. Este plásmido puede ser interesante desde el punto de vista de búsqueda de mutantes al azar con propiedades concretas. Permite además desarrollar librerías de mutantes, que tras el *screening* adecuado pueden dar lugar a cianobacterias con fenotipos de interés de manera a veces más sencilla que mediante mutagénesis dirigida.

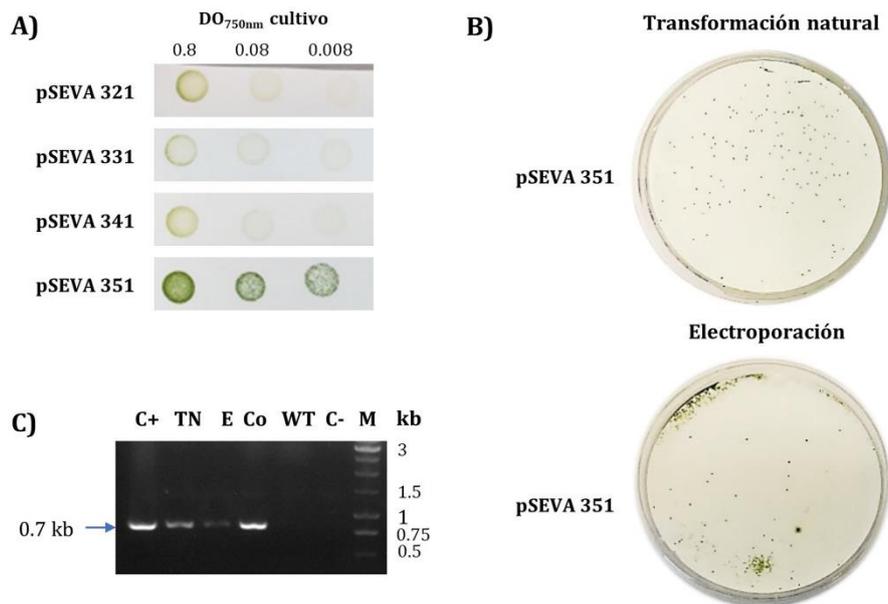


Figura R.3.2. Transformación de *Synechocystis* 6803 con diferentes pSEVA replicativos. **A)** Resultado de la conjugación triparental, crecimiento de los transformantes tras 7 días en BG11 Cm10. **B)** Transformación mediante competencia natural y electroporación del pSEVA351, tras 7 días en presencia de BG11 Cm10. **C)** PCR de confirmación de la presencia de pSEVA351 en las distintas transformaciones usando el par de oligos 7/8. Los oligonucleótidos empleados amplifican el gen de resistencia a cloranfenicol. El plásmido fue empleado como control positivo y el cultivo WT como control negativo en la PCR. Abreviaturas: TN, transformación natural; E, electroporación; Co, conjugación triparental, WT, ADN de la cepa silvestre, C+, control positivo (plásmido); C-, control negativo de PCR (sin ADN) y M, marcador de tamaño.

Se decidió probar el plásmido pBAMD1-4 en las cianobacterias *Synechocystis* 6803, *Anabaena* 7120 y *Chroococidiopsis* sp. Helios. En todos los casos, se empleó la conjugación triparental para la transferencia del plásmido, junto con el plásmido auxiliar pRL623. No obstante, para ninguna de las cianobacterias se apreciaron colonias después de 2 semanas de crecimiento.

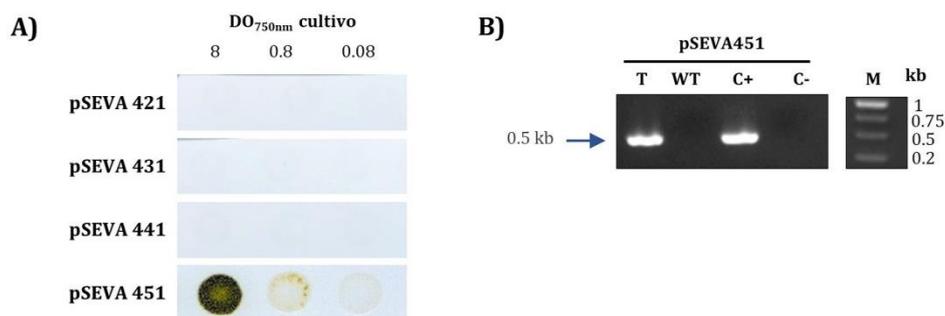


Figura R.3.3. Transformación de *Anabaena* 7120 con diferentes pSEVA replicativos. **A)** Resultado de la conjugación triparental, crecimiento de los transformantes tras 7 días en BG11 Spt10. **B)** PCR de confirmación de la presencia de pSEVA451 usando AL040/041. Los oligonucleótidos empleados amplifican el gen de resistencia a espectinomicina. Abreviaturas: T, Transformante; WT, ADN de la cepa silvestre, C+, control positivo (plásmido); C-, control negativo de PCR (sin ADN) y M, marcador de tamaño.

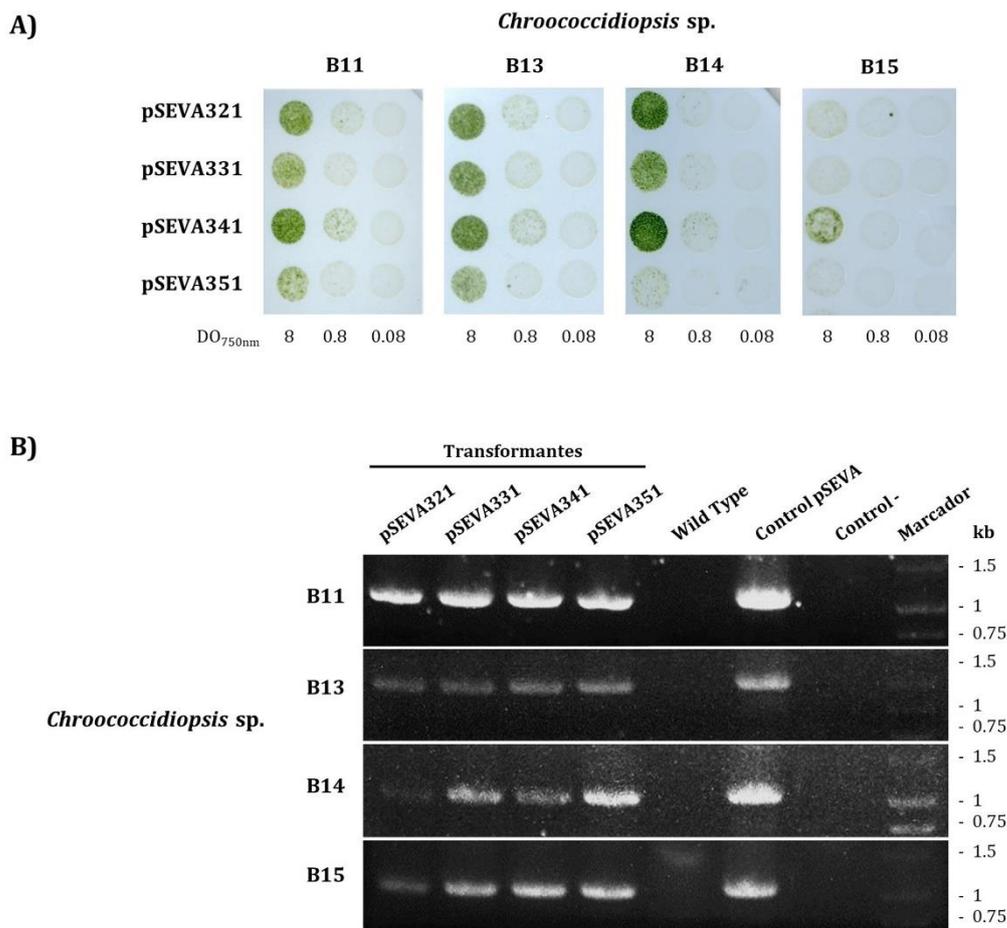


Figura R.3.4. Transformación de *Chroococidiopsis* sp. Helios con diferentes pSEVA replicativos. A) Resultado de la conjugación triparental, crecimiento de los transformantes tras 7 días en BG11 Cm10. **B)** PCR de confirmación de la presencia de los plásmidos pSEVA usando Oligo7/8. Los oligonucleótidos empleados amplifican el gen de resistencia a cloranfenicol. Se empleó un plásmido SEVA como control positivo y el cultivo WT de cada *Chroococidiopsis* sp. como control.

3.2. Prueba de promotores en cianobacterias utilizando pSEVA

Para validar el uso de pSEVA como un posible vector de expresión, se desarrolló un plásmido pSEVA con el promotor constitutivo P_{c223} , descrito en *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Markley *et al.*, 2015). Como prueba de concepto, se utilizó como gen reportero a la proteína fluorescente amarilla (YFP) (Figura R.3.5A). El plásmido obtenido se transfirió a *Synechocystis* 6803 y *Chroococidiopsis* sp. Helios mediante conjugación triparental, obteniéndose colonias en todos los casos (datos no mostrados). Tras evaluar la presencia del plásmido (Figura R.3.5B y Figura R.3.5E), se midió la fluorescencia de los cultivos transformados. En *Synechocystis* 6803, resultó funcionar adecuadamente (Figura R.3.5C) y la fluorescencia fue fácilmente visible al microscopio (Figura R.3.5D). Por otro lado, los niveles observados entre las cepas Helios fueron diferentes entre sí para alguna cepa, pero el promotor funcionó en todas ellas (Figura R.3.5F).

3.3. Desarrollo de CRISPR-Cas en pSEVA para cianobacterias

Una de las herramientas que más se han desarrollado en la última década es la edición con CRISPR-Cas. Esta tecnología se ha utilizado en una gran variedad de microorganismos de interés industrial o biotecnológico, incluyendo cianobacterias. Partiendo de trabajos publicados, se adquirieron dos plásmidos con la tecnología CRISPR-Cas que han sido utilizados para la conjugación en cianobacterias (Ungerer y Pakrasi, 2016; Wendt *et al.*, 2016). El plásmido pCRISPomyces-2 presenta los genes y secuencias necesarias para utilizar la Cas9 (Addgene #61737) (Figura R.3.6), mientras que el pSL2680 presenta la tecnología para utilizar la Cas12a/Cpf1 (Addgene #85581) (Figura R.3.7, parte superior izquierda). Estos plásmidos presentan un ARN guía (ARNg) por defecto, sirviendo de base para aplicar la técnica. Para los dos plásmidos, la inserción del ARNg se realiza con el corte de una enzima de restricción de Tipo IIS, que reconoce secuencias asimétricas de ADN y corta a una distancia definida fuera de su secuencia de reconocimiento, con lo que se elimina el *lacZα*. Ambas Cas se han empleado en cianobacterias, pero han mostrado diferencias en toxicidad (Xia *et al.*, 2019). Por otro lado, en cuanto a la cantidad de regiones PAM para cada Cas en el genoma de las cianobacterias escogidas, si bien difieren, en principio no es una limitación a la hora de elegir una u otra (Gale *et al.*, 2019).

Como se ha comentado, el plásmido pCRISPomyces-2 presenta la Cas9 y un casete para el clonaje del ARNg. En este caso, dicho casete expresa un ARNg sintético que al clonarlo entre los sitios *BbsI* (Figura R.3.6B) queda justo delante de la secuencia que formará la horquilla para el anclaje de la Cas9. De esta manera se evita tener que incluir en el plásmido el ARNtracr (3.4.1. Edición génica mediante sistemas CRISPR-Cas). Por otro lado, la replicación del plásmido pCRISPomyces-2 depende del origen de replicación de *Streptomyces ghanaensis* pSG5, que no es funcional a temperaturas superiores a 34°C (Cobb *et al.*, 2015). Se transformaron *Synechocystis* 6803, *Anabaena* 7120 y *Chroococcidiopsis* sp. Helios con pCRISPomyces-2 mediante conjugación triparental. Después de 10 días de crecimiento, no se observaron colonias para ninguna de las cianobacterias.

A raíz de estos resultados, se probó el plásmido pSL2680 con la Cas12a/Cpf1, descrita como menos tóxica en cianobacterias (Ungerer y Pakrasi, 2016). El pSL2680 contiene el replicón RSF1010 de amplio rango y el gen de resistencia a kanamicina para selección. El sistema CRISPR se compone del gen de la nucleasa *cpf1* de *Francisella novicida* y la matriz de CRISPR, que contiene el *lacZα* flaqueado por repeticiones directas (Figura R.3.7B). Además, el *lacZα* presenta antes y después regiones para el reconocimiento por la enzima de restricción *AarI*, lo que permite el clonaje del ARNg. Después de *lacZα*, se encuentran dos espaciadores originales de la matriz de CRISPR de *Francisella novicida* (Figura R.3.7B). La expresión de los componentes CRISPR es constitutiva utilizando el promotor J23119 (Biobrick # BBa_J23119, http://parts.igem.org/Part:BBa_) para controlar la expresión de la matriz de CRISPR, y un promotor Lac para impulsar la expresión de *cpf1* y *lacZα* (Ungerer y Pakrasi, 2016).

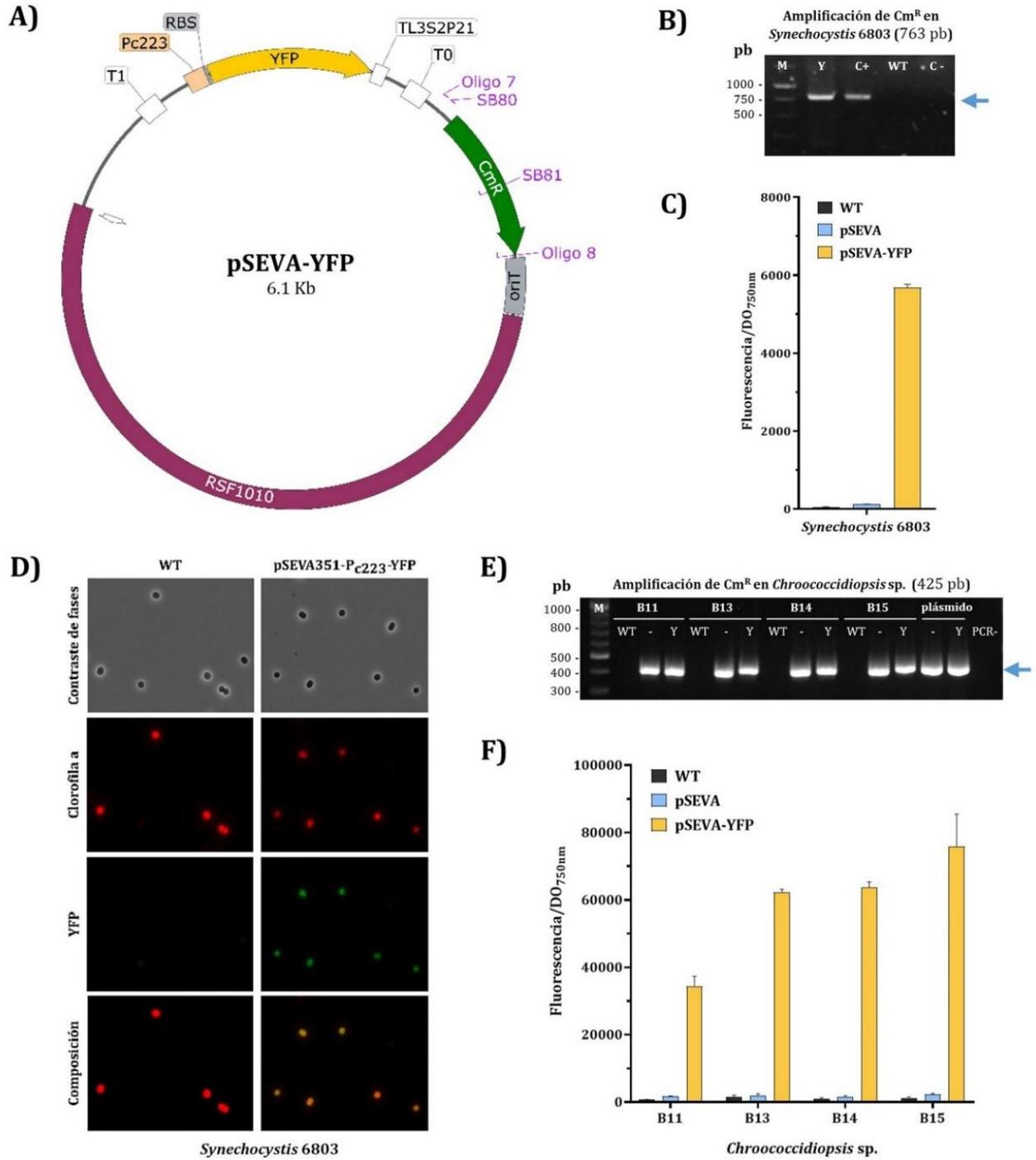


Figura R.3.5. Expresión de YFP en pSEVA. **A)** Plásmido pSEVA empleado para la expresión del gen *yfp* acoplado al promotor P_{c223} . **B)** Confirmación mediante PCR de la presencia del plásmido en *Synechocystis* 6803. Se emplearon los oligonucleótidos SB80/81 para detectar el gen de resistencia a cloranfenicol. En el gel, C+ indica control positivo (plásmido 351), WT es la cepa silvestre sin transformar y C-, control negativo de PCR (sin ADN). **C)** Fluorescencia/ DO_{750nm} obtenida para YFP en cultivos de dos días de *Synechocystis* 6803. **D)** Imágenes de microscopía de fluorescencia de *Synechocystis* 6803 transformado con pSEVA-YFP. Como control, se muestra la autofluorescencia debida a la clorofila a y el contraste de fases tanto de la cepa transformada como del WT. El último panel muestra la composición entre la clorofila a y la YFP. Las imágenes se tomaron 48h después del inicio del cultivo. **E)** Confirmación mediante PCR de la presencia del plásmido en *Chroococidiopsis* sp. Helios. Se emplearon los oligonucleótidos Oligo 7/8 para detectar el gen de resistencia a cloranfenicol. En los geles, un “-” indica el pSEVA vacío e “Y”, pSEVA con YFP. WT indica cianobacteria sin transformar y PCR-, control negativo de PCR (sin ADN). Los plásmidos pSEVA351 y pSEVA351-YFP se emplearon como control positivo. **F)** Ratio de Fluorescencia/ DO_{750nm} obtenida en cultivos de cinco días de *Chroococidiopsis* sp. Helios. En C) y F) las medidas se realizaron de tres cultivos independientes y se muestra la media y la desviación estándar. Nota: las medidas de fluorescencia de C) y F) se realizaron en equipos diferentes (2.5. Medida y visualización de la fluorescencia). (Figura en página anterior)

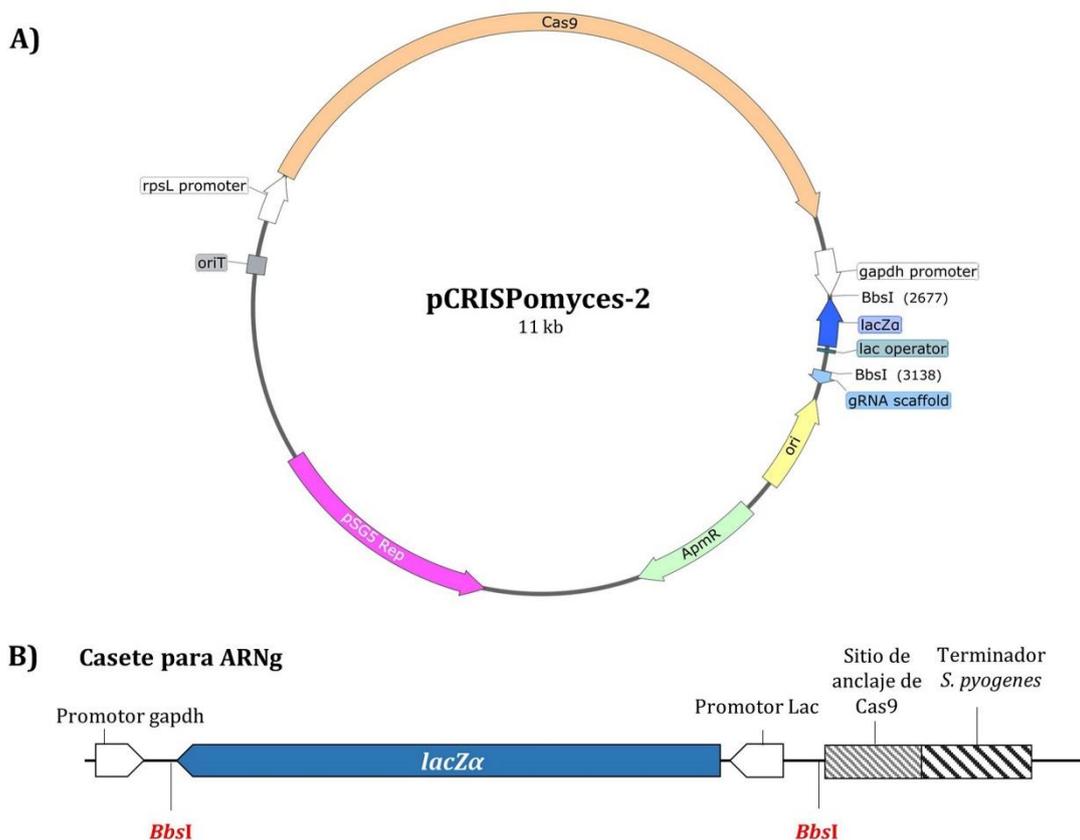


Figura R.3.6. Plásmido pCRISPomyces-2. **A)** Mapa del plásmido con los componentes más importantes. **B)** Casete para clonaje del ARNg. Los sitios de restricción *BbsI* (rojo) permiten intercambiar *lacZα* con oligonucleótidos hibridados, dejando el ARNg justo delante

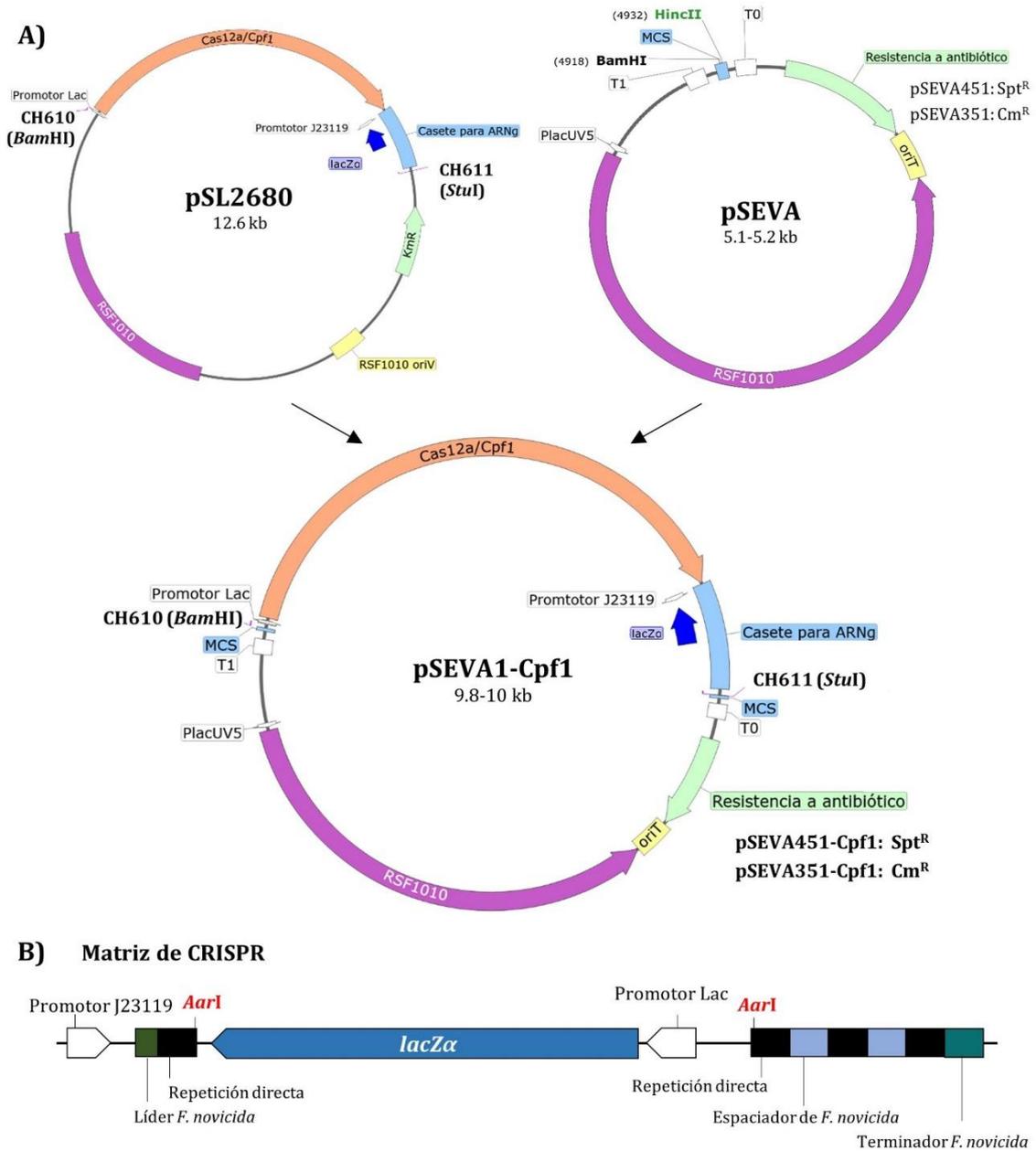


Figura R.3.7. Construcción y características de los plásmidos pSEVA-Cpf1. **A)** Representación esquemática del desarrollo de pSEVA-Cpf1. Los plásmidos SEVA se modificaron insertando el gen *cpf1* y la matriz de CRISPR de pSL2680, amplificado mediante PCR. **B)** Organización de la matriz de CRISPR. Los sitios de restricción *AarI* (rojo) permiten intercambiar *lacZα* con cebadores hibridados, entre dos repeticiones directas.

3.3.1. pSEVA con CRISPR-Cpf1 para cianobacterias

Como se ha comentado en la introducción de este Capítulo 3, Ungerer y Pakrasi, 2016 aplicaron el sistema CRISPR-Cpf1 con éxito en tres cianobacterias diferentes, pero indicaron que 90% de la preparación del plásmido es ssADN (*single strand DNA*, Addgene #85581 material complementario). Los vectores SEVA se han utilizado con éxito en los procesos de corte (Aparicio *et al.*, 2019) o edición de CRISPR en bacterias gramnegativas (Z. Lin *et al.*, 2021) pero aún no se han probado en la edición génica de cianobacterias. Con el objetivo de mejorar una tecnología tan útil, se buscó transferir el casete CRISPR-Cpf1 a un vector nuevo y más versátil. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con los plásmidos pSEVA en el apartado anterior (3.1. Evaluación plásmidos de la colección SEVA en cianobacterias) se decidió emplear estos como base para la tecnología Cas12a/Cpf1. Puesto que el origen de replicación RK2 demostró tener un número de copias reducido en relación con RSF1010 (Vasudevan *et al.*, 2019) y no funcionó en algunas cianobacterias de las ensayadas (Figura R.3.2 y Figura R.3.3), los vectores pSEVA elegidos fueron el pSEVA351 y el pSEVA451 (Tabla R.3.2), los cuales presentan el origen RSF1010 y difieren en el gen de resistencia a antibiótico. Para construir los plásmidos pSEVA351Cpf1 y pSEVA451Cpf1, se transfirió la maquinaria CRISPR-Cpf1 de pSL2680 a pSEVA351 o pSEVA451 (Figura R.3.7A). El sistema CRISPR mantiene en el pSEVA las mismas características que en el pSL2680 original, donde el ARNg puede clonarse en sitios *AarI*, reemplazando el gen *lacZα* (Figura R.3.7B).

Para comprobar en cianobacterias la viabilidad de los plásmidos obtenidos, estos se transformaron mediante conjugación triparental en *Synechocystis* 6803, *Anabaena* 7120 y *Chroococcidiopsis* sp. Helios (Figura R.3.8). En el caso de *Anabaena* 7120 se empleó el pSEVA451-Cpf1 (Spt^R) y el plásmido auxiliar pRL623 (Cm^R), mientras que para las otras dos cianobacterias se empleó el pSEVA351-Cpf1 (Cm^R). Como control, en las conjugaciones de las tres cianobacterias, se empleó el plásmido original, el pSL2680 (Km^R/Nm^R). Los resultados obtenidos para las conjugaciones mostraron que los plásmidos pSEVA-Cpf1 podrían transformarse con éxito en tres géneros de cianobacterias diferentes: *Synechocystis*, *Chroococcidiopsis* y *Anabaena* (Figura R.3.8). Si bien en la Figura R.3.8 solo se muestra *Chroococcidiopsis* sp. B13, el plásmido pSEVA351-Cpf1 funcionó en todas las cepas Helios (datos no mostrados).

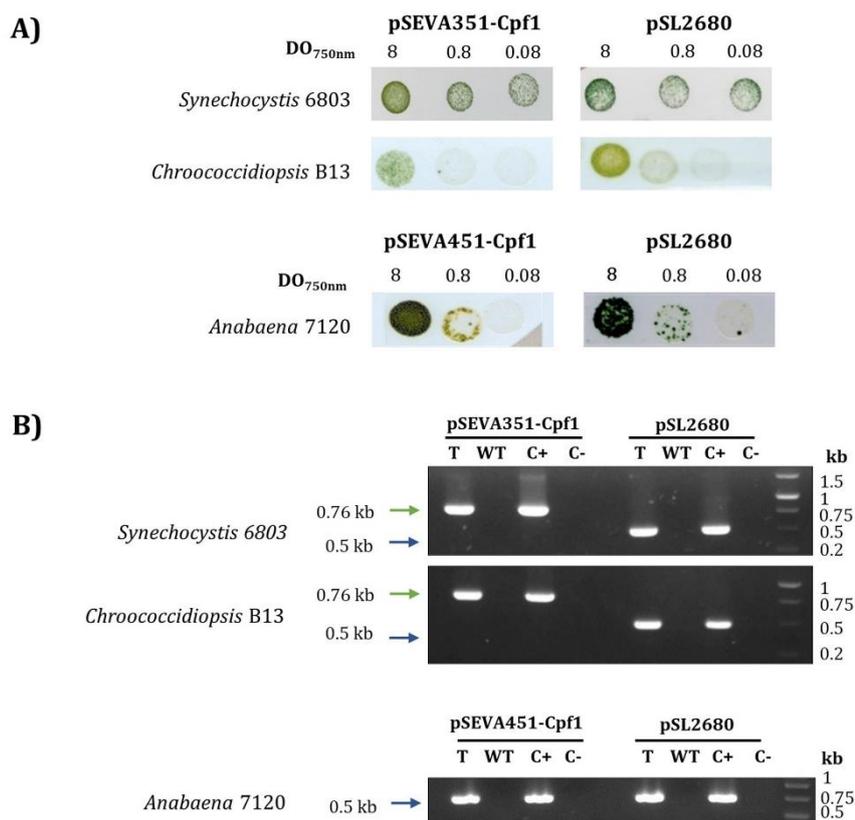


Figura R.3.8. Transformación de pSEVA-Cpf1 en diversas cianobacterias. A) Resultado de la conjugación triparental de los pSEVA-Cpf1 y el pSL2680. Crecimiento después de la selección de transformantes tras 7 días en BG11 Cm 10 µg/ml (pSEVA351-Cpf1), BG11 Spt 10 µg/ml (pSEVA451-Cpf1) y BG11 Km 50 µg/ml o Nm50 µg/ml (pSL2680). **B)** Confirmación por PCR de la presencia de los distintos plásmidos en cianobacterias. Se muestra un gel de PCR para la detección del gen de resistencia a Cm (pSEVA351Cpf1), Spt (pSEVA451Cpf1) o Km/Nm (pSL2680) en un cultivo de 7 días de crecimiento. C+, control positivo (plásmido); T, muestra transformada; WT, cianobacteria sin transformar; C-, control negativo para PCR (sin ADN).

3.3.2. Transformación natural de *Synechocystis* 6803 con el vector pSEVA-Cpf1

Como se ha comentado anteriormente, los vectores pSEVA con el replicón RSF1010 con diferentes marcadores antibióticos (kanamicina, pSEVA251; cloranfenicol, pSEVA351 y espectinomicina/estreptomicina, pSEVA451), se han transformado con éxito en *Synechocystis* 6803 mediante transformación natural (Ferreira *et al.*, 2018). Puesto que los protocolos para la transformación natural son generalmente simples y directos, la posibilidad de transformar el pSEVA-Cpf1 mediante este método podría facilitar el rápido empleo de los organismos con competencia natural (Nies *et al.*, 2020; Schirmacher *et al.*, 2020; Wendt y Pakrasi, 2019). De las tres cepas elegidas en este trabajo, solo en *Synechocystis* 6803 se ha descrito la capacidad de adquirir ADN mediante competencia natural, por lo que evaluamos si el vector pSEVA-Cpf1 podría ser útil también para la transformación natural en esta cianobacteria.

Para ellos se utilizó el pSEVA351-Cpf1 utilizando el protocolo descrito en Material y métodos (2.3.2.1. Transformación natural de *Synechocystis* sp. PCC 6803) y a modo de comparación, también se incluyeron en el estudio el pSEVA351 como control positivo y el pSL2680, porque es

el plásmido original que contiene la maquinaria CRISPR (como el pSEVA-Cpf1). Después de una semana de crecimiento en BG11 con los antibióticos apropiados, sólo se obtuvieron transformantes usando los vectores pSEVA351 y pSEVA351-Cpf1 (Figura R.3.9A). Se realizaron cultivos de diferentes colonias en BG11 con antibióticos frescos y se comprobó la presencia del plásmido por PCR (Figura R.3.9B). Este experimento confirma que los vectores SEVA-Cpf1 también se pueden utilizar para la transformación natural. No se observó crecimiento en cultivos transformados con pSL2680 tras dos semanas en presencia de antibióticos tras la transformación (datos no mostrados). Por lo tanto, el uso de pSL2680 no parece ser conveniente para la transformación natural y por esta razón solo se recomienda su uso en procesos de conjugación (Addgene #85581 material complementario) (Ungerer y Pakrasi, 2016).

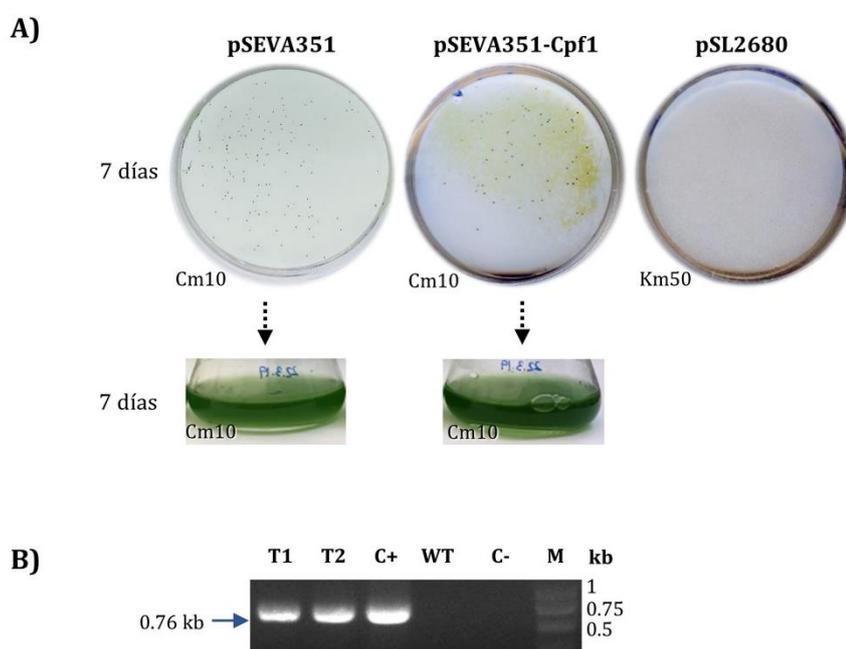


Figura R.3.9. Transformación natural de pSEVA351Cpf1 en *Synechocystis* 6803. A) Crecimiento después de la selección de transformantes con cloranfenicol 10 µg/mL (pSEVA) o kanamicina 50 µg/mL (pSL2680) durante siete días. El vector pSL2680 no pudo transformarse mediante transformación natural. B) Confirmación por PCR de la persistencia de pSEVA351Cpf1 en *Synechocystis* 6803. Se muestra un gel de PCR para la detección del gen de resistencia Cm para pSEVA351Cpf1 en un cultivo de 7 días de crecimiento. T1, ADN de *Synechocystis* 6803 con pSEVA351; T2, ADN de *Synechocystis* 6803 con pSEVA351Cpf1; C +, control positivo (plásmido); WT, *Synechocystis* 6803 Tipo silvestre; C-, control negativo para PCR (sin ADN); M, marcador de tamaño.

3.3.3. Edición genómica de *Synechocystis* 6803 utilizando pSEVA351Cpf1

Para validar el sistema pSEVA351-Cpf1 en procesos de edición del genoma se eligió *Synechocystis* 6803. La diana genómica seleccionada fue la delección del gen *nbla* que codifica la proteína A *non-bleaching* (Figura R.3.10A). Esta mutación confiere un fenotipo fácilmente observable ya que evita la despigmentación desarrollada bajo la privación de nitrógeno (Behler *et al.*, 2018). El fenotipo WT se despigmenta (clorosis) ante la falta de nitrógeno debido a la degradación de los complejos de antena (parte de los fotosistemas), mientras que los mutantes *nbla* permanecen verdes en estas condiciones. Por estas razones, la inactivación del gen *nbla* se ha utilizado a menudo como indicador de procesos de edición en cianobacterias (Behler *et al.*, 2018; Ungerer y Pakrasi, 2016; Wendt *et al.*, 2016).

El genoma de *Synechocystis* 6803 contiene dos copias adyacentes del gen *nbla* (Figura R.3.10B). Para introducir la delección, se diseñó un ARNg frente a la región intergénica entre las dos copias de *nbla* de una manera similar a la descrita a Ungerer y Pakrasi, 2016. La ruptura mediada por CRISPR se repara posteriormente mediante doble recombinación homóloga utilizando un molde de clonado justo después de la matriz de CRISPR (Figura R.3.10C). Se probó tanto la transformación natural (Figura R.3.11A) como la conjugación triparental (Figura R.3.11B) para introducir el pSEVACpf1nbla en *Synechocystis* 6803 y en ambos casos se obtuvieron colonias transformantes.

Varios clones obtenidos en las transformaciones, ya sea mediante conjugación o competencia natural, se sometieron a tres pases en BG11 Cm10 antes de analizarlos por PCR. Este paso es necesario debido al alto grado de ploidía y al proceso de segregación de *Synechocystis* 6803. Después de la última reestría, todos los mutantes seleccionados mostraron la segregación completa de la delección (Figura R.3.11C, mutantes procedentes de la transformación natural). Se procedió entonces a ensayar el fenotipo de clorosis en los mutantes de *nbla*. Para ello se crecieron *Synechocystis* 6803 $\Delta nbla$ (procedentes de ambos tipos de transformación) y el WT en medio sin nitrógeno (BG11 sin NaNO₃). Después de 10 días de crecimiento, se registraron diferencias cualitativas en el color como se muestra en la Figura R.3.11D (Transformación natural). Las colonias mutantes de *Synechocystis* 6803 no mostraron la pérdida de color del WT al eliminar el nitrato del medio. Cabe señalar que se obtuvieron los mismos resultados de edición y despigmentación cuando el pSEVACpf1nbla se conjugó en *Synechocystis* 6803 (datos no mostrados). Por otro lado, la secuenciación de los productos de PCR de colonias editadas (obtenidas tanto de la transformación natural como de la conjugación) presentaron la modificación esperada. Por lo tanto, pSEVA-Cpf1 es útil para procesos de edición en *Synechocystis* y también podría ser útil para procesos de edición de otras cianobacterias.

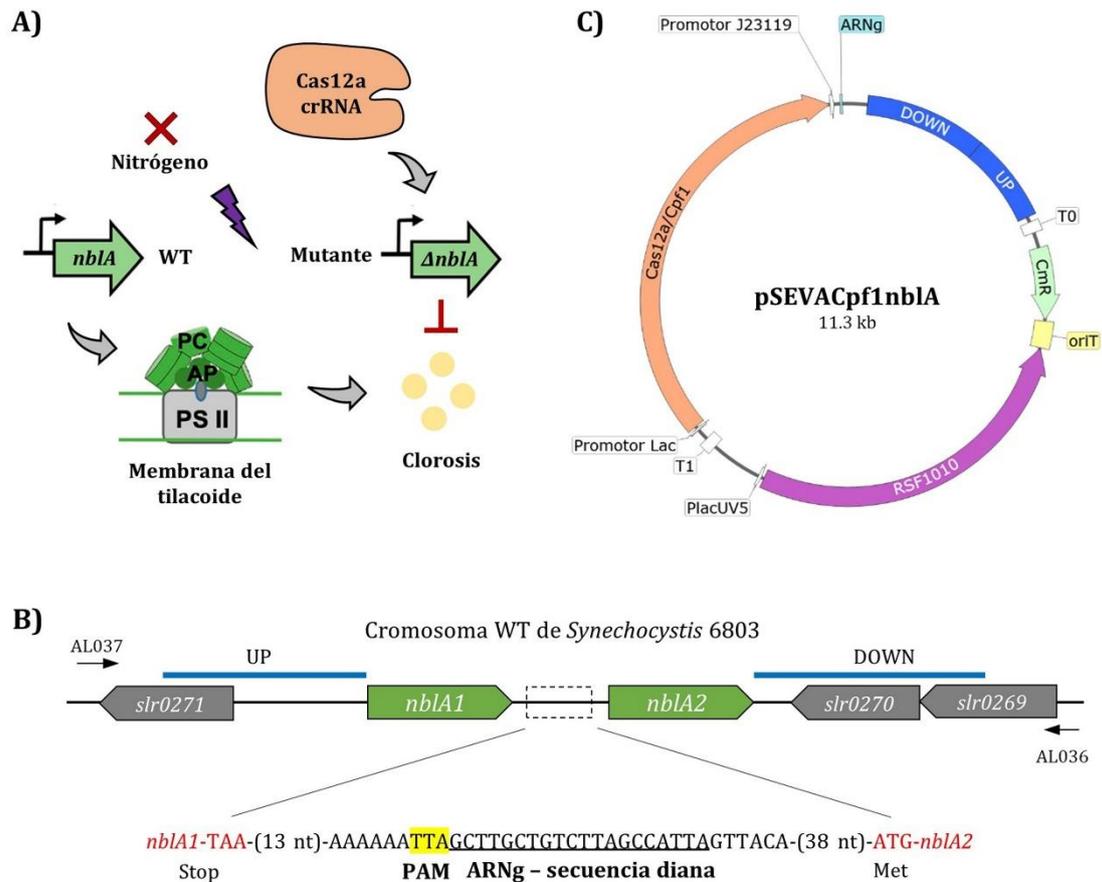


Figura R.3.10. Esquema de la delección del gen *nblA* en genoma de *Synechocystis 6803*. **A)** Diagrama del proceso de la clorosis en condiciones de privación de nitrógeno en la cepa WT y en mutantes de delección de *nblA*. Modificado de S. Y. Choi y Woo, 2020. PC, ficocianina; AP, aloficocianina; PS II, sistema fotosintético II. **B)** Diseño de elementos genéticos CRISPR-Cpf1 para la delección de *nblA*. Se muestra un esquema del contexto genómico de las copias de *nblA*. Las flechas negras indican los cebadores utilizados para la verificación mediante PCR, las líneas azules indican los brazos de homología, los recuadros verdes indican los genes *nblA1* y *nblA2* y los recuadros grises, los genes que rodean *nblA*. El codón de terminación de *nblA1* y el codón de inicio de *nblA2* se muestran en rojo, la secuencia diana para el ARNg y la secuencia de PAM también se indican. **C)** Plásmido pSEVACpf1nblA utilizado para la eliminación de *nblA*. Contiene Cpf1, el ARNg frente a la región intergénica de *nblA* y un molde de reparación homóloga para generar la delección (*UP* y *DOWN*).

3.3.4. Eliminación del plásmido pSEVA tras la edición mediante CRISPR

Para permitir más de una ronda de edición del genoma, el plásmido de edición debe estar curado, a menos que el nuevo vector de edición contenga un marcador de selección y un origen de replicación diferentes. Por lo tanto, se analizó el número de pases necesario para la curación del plásmido pSEVACpf1nblA en las cepas de *Synechocystis 6803* editadas. Se reestriaron diez colonias editadas en BG11 sin antibiótico. La pérdida de la capacidad de crecer en medios que contienen antibióticos no se logró con ningún clon en 14 pases.

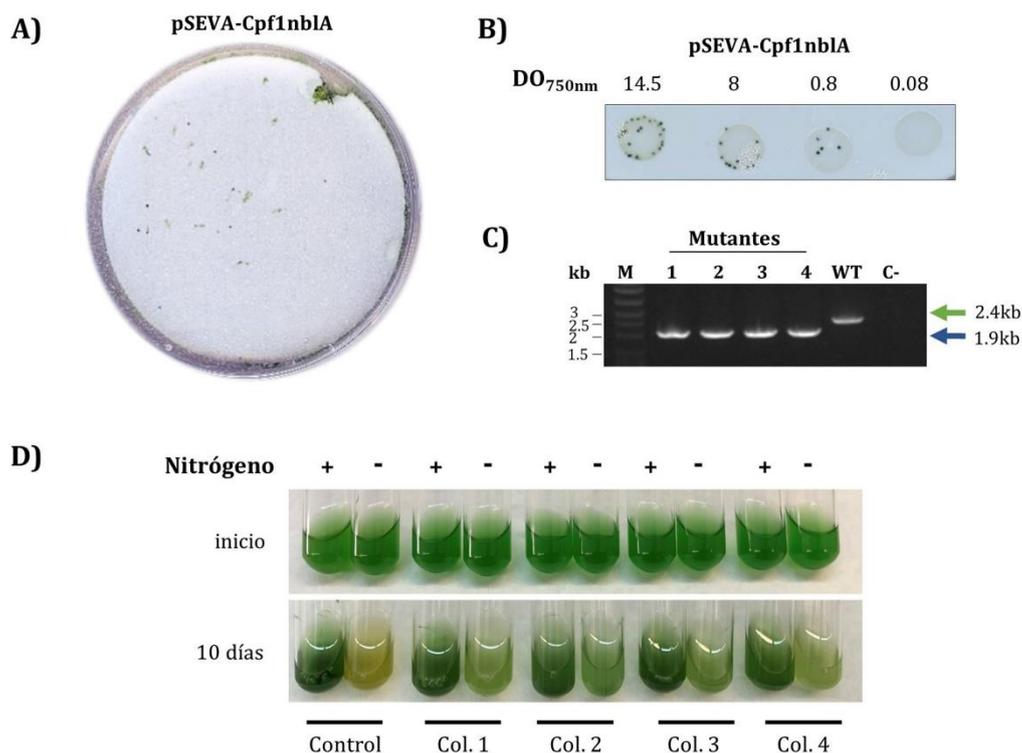


Figura R.3.11. Delección de *nblA* en *Synechocystis* 6803. Resultado de la transferencia de pSEVA-Cpf1nblA mediante **(A)** transformación natural y **(B)** conjugación triparental. Crecimiento tras 7 días en BG11 con Cm10. **(C)** Confirmación por PCR de la delección *nblA1/2* (transformación natural) usando los oligonucleótidos AL036/037. La flecha azul indica el producto de PCR de 4 colonias diferentes (Mutantes 1-4) cuando se ha eliminado el gen (1.9 kb). La flecha verde indica el tamaño del producto de PCR en *Synechocystis* 6803 (WT) (2.4 kb); C-, control negativo (sin ADN); M, marcador de peso. **(D)** Experimento de despigmentación en WT y mutantes *nblA1/2* (Col. 1 a 4 de la delección *nblA* en BG11 con o sin NaNO₃) procedentes de la transformación natural.

Debido a la estabilidad observada, se forzó la pérdida del plásmido siguiendo un protocolo similar al descrito en Ungerer y Pakrasi, 2016 (Material y métodos, 2.4.5.4. Evaluación de la pérdida del plásmido empleado en CRISPR). Así, de las colonias editadas aisladas en placa de BG11 tras crecer en medio líquido, se cogieron 60 al azar y se estiraron en placas BG11Cm10 y BG11 para identificar las colonias que se habían vuelto sensibles al cloranfenicol y, por lo tanto, habían perdido el plásmido de edición (Figura R.3.12). Posteriormente, se comprobó la ausencia de plásmido por PCR en todas las colonias sensibles a cloranfenicol (Figura R.3.12B). De los 60 clones probados, 26 fueron sensibles al cloranfenicol (Figura R.3.12A), pero solo 2 de las colonias que habían perdido la resistencia al antibiótico aún mostraban la presencia del plásmido cuando se analizaron por PCR. Dado que una colonia incluye varias generaciones de células, la pérdida de plásmido podría ser un proceso en curso en estos dos mutantes. Estos resultados demostraron que el plásmido de edición se perdió en el 40% de las colonias analizadas.

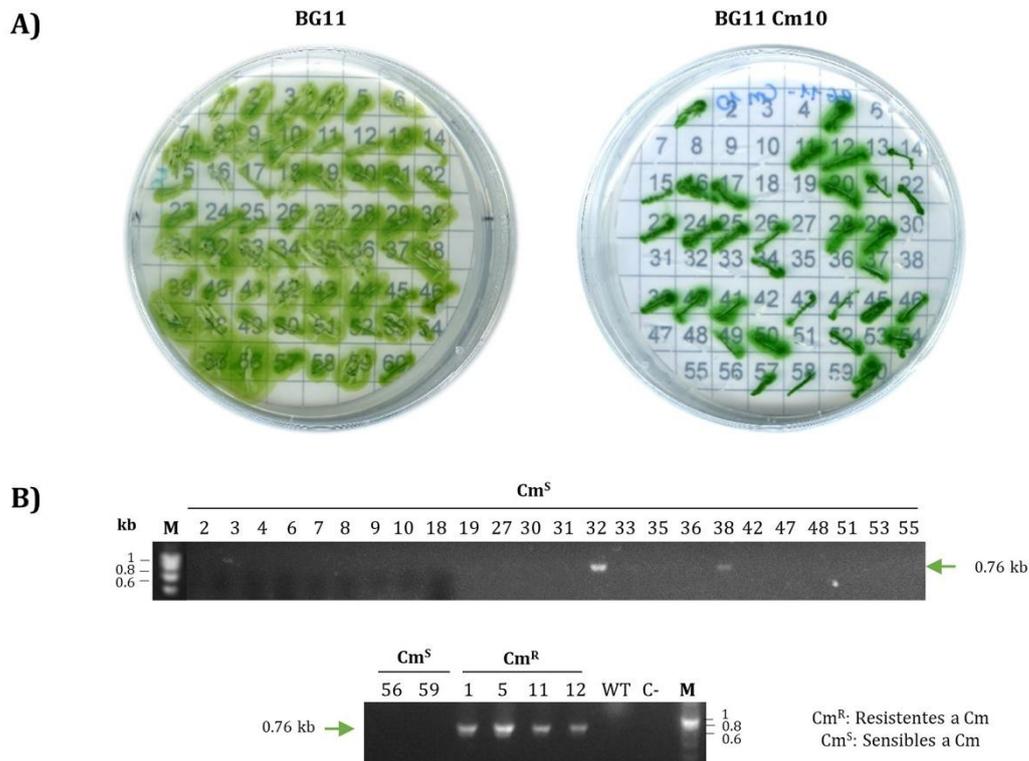


Figura R.3.12. Pérdida del plásmido de edición pSEVACpf1nblA en *Synechocystis* 6803. **A)** Estrías de colonias editadas ($\Delta nblA$) en medio BG11 sin y con Cm10 tras 12 días de crecimiento. **B)** Confirmación mediante PCR de la ausencia de pSEVA351-Cpf1nblA en *Synechocystis* 6803 $\Delta nblA$. Se usaron oligonucleótidos específicos que amplifican el gen de resistencia Cm (Oligo7/8). Todas las colonias sensibles a Cm fueron analizadas por PCR (sensibles a Cm). Como controles se incluyeron cuatro colonias resistentes a Cm (Cm resistentes). WT: ADN de *Synechocystis* 6803 de tipo silvestre; C-: control negativo de PCR (sin ADN); M: marcador de tamaño.

En resumen, en este Capítulo 3 se ha demostrado la funcionalidad de los plásmidos pSEVA RSF1010 en diferentes géneros de cianobacterias: desde modelos de cepas industriales y de investigación como *Synechocystis* o *Anabaena* hasta extremófilos no modelo como *Chroococcidiopsis*. Estos plásmidos han servido de base para la expresión de *yfp* así como la aplicación de la tecnología CRISPR-Cpf1. Como prueba de concepto del potencial de los vectores pSEVA-Cpf1 en los procesos de edición CRISPR, se ha aplicado con éxito uno de estos plásmidos en la eliminación del gen *nblA* en *Synechocystis* 6803. Además, los vectores SEVA con las herramientas CRISPR mostraron ser de fácil manejo y permitieron la edición de *Synechocystis* 6803 mediante transformación natural, además de conjugación triparental. Por lo tanto, este sistema podría superar el obstáculo de usar otros vectores de edición de Cpf1, como pSL2680, que presenta algunas desventajas, como mayores cantidades necesarias para el clonaje y una baja versatilidad. Finalmente, dado que los vectores SEVA son funcionales en otras bacterias, los plásmidos desarrollados podrían emplearse como herramientas de biología sintética en otros microorganismos aumentando el repertorio disponible.

Capítulo 4.

Desarrollo de herramientas de expresión génica y control de proteínas en *Synechococcus* sp. PCC

11901

El trabajo recogido en este capítulo se realizó durante dos estancias llevadas a cabo en el 2020 (agosto-diciembre) y 2021 (septiembre-octubre) en el grupo de Ingeniería Metabólica de bacterias autótrofas dirigido por Paul Hudson en KTH-Royal Institute of Technology, Estocolmo, Suecia.

Parte de los resultados de este capítulo se reescribirá para su publicación como:

Baldanta S.¹; Willi, T², Cengic, I², Navarro-Llorens, J.M.¹, Sporre, E², Miao, R², Hudson, P².
Synthetic biology tools for controlling gene expression in *Synechococcus* PCC 11901.

1. Grupo de Ingeniería Metabólica, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid.
2. KTH-Royal Institute of Technology. School of Engineering Sciences in Chemistry, Biotechnology, and Health, Science for Life Laboratory, Stockholm, Sweden

1. ANTECEDENTES: HERRAMIENTAS DE CONTROL DE LA EXPRESIÓN EN CIANOBACTERIAS

Synechococcus 11901 es una cianobacteria de crecimiento rápido descubierta recientemente (Włodarczyk *et al.*, 2020). Además, de la alta tasa de crecimiento, presenta otros rasgos atractivos como competencia natural, tolerancia a una alta intensidad de luz y una elevada producción de biomasa. Por estas razones, podría ser una cianobacteria modelo de estudio en el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas (Introducción, Tabla I.1), para lo cual se debe poder realizar ingeniería metabólica en ella.

La modificación genética de una nueva cepa requiere herramientas moleculares que permitan controlar la expresión de genes y proteínas, y plásmidos que permitan la modificación genética. Como se indicó en la Introducción (2.3.1. Cianobacterias modelo de los géneros *Synechocystis* y *Synechococcus*), esta nueva cepa es filogenéticamente cercana a la cianobacteria *Synechococcus* 7002 de la que se cuenta con herramientas genéticas por lo que sería fácil transferir estas herramientas a *Synechococcus* 11901 y desarrollar diferentes aplicaciones. Algunas de las herramientas biotecnológicas que se han desarrollado para *Synechococcus* 7002 son promotores (Markley *et al.*, 2015; Ruffing *et al.*, 2016), plásmidos integrativos (Ruffing *et al.*, 2016; Vogel *et al.*, 2017) o la tecnología CRISPRi (Gordon *et al.*, 2016). Aunque en ocasiones la transferencia de herramientas entre diferentes cianobacterias se da por hecho, la realidad es que es necesario validarlas y optimizarlas para cada una de ellas antes de que se puedan utilizar para una aplicación biotecnológica determinada.

Hasta hoy en día, solo el trabajo de Włodarczyk *et al.*, 2020 ha explorado herramientas de ingeniería metabólica para *Synechococcus* 11901, utilizándose con éxito en la producción de ácidos grasos libres. En este trabajo se han probado con éxito dos promotores, el promotor constitutivo P_{cpt} y el promotor inducible por IPTG P_{clac143} , que han sido descritos con anterioridad para *Synechococcus* 7002 (Markley *et al.*, 2015).

En lo que respecta a herramientas de control de la expresión génica, en cianobacterias al igual que otros microorganismos, se han desarrollado sobre todo a nivel transcripcional, como p.e, CRISPRi. No obstante, en ocasiones, un cambio rápido requiere no solo del bloqueo transcripcional sino también de la degradación de la proteína diana (Shabestary *et al.*, 2018). En la Introducción (4.4. Regulación post-traducciona) se comentaron varias estrategias para controlar la degradación de proteínas, como aquellas en las que se emplea un degrón y una proteasa que actúa de manera ortogonal (Durante-Rodríguez *et al.*, 2018; Fernández-Rodríguez y Voigt, 2016; Martínez *et al.*, 2017). En lo que se refiere al uso de estas herramientas en cianobacterias, se han publicado recientemente dos trabajos en los que se controlan los niveles de proteínas en *Synechococcus elongatus* 7942. En Sakkos *et al.*, 2021, emplearon el sistema ARNtm de *Mesoplasma florum* y degrones para degradar proteínas diana. Por otro lado, en M. Y. Zhang *et al.*, 2021, utilizaron una versión modificada de la etiqueta *ssrA* de *E. coli* inmune al sistema de degradación nativo de *Synechococcus* 7942. En este sistema, la proteólisis de las proteínas etiquetadas se consiguió regulando la expresión de dos proteínas del complejo de degradación de *E. coli*, SspB y ClpXP (M. Y. Zhang *et al.*, 2021).

Dado el potencial industrial de *Synechococcus* 11901 y la escasez de herramientas biotecnológicas en esta especie, en el Capítulo 4 de esta tesis doctoral, se desarrollarán en esta cianobacteria diferentes herramientas de control de la expresión. Los objetivos específicos perseguidos en este capítulo son: (i) la construcción de plásmidos para modificación genética, (ii) la prueba de diferentes promotores y (iii) el desarrollo de un sistema de degradación inducible y dirigida de proteínas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla R.4.1 junto con su procedencia y características genotípicas y fenotípicas relevantes.

Tabla R.4.1. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo.

Cepa	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> XL-1	Cepa de clonaje y conjugación, F' <i>endA1 hsdR17 (r_K m_K') supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^R) relA1 Δ(argF-lac) U169 deoR (φ80dlacΔ(lacZ)M15)</i>	Colección del laboratorio
<i>E. coli</i> Copy Cutter	Cepa de clonaje, F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ rpsL (Str^R) nupG trfA tonA pcnB4 dhfr</i>	Colección del laboratorio
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	Cepa silvestre (NC_010475)	Colección del laboratorio
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 11901	Cepa silvestre (CP040360.1)	Colección del laboratorio
Mutantes de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 11901		
Caracterización de sitios neutrales de integración y promotores		
HSL086	NS1::Km ^R	Este trabajo
HSL084	NS2::Spt ^R	Este trabajo
HSL085	NS3::Spt ^R	Este trabajo
HSL064	NS2::P _{J23110} YFP Spt ^R	Este trabajo
HSL164	NS2::P _{c223} YFP Spt ^R	Este trabajo
HSL238	NS1::P _{cLac94} YFP Km ^R	Este trabajo
HSL219	NS1::P _{cLac143} YFP Km ^R	Este trabajo
HSL142	NS1::P _{Rha} YFP Km ^R	Este trabajo
HSL239	NS1::P _{Rha-RSW} YFP Km ^R	Este trabajo
HSL241	NS1::P _{c223} YFP Spt ^R	Este trabajo
HSL242	NS3::P _{c223} YFP Spt ^R	Este trabajo
HSL243	NS2::P _{cLac143} YFP Km ^R	Este trabajo
HSL244	NS3::P _{cLac143} YFP Km ^R	Este trabajo
Desarrollo del sistema de degradación inducible de proteínas		
HSL082	NS2::P _{J23110} FR-YFP Spt ^R	Este trabajo
HSL083	NS2::P _{J23110} YA-YFP Spt ^R	Este trabajo
HSL071	NS1::P _{cLac143} TEV Km ^R	Este trabajo
HSL078	NS1::P _{cLac143} TEVp Km ^R ; NS2::P _{J23110} YFP Spt ^R	Este trabajo
HSL076	NS1::P _{cLac143} TEVp Km ^R ; NS2::P _{J23110} FR-YFP Spt ^R	Este trabajo
HSL077	NS1::P _{cLac143} TEVp Km ^R ; NS2::P _{J23110} YA-YFP Spt ^R	Este trabajo
HSL163	NS2::P _{c223} FR-G-YFP Spt ^R	Este trabajo
HSL162	NS2::P _{c223} L7-FR-YFP Spt ^R	Este trabajo
HSL140	NS1::P _{cLac143} TEVp Km ^R ; NS2::P _{c223} YFP Spt ^R	Este trabajo
HSL141	NS1::P _{cLac143} TEVp Km ^R ; NS2::P _{c223} FR-G-YFP Spt ^R	Este trabajo
HSL165	NS1::P _{cLac143} TEVp Km ^R ; NS2::P _{c223} L7-FR-YFP Spt ^R	Este trabajo
HSL258	NS1::P _{Rha} TEVp Km ^R ; NS2::P _{c223} FR-G-YFP Spt ^R	Este trabajo

Cada cepa se ha construido mediante la integración de uno o dos casetes mediante plásmidos integrativos (Tabla R.4.2. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.). Se indica el sitio neutral para la integración, junto con el promotor, el gen introducido y la resistencia a antibiótico. La construcción de mutantes se realizó como se indica en la Figura R.4.1.

La síntesis de los oligonucleótidos y fragmentos de ADN utilizados en este trabajo fueron encargados a la empresa IDT Technologies. El nombre, la secuencia y la aplicación de los oligonucleótidos en el presente trabajo se detallan en la Tabla R.4.2.

Tabla R.4.2. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Oligonucleótido y secuencia 5'-3'		Uso
Para construir los plásmidos de integración		
SB9	AGGAAGCGGAAGAGCATTCTCCAGGATGTG GCTGCTG	Amplificar ~1000 pb <i>upstream acsA</i> (NS1)
SB10	TCTTCGATATCACGTGAAGACAGAATTCGG AGTCGGAGGGAAAATTTCCATTA	
SB11	TGTCTTCACGTGATATCGAAGACACTGCAG TTGCGCTCAAGTTGATTGAA	Amplificar ~1000 pb <i>downstream acsA</i> (NS1)
SB12	GTAATACGACTCACTATAGGGCCATTGGTG CCGACAATTC	
SB7	CCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCCTGG CC	Linealizar el plásmido pALM174 y clonar los brazos de homología para la delección de <i>acsA</i> mediante el <i>kit</i> NEB Hifi assembly (NS1)
SB8	AGAATGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACT	
SB13	GGAAGCGGAAGAGCAGGGCACGGATCAAGG CTAAAT	Amplificar ~1000 pb <i>upstream</i> NS2
SB14	GTCTTCCCGGGTTCACGTGAAGACAGGTAC CGAGTTTCATTACTTCTGGCA	
SB15	GTCTTCACGTGAACCCGGGAAGACGGTCCGA CACTATTTATGCTGCCAAGGCTGTT	Amplificar ~1000 pb <i>downstream</i> NS2
SB16	GTAATACGACTCACTATAGGAAAAATCCTT AGCCCGGTGGGT	
SB17	TGCCCTGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTG	Junto con el SB7, para linealizar el plásmido pALM174 y clonar los brazos de homología para integración en NS2 mediante el ensamblaje <i>kit</i> NEB Hifi assembly
SB18	GGAAGCGGAAGAGCGTTGGCGATCGCCGTC AAAG	Amplificar ~1000 pb <i>upstream</i> NS3
SB19	GTCTTCGATATCTCACGTGAAGACAGGTAC CTTAGTCCCTAATCTCTCAATTT	
SB20	GTCTTCACGTGAGATATCGAAGACGGTCCGA CCCTCCACGGGGTTGTAGTGG	Amplificar ~1000 pb <i>downstream</i> NS3
SB21	GTAATACGACTCACTATAGGCAAGGCCAAT GAGAAACGAC	
SB22	GCCAACGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTG	Junto con el SB7, para linealizar el plásmido pALM174 y clonar los brazos de homología para integración en NS3 mediante el ensamblaje <i>kit</i> NEB Hifi assembly
SB41	GCATATCACGTGTCGACGCTAGCTCGAGGA TATCTTACTAGAGCCAGGCATCAAATAAAA	Amplificar el casete de resistencia a kanamicina y el terminador B0015 (pMD19T_PL22_sgRNA) y clonarlo en pNS1 (<i>PmlI/PstI</i>)
SB42	GCAAGCCTGCAGCATATGACTAGTACAACA AAGCCACGTTGTG	
SB23	GCAAACGAAGACAGTCGACGCCGCTACTAG TAGTAGCGA	Amplificar el casete de Resistencia a espectinomina (pMD19T_PL22_dCas9) y el terminador B0015 y clonarlo en pNS2 y pNS3 (<i>Bpil</i>)
SB24	GCAGCAGAAGACTGGTACCATTGATTAGTG AAGAAGATTTGTA	
Para construir los plásmidos con distintos promotores y YFP		
SB43	GCACAGTCGACTAAAGTCAAACCTAGGCC TGTG	Amplificar los promotores cLac, el gen de interés y <i>LacI</i> de los plásmidos pALM y clonarlos en pNS1-Km ^R (plásmido <i>Sall/EcoRV</i> , inserto: TG
SB44	GCAGACCACGTGGAACCGGAAGGAGCTGAC TG	

		<i>Sall/PmlI</i>). Utilizados también en la construcción del sistema TEVp
TW115	TAGTGCCAAACATTCATGTATTCTGTGCCT TCATCTTTCC	Amplificar la construcción P _{Rha} -YFP-RhaS de un <i>gBlock</i> y clonarla en pNS1-Km ^R mediante el <i>kit</i> NEB Hifi <i>assembly</i> .
TW116	CAGACTCAATTAACATACGCTTTTTAGCTAT AAAAAAACCCGCC	
SB25	GCAGCAGAAGACTGAATTCAATTGACAATT GACAATTCCTCCACTTA	Amplificar el P _{Rha-RSW} de un <i>gBlock</i> , incluyendo <i>RhaS</i> y clonarlo en pNS1 (<i>BpiI</i>).
SB26	ATAGCAGAAGACTGCAGCTATAAAC	
SB47	GCACAAGCGGCCGCTTACTAGAGCCAGGCA TCAAAATAAACG	Junto con SB42, para amplificar el casete de resistencia a kanamicina (pMD19T_PL22_sgRNA) y clonarlo pNS1-P _{RhaRSW} (<i>NotI/PstII</i>)
SB70	GCACTACACGTGGTATCCAAAGGCGAGGAG CTCT	Amplificar YFP y clonarla en pNS1-P _{Rha-RSW} -Km ^R (plásmido <i>EcoRV/NotI</i> , inserto <i>PmlI/NotI</i>)
SB71	GCATGCGCGGCCGCTATGCCTGGTTACTA CTTATAACAAC	
IVCE975	CGTAAGGAAGACGTTGCCTTTACGGCTAGC TCAGTC	Amplificar P _{J23110} -YFP de un <i>gBlock</i> y clonar en pPMQAK1-T (<i>BpiI</i>). Utilizados también en la construcción del sistema TEVp
IVCE976	CGTAAGGAAGACGTTCCCTATAAACGCAGA AAGGCC	
SB48	GCAGCGTCTAGACACGTGATTAACCTATAA AAATAGGCGTATCAC	Amplificar P _{J23110} -YFP del pPMQAK1-T y clonarla en pNS2-Spt ^R (Plásmido <i>NheI/Sall</i> , inserto <i>XbaI/Sall</i>). Utilizados también en la construcción del sistema TEVp
SB49	GCACCAGTCGACACCGGTCCGGATCCCTAT AAACGCAGAA	
TW119	TAGTGCCAAACATTCATGTAGCTGCTTGGA CACCGAATTAAC	Amplificar P _{c223} -YFP de un <i>gBlock</i> y clonarlo en pNS2-Spt ^R mediante ensamblaje con <i>kit</i> NEB Hifi <i>assembly</i> .
TW120	CAGACTCATTAACATACGCTCGTTTAGCTA TAGGAGTTTGTTCG	
TW117	TACATGAATGTTTGGCACTATAGCGACCGA GTGAGCTAGC	Linealizar pNS2-Spt ^R y clonar P _{c223} -YFP mediante el <i>kit</i> NEB Hifi <i>assembly</i> .
TW118	AGCGTATGTTAATGAGTCTGCGACACTATT TATGCTGCCAAGG	
SB64	GCAACACACGTGTAAGTCAAACCTAGGCC TGTC	Amplificar P _{cLac143} -YFP-LacI-Km ^R del pNS1-P _{cLac143} -YFP y clonarla en pNS2 o pNS3 (<i>Sall/PmlI</i>)
SB65	AACGAAGTCGACACTAGTACAACAAAGCCA CGTT	
SB68	GCAGCAGAAGACTGGTACCACGTGATTGAT TAGTGAAGAAGATTTGTAAT	Amplificar P _{c223} -YFP-Spt ^R del pNS2-P _{c223} -YFP y clonarla en pNS1 (<i>PmlI/PstI</i>) o pNS3 (<i>BpiI</i>).
SB69	GCAAACGAAGACAGTCGACTGCAGCAGACT CATTAACATACGCT	
Oligonucleótidos para comprobar construir el sistema de degradación de proteínas (sistema TEVp)		
SB1	AGTAGGAGATTAATTCATGTTTGTCCAAG AACAGAAGCT	Para amplificar <i>TEVp</i> de un <i>gBlock</i> y clonarla en pALM179 mediante el <i>kit</i> NEB Hifi <i>assembly</i> . <i>TEVp</i> incluye una etiqueta myc antes del gen.
SB4	AGCTTCCTTTCCGGCTTTGTTATTATTAGT TCATGAGTTGTGTT	
SB2	ACAAACATGGAATTAATCTCCTACTTGACT TTAT	Para linealizar pALM179 y clonar <i>TEVp</i> mediante el <i>kit</i> NEB Hifi <i>assembly</i> .
SB3	TAACAAAGCCCCGAAAGGAAGCT	
SB73	GACCTATCTAGAATGTTTGTCCAAGAAGAG AAGCTG	Para amplificar <i>TEVp</i> de un <i>gBlock</i> y clonarla en pNS1-P _{Rha} -YFP, reemplazando <i>yfp</i> (<i>XbaI/NotI</i>)
SB74	GCTCCAGCGGCCGCTTATTAGTTCATGAGT TGTGTT	
TW149	TTGAAAATACAGATTTTCTCCCTCCTCGCC TTTGATACCATC	Para amplificar y añadir el debrón L7-FR siete aminoácidos después del ATG en pNS2-P _{c223} -YFP
TW150	TTTCGATTTCGATAAGGAGGACTCTTTACG GGCGTTGTTCCAATTC	
Otras parejas utilizadas (indicadas en apartados anteriores): SB43/44, IVCE975/976, SB48/49, TW119/120, TW117/178		

Oligonucleótidos para comprobar la transformación de <i>Synechococcus</i> 11901		
SB29	TACGTCACGCCTTTGGGTGAAATTT	Para genotipar la inserción en NS1
SB30	CCTCGAACAAAGTTGGTTATGGTTC	
SB50	TTTTCGCCAATGAGGGCATTGATCA	Para genotipar la inserción en NS2
SB51	AAATTCGCGAAGCGACTAAAAAGA	
SB52	ATCTGGGGATTGAGTTCTTGGGTAT	Para genotipar la inserción en NS3
SB53	CCCAGAAGCCTTTTAGATTGCAACA	
NC29	CCCGAAAAGTGCCACCTGAC	Para comprobar la presencia del pPMQAK1-T y plásmidos derivados.
NC30	GCGAGTCAGTGAGCGAGG	

Los plásmidos empleados en este trabajo, junto con sus características más relevantes se muestran en la Tabla R.4.3.

Tabla R.4.3. Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Descripción	Referencia
Plásmidos para transformación		
pRL443	Plásmido para conjugación, proporciona los genes <i>tra</i> y función de corte de RK2, Km ^R	Colección del laboratorio
pAM5505	Plásmido auxiliar, pRL623 con el gen <i>mobA</i> de RSF1010. También lleva los genes para las metilasas <i>M.AvaI</i> , <i>M.Eco47II</i> y <i>M.EcoT22I</i> y los genes <i>mob</i> de ColK. Cm ^R , ColK oriV	Addgene #132664
pSEVA421-T-LacZα	pSEVA421 modificado para eliminar los sitios <i>BsaI</i> y <i>BpiI</i> nativos y con un casete de expresión <i>lacZα</i> flanqueado por dos sitios <i>BpiI</i>	Addgene #119555
pPMQAK1-T-LacZα	pPMQAK1 modificado para eliminar los sitios <i>BsaI</i> y <i>BpiI</i> nativos y con un casete de expresión <i>lacZα</i> flanqueado por dos sitios <i>BpiI</i>	Addgene #119559
pPMQAK1-T-YFP	Plásmido pPMQAK1-T-LacZα con <i>yfp</i> bajo el promotor constitutivo J23110 clonado en sitios <i>BpiI</i> .	Este trabajo
pALM174	<i>yfp</i> bajo el promotor cLac94, inducible por IPTG. Incluye <i>LacI</i> y brazos de homología para la delección de <i>acsA</i> en <i>Synechococcus</i> 7002. Amp ^R	Addgene #82022
pALM179	<i>yfp</i> bajo el promotor cLac143, inducible por IPTG. Incluye <i>LacI</i> y brazos de homología para la delección de <i>acsA</i> en <i>Synechococcus</i> 7002. Amp ^R	Addgene #82023
pMD19T_PL22_dCas9	<i>dCas9</i> bajo el promotor P _{L22} y resistencia a espectinomicina, para la delección de <i>psbA1</i> (BAA18829.1) en <i>Synechocystis</i> 6803.	Colección del laboratorio, Yao <i>et al.</i> , 2016
pMD19T_PL22_sgRNA	Plásmido con ARNg frente a <i>gfp</i> y resistencia a kanamicina, para la inserción en <i>slr0397</i> (BAA18527.1) en <i>Synechocystis</i> 6803	Colección del laboratorio, Yao <i>et al.</i> , 2016
Definición de sitios neutrales y prueba de promotores		
pNS1	Plásmido para delección de <i>ascA</i> (NS1). Amp ^R	Este trabajo
pNS1-Km ^R	Plásmido para delección de <i>ascA</i> (NS1). Incluye un casete de resistencia a kanamicina. Amp ^R , Km ^R	Este trabajo
pNS2-Spt ^R	Plásmido para inserción en sitio neutral 2 (NS2). Incluye un casete de resistencia a espectinomicina. Amp ^R , Spt ^R	Este trabajo
pNS3-Spt ^R	Plásmido para inserción en sitio neutral 3 (NS3). Incluye un casete de resistencia a espectinomicina. Amp ^R , Spt ^R	Este trabajo

pNS1-P_{cLac94}-YFP	pNS1-Km ^R con <i>yfp</i> bajo el promotor inducible cLac94 y <i>LacI</i> del plásmido pALM174. Amp ^R , Km ^R	Este trabajo
pNS1-P_{cLac143}-YFP	pNS1-Km ^R con <i>yfp</i> bajo el promotor inducible cLac143 y <i>LacI</i> del plásmido pALM179. Amp ^R , Km ^R	Este trabajo
pNS1-P_{Rha}-YFP	pNS1-Km ^R con <i>yfp</i> bajo el promotor inducible Rha y RhaS (Behler <i>et al.</i> , 2018). Amp ^R , Km ^R	Este trabajo
pNS1-P_{RhaRSW}-YFP	pNS1-Km ^R con <i>yfp</i> bajo el promotor inducible Rha-RSW y RhaS (Liu <i>et al.</i> , 2020). Amp ^R , Km ^R	Este trabajo
pNS2-P_{J23110}-YFP	pNS2-Spt ^R con <i>yfp</i> bajo el promotor constitutivo J23110. Amp ^R , Spt ^R	Este trabajo
pNS2-P_{c223}-YFP	pNS2-Spt ^R con <i>yfp</i> bajo el promotor constitutivo c223 (Markley <i>et al.</i> , 2015). Amp ^R , Spt ^R	Este trabajo
pNS2-P_{cLac143}-YFP	pNS2 con <i>yfp</i> bajo el promotor inducible cLac143, <i>LacI</i> y el casete Km ^R del plásmido pNS1-P _{cLac143} -YFP. Amp ^R , Km ^R	Este trabajo
pNS3-P_{cLac143}-YFP	pNS3 con <i>yfp</i> bajo el promotor inducible cLac143, <i>LacI</i> y el casete Km ^R del plásmido pNS1-P _{cLac143} -YFP. Amp ^R , Km ^R	Este trabajo
pNS1-P_{c223}-YFP	pNS1 con <i>yfp</i> bajo el promotor constitutivo c223 y el casete Spt ^R del plásmido pNS2-P _{c223} -YFP. Amp ^R , Spt ^R	Este trabajo
pNS3-P_{c223}-YFP	pNS3 con <i>yfp</i> bajo el promotor constitutivo c223 y el casete Spt ^R del plásmido pNS2-P _{c223} -YFP. Amp ^R , Spt ^R	Este trabajo
Sistema de degradación de proteínas		
pNS1-P_{cLac143}-TEVp	pNS1-Km ^R con <i>TEVp</i> expresado bajo el promotor cLac143. El plásmido incluye <i>LacI</i> . Amp ^R , Km ^R	Este trabajo
pNS1-P_{rha}-TEVp	pNS1-Km ^R con <i>TEVp</i> expresado bajo el promotor Rha. El plásmido incluye <i>RhaS</i> . Amp ^R , Km ^R	Este trabajo
pNS2-P_{J23110}-FR-YFP	pNS2-Spt ^R con <i>yfp</i> expresada con el promotor J23110, con la secuencia de reconocimiento de TEVp y el degrón FR después del ATG. Amp ^R , Spt ^R	Este trabajo
pNS2-P_{J23110}-YA-YFP	pNS2-Spt ^R con <i>yfp</i> expresada con el promotor J23110, con la secuencia de reconocimiento de TEVp y el degrón YA después del ATG. Amp ^R , Spt ^R	Este trabajo
pNS2-P_{c233}-FR-G-YFP	pNS2-Spt ^R con <i>yfp</i> expresada con el promotor c223, con la secuencia de reconocimiento de TEVp y el degrón FR-G después del ATG. Amp ^R , Spt ^R	Este trabajo
pNS2-P_{c233}-L7-FR-YFP	pNS2-Spt ^R con <i>yfp</i> expresada con el promotor c223, con la secuencia de reconocimiento de TEVp y el degrón L7-FR aminoácidos después del ATG. Amp ^R , Spt ^R	Este trabajo

2.2. Medios y condiciones de cultivo

Todas las soluciones y medios de cultivo utilizados en este trabajo se esterilizaron por calor húmedo en un autoclave a 121°C y 1 atm de presión o mediante filtración utilizando filtros estériles Millipore de 0.2 µm de diámetro (Merck).

2.2.1. Medios y condiciones de cultivo empleados para *E. coli*

El cultivo de *E. coli* se realizó en el medio rico LB a 250 rpm, a 37°C (Green y Sambrook, 2012). Los cultivos en medio sólido se realizaron con medio LB con 1.5% de agar (Sigma). Cuando fue necesario, se añadieron antibióticos a las siguientes concentraciones finales: Amp 100 µg/mL, Km 50 µg/mL, Cm 35 µg/mL y Spt 50 µg/mL. El crecimiento del cultivo en medio líquido se determinó en base a la medida de la DO_{600nm} con un espectrofotómetro (VWR).

2.2.2. Medios y condiciones de cultivo empleados para *Synechococcus* sp.

Los cultivos de *Synechococcus* sp. (cepas PCC 11901 y 7002) se crecieron de forma rutinaria en medio AD7 (Włodarczyk *et al.*, 2020; Capítulo 2, Tabla R.2.3) a 30°C, 1% CO₂, con iluminación de luz blanca fluorescente constante (60 μ moles de fotones/m² s) y con agitación orbital (150 rpm). El crecimiento del cultivo se determinó en base a la medida de DO_{730nm} con un espectrofotómetro (VWR) o en un lector Tecan Spark. Para *Synechococcus* 11901, cuando fue necesario, los antibióticos fueron añadidos a las siguientes concentraciones: Spt 25 μ g/mL y Km 50 μ g/mL. Para el cultivo sólido se usaron placas de Bactoagar americano (Sigma) al 1.5% (p/v) en medio AD7. Para los experimentos de transformación por conjugación se emplearon placas de AD7 con agar y 5% (v/v) de LB.

2.2.3. Conservación de las cepas bacterianas

Las cianobacterias se crecieron hasta una fase exponencial y se guardaron a -80°C en DMSO al 5% (v/v). El resto de las bacterias se conservaron a -80°C, en LB con glicerol al 20% (v/v).

2.3. Experimentos de transferencia génica

2.3.1. Transformación de *E. coli*

Las células de *E. coli* fueron modificadas genéticamente por transformación mediante choque térmico tras hacerlas competentes mediante el método CCMB80 (Green y Sambrook, 2012; Hanahan *et al.*, 1991). La selección de los transformantes se llevó a cabo en placas de LB agar suplementadas con el antibiótico apropiado.

2.3.2. Transformación de *Synechococcus* sp. PCC 11901

2.3.2.1. Transformación natural

La modificación genética de *Synechococcus* sp. PCC 11901 mediante transformación natural se llevó a cabo usando un cultivo a DO₇₃₀ \approx 0.5 y 1-2 μ g de plásmido, en 1 mL de cultivo, y agitación suave. Las colonias aparecieron en 5-7 días y se pasaron a una nueva placa con antibiótico. La segregación completa se confirmó mediante PCR (Tabla R.4.2) tras reestriar las colonias resistentes a placas con antibiótico al menos una vez.

2.3.2.2. Conjugación triparental

La transformación mediante conjugación triparental de *Synechococcus* 11901 fue realizada de acuerdo con el protocolo descrito en Gale *et al.*, 2019, con pequeñas modificaciones. *E. coli* XL-1 con los plásmidos pPMQAK1-YFP o pSEVA421-LacZ y *E. coli* XL-1 con los plásmidos pRL443 y pAM5505 (Addgene, Bishé *et al.*, 2019) se crecieron O/N en 5 mL de LB con los antibióticos correspondientes. En primer lugar, los cultivos de *E. coli* se centrifugaron a 4000 rpm 10 min y se descartó el sobrenadante. Los *pellets* se resuspendieron en LB fresco sin antibióticos. Tras dos lavados, el *pellet* se resuspendió en 2.5 mL de LB y ambas cepas se mezclaron usando 0.45 mL de cada una. Por otro lado, *Synechococcus* 11901 crecida hasta una DO_{730nm} de 1 en medio

AD7 se empleó para la conjugación. Cultivos de *Synechococcus* 11901 se recogieron centrifugando durante 10 min a 4000 rpm y 20°C. El sobrenadante se descartó y el *pellet* se lavó 3 veces con medio de cultivo AD7 (manteniendo el volumen original). Finalmente, 900 µL de cultivo ($DO_{730nm} = 1$) se combinaron con los 900 µL de la mezcla de *E. coli* y se mantuvo la mezcla 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla se centrifugó 10 min a 2000 rpm. Se desecharon 1.6 mL de sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en el volumen restante, que se sembró en membranas de 0.45 µm de nitrocelulosa (ThermoFisher) dispuestas sobre placas de AD7 con 5% de LB (v/v). Las placas con las mezclas conjugativas se incubaron a 30°C, en condiciones de luz normal. A las 24 h, los filtros conjugativos se traspasaron a placas de AD7 con antibióticos. Las colonias aparecieron en 4-6 días y se pasaron a una nueva placa con antibiótico. La transformación se confirmó mediante PCR (Tabla R.4.2) tras reestriar las colonias resistentes en placas con antibiótico al menos una vez.

2.4. Técnicas que manipulación de ADN

Las técnicas de manipulación de ADN, así como otras técnicas de biología molecular utilizadas en esta tesis se describen en Green y Sambrook, 2012. Las enzimas se emplearon siguiendo las especificaciones del fabricante, salvo que se indique lo contrario.

2.4.1. Extracción de ADN

El ADN plasmídico de *E. coli* se extrajo mediante el *kit* de *miniprep mi-Plasmid Miniprep* (ThermoFisher), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Para determinar la concentración y la pureza de las muestras de ADN se utilizó un NanoPhotometer® N60/N50 (Implen).

Para la extracción de ADN de *Synechococcus* 11901, se recogieron 20 mL de cultivo y se realizaron 3 lavados con agua estéril. Posteriormente, el ADN se extrajo siguiendo un protocolo de aislamiento de genómico descrito para gran-positivas del *kit Genomic DNA Purification* (ThermoFisher). Por otro lado, para la comprobación de transformantes, el ADN se extrajo rápidamente con cloroformo como se detalla a continuación: varias colonias procedentes de una estría se resuspendieron en 200 µL de agua y se homogeneizó con vórtex. Posteriormente, se añadieron otros 200 µL de cloroformo y se mezcló 15 s con vórtex. Tras 15 min de centrifugación a 12000 rpm, la fase superior se pasó a un nuevo tubo y se empleó para realizar las PCRs.

2.4.2. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa (PCR)

La amplificación del ADN se realizó en un equipo C1000 Touch Thermal cycler (Biorad). Para los clonajes se empleó exclusivamente la polimerasa de alta fidelidad *Phusion polymerase* (New England Biolabs). Las mezclas de reacción contenían oligonucleótidos 0.5 µM, dNTPs 0.2 mM y 0.25 ng de molde. Los productos amplificados se purificaron con el *kit GeneJET PCR Purification Kit* (ThermoFisher). Por otro lado, para comprobar la transformación de *Synechococcus* 11901 se amplificó por PCR una parte del plásmido replicativo introducido en la cianobacteria o bien la región de ADN del genoma donde se había insertado la construcción (Tabla R.4.2). La PCR se

realizó con el *Dreamtaq master mix 2x* (Thermofisher), empleando oligonucleótidos 0.5 μM , y 2 μL del ADN extraído con cloroformo (2.4.1. Extracción de ADN).

2.4.3. Construcción de los plásmidos de transformación

Para la construcción de los distintos plásmidos empleados en este trabajo, los clonajes se realizaron digiriendo y ligando los insertos y los plásmidos, o bien empleando el *kit* de ensamblaje *NEB Hifi assembly* (New England Biolabs). Las digestiones enzimáticas se llevaron a cabo con enzimas de restricción *Fast Digest* de Thermofisher, empleando 1 μL de enzima por cada μg de ADN en un volumen de 20 μL de reacción, durante 20 min a 37°C. Posteriormente, los insertos digeridos se purificaron con el *kit GeneJET PCR Purification Kit* (Thermofisher) y los plásmidos digeridos se corrieron en un gel de agarosa y se purificaron con el *kit GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermofisher). Las ligaciones se realizaron con la *T4 DNA ligase* de Thermofisher, utilizando proporciones en ng inserto:vector 5:1 en un volumen de reacción de 20 μL . Las reacciones de ligación se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente, 10 μL de la mezcla de ligación se utilizaron para transformar 100 μL de células competentes.

Para las construcciones en las que se usó la diana de *BpiI* tanto en el inserto como en el vector, el clonaje se realizó siguiendo el protocolo descrito en Vasudevan *et al.*, 2019, con pequeñas modificaciones. El inserto y vector se digirieron y ligaron en la misma reacción en el tampón de la ligasa *T4 DNA ligase* (Thermofisher) con 1 μL de *BpiI*, 1 μL de *T4 DNA ligase*, 50 ng de vector y 100 ng de inserto siguiendo el programa: 5 min 37°C, 10 min 16°C (30 ciclos), 5 min 55°C. Posteriormente, 10 μL de la mezcla de ligación se utilizaron para transformar 100 μL de células competentes.

Cuando los clonajes se realizaron con el *kit NEB Hifi assembly*, los plásmidos fueron linealizados mediante amplificación por PCR. Tras purificar los productos de PCR, se digirieron con *DpnI* (Thermofisher) para eliminar el plásmido empleado como molde, durante 1 hora a 37°C. Las reacciones con el *kit* se llevaron a cabo utilizando la relación molar de 1:2 vector:inserto (*NEBioCalculator*, <https://nebiocalculator.neb.com>) en un volumen final de 10 μL y se incubaron 15 min a 50°C. Finalmente, 2 μL de la mezcla anterior se utilizaron para transformar 100 μL de células competentes.

2.4.4. Electroforesis en geles de agarosa

Para visualizar los fragmentos de ADN se utilizaron geles 1% o 2% (p/v) de agarosa en tampón TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 7.6), utilizando el mismo tampón como electrolito. Para visualizar el ADN se empleó *GreenSafe Premium* (Thermofisher) a una dilución de 1:1000, añadido previamente a la gelificación de la agarosa. A las muestras se les añadió 1/6 de su volumen de tampón de carga (Thermofisher). La electroforesis se realizó a 100 V durante 20-30 min y, una vez finalizada, los fragmentos de DNA se visualizaron con radiación ultravioleta en un transiluminador (Biorad). El tamaño de los fragmentos se estimó por su movilidad electroforética utilizando como marcador de tamaño *DNA Ladder Mix Ready to use* (Thermofisher).

2.4.5. Diseño de construcciones sintéticas

Para diferentes promotores o construcciones con YFP se encargó la síntesis a IDT technologies como fragmentos de ADN sintéticos (*gBlocks*) (Anexo 1). Los *gBlocks* se usaron como molde para PCR (Tabla R.4.3). Para el clonaje del gen codificante de la proteasa TEV (Kapust *et al.*, 2001) se optimizó el uso de codones de la secuencia génica para la expresión en *Synechocystis* 6803 (mediante el programa *IDT Codon Optimization Tool*, IDT technologies) y también se sintetizó químicamente (IDT technologies). La secuencia para TEV se diseñó para incluir en N-terminal la etiqueta de epítipo myc, para poder detectar la expresión de la proteína mediante un *westernblot*.

2.4.6. Construcción de cepas mutantes de *Synechococcus* 11901 mediante inserción por recombinación homóloga

La construcción de cepas mutantes de inserción génica se realizó mediante doble recombinación homóloga utilizando los plásmidos integrativos derivados de pNS1-Km^R, pNS2-Spt^R y pNS3-Spt^R (ver Tabla R.4.3), cuyo origen de replicación no es funcional en *Synechococcus* 11901. La construcción de los plásmidos y su posterior integración en el genoma de *Synechococcus* 11901 se esquematiza en la Figura R.4.1. Para la construcción inicial de los plásmidos integrativos, se amplificaron por PCR dos fragmentos de aproximadamente 1000 pb, uno en posición 5' a la zona de inserción seleccionada y otro en posición 3', dando los fragmentos mencionados en este capítulo como NS *UP* y NS *DOWN* (1). Los cebadores empleados para amplificar el extremo 3' de *UP* y el 5' *DOWN* se diseñaron para incluir una secuencia extra, con diferentes dianas de restricción y con 20 pb solapantes. Los cebadores empleados en 5' de *UP* y 3' *DOWN* eran solapantes con el vector donde se iban a ligar (2). El ensamblaje de vector, *UP* y *DOWN* se llevó a cabo mediante el *kit NEB Hifi assembly* para obtener los plásmidos con los brazos de homología (3). A continuación, en los plásmidos obtenidos se clonaron casetes de resistencia a antibiótico amplificados por PCR (4) mediante enzimas de restricción, dando lugar a los plásmidos integrativos pNS1-Km^R, pNS2-Spt^R y pNS3-Spt^R (5). Estos plásmidos fueron la base para la construcción del resto de plásmidos mostrados en la Tabla R.4.3, incorporándose distintas construcciones ya sea mediante enzimas de restricción o usando el *kit NEB Hifi assembly*. Una vez obtenidos los distintos plásmidos integrativos con resistencia a antibiótico incluida y sus derivados, estos se transformaron en *Synechococcus* 11901 (6). Los transformantes se seleccionaron con el antibiótico correspondiente. Debido a la poliploidía de *Synechococcus* 11901, tras una primera selección, parte de los transformantes presentaban alguna copia WT. Para favorecer la segregación del casete de integración en todas las copias cromosómicas, se realizó al menos una reestría en el mismo antibiótico (7). La confirmación de un mutante completamente segregado se confirmó mediante PCR con cebadores que amplificaban fragmentos de diferente tamaño en WT y el mutante.

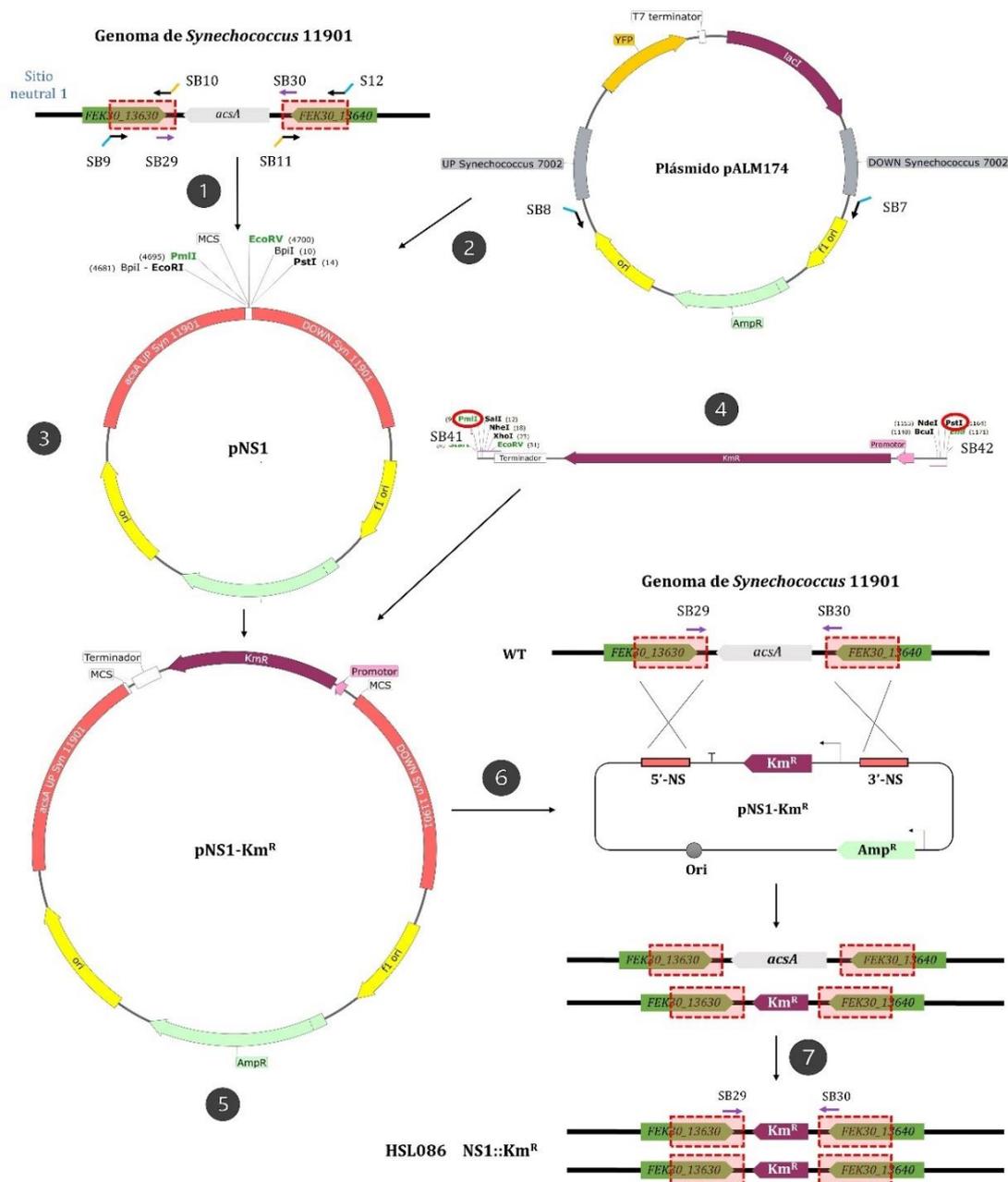


Figura R.4.1. Representación esquemática para la obtención de mutantes vía integración en sitios neutrales del genoma de *Synechococcus* 11901. Se muestra la construcción del mutante HSL086 (NS1::Km^R) en el que se ha insertado un gen de resistencia a kanamicina (Km^R) en el sitio neutral 1, llevando a la delección génica del gen *acsA* en *Synechococcus* 11901. El proceso consta de las siguientes etapas: (1) amplificación mediante PCR de los fragmentos UP y DOWN; (2) amplificación mediante PCR del plásmido en el que se van a incluir los fragmentos UP y DOWN; (3) ensamblaje de los fragmentos UP, DOWN y vector para (3) generar el plásmido pNS1; (4) amplificación de un casete de resistencia a kanamicina y clonaje en pNS1 para (5) generar el plásmido pNS1-Km^R. Este plásmido sirvió de base para generar todos los plásmidos para integrar en el sitio neutral 1 de *Synechococcus* 11901. Posteriormente, (6) transformación natural en *Synechococcus* 11901 para producir la recombinación homóloga y obtener transformantes tras la selección con kanamicina. (7) Pase de colonias a placas con nuevos antibióticos para conseguir la completa segregación de las copias modificadas. Se representan a modo de ejemplo dos copias cromosómicas.

2.4.7. Secuenciación y análisis del ADN

La secuenciación de ADN se llevó a cargo de la empresa Eurofins Genomics. El análisis de secuencias, los mapas de plásmidos y clonajes *in silico* se realizaron con SnapGene (<http://www.snapgene.com/>).

2.5. Técnicas de manipulación de proteínas

2.5.1. Obtención de extractos proteicos de *Synechococcus* 11901

Los extractos proteicos de *Synechococcus* 11901 para la detección de la expresión de TEVp se prepararon a partir de 15 mL de cultivo ($DO_{730nm} \approx 2-3$) en diferentes condiciones de inducción. Los cultivos se centrifugaron, lavaron dos veces con agua y resuspendieron en 500 μ L de tampón de lisis celular (NaCl 136.5 mM, Tris-HCl 45.5 mM, pH 7.5, Triton X-100 al 1%) suplementado con el inhibidor de proteasas PMSF 1 mM. Para la extracción de proteínas solubles, se utilizó el mismo tampón sin Triton X-100. Las muestras se incubaron con 40 μ g/mL de lisozima a 37°C durante 30 min, y luego se agregaron ~ 100 μ L de perlas de vidrio lavadas (425-600 μ m, Sigma-Aldrich). Las células se lisaron agitando en vórtex durante 30 min a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron durante 10 min o 30 min a 13000 rpm 4°C, según se analicen proteínas del extracto total o proteínas solubles, respectivamente. La concentración de proteína total se determinó mediante el método de Bradford (Biorad) empleando una recta patrón elaborada con albúmina de suero bovino (BSA).

2.5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

Las electroforesis analíticas de proteínas se realizaron en geles de poliacrilamida comerciales (*Any kD™ Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels*, Biorad) a temperatura ambiente, en glicina 0.19 M, Tris 25 mM y SDS 0.1%. Las muestras contenían 25 μ g de proteínas y se hirvieron durante 10 min en presencia de tampón de lisis: Tris-HCl 250 mM (pH 6.8); SDS 2%; β -mercaptoetanol 5%; glicerol 10% y azul de bromofenol 0.05%. Se utilizó *SeeBlue Plus2 Pre-stained Protein Standard* (ThermoFisher) como marcador de tamaño molecular.

2.5.3. Transferencia del gel (*westernblot*) e inmunodetección de proteínas

Los geles se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de Amersham Biosciences mediante el sistema *Mini Trans-Blot Cell and Criterion Blotter* (Biorad) durante 1 h a 100V. Previamente, las membranas se equilibraron 30 s en metanol, se hidrataron con agua y finalmente se humedecieron en tampón de transferencia (glicina 0.19 M, Tris 25 mM y metanol 20%). Tras la transferencia se empleó el *kit* de inmunodetección *WesternBreeze Chromogenic Immunodetection anti-mouse* (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante para membranas PVDF. Para la detección de la proteasa TEV, que contaba con una etiqueta myc, se empleó el anticuerpo monoclonal anti-myc (1:5000, M4439, Sigma) (anticuerpo primario).

2.6. Medidas de fluorescencia

La fluorescencia del cultivo se midió transfiriendo 100 μ L de cultivo ajustados a $DO_{730nm} = 0.1$ en placas negro de fondo transparente de 96 pocillos y se midió con un lector Tecan Spark, utilizando filtros de 485/20 y 535/25 nm para excitación y emisión, respectivamente. La fluorescencia relativa se normalizó a DO_{730nm} (Fluorescencia/ DO_{730nm}).

Para la caracterización de los diferentes promotores, se cultivaron triplicados de las diferentes cepas en medio AD7 hasta $DO_{730nm} \approx 1$ y, cuando fue necesario, se indujeron con teofilina y ramnosa, ramnosa o IPTG. La fluorescencia se midió 24 h después de la inducción usando la ganancia óptima del aparato. En todos los experimentos se incluyeron muestras WT y, en el caso de promotores inducibles, cultivos sin inducir.

Para determinar la funcionalidad del sistema TEVp desarrollado y caracterizarlo se emplearon diferentes condiciones de crecimiento para las cepas transformadas, como se detalla a continuación. En primer lugar, para estudiar preliminarmente la funcionalidad del sistema TEVp, se cultivaron triplicados de las diferentes cepas en placas de 24 pocillos en 3 mL de medio AD7 a $DO_{730nm} \approx 1$ y se indujeron con 1 mM de IPTG o 10 g/L de ramnosa. La fluorescencia se midió 24 h después de la inducción y, como controles, también se midieron las mismas cepas sin inductor utilizando una ganancia óptima. Se incluyeron WT (señal de fluorescencia mínima) y la cepa HSL164 (señal de fluorescencia máxima esperada). Posteriormente, para determinar la fuerza de inducción, se utilizaron diferentes concentraciones de IPTG o ramnosa, incluyendo WT y muestras no inducidas. La fluorescencia se midió 24 h después de la inducción utilizando una ganancia óptima. Finalmente, para determinar la reversibilidad del sistema TEVp, se cultivaron dos conjuntos de triplicados de HSL76, HSL141 y HSL165 (cultivos de 10 mL) hasta una $DO_{730nm} \approx 1$ y se indujeron con IPTG 1 mM. Para el tiempo 0 h, incluido el WT, se midió la ganancia óptima y se mantuvo durante el experimento. La fluorescencia se midió cada 4-8 horas, hasta 20-24 horas después de la inducción. Luego, se centrifugó un conjunto de cultivos a 4000 rpm durante 20 min, se lavó dos veces con AD7 y se resuspendió en el mismo volumen de medio, con antibióticos y sin IPTG, para mantener una densidad celular constante. La fluorescencia también se midió cada 4-8 horas.

3. RESULTADOS

Tal como se ha indicado en la introducción de este Capítulo 4, la cianobacteria *Synechococcus* 11901 (Figura R.4.2A) se escogió por su novedad, alta tasa de crecimiento y acumulación de biomasa, y por presentar competencia natural. En cuanto a su crecimiento, han publicado que *Synechococcus* 11901 puede alcanzar tiempos de duplicación de ~2.1-2.4 h a 38°C, 1% de CO₂ y 300-660 μmol fotón/m²·s, incrementándose a ~3.5 h cuando las condiciones de crecimiento son a 30°C, 1% de CO₂ y 300 μmol fotón/m²·s (Material suplementario Włodarczyk *et al.*, 2020). Con el fin de crecer esta cepa con los recursos disponibles en el laboratorio, *Synechococcus* 11901 se cultivó siempre en medio AD7 a 30°C, 1% de CO₂ y 100 μmol fotón/m²·s. En estas condiciones, se obtuvo un tiempo de duplicación de 10.9 h, entrando los cultivos en fase estacionaria aproximadamente a los 4 días (Figura R.4.2B).

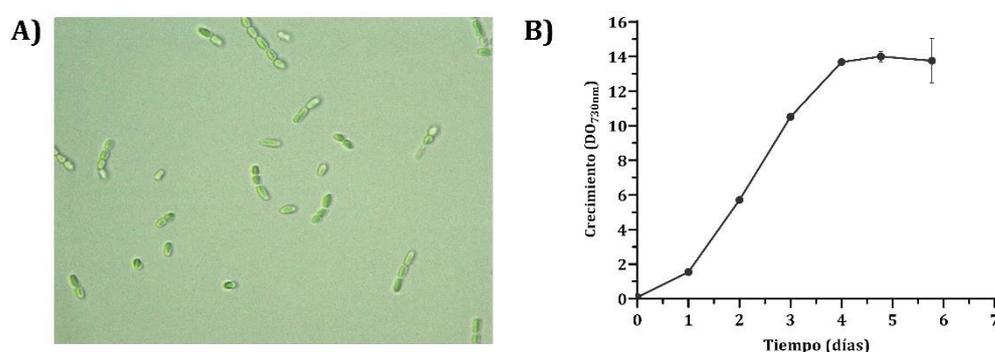


Figura R.4.2. Crecimiento de *Synechococcus* 11901. A) Visualización al microscopio de *Synechococcus* 11901 (100X). B) Curva de crecimiento de *Synechococcus* 11901 en medio AD7. El resultado mostrado corresponde a tres réplicas biológicas.

3.1. Construcción de plásmidos para modificación genética

Es frecuente el uso de plásmidos integrativos en *Synechococcus* spp., para lo cual hay que disponer de sitios en el genoma que permitan la integración sin causar ningún perjuicio a la cianobacteria (Xia *et al.*, 2019; Yadav *et al.*, 2021). Hasta la fecha, se han utilizado dos sitios para la integración en el genoma de *Synechococcus* 11901. En Włodarczyk *et al.*, 2020, las construcciones de ADN de interés se insertaron en el locus *acsA* (FEK30_13635), que ha sido probado previamente en *Synechococcus* 7002 (Begemann *et al.*, 2013), o el locus *psbA2* (que codifica la subunidad D1 de fotosistema II, FEK30_15065). De estos dos, solo el primero podría considerarse un sitio neutral, ya que el segundo sitio requiere de 10 mM glicerol para crecer los transformantes (Włodarczyk *et al.*, 2020). El hecho de contar con un solo sitio de integración neutral es limitante en la modificación genética de esta cepa y hace necesario el localizar nuevos sitios. No obstante, si bien la integración en el genoma es habitual en la modificación genética de cianobacterias con interés industrial, en ocasiones es útil disponer de plásmidos auto-replicativos, ya que permiten la expresión de genes sin tener que alterar el genoma de la cianobacteria. Por este motivo, es necesario desarrollar nuevos plásmidos para la modificación genética de *Synechococcus* 11901.

3.1.1. Uso de plásmidos replicativos

El trabajo de Włodarczyk *et al.*, 2020 no hace referencia al uso de plásmidos replicativos, por lo que en esta tesis se planteó el probar plásmidos replicativos basados en el pSEVA421 (Silva-Rocha *et al.*, 2013) y pPMQAK1-T (Huang *et al.*, 2010). Los plásmidos utilizados, adquiridos de la colección Cyanogate, fueron el pSEVA421-T-LacZ α (ori RK2) y pPMQAK1-T-LacZ α (ori RSF1010) (Vasudevan *et al.*, 2019). Estos plásmidos derivan de vectores en los que se han eliminado los sitios *BsaI* y *BpiI* nativos y se ha incluido un casete de expresión *lacZ* flanqueado por dos sitios *BpiI* (Vasudevan *et al.*, 2019). En el caso del pSEVA421-T-LacZ α no se realizó ninguna modificación (Figura R.4.3. A), mientras que para el pPMQAK1-T, se clonó entre los sitios *BpiI*, el gen *yfp* bajo el promotor J23110 y con el doble terminador B0015, originando el vector pPMQAK1-T-YFP (Figura R.4.3. B). Se utilizó tanto la transformación natural como la conjugación triparental para la transferencia de los plásmidos a *Synechococcus* 11901. No se obtuvieron colonias ni en la transformación natural ni en la conjugación para el pSEVA421-T-LacZ α , mientras que sí hubo transformantes en el caso de pPMQAK1-T-YFP utilizando ambos métodos. No obstante, pese a la aparición de colonias, alrededor de un 75% los clones no crecieron en presencia de antibiótico tras pasarlos a líquido o placa. Por otro lado, no se consiguió ver la presencia del plásmido mediante PCR en ninguno de los clones analizados. Debido a la presencia de *yfp* bajo un promotor constitutivo, se decidió medir la fluorescencia para YFP en un total de 12 clones capaces de crecer en kanamicina, tanto procedentes de la transformación natural como conjugación. Se observó claramente la presencia de dos clones positivos (clon 6 en transformación natural, clon 4 en conjugación); en cambio, el resto eran resistentes a kanamicina y la fluorescencia obtenida era similar o incluso menor que en el WT (Figura R.4.3. C).

De los dos tipos de plásmidos elegidos, ambos orígenes de replicación están descritos en cianobacterias, siendo el RSF1010 el más habitual y de mayor número de copias (Vasudevan *et al.*, 2019). Si bien el ori RK2 no dio transformantes, de las colonias obtenidas en *Synechococcus* 11901 con RSF1010, ya sea por transformación natural o conjugación, se concluyó que la presencia del plásmido pPMQAK1-T-YFP no era estable. Estos resultados de problemas de estabilidad o aparición de poblaciones resistentes sin plásmido se han observado en el laboratorio con el origen de replicación RSF1010 en otras cepas de *Synechococcus*, como *Synechococcus elongatus* 7942 o *Synechococcus* 7002.

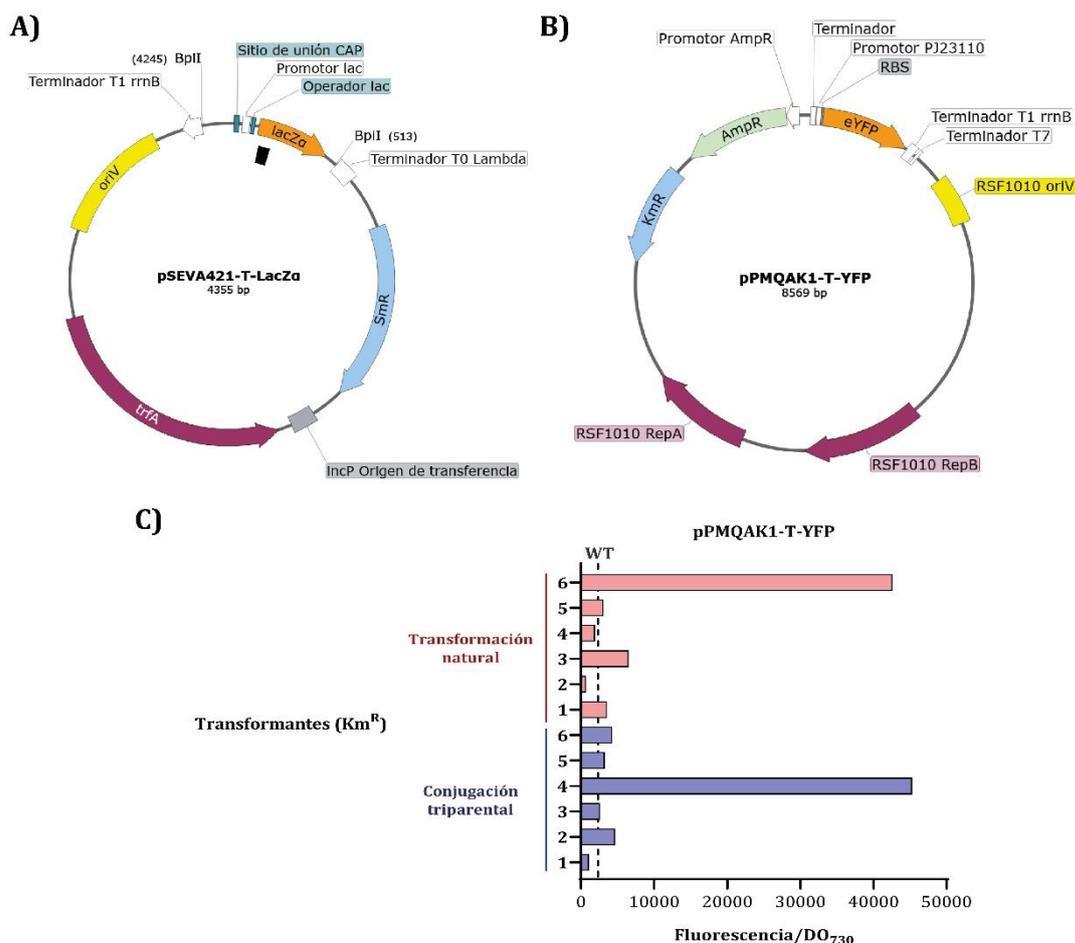


Figura R.4.3. Plásmidos replicativos utilizados en *Synechococcus* 11901. A) Mapa del pSEVA421-T-LacZα (ori RK2). **B)** Mapa del pPMQAK1-T-YFP (ori RSF1010). **C)** Resultados de fluorescencia para YFP de clones resistentes a kanamicina (pPMQAK1-T-YFP). La línea discontinua indica la señal obtenida para el WT.

3.1.2. Búsqueda y comprobación de sitios neutrales

Con el fin de poder seguir trabajando con *Synechococcus* 11901, se decidió optar por buscar sitios neutrales para una integración y expresión estable, como es habitual en otros *Synechococcus* spp. En M. Wang *et al.*, 2019 se describen 51 sitios neutrales potenciales en el cromosoma *Synechococcus* 7002, basados en un refinamiento sistemático de la información genómica y transcriptómica masiva. Entre los 51 sitios candidatos, estos autores detectaron 3 pares de ORFs vecinas sin una función biológica relevante (*SYNPCC7002_RS00135* y *SYNPCC7002_RS00140*, *SYNPCC7002_RS00425* y *SYNPCC7002_RS00430*, *SYNPCC7002_RS11415* y *SYNPCC7002_RS11420*). Para evitar posibles efectos negativos de la integración, los autores probaron como sitio neutral una inserción entre genes hipotéticos en una de estas 3 parejas: *SYNPCC7002_RS00425* y *SYNPCC7002_RS00430* (Tabla R.4.4).

Tabla R.4.4. Genes hipotéticos cercanos a los sitios neutrales en el cromosoma de *Synechococcus* 7002 y 11901.

Sitio neutral, Locus	Longitud (pb)	Producto	ID_Proteína	Referencia	
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002					
ΔacsA	<i>RS09200^a</i>	1218	Proteína transportadora de unión a sustrato ABC	WP_041443542.1	Validado (Begemann <i>et al.</i> , 2013)
	<i>RS09205^a</i>	1965	acetato-CoA ligasa (AcsA)	WP_012307449.1	
	<i>RS09210^a</i>	1350	Proteína hipotética	WP_012307450.1	
	<i>RS00135^a</i>	1353	Proteína que contiene el dominio DUF697	WP_012305668.1	Validado (M. Wang <i>et al.</i> , 2019)
	<i>RS00140^a</i>	441	Proteína hipotética	WP_012305669.1	
	<i>RS11415^a</i>	351	Proteína hipotética	WP_041443605.1	Hipotético (M. Wang <i>et al.</i> , 2019)
	<i>RS11420^a</i>	615	Proteína hipotética	WP_012307902.1	
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 11901					
ΔacsA (NS1^b)	<i>FEK30_13630</i>	1218	Proteína transportadora de unión a sustrato ABC	QCS50377.1	Validado (Włodarczyk <i>et al.</i> , 2020)
	<i>FEK30_13635</i>	1965	acetato-CoA ligasa (AcsA)	QCS50378.1	
	<i>FEK30_13640</i>	1353	Proteína hipotética	QCS50379.1	
NS2	<i>FEK30_04155</i>	1353	Proteína que contiene el dominio DUF697	QCS48691.1	Validado en este trabajo
	<i>FEK30_04160</i>	498	Proteína hipotética	QCS48692.1	
NS3	<i>FEK30_15795</i>	351	Proteína hipotética	QCS50767.1	Validado en este trabajo
	<i>FEK30_15800</i>	615	Proteína hipotética	QCS50768.1	

^a. "SYNPCC7002_" se ha quitado de cada *locus* para facilitar la visualización ^b. Włodarczyk *et al.*, 2020. Bases deletadas 2120, 2607579-2609699.

Puesto que no existían datos de transcriptómica para *Synechococcus* 11901, se realizó una búsqueda en el genoma de esta cianobacteria para dos de las tres parejas de genes (*SYNPCC7002_RS00425* y *SYNPCC7002_RS00430*; *SYNPCC7002_RS11415* y *SYNPCC7002_RS11420*) sin función biológica conocida descritos en M. Wang *et al.*, 2019 e indicados en la Tabla R.4.4. Estas dos parejas de ORFs se encontraron en el genoma de *Synechococcus* 11901 y por tanto se seleccionaron como dos sitios potenciales para la integración. Estos dos sitios consistieron en la región intergénica entre dos parejas de ORFs sin una función desconocida, *FEK30_04155* y *FEK30_04160* y *FEK30_15795* y *FEK30_15800*, identificados a partir de ahora como NS2 y NS3, respectivamente (Figura R.4.4A, Tabla R.4.4). El locus *acsA*, ya empleado en Włodarczyk *et al.*, 2020, se consideró como el sitio neutral NS1.

Para probar la neutralidad de sitios escogidos, se construyeron los vectores pNS2-Spt^R y pNS3-Spt^R que insertan un casete de resistencia a espectinomicina a través de una recombinación homóloga doble (Figura R.4.4B), generando las cepas mutantes NS2::Spt^R y NS3::Spt^R. La delección de *acsA*, previamente validada para *Synechococcus* 11901 (Włodarczyk *et al.*, 2020), se incluyó también en este estudio. La delección de *acsA* genera una resistencia a ácido acrílico, por lo que este compuesto se ha empleado como agente de selección en *Synechococcus* 7002 (Begemann *et al.*, 2013) y *Synechococcus* 11901 (Włodarczyk *et al.*, 2020). En el laboratorio, los ensayos realizados con diferentes concentraciones de ácido acrílico en *Synechococcus* 11901 WT mostraron que, incluso en las concentraciones empleadas en los artículos publicados, existe un pequeño porcentaje del cultivo que acaba siendo resistente a este compuesto de manera espontánea (Figura R.4.4C). Por tanto, a diferencia de los plásmidos utilizados en Włodarczyk *et al.*, 2020, en este trabajo, para este sitio neutral, se insertó un casete que llevaba un gen de resistencia a la kanamicina, generando la cepa mutante NS1::Km^R.

Los resultados de transformación con estos plásmidos integrativos mostraron algunas diferencias en la eficiencia de transformación entre los tres sitios neutrales utilizados: $7.12 \pm 0.45 \times 10^3$ UFC μg^{-1} para NS1, $5.03 \pm 8.26 \times 10^2$ UFC μg^{-1} para NS2 y $1.38 \pm 0.32 \times 10^3$ UFC μg^{-1} para NS3 (utilizando tres réplicas biológicas). En todas las transformaciones, las colonias que se comprobaron contenían el casete de antibiótico y estaban completamente segregadas tras reestriar una vez las colonias en placas con antibiótico nuevo.

Para determinar la neutralidad del sitio potencial, se ensayó el crecimiento del WT y de cada mutante en AD7 con los antibióticos adecuados (Km para NS1 y Spt para NS2 y NS3). A pesar de las diferencias en la eficiencia de transformación, en condiciones de crecimiento estándar, los mutantes no mostraron cambios significativos en el crecimiento entre ellos o en comparación con el WT (Figura R.4.4D). Por tanto, estos resultados confirman que se han identificado dos nuevos sitios de integración en el genoma de *Synechococcus* 11901 sin que haya un efecto negativo en el crecimiento de la cianobacteria.

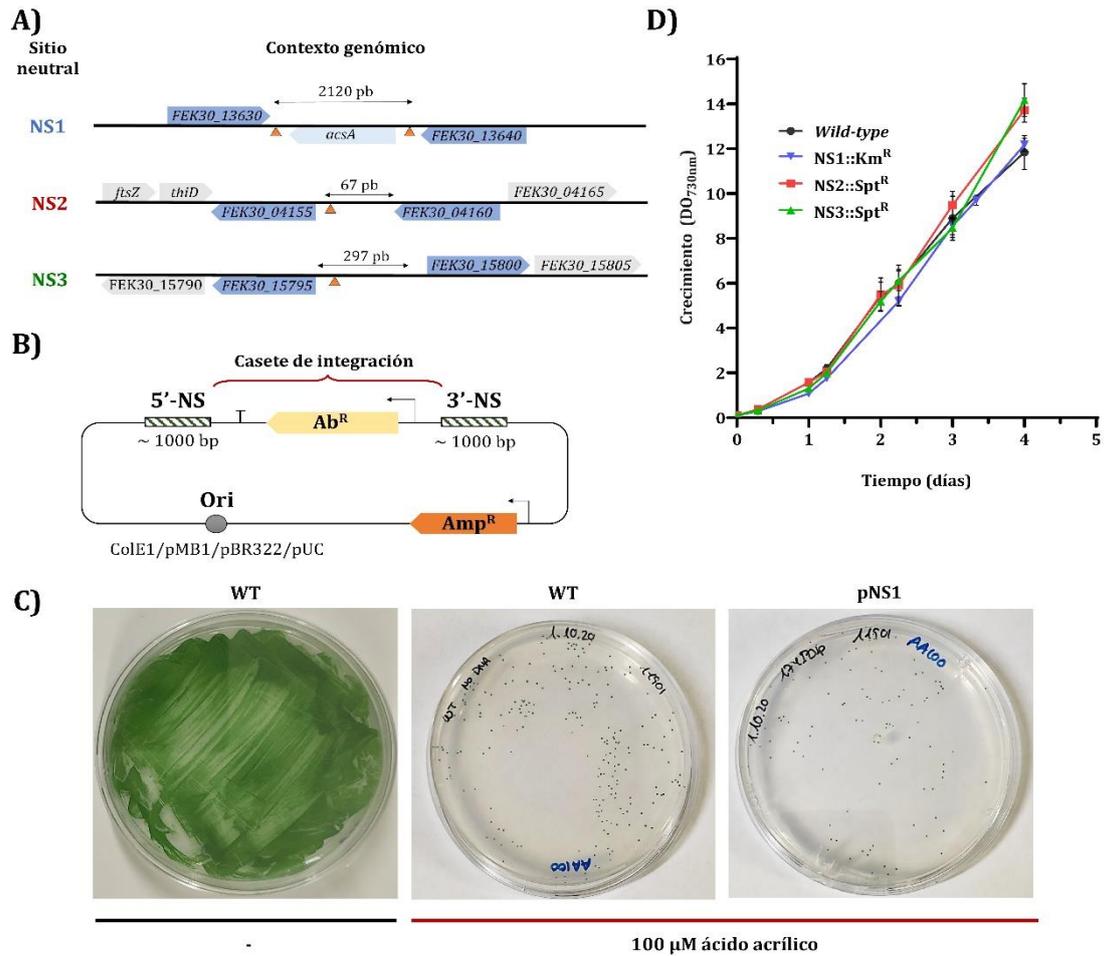


Figura R.4.4. Validación de sitios neutrales para la integración en el genoma de *Synechococcus* 11901. A) Contexto genómico de los sitios neutrales de integración utilizados. En los diferentes sitios un gen de resistencia a antibiótico se insertó entre las regiones flanqueantes (~1000 pb) de los genes representados en azul. El lugar de inserción se indica con triángulos naranjas. Para NS1, se eliminaron 2120 pb mientras que para los otros dos sitios no se eliminó ninguna base. **B)** Representación esquemática de los plásmidos pNS1-Km^R, pNS2-Spt^R y pNS3-Spt^R utilizados para la transformación natural y la recombinación homóloga en el cromosoma de *Synechococcus* 11901. Se indica el casete que se integra en el genoma de la cianobacteria. Ab^R hace referencia al casete de resistencia a antibiótico empleado. **C)** Uso de ácido acrílico como agente de selección sobre *Synechococcus* 11901 WT y transformado con el plásmido pNS1 para deletar *acsA*. **D)** Efecto de la integración de una resistencia a antibiótico en el crecimiento de *Synechococcus* 11901. Se muestran las curvas de crecimiento para cepas WT y mutantes en presencia de antibióticos apropiados. La gráfica presenta el promedio de tres réplicas biológicas junto con la desviación estándar. Más información de los sitios de integración en Tabla R.4.4.

3.2. Prueba de promotores

Una vez encontrados diferentes sitios de integración neutros en el genoma, con el objetivo de disponer de herramientas moleculares con las que poder controlar la expresión en esta cianobacteria, se ensayaron diferentes promotores comprobando la expresión de la proteína fluorescente amarilla (YFP). Se probaron dos promotores constitutivos incluidos en el trabajo de Markley *et al.*, 2015, utilizados en *Synechococcus* 7002. Los promotores fueron el P_{c223} (fuerte) y el promotor P_{J23110} (débil) (Figura R.4.5A), que se insertaron en el sitio NS2. Como se puede observar en la Figura R.4.5B, el promotor P_{J23110} da una señal ~5 veces menor que el

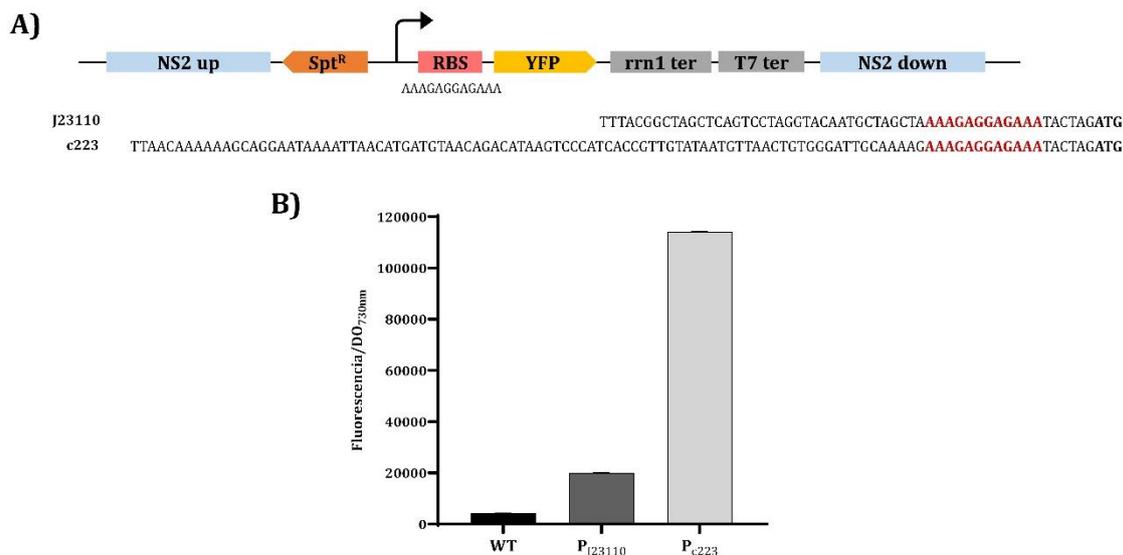


Figura R.4.5. Prueba de promotores constitutivos en *Synechococcus* 11901. **A)** Estructura de los promotores constitutivos utilizados. Se indican en los extremos las regiones UP (*upstream*) y DOWN (*downstream*) del genoma entre las que se ha producido la integración. **B)** Fluorescencia de la YFP expresada con cada promotor. La gráfica presenta el promedio de tres réplicas biológicas junto con la desviación estándar.

promotor P_{c223}.

Por otro lado, en ocasiones es útil controlar la expresión con el tiempo, por lo que también se probaron promotores inducibles en esta cianobacteria. Los promotores cLac94 y cLac143 inducibles por IPTG se han ensayado en *Synechococcus* 7002 y el segundo también en *Synechococcus* 11901 (Markley *et al.*, 2015; Włodarczyk *et al.*, 2020). Entre ambos promotores, la diferencia es de solo dos nucleótidos en la región que se encuentra entre los dos operadores (Figura R.4.6A). Por otro lado, se probaron otros dos promotores diferentes inducibles por ramnosa, los cuales han sido utilizados y validados en *Synechocystis* 6803 (Figura R.4.8A), el P_{rha} (Behle *et al.*, 2020) y el P_{rhaRSW} (Liu *et al.*, 2020). La diferencia entre ambas versiones de promotor es que en el P_{rhaRSW} presenta un *riboswitch* sensible a teofilina (Liu *et al.*, 2020). En condiciones normales, sin teofilina, el *riboswitch* incluido forma una horquilla en el ARN transcrito que “esconde” el RBS, impidiendo la traducción de la proteína. Cuando se añade teofilina, la horquilla se reordena de tal manera que el RBS queda libre (Figura R.4.8B). Por tanto, este promotor presenta dos elementos de control, la ramnosa a nivel de transcripción y la teofilina, a nivel de traducción. Se comprobó previamente que la ramnosa no afectaba al

crecimiento de *Synechococcus* 11901 (datos no mostrados). En cambio, al igual que ocurre en *Synechocystis* 6803, se ha observado que la teofilina parece ser un poco tóxica en altas concentraciones (Figura R.4.8C).

El gen *yfp* bajo el control de cada promotor junto con los factores de regulación (*LacI* y *RhaS*,

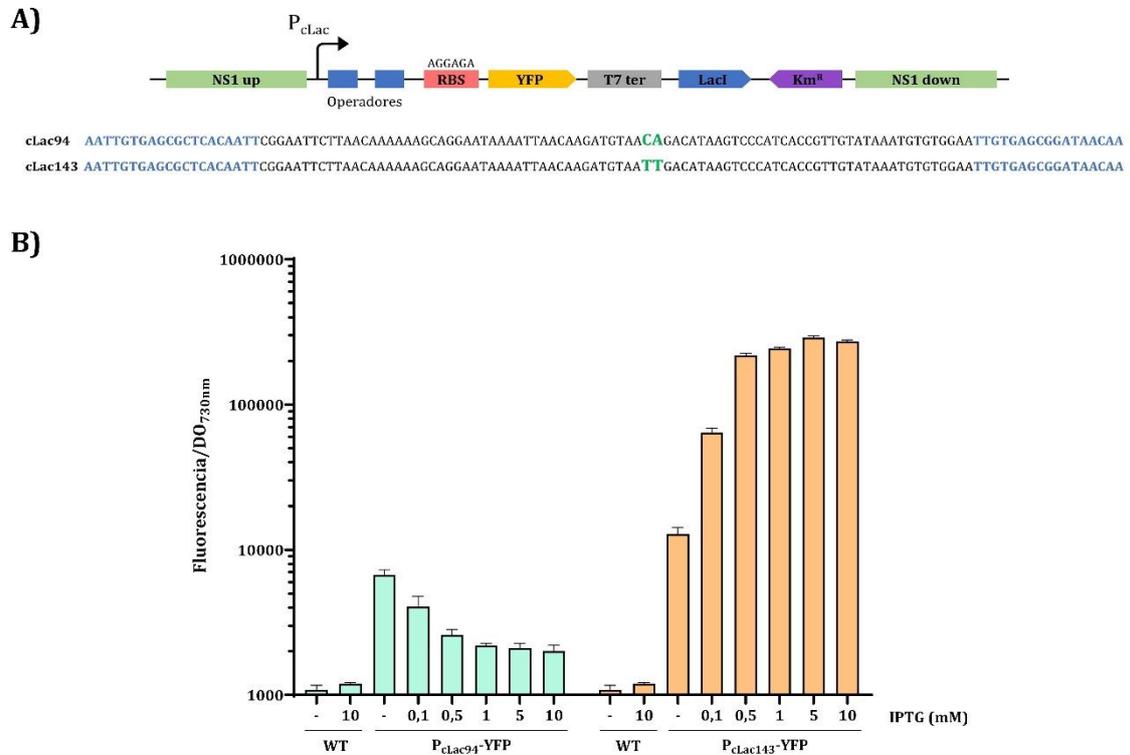


Figura R.4.6. Promotores inducibles por IPTG probados en *Synechococcus* 11901. A) Estructura de los promotores cLac94 y cLac143. Se indican en los extremos las regiones UP (*upstream*) y DOWN (*downstream*) del genoma entre las que se ha producido la integración. B) Funcionamiento de los promotores inducibles 24 h después de añadir IPTG. La gráfica presenta el promedio de tres réplicas biológicas junto con la desviación estándar.

dependiendo del promotor) se integraron en el sitio NS1. Para las distintas construcciones, se cuantificó la fluorescencia 24 horas después de la inducción con distintas concentraciones de inductor. En el caso de los promotores cLac, solo el promotor cLac143 resultó ser funcional en *Synechococcus* 11901 (Figura R.4.6B). Por otro lado, en el caso de los promotores inducibles por ramnosa, solo el P_{Rha} mostró ser inducible en esta cepa (Figura R.4.8D). El promotor de ramnosa con el *riboswitch* presentaba de partida una fluorescencia basal; sin embargo, la adición de ramnosa y teofilina no se tradujo en un aumento de la expresión basal de YFP (Figura R.4.8E).

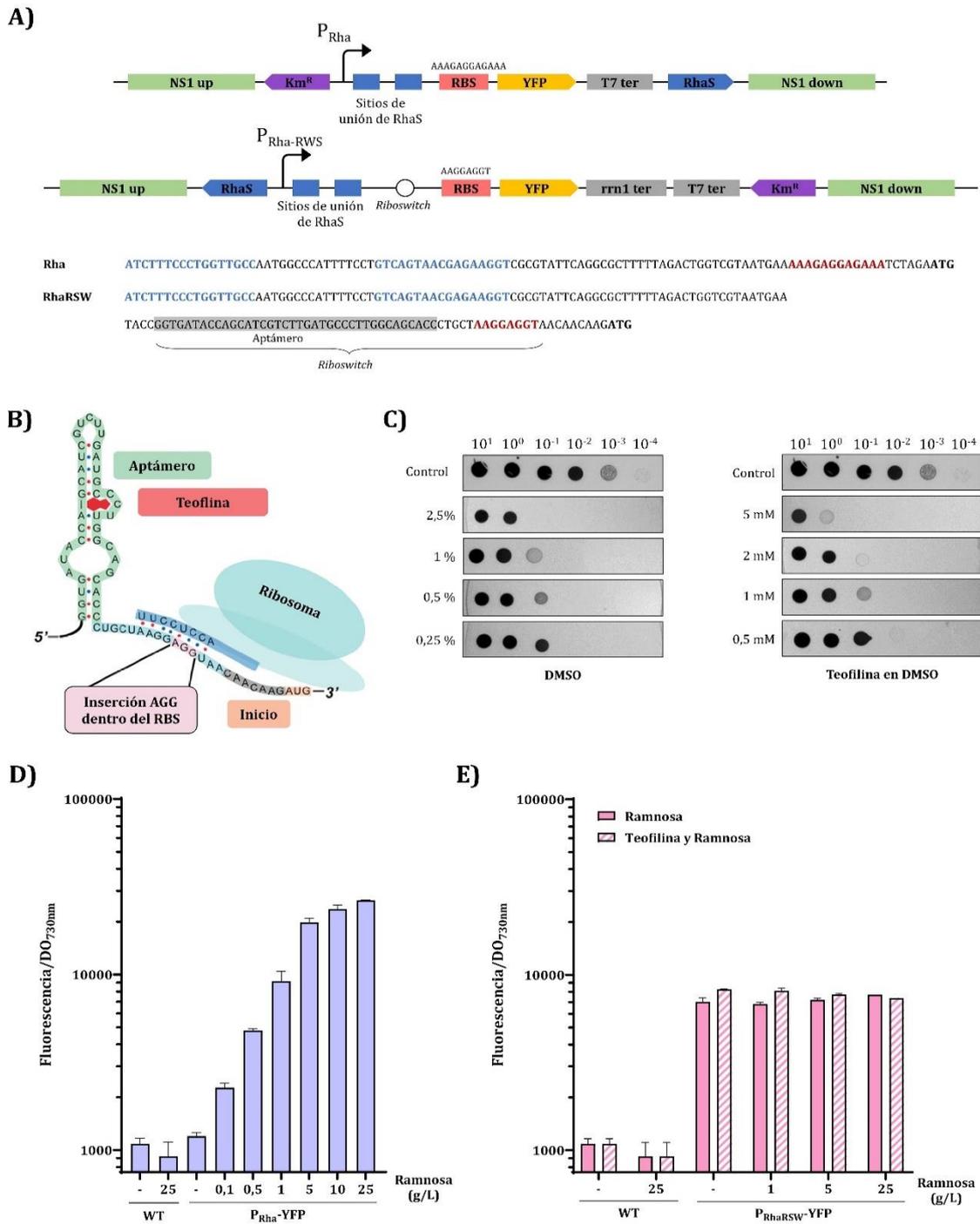


Figura R.4.7. Promotores inducibles por ramnosa probados en *Synechococcus* 11901. A) Estructura de los promotores inducibles utilizados. Se indican en los extremos las regiones UP (upstream) y DOWN (downstream) del genoma entre las que se ha producido la integración. **B)** Estructura del riboswitch en el promotor quimérico P_{RhaRSW}. Figura adaptada de **Topp et al., 2010**. **C)** Efecto de la teofilina en el crecimiento de *Synechococcus* 11901. Se muestran diluciones seriadas de *Synechococcus* 11901 en placas con diferentes concentraciones de DMSO y teofilina. La teofilina se prepara en DMSO 100%. **D)** Funcionamiento del promotor RhaS, 24 h después de añadir ramnosa. **E)** Funcionamiento del promotor Rha-RSW, 24 h después de añadir ramnosa o ramnosa y teofilina. Los resultados de las gráficas D y E presentan el promedio de tres réplicas biológicas junto con la desviación estándar.

Con fines comparativos, en la Figura R.4.8. se recopila la expresión obtenida para todos los promotores que probaron ser funcionales *Synechococcus* 11901, midiéndose la fluorescencia con los mismos parámetros. Tanto para $P_{cLac143}$ y P_{Rha} , los niveles de fluorescencia aumentaron hasta ~21 veces (inducción máxima) en comparación con los valores obtenidos en células de control no inducidas. No obstante, la inducción obtenida para $P_{cLac143}$ fue más fuerte que para P_{Rha} incluso a la concentración más baja de IPTG, obteniéndose un valor de fluorescencia máximo para P_{Rha} de ~26400 (ramnosa 25 g/L) frente a ~64300 de fluorescencia para $P_{cLac143}$ con 0.1 mM de IPTG. En cuanto a la expresión basal de estos promotores, el $P_{cLac143}$ demostró tener bastante fuga, mientras que el control sin inducir para P_{Rha} tenía niveles de fluorescencia de YFP similares a los valores en la WT (~1200 para P_{Rha} sin inducir frente a ~1080 del WT). Por otro lado, en lo que se refiere a los promotores constitutivos, el P_{c223} produjo casi los mismos niveles de expresión de YFP que la máxima inducción de P_{Rha} , obteniéndose valores de ~30000 y ~26400 respectivamente, aunque las construcciones se encontrasen en diferentes loci del genoma (Figura R.4.8.).

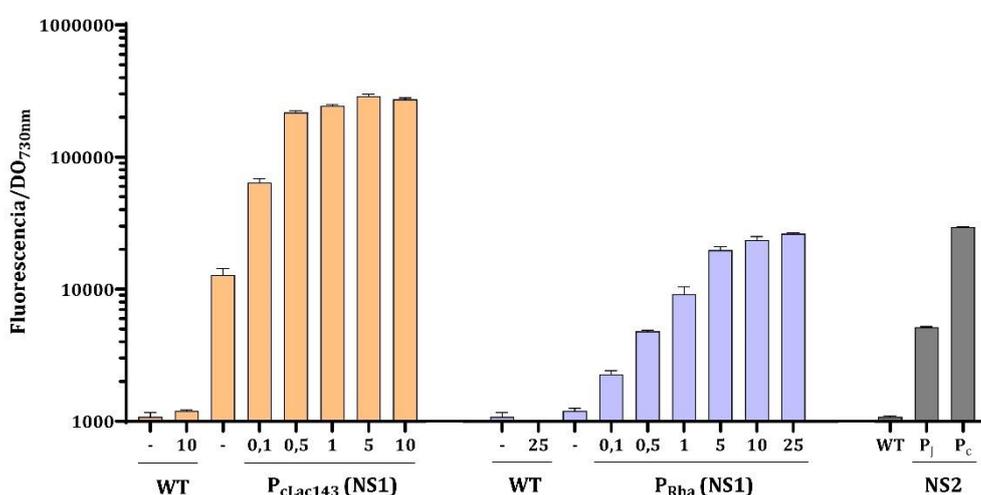


Figura R.4.8. Comparación de fuerza de varios promotores en *Synechococcus* 11901. Para los promotores inducibles, el gráfico muestra la fluorescencia/DO_{730nm} 24 horas después de la adición del inductor. Para $P_{cLac143}$, el inductor es IPTG (mM), para P_{Rha} , el inductor es ramnosa (g/L). Los promotores constitutivos se muestran en gris, PJ: PJ₂₃₁₁₀, Pc: Pc₂₂₃. Todas las muestras se midieron al mismo tiempo y en las mismas condiciones. Nota: los promotores constitutivos están en un sitio neutral diferente. La gráfica presenta el promedio de tres réplicas biológicas junto con la desviación estándar.

3.2.1. Efecto del sitio neutral de integración en la expresión de YFP

Si bien se ha comprobado que los dos promotores constitutivos y varios de los promotores inducibles funcionaron, es posible que la expresión pudiera no ser comparable ya que no se integraron en el mismo lugar del genoma. Aunque los resultados de crecimiento con el casete de resistencia a antibiótico no mostraron diferencias entre los distintos sitios neutrales (Figura R.4.4C), para una mayor caracterización de los sitios de integración se insertó todo el casete de expresión (promotor, *yfp* y gen de resistencia a antibiótico) de P_{c223} y $P_{cLac143}$ en los otros dos sitios neutrales respectivos. Para cada cepa se midió de nuevo la fluorescencia; en el caso de $P_{cLac143}$ 24 horas después de añadir 1 mM de IPTG (Figura R.4.9).

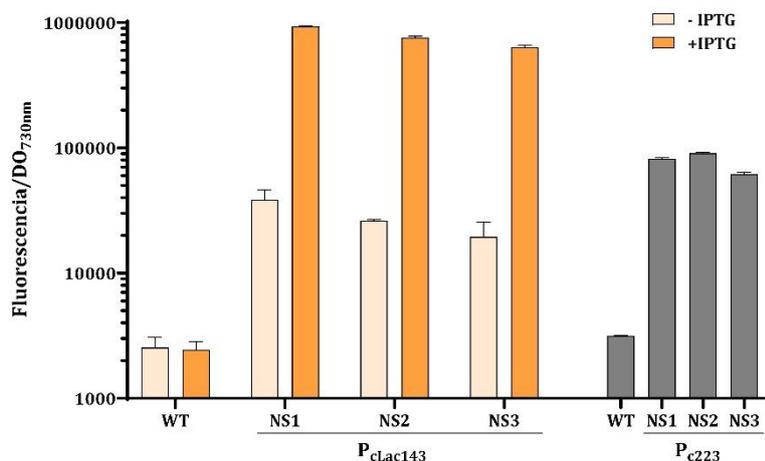


Figura R.4.9. Caracterización de promotores en diferentes sitios neutrales. Los gráficos muestran la fluorescencia/ DO_{730nm} 24 horas después de la adición del inductor (cuando fue necesario). Los resultados muestran el promedio de tres réplicas biológicas junto con la desviación estándar.

Tal como se muestra en la Figura R.4.9, la expresión fue mayor en NS1 en comparación con los otros dos sitios para el promotor $cLac143$, obteniéndose valores de ~ 930000 para NS1, ~ 763000 para NS2 y ~ 636000 para NS3 24 h después de añadir IPTG. El efecto entre los sitios neutrales NS1 y NS2 fue menos para el promotor P_{c223} , obteniéndose para NS1 ~ 81500 , para NS2 ~ 90000 y para NS3 ~ 62000 de unidades relativas de fluorescencia.

3.3. Desarrollo de un sistema de interferencia de proteínas

Además de las herramientas que permiten el control de la expresión génica, se buscó desarrollar un sistema de control de la expresión a través de la degradación de proteínas. Para ello, se diseñó y probó un sistema ortogonal de degradación inducible y dirigida de proteínas en *Synechococcus* 11901.

3.3.1. Construcción del sistema TEVp en *Synechococcus* 11901

En el sistema de degradación de proteínas planteado en este trabajo se combina la proteasa específica de grabado de tabaco (TEVp) con el proteasoma bacteriano para degradar proteínas de una manera controlada tras la exposición de un deegrón en el N-terminal de la proteína de interés (Figura R.4.10). Para conseguirlo, se añade una etiqueta sintética antes del gen que codifica para la proteína diana. Esta etiqueta incluye la secuencia de reconocimiento de la proteasa TEV (ENLYFQX, en donde X denota cualquier aminoácido excepto prolina) fusionada con un N-degrón (posición X), que puede ser reconocido y degradado por los componentes del proteasoma de cianobacterias. Esta configuración hace que el N-degrón sea inaccesible para las proteasas celulares constitutivas hasta que se exprese la proteasa TEV. En presencia de TEVp, la proteasa escinde parte de la etiqueta, después del aminoácido Q y antes del primer aminoácido del N-degrón, exponiendo la proteína a una degradación rápida por parte del sistema proteasómico y suprimiendo la actividad de la proteína (Figura R.4.10). Aunque a lo largo de esta tesis se va a hacer referencia al uso de la proteasa TEV (sistema TEVp) para la degradación de proteínas de manera dirigida, es importante señalar que la proteasa no participa en la degradación en sí misma, sino que solo hace que las proteínas estén accesibles para el reconocimiento por el proteasoma cianobacteriano. Para demostrar la funcionalidad de este sistema en la cianobacteria *Synechococcus* 11901, se probó la degradación dirigida y controlada de YFP.

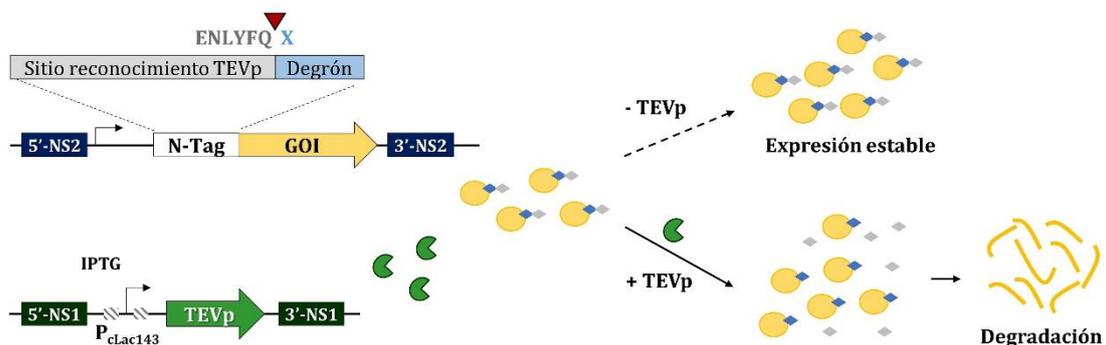


Figura R.4.10. Sistema TEVp de degradación inducida y dirigida de proteínas en *Synechococcus* 11901. Se representa el funcionamiento del sistema TEVp. Se añade una etiqueta (N-Tag) que incluye la secuencia de reconocimiento de TEV y un N-degrón antes del gen que codifica para la proteína diana (GOI, gen de interés). Solo tras la inducción de la proteasa TEV (se indican los sitios de reconocimiento y escisión), el N-degron se expone al proteasoma bacteriano y, por lo tanto, conduce a una degradación de la proteína. NS: sitio neutral

Primero se diseñó e integró en el sitio neutral 2 un casete con el gen *yfp* y diferentes etiquetas fusionadas a la región que codifica el N-terminal bajo el promotor constitutivo P_{J23110} (Markley *et al.*, 2015) (Figura R.4.11A). Como control, se construyó una cepa con el gen *yfp* sin etiquetar. Se observó una reducción de la fluorescencia cuando se añadieron las etiquetas al gen (Figura R.4.11B), obteniéndose un 50% del control en el FR-degrón (FRFVQ) y una expresión que estaba cerca de la señal de fondo del WT para el YA-degrón (YAFVQ). Esta reducción de la fluorescencia no solo se observa en *Synechococcus* 11901, sino también en *E. coli* (Figura R.4.11C).

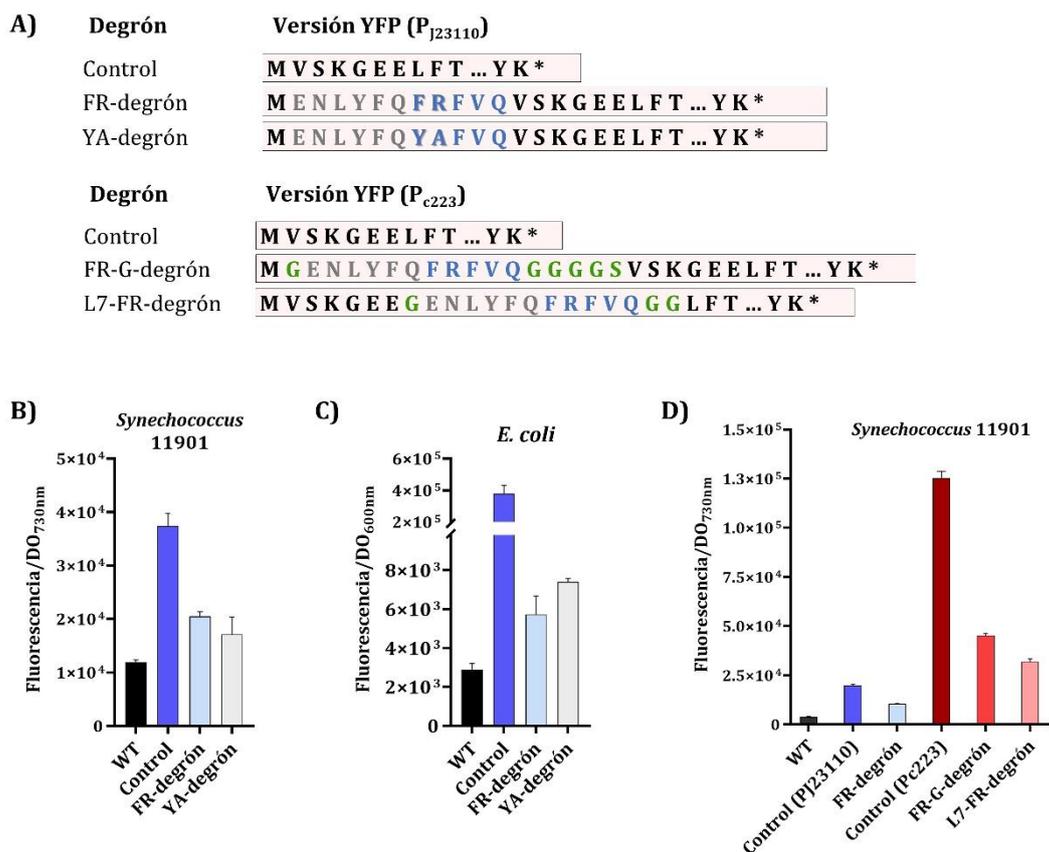


Figura R.4.11. Versiones de YFP con diferentes etiquetas utilizadas. **A)** Etiquetas utilizadas en YFP expresada con P_{J23110} **B)** Fluorescencia de YFP en diferentes cepas de *Synechococcus* 11901. Se utilizó WT como control negativo. **C)** Fluorescencia de YFP de los plásmidos que expresan las diferentes versiones de YFP en *E. coli*. Se utilizó como control negativo *E. coli* que alberga el plásmido vacío. **D)** Comparación de fluorescencia de YFP entre las diferentes versiones de YFP utilizando el degrón FRFVQ. En A y C, la versión original de YFP se muestra en negro, el sitio de reconocimiento TEVp ENLYFQ en gris, los degrones en azul y los aminoácidos adicionales en verde. En el caso de las medidas de fluorescencia, los resultados muestran el promedio de tres réplicas biológicas junto con la desviación estándar.

En un intento por aumentar los niveles de fluorescencia detectados, se cambiaron varios componentes del sistema usando FRFVQ como N-degrón. Se pensó mejorar la expresión de YFP reemplazando el promotor P_{J23110} por el promotor P_{c223} , que en los ensayos de promotores mostró ser más fuerte (Figura R.4.5). Además, pensando que la reducción de la fluorescencia podía deberse a la localización de los N-degrones utilizados, se construyeron nuevas cepas con la etiqueta a más distancia del N terminal, añadiendo un *linker* de varios aminoácidos (FR-G degrón y L7-FR degrón) (Figura R.4.11A). El cambio del promotor para la expresión de YFP mostró un aumento de la fluorescencia, sin embargo, la presencia de la etiqueta también redujo la señal de fluorescencia en comparación con la cepa sin degrón, incluso con un efecto mayor (Figura R.4.11D). A raíz de estos resultados, se decidió continuar con las versiones mostradas en la Figura R.4.11E para probar la degradación mediada por TEVp.

Por otro lado, se integró la proteasa TEV bajo los promotores inducibles cLac143 o Rha en el sitio NS1. Para que el sistema diseñado pueda considerarse ortogonal, la expresión de la proteasa debe ser estricta. Si bien se había visto previamente que el promotor cLac143 tenía fugas sin añadir IPTG (Figura R.4.6B), se escogió también por ser más fuerte que P_{Rha} . La inducción de TEVp con ambos promotores se intentó verificar mediante *westernblot* 24 horas después de inducir con 1 mM o 10 g/L de ramnosa. No obstante, los resultados obtenidos no fueron concluyentes, debido a la aparición de bandas inespecíficas muy cercanas al tamaño esperado para TEVp (datos no mostrados). Por otro lado, en Martínez *et al.*, 2017 añadieron la etiqueta Male para favorecer la solubilidad de TEVp en *E. coli*. No obstante, cuando se intentó añadir esta etiqueta en este trabajo, no se consiguieron clones con plásmidos con la secuencia correcta. Otros trabajos han mostrado que esta proteína tiende a formar agregados, por lo que consideramos que quizá un promotor débil no sería suficiente para superar este problema (Martínez *et al.*, 2017). Por estos motivos, se decidió evaluar la funcionalidad del sistema TEVp con ambos promotores y se construyeron mutantes dobles que expresaban la proteasa TEVp con los promotores P_{Rha} o $P_{cLac143}$, y las diferentes versiones de la YFP (con y sin etiqueta y distintas etiquetas).

Para realizar una validación preliminar del sistema TEVp en *Synechococcus* 11901, se midió la fluorescencia de la YFP 24 h después de la inducción de TEVp usando IPTG 1 mM para $P_{cLac143}$ (Figura R.4.12) o 20 g/L de ramnosa para P_{Rha} (Figura R.4.13). Aunque se usaron promotores con diferente fuerza y escape, el sistema TEVp disminuyó los niveles de fluorescencia cuando se indujo con cualquiera de los promotores. Como se observa en la Figura R.4.12, cuando la proteasa se expresaba bajo el $P_{cLac143}$, la fluorescencia disminuyó en todas las cepas con el degrón en YFP y la presencia de TEVp inducida (cuadros discontinuos). En cambio, para las cepas con YFP sin etiqueta (N) la fluorescencia no cambió al integrarse la TEVp o al inducirla. En cuanto a la funcionalidad del sistema, se observaron diferencias en función del degrón considerado, obteniéndose la mayor reducción, del 86% para la etiqueta FR-G. Para las otras dos versiones de YFP, la reducción de fluorescencia fue similar, llegando a valores del 24-28% de la señal de fluorescencia de los controles no inducidos.

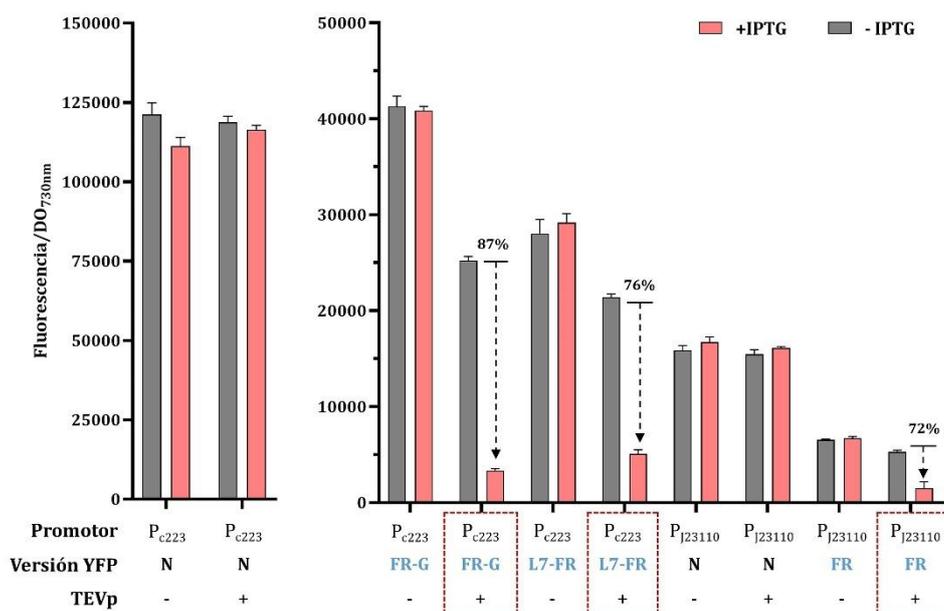


Figura R.4.12. Funcionalidad del sistema TEVp en la degradación controlada de YFP en *Synechococcus* 11901. Los resultados corresponden a las 24 h posteriores a la inducción de TEVp con IPTG 1 mM. Las medidas de fluorescencia muestran el promedio de tres réplicas biológicas junto con la desviación estándar. Se señala el promotor utilizado para expresar *yfp*. La proteasa TEVp se expresa bajo el promotor P_{clac143}. La versión de etiqueta con degrón empleada en cada caso se indica en cada caso, siguiendo la nomenclatura indicada en la Figura 10 y siendo N la ausencia de etiqueta (control). También se muestra si la cepa empleada en cada caso presenta la TEVp o no (insertada en su genoma).

Por otro lado, si bien se apreció una disminución de la fluorescencia cuando se expresó la TEVp bajo el promotor Rha (Figura R.4.13), está no alcanzó los niveles de represión observados para el P_{clac143} en el sistema TEVp. Así, empleándose la mayor concentración de ramnosa para inducir TEVp, solo se consiguió una reducción de fluorescencia del 41% frente al control sin inducir. No obstante, para ambos promotores se observó el mismo efecto, la reducción de la señal de YFP al integrar la TEVp, aunque esta no se hubiera inducido. Esta disminución varió en función de la etiqueta empleada y también del promotor para expresar la TEVp. A raíz de los resultados mostrados en las Figura R.4.11y Figura R.4.12, se escogió el sistema TEVp inducido por P_{clac143} para una mayor caracterización.

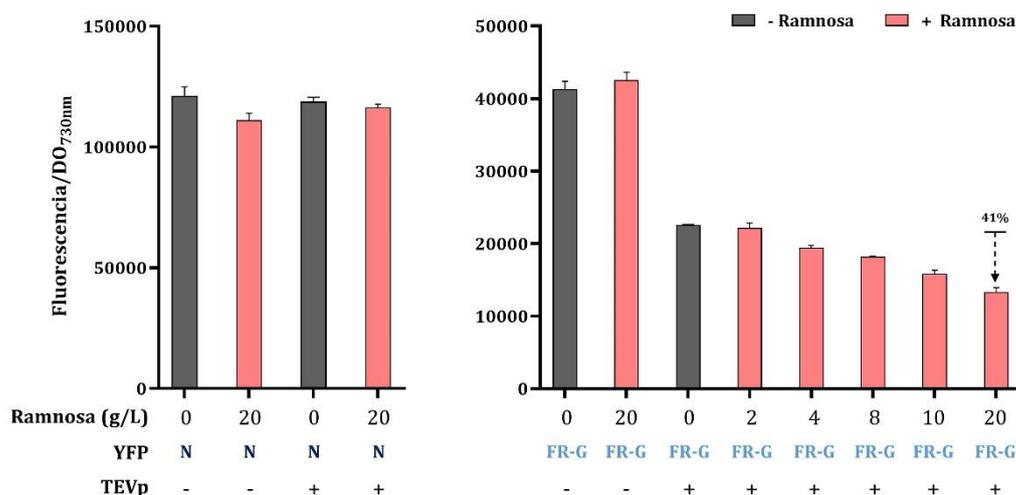


Figura R.4.13. Degradación de YFP con diferentes concentraciones de ramnosa en *Synechococcus* 11901. Se evaluó la funcionalidad del sistema TEV en la cepa con la TEVp bajo el promotor de ramnosa (P_{Rha}) y la YFP con el degrón FR-G (HSL258). Como control, se empleó la versión de YFP sin etiqueta (N). Se indica si la cepa empleada en cada caso presenta la TEVp o no (insertada en su genoma). Los resultados corresponden a las 24 h posteriores a la inducción de TEVp con distintas concentraciones de ramnosa. Las medidas de fluorescencia muestran el promedio de tres réplicas biológicas junto con la desviación estándar.

3.3.2. Caracterización del sistema de degradación

Una vez comprobado el funcionamiento del sistema de degradación de proteínas, se determinó la fuerza de inducción de TEVp para la degradación de YFP probando diferentes concentraciones de IPTG y midiendo la fluorescencia 24 h después de la inducción (Figura R.4.14A). Con las muestras no inducidas normalizadas al valor de 100%, se pudo determinar que la represión de la fluorescencia de YFP fue del ~ 91% para el FR-G degrón y del ~ 78% para el L7-FR degrón cuando TEVp estaba completamente inducida. Estos resultados sugieren que la expresión de TEVp a 1 mM de IPTG es suficiente para reprimir la fluorescencia de YFP.

Por otro lado, también se determinó la escala de tiempo necesaria para la degradación de YFP al inducir el TEVp con 1 mM de IPTG (Figura R.4.14B). El nivel máximo de represión se observó ~ 8 horas después de la inducción en la cepa HSL141 (FR-G degrón) pero necesitó más tiempo en la cepa HSL165 (L7-FR degrón), que alcanzó la represión más alta ~ 24 horas después de la adición de IPTG. En paralelo a este ensayo, se comprobó la reversibilidad de la represión y la escala de tiempo necesaria para recuperar la señal de fluorescencia YFP original. Tras 24h de la inducción del sistema TEVp, en algunos se retiró el IPTG. La fluorescencia se midió a lo largo del tiempo y, como se muestra en la Figura R.4.14B, la represión es reversible. Con respecto a la escala de tiempo, se observa la recuperación completa solo en uno de los degrades, mientras que para el FR-G no se llega a recuperar los niveles iniciales de fluorescencia después de la eliminación de IPTG (Figura R.4.14A, líneas discontinuas).

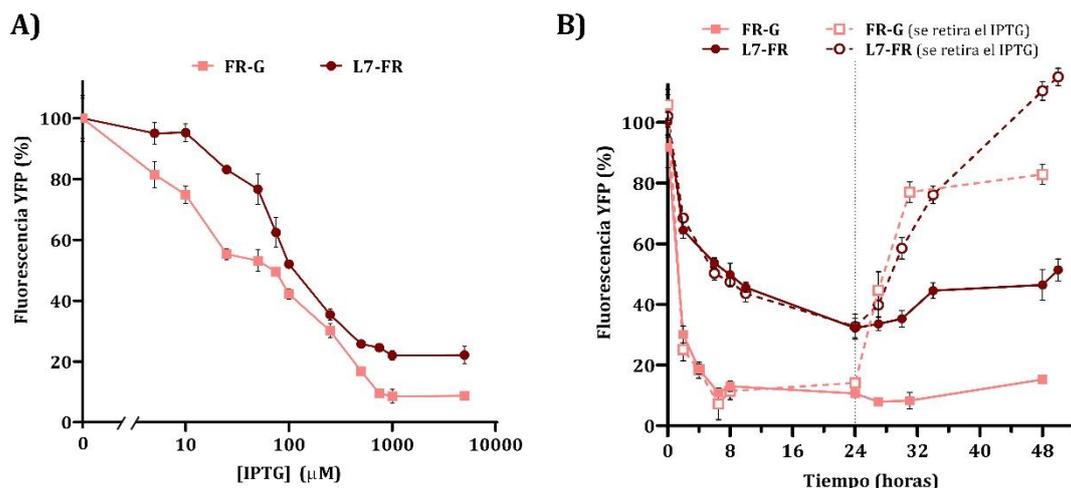


Figura R.4.14. Caracterización del sistema TEVp en *Synechococcus* 11901. **A)** Titulación de la degradación de YFP con concentraciones crecientes de IPTG. Los resultados corresponden a las 24 h posteriores a la inducción. **B)** Escala de tiempo y reversibilidad de la degradación de YFP. A tiempo 0h se añadió a todos los cultivos IPTG 1 mM y se midió la fluorescencia durante 24 h. La línea vertical punteada muestra el momento en que se eliminó el IPTG en un conjunto de cultivos. Para A y B, los experimentos se realizaron por triplicado y se muestran los promedios, empleando la muestra no inducida normalizada al 100%. Las barras de error muestran la desviación estándar.

En resumen, en este Capítulo 4 se han desarrollado herramientas moleculares en la cianobacteria de rápido crecimiento *Synechococcus* 11901. Se han identificado dos nuevos sitios neutrales para la integración estable en el genoma de esta cianobacteria y se han evaluado diferentes promotores constitutivos e inducibles para expresión heteróloga. Además, se ha desarrollado un sistema de degradación inducible y dirigida de proteínas que se ha ensayado y caracterizado empleando la YFP como proteína diana. Todas las herramientas desarrolladas en este estudio proporcionan la base para futuras aplicaciones biotecnológicas usando *Synechococcus* 11901 como chasis cianobacteriano y abre la puerta a aplicarla en otros posibles chasis similares.

VI. Discusión

El uso de cianobacterias a nivel biotecnológico supone una gran ventaja en cuanto a recursos ilimitados y gratuitos pues estos microorganismos tienen la capacidad de crecer empleando solo la luz y el CO₂ como fuente de energía y de carbono. No obstante, además las cianobacterias son un recurso clave en el cambio hacia una economía circular, sostenible y compatible con el medio ambiente pues ayudan a reducir las emisiones de CO₂ producidas como consecuencia de la obtención industrial de ciertos compuestos. Por otro lado, presentan una gran variedad de aplicaciones que permiten la obtención de productos de valor añadido, tanto por compuestos que pueden aislarse de ellas, así como también por la propia biomasa, que puede emplearse p.e en la producción de combustibles. No obstante, la cantidad de herramientas moleculares en estas bacterias es limitado en comparación con otros microorganismos como *E. coli* o levaduras (Behler *et al.*, 2018; Santos-Merino *et al.*, 2019; Xia *et al.*, 2019), lo que restringe en parte su estudio y sus aplicaciones. Como se ha descrito en esta Tesis Doctoral, las cianobacterias presentan diferentes condiciones de crecimiento y pueden tener diferente interés biotecnológico. Por ejemplo, las cepas de *Choococidiopsis* sp. aisladas y caracterizadas en el Capítulo 1 son relevantes en estudios sobre mecanismos de resistencia a estrés por desecación y radiación, mientras que *A. platensis* (Capítulo 2) se utiliza, entre otras cosas, en alimentación, en el tratamiento de aguas residuales y en el aislamiento de compuestos de valor en biomedicina y cosmética. Por otro lado, *Synechocystis* 6803 (Capítulo 3) y *Synechococcus* 11901 (Capítulo 4) son cianobacterias que se emplean como chasis para la producción de compuestos de gran relevancia a nivel industrial como L-lactato, bioetanol o ácidos grasos, entre otros. *Anabaena* 7120, empleada en el Capítulo 3 de esta Tesis Doctoral, es una cianobacteria modelo tanto en la fijación de nitrógeno como en la formación de células especializadas, aunque también se ha llegado a estudiar con fines industriales.

En este contexto, el estudio de cianobacterias para definir mecanismos fisiológicos o el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas pasa en muchas ocasiones por la transformación genética de las cepas de interés. La investigación realizada en esta Tesis Doctoral incrementa las herramientas disponibles para cianobacterias, dejando atrás el uso exclusivo de cepas consideradas modelo. De este modo, a lo largo de este trabajo de investigación se han buscado tanto nuevas cepas de cianobacterias extremófilas como se ha profundizado en protocolos de transformación genética y herramientas moleculares en diferentes cianobacterias.

1. AMPLIANDO EL PORFOLIO DE CIANOBACTERIAS

Una de las estrategias para la mejora de las aplicaciones de las cianobacterias implica el aislamiento y estudio de nuevas cepas. Por otro lado, desde el punto de vista industrial el cultivo de extremófilos tiene ciertas ventajas sobre el cultivo de no extremófilos. Una de ellas es que el empleo de ciertas condiciones un poco más extremas, de temperatura, sal o pH puede reducir el riesgo de contaminaciones (Forján *et al.*, 2015).

1.1. Diversidad de cianobacterias cultivables procedentes de un panel solar

Los resultados obtenidos en el Capítulo 1 muestran que a nivel de cianobacterias/microalgas, un panel solar representa un nicho ecológico similar a un desierto, pues soporta una intensa radiación solar, altas temperaturas y largos períodos de desecación y esto se refleja a nivel microbiano. Este resultado fue descrito primero por Dorado-Morales *et al.*, 2016. Los porcentajes de cianobacterias observados en otros trabajos en paneles solares (a nivel metagenómico) mostraron un rango de entre 0.8 y 3.44% de cianobacterias. Este bajo porcentaje de cianobacterias encontrado en los paneles solares contrasta con el 30-60% de cianobacterias claramente dominante en algunas comunidades microbianas en el subsuelo continental profundo (Puente-Sánchez *et al.*, 2018). No obstante, se ha señalado que la abundancia de cianobacterias es menor en ciertos ecosistemas como las costras biológicas de suelo (BSC, *biological soil crusts*), ya que las cianobacterias podrían actuar como colonizadores pioneros y estimular la proliferación de otros microorganismos heterótrofos (Muñoz-Martin *et al.*, 2019; J. Wang *et al.*, 2020). En J. Wang *et al.*, 2020, el consorcio formado por las cianobacterias *Microcoleus vaginatus*, *Wilmottia* spp. y otras de los géneros *Mastigocladopsis* y *Chroococcidiopsis* mostraron ser los microorganismos pioneros centrales en la formación de BSCs en dos desiertos templados (Desierto de Tengger, China y Desierto de Karakum, Turkmenistán). En estas comunidades microbianas, las cianobacterias desempeñan un papel esencial debido a su capacidad para realizar la fotosíntesis, fijar el nitrógeno atmosférico y producir polisacáridos extracelulares (Muñoz-Martín *et al.*, 2019; Puente-Sánchez *et al.*, 2018). Este mismo esquema de comunidad podría estar presente en el panel solar.

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral proporciona información sobre las cianobacterias cultivables de un panel solar de una ciudad mediterránea. Las cianobacterias aisladas pertenecen a los órdenes *Chroococcidiopsidales* y *Synechococcales*, que comprende diferentes géneros (*Leptolyngbya*, *Oculatella* y *Myxocorys*). Estos órdenes también están representados en otros sitios considerados extremos como un desierto frío de alta montaña (Pamir Oriental; Tayikistán) (Khomutovska *et al.*, 2020). Por otro lado, Muñoz-Martín *et al.*, 2019 analizó muestras procedentes de BSCs de diferentes partes de España y observó que tenían proporciones diferentes de cianobacterias, correlacionándose, por ejemplo, una mayor presencia de *Chroococcidiopsis* con mayor temperatura y menor precipitación o de *Leptolyngbya* en condiciones de mayor salinidad y menor temperatura (Muñoz-Martín *et al.*, 2019).

Además, aunque no fueron caracterizadas en esta Tesis Doctoral, del panel solar también se aislaron dos microalgas, *Coelastrella* sp. D14 y *Diplosphaera chodati* B7. Ambos géneros son frecuentes en ambientes extremos o se han encontrado de los mismos, cepas extremotolerantes. Así, se ha descrito la microalga *Coelastrella thermophila* como una especie termotolerante, distribuida en rocas húmedas y en superficies de cemento (Nayana *et al.*, 2022) y la especie *Diplosphaera chodati* es común en ambientes terrestres como bosques (Medwed *et al.*, 2021).

1.2. Caracterización de *Chroococidiopsis* sp.

En esta Tesis Doctoral, el interés de aislar microorganismos en un panel solar buscaba caracterizar nuevas cepas de cianobacterias extremófilas y desarrollar herramientas biotecnológicas en estas. Debido a una mayor facilidad de manejo, se escogieron las cepas *Chroococidiopsis* sp. B11, B13, B14 y B15 (Capítulo 1). En línea con otros trabajos publicados, estas cianobacterias crecen con concentraciones de NaCl moderadas (0.1-0.25 M de NaCl), a pH moderado (7.5) y a temperaturas entre los 20-40°C. En general, un pH neutro es óptimo para el crecimiento muchas cianobacterias (Prasanna, 2007; Temraleeva *et al.*, 2016) y, de hecho, todas las cepas Helios crecen mejor a un pH de 7.5. Solo *Chroococidiopsis* sp. B13 toleró un pH de 9.0 en medio líquido. Otras cianobacterias, como *Leptolyngbya* sp., parecen resistir pHs más altos (Taton *et al.*, 2012) y de hecho en este trabajo se creció con éxito *Leptolyngbya* sp. UTEX1 en un medio de cultivo que presenta un pH de 9.5.

Por otra parte, en cuanto a temperatura, si bien se ha observado que *Chroococidiopsis* sp. Helios no crece a temperaturas superiores a 40°C (Capítulo 1; Figura R.1.7), la temperatura reportada en paneles solares es superior a las ensayadas. No obstante, debido a las condiciones a las que está sometido un panel solar, probablemente en este, las cianobacterias se encontrasen en desecación. Para otras cepas del género se ha observado una mayor resistencia a temperatura en desecación. De hecho, los microorganismos, incluyendo cepas del género *Chroococidiopsis*, que pueden deshidratarse antes de estar expuestos a las condiciones presentes en ambientes áridos extremos, resisten mejor ya que minimizan el daño térmico asociado a radiación (Cockell *et al.*, 2017).

Otro aspecto que puede ser de interés en biotecnología es la capacidad de crecimiento en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno. Las cepas *Chroococidiopsis* sp. B11 y B13 crecieron de manera similar en presencia de NaNO₃ y urea (Capítulo 1, Figura R.1.8). Para la cepa B14, la urea no reemplaza la fuente de nitrógeno original, pero no es tóxica para la cianobacteria (Capítulo 1; Figura R.1.9). El uso de urea como fuente de nitrógeno se ha estudiado también con *Chroococidiopsis* sp. obteniéndose el mismo crecimiento que para NaNO₃ (Montero-Lobato *et al.*, 2020). En Taton *et al.*, 2012, la presencia de urea y NaNO₃ permitió el crecimiento de la cianobacteria *Leptolyngbya* sp. BL0902 pero no de *Arthrospira maxima* (Taton *et al.*, 2012). El crecimiento de cianobacterias con urea parece depender en gran medida de la cepa empleada; no obstante, para las cepas donde es posible el uso o tolerancia de este compuesto se abre la posibilidad de emplear por ejemplo aguas residuales o aguas basadas en fertilizantes agrícolas, en los que la urea y el nitrato están presentes, para el crecimiento de estas cianobacterias a mayor escala (Montero-Lobato *et al.*, 2020).

1.3. Potencial biotecnológico *Chroococcidiopsis* sp. Helios

En el Capítulo 1 de esta Tesis se describió que *Chroococcidiopsis* sp. Helios son resistentes a dosis de UV-C elevadas, así como a desecación prolongada de hasta 1 año. Como se mencionó en la Introducción, *Chroococcidiopsis* spp. puede ser una fuente valiosa de compuestos con fines farmacéuticos pues como mecanismo de supervivencia frente a ciertas condiciones propias de su hábitat sintetizan compuestos bioactivos. Una de las características del panel solar es una elevada exposición a radiación. La radiación UV-C es la más importante de cara aplicación en astrobiología, por lo que se decidió ensayar la resistencia a exposición con UV-C en medio líquido empleándose como controles *E. coli* y *S. elongatus* 7942 (Capítulo 1, Figura R.1.13). La radiación de UV-C descrita para reducir el 90% de la viabilidad (F_{10}) en estas bacterias es de 50 y 400 J/m², respectivamente (Baque *et al.*, 2013). En este trabajo se han obtenido valores de F_{10} similares a los descritos, mientras que los resultados para *Chroococcidiopsis* sp. Helios demostraron que en las condiciones empleadas resisten dosis más altas que *E. coli* y *S. elongatus* 7942. No obstante, para *Chroococcidiopsis* sp. Helios no se pudo obtener el valor F_{10} , pues siempre estuvieron por encima del 10% de viabilidad. En otra cepa del género *Chroococcidiopsis*, CCMEE 029, este valor es de 300 J/m², por lo que los aislados caracterizados presentan mejor resistencia que dicha cepa (Baque *et al.*, 2013). Cabe indicar que, otras bacterias procedentes del panel solar, como *Kocuria rosea*, *Microbacterium paraoxydans*, *Pseudomonas psychrotolerans* también mostraron una resistencia radiación UV-C bastante superior a *E. coli* (Dorado-Morales *et al.*, 2016).

En relación con esta resistencia, *Chroococcidiopsis* sp. y cepas similares producen un compuesto denominado escitonemina generalmente frente a exposición a UV-B (Billi, 2009; Casero *et al.*, 2021; X. Gao *et al.*, 2021). Además, también se ha observado una mayor acumulación de escitonemina en *Chroococcidiopsis* sp. frente a otros estreses y en ausencia de exposición a UV, como estrés osmótico (Dillon *et al.*, 2002) o desecación (Fleming y Castenholz, 2007). Si bien son necesarios estudios bioquímicos para validar la producción de este pigmento, el clúster completo necesario para la síntesis de este compuesto se ha encontrado en todas las *Chroococcidiopsis* sp. Helios (Capítulo 1, Figura R.1.16).

Por otra parte, en el Capítulo 1 se evaluó la resistencia a desecación de *Chroococcidiopsis* sp. Helios. En varios trabajos se ha estudiado la resistencia a desecación en *Chroococcidiopsis*, mostrándose diferencias entre cepas (Billi, 2009; Fagiarone *et al.*, 2017). No obstante, no existe un método estandarizado para medir la tolerancia a la desecación y las condiciones mantenidas durante este estado son variables, por lo que una comparación entre diferentes publicaciones y microorganismos es compleja (Greffé y Michiels, 2020; Singh, 2018). Las cuatro cepas caracterizadas en este trabajo fueron sometidas a desecación hasta 1 año utilizando el protocolo descrito en Katoh *et al.*, 2003, por lo que los resultados obtenidos sugieren que las cepas de Helios podrían ser un buen modelo para estudiar el proceso de desecación. En paralelo, otras bacterias descritas de la misma muestra de panel solar, como *Exiguobacterium* sp. Helios han mostrado también ser resistentes a desecación (Castillo-López *et al.*, 2021). Una de las aplicaciones derivadas de esta resistencia de *Chroococcidiopsis* sp. Helios, podría ser el uso de cianobacterias desecadas o semidesecadas como fertilizantes (Greffé y Michiels, 2020), ya que se ha reportado que varias cepas de *Chroococcidiopsis* sp. producen compuestos como auxinas y citoquinas que promueven el crecimiento vegetal (Hussain y Hasnain, 2011).

Otro de los mecanismos relacionados con la resistencia a desecación es la acumulación de trehalosa en condiciones de escasez de agua. Este mecanismo es habitual en microorganismos resistentes a este estrés, aunque no es el único, y ha sido descrito en *Chroococcidiopsis* sp. CCME 029 (Fagliarone *et al.*, 2020). Las cepas *Chroococcidiopsis* sp. Helios, que presentan resistencia a desecación, cuentan en su genoma con los genes implicados en la síntesis de trehalosa descritos para la cepa CCME 029, por lo que potencialmente podrían acumular trehalosa como un mecanismo protector. Este compuesto es relevante biotecnológicamente porque se emplea como ingrediente en alimentación, como hidratante en cosméticos y como protector de compuestos biológicos y órganos para trasplantes (X. Cai *et al.*, 2018; Ohtake y Wang, 2011). La producción de este azúcar podría llevarse a cabo a partir de luz y CO₂ en *Chroococcidiopsis* spp. con limitación de agua, frente a alternativas actuales que emplean microorganismos heterótrofos como *Rhizobium* spp. y *Arthrobacter* spp. o la síntesis química (X. Cai *et al.*, 2018). De hecho, recientemente se ha desarrollado una cepa de *S. elongatus* 7942 recombinante para la producción fotosintética de trehalosa (Qiao *et al.*, 2020).

Finalmente, otra respuesta crucial en la adaptación de cianobacterias de ambientes extremos es la producción de envolturas ricas en exopolisacáridos (EPS), que proporcionan un ambiente húmedo y permite que haya actividad fotosintética en estas condiciones (Casero *et al.*, 2021; Derikvand *et al.*, 2017; S. Wu *et al.*, 2021). Parte de los carbohidratos se acumula en las cianobacterias en forma de EPS, según la especie y las condiciones de cultivo; y algunos de ellos, han mostrado cierta actividad antiinflamatoria o antibiótica (Moscovici, 2015). Excepto *Chroococcidiopsis* sp. B11, las cepas Helios fueron capaces de formar biopelículas y en cuanto a la proporción de carbohidratos producidos por estas, se obtuvieron valores de ~11% para B11, B13 y B14 y del ~6% para B15 (Capítulo 1, Figura R.1.10). No obstante, Montero-Lobato *et al.*, 2020, describieron una cepa de *Chroococcidiopsis* sp. que dio valores de en torno al 45% de carbohidratos (Montero-Lobato *et al.*, 2020). Esta diferencia pudo ser debida al crecimiento de dicha cianobacteria con mayor agitación (500 rpm) que la empleada en esta Tesis (150 rpm), así como el uso de otro medio de cultivo diferente y una atmósfera enriquecida en CO₂ de 2.5% (v/v) (Montero-Lobato *et al.*, 2020). Los resultados obtenidos con *Chroococcidiopsis* sp. Helios se encuentran dentro de los determinados para diferentes cianobacterias, como *Spirulina maxima* y *Synechococcus* (13-16% peso seco, Becker, 2004) o *Synechocystis* 6803 (10% peso seco, Patel *et al.*, 2018). Evaluar la bioactividad potencial del EPS producido por *Chroococcidiopsis* sp. Helios y las mejores condiciones de producción requerirá de más investigación.

1.4. Velocidad de crecimiento y acumulación de biomasa en cianobacterias

Pese al potencial de las *Chroococcidiopsis* sp. aisladas, cabe indicar que su velocidad de crecimiento difiere en gran medida de otras cianobacterias de uso industrial también empleadas en esta Tesis Doctoral. Si bien para muchas cepas de uso industrial los tiempos de duplicación son del orden de horas, en *Chroococcidiopsis* spp. son del orden de días. Si bien un panel solar es buen nicho para aislar cianobacterias con propiedades más extremas, en los últimos años se ha reportado el aislamiento de cepas de crecimiento rápido en ambientes acuáticos. Un ejemplo reciente es la cianobacteria *Synechococcus* 11901, estudiada en el Capítulo 4. Si bien este género no presenta gran resistencia a estrés, el interés de esta cepa en concreto radica en que su velocidad de crecimiento y la acumulación de biomasa es superior a otras cianobacterias de uso actual (Włodarczyk *et al.*, 2020). *Synechococcus* 11901 tiene gran potencial biotecnológico debido a una tasa de crecimiento rápida (2.1-3.8 h). En esta Tesis Doctoral, incluso en condiciones de luz y temperatura menos óptimas a las descritas en Włodarczyk *et al.*, 2020, el tiempo de duplicación de *Synechococcus* 11901 fue de 10.9 h (Capítulo 4, Figura R.4.1), que sigue siendo inferior a otras cianobacterias de uso industrial como *Synechocystis* 6803 con 12 h (Heidorn *et al.*, 2011) o *Synechococcus elongatus* 7942 con 12-24 h (Berla *et al.*, 2013).

Otra cianobacteria de uso extendido, estudiada también en esta Tesis Doctoral, es *A. platensis* (Capítulo 2). Esta cianobacteria acumula grandes cantidades de biomasa y tiene crecimientos relativamente rápidos, y además, su producción se ha mejorado a nivel industrial variando parámetros como la fuente de nitrógeno, presencia de otras fuentes de carbono (crecimiento mixotrófico) o el uso de aguas residuales para su cultivo (Furmaniak *et al.*, 2017; Hena *et al.*, 2018). En G. Choi *et al.*, 2008, utilizaron la cepa *A. platensis* PCC 9108 (la misma que en esta Tesis Doctoral), e incrementaron la producción de ácido gamma linoleico mediante crecimiento mixotrófico con glucosa. Por otro lado, en Andreeva *et al.*, 2021 obtuvieron un mejor crecimiento y acumulación de biomasa de la cepa *A. platensis* Gormont con maltosa, frente a un crecimiento exclusivamente fototrófico (Andreeva *et al.*, 2021). Estas estrategias podrían evaluarse para mejorar el crecimiento de *Chroococcidiopsis* sp. Helios que ha mostrado la capacidad de crecer heterotróficamente con sacarosa y maltosa.

Además de la velocidad de crecimiento, alternativas como la obtención de biomasa a partir del crecimiento de cianobacterias en agua de mar puede ser deseable a nivel industrial. En promedio, el NaCl representa alrededor del 73% de las sales en el agua de mar, lo que corresponde a 437.5 mM (2.6%) (Cumbers y Rothschild, 2014). En lo que respecta a medios salinos, *Synechococcus* crece adecuadamente en el medio AD7, el cual presenta 1.8% de NaCl. No obstante, los medios empleados para *Chroococcidiopsis* sp. o *A. platensis* no son salinos, pues el BG11 no lleva NaCl y el UTEX presenta un 0.1%. Por este motivo, tanto *Chroococcidiopsis* sp. Helios como *A. platensis* 9108 requieren un paso previo de adaptación a cierta concentración de sal. El cultivo directo (sin adaptación) de estas cianobacterias en concentraciones mayores de NaCl que la presente en el medio tuvo efectos diferentes. Si bien *A. platensis* disminuía su crecimiento a concentraciones de 0.5 M (~3%) de NaCl (Capítulo 2, Figura R.2.4), en la mayor parte de las *Chroococcidiopsis* sp. Helios no se observaba crecimiento por encima de 0.25 M (~1.5%) (Capítulo 1, Figura R.1.5).

La técnica de la evolución adaptativa en laboratorio (ALE) ha permitido obtener mutantes de *Synechocystis* sp. o *Anabaena* sp. resistentes a concentraciones de NaCl superiores a las empleadas en los medios de cultivo habitual (Cui *et al.*, 2020). En Swapnil y Rai, 2018, crecieron *Anabaena fertilissima* desde 100 mM de NaCl, incrementando 50 mM de NaCl cada semana hasta los 500 mM. Esta concentración de sal era letal para *A. fertilissima* en condiciones normales, pero no en los cultivos adaptados, lo mismo que se observó en esta Tesis Doctoral con *A. platensis* 9108 a 1 M de NaCl (Capítulo 2, Figura R.2.4).

Además de la posibilidad en sí de utilizar el agua de mar para el crecimiento de *A. platensis* 9108, en otras cepas el uso de concentraciones mayores de NaCl ha tenido otras implicaciones industriales (Pade y Hagemann, 2014). En C. Liu *et al.*, 2016 estudiaron el crecimiento de dos cepas diferentes de *Spirulina* en concentraciones crecientes de NaCl y el efecto de esta sal en la producción de antioxidantes y obtuvieron que, aunque las dos cepas crecían de manera similar al control, en 600 mM de NaCl producían concentraciones mayores de caroteno, ficocianina y polisacáridos (C. Liu *et al.*, 2016). De igual manera, Sharma *et al.*, 2014 describen que la modificación de diversos parámetros de cultivo como cambios en el pH o NaHCO₃ y también una mayor cantidad de NaCl en el medio, incrementa la producción de ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina (Herrmann y Gehringer, 2019; Sharma *et al.*, 2014). El crecimiento en agua de mar también podría tener otras implicaciones en *Chroococcidiopsis* sp. En *Chroococcidiopsis thermalis* PCC 7203 se ha observado que la capacidad fotosintética se mantiene pese a un incremento de la salinidad del medio y una reducción en la tasa de crecimiento (Herrmann y Gehringer, 2019). Por otra parte, en Dillon *et al.*, 2002 mostraron que el estrés osmótico producido por esta sal redujo el crecimiento, pero indujo la síntesis de escitonemina en ausencia de irradiación UV-A en *Chroococcidiopsis* sp. M88-VD (1) (Dillon *et al.*, 2002).

En general, el desarrollo de productos basados en cianobacterias procedentes de ambientes extremos como *Chroococcidiopsis* sp. aún debe superar desafíos técnicos y económicos. No obstante, el conocimiento generado en este género está creciendo recientemente debido al extraordinario potencial biotecnológico de estos microorganismos extremófilos, pese a sus bajas tasas de crecimiento.

2. MEJORA GENÉTICA DE CIANOBACTERIAS

Una de las principales limitaciones del uso de algunas especies de cianobacterias de manera más extendida es la falta de protocolos para la modificación genética. Es por ello, que gran parte de las herramientas moleculares se limita a algunas cepas. Dada la importancia biotecnológica de las diferentes cianobacterias empleadas en esta Tesis Doctoral, se desarrollaron protocolos y herramientas de modificación genética para ellas.

2.1. Transformabilidad de las cianobacterias

Como se ha recogido en el Capítulo 3, para *Synechocystis* 6803, *Anabaena* 7120 y las cepas de *Chroococcidiopsis* sp. Helios, la conjugación es un método eficiente de transformación. No obstante, en *Synechocystis* 6803 las condiciones de transformación mediante competencia

natural y electroporación se conocen y permiten buenos resultados de transformación, tal como indican otros autores (Ferreira *et al.*, 2018). Por otro lado, para *Synechococcus* 11901 (Capítulo 4) tanto la conjugación triparental como la competencia natural permitieron obtener transformantes, si bien por sencillez se empleó la transformación natural.

En lo que se refiere a los plásmidos empleados, en el Capítulo 3 se ha demostrado que los vectores pSEVA pueden utilizarse en la transformación de varios géneros de cianobacterias. Si bien al comienzo de esta Tesis Doctoral no existían publicaciones con el uso de plásmidos pSEVA en cianobacterias, en Ferreira *et al.*, 2018 mostraron que *Synechocystis* 6803 podía admitir plásmidos con origen RSF1010 de la colección SEVA. Este resultado se ha observado también en el laboratorio, pues se consiguió transformar pSEVA351 mediante los tres métodos de transformación (Capítulo 3, Figura R.3.2). En cambio, el ori RK2 no funcionó en *Synechocystis* 6803 por ninguno de los métodos de transformación mencionados, a diferencia de lo que se presenta en Vasudevan *et al.*, 2019. Esto puede ser debido por la evolución que acaban sufriendo las cepas con el tiempo en el laboratorio. De hecho, se han observado diferencias en motilidad, tamaño celular y en el espectro de absorción entre distintas subcepas de *Synechocystis* 6803 (Morris *et al.*, 2017) (Tabla D.1). Por otro lado, como la mayoría de las herramientas genéticas descritas para cianobacterias se enfocan frecuentemente en *Synechococcus* o *Synechocystis* (F. Wang *et al.*, 2020), los vectores SEVA descritos en este trabajo pueden ampliar las aplicaciones potenciales para otras cepas. De hecho, en el caso de *Anabaena* y *Chroococcidiopsis* sp., no hay trabajos publicados de transformación de estas cianobacterias hasta el momento con vectores pSEVA (Tabla D.1).

Tabla D.1. Resumen de los orígenes de replicación de plásmidos funcionales en las cianobacterias utilizadas en esta Tesis Doctoral.

Cianobacteria	Orígenes de replicación			
	RK2	pBBR1	pRO1600/ColE1	RSF1010
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	-	-	-	+
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	-	-	-	+
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. Helios	+	+	+	+
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 11901	-	-	-	nc
<i>Arthrospira platensis</i> PCC 9108	-	-	-	-

+ funcional; - no replicativo; nc no concluyente por problemas de estabilidad

Si bien *Chroococcidiopsis* no es un género destacado como chasis biotecnológico, es interesante por ser extremófilo. El estudio de los mecanismos de resistencia de este género puede potenciarse al disponer de plásmidos para su transformación. Un plásmido con el replicón pDU1 de *Nostoc* sp. PCC 7524 se transfirió con éxito a 3 de 5 cepas de *Chroococcidiopsis* sp. mediante conjugación y/o electroporación (Billi *et al.*, 2001). En este trabajo, se ha observado que las cepas Helios se pueden transformar fácilmente mediante conjugación triparental. Por otro lado, se observaron diferencias entre las cianobacterias escogidas, así en este trabajo solo funcionó el ori RSF1010 en *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120, mientras que las cepas Helios se transformaron con los cuatro replicones probados, ampliando de este modo los orígenes de replicación que se encuentran disponibles para este género (Capítulo 3, Figura R.3.4; y Tabla D.1).

En cuanto a la cianobacteria *Synechococcus* 11901, en el Capítulo 4 se emplearon también plásmidos con ori RK2 y RSF1010 para la transformación. En algunas especies y cepas de este género, el ori RSF1010 parece ser compatible; por ejemplo, un plásmido derivado del pPMQAK1 (RSF1010) se ha empleado con éxito en *Synechococcus elongatus* UTEX 2973 (Yu *et al.*, 2015). En este trabajo, pese a que se obtuvieron clones con el plásmido pPMQAK1 en *Synechococcus* 11901, el plásmido no se pudo detectar mediante PCR o bien los clones no expresaban la proteína fluorescente presente en él. En cuanto al origen RK2 (pSEVA 421-T) no se obtuvieron clones tras la transformación (Tabla D.1). Además de los orígenes RSF1010 y RK2, probados en *Synechococcus* 11901, existen otros orígenes de replicación que podrían ser compatibles con esta cianobacteria (B. Wang *et al.*, 2012). Dado que *Synechococcus* 7002 es la cepa caracterizada que es filogenéticamente más cercana, una opción sería emplear plásmidos lanzadera. *Synechococcus* 7002 presenta 6 plásmidos endógenos (pAQ) y algunos de ellos se han modificado para incluir un origen de replicación para *E. coli* (B. Wang *et al.*, 2012). Si bien Y. Xu *et al.*, 2011 menciona que el plásmido endógeno pAQ4 puede curarse sin que suponga un efecto negativo en el crecimiento de *Synechococcus* 7002, los plásmidos descritos en bibliografía para esta cepa realmente implican la integración del transgén en alguno de los plásmidos endógenos (Nozzi *et al.*, 2017; Y. Xu *et al.*, 2011). Por otra parte, los orígenes de replicación pUH24 (Chauvat *et al.*, 1983) y pANS (Y. Chen *et al.*, 2016) de plásmidos endógenos de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 se han empleado en la construcción de plásmidos lanzadera utilizados tanto en esta cianobacteria (Y. Chen *et al.*, 2016; Iwaki *et al.*, 2006) como *Anabaena* sp. PCC 7120 (pANS, Y. Chen *et al.*, 2016). Otros replicones que también podrían evaluarse en *Synechococcus* 11901 son pDU1 de *Nostoc* sp. PCC 7524 (Elhai y Wolk, 1988) o los vectores lanzadera pSCB-YFP (Jin *et al.*, 2018) o pCA-UC118 y pCB-SC101 (D. Liu y Pakrasi, 2018) obtenidos a partir de plásmidos de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Por otra parte, según se indica en Włodarczyk *et al.*, 2020, *Synechococcus* 11901 parece presentar varios plásmidos, por lo que un estudio más detallado de los mismos podría permitir el desarrollo de vectores lanzadera específicos de esta cepa.

Como alternativa a los plásmidos replicativos, se buscaron sitios putativos de integración en zonas no codificantes en el genoma de *Synechococcus* 11901 usando como base el trabajo en *Synechococcus* 7002 de M. Wang *et al.*, 2019. La eficiencia fue variable entre los sitios neutrales probados. Esto puede ser debido a la distancia entre los genes en los que se ha integrado el transgén, que es de solo 67 pb frente a los 297 pb que hay en NS3. No obstante, los dos nuevos sitios definidos fueron confirmados para una integración estable y sin un efecto negativo en el crecimiento de la cianobacteria en condiciones normales. Además, en términos de expresión, solo el NS3 exhibió una expresión un 30% menor de YFP frente a NS1 (Capítulo 4, Figura R.4.9). Diferencias de expresión o en la eficiencia de transformación entre sitios neutrales distintos también se han observado en otras cianobacterias como *Synechocystis* 6803 (Ng *et al.*, 2015) y *Synechococcus* 7002 (Vogel *et al.*, 2017), consecuencia de efectos polares del entorno o interrupción de genes esenciales.

2.2. Barreras a la transformación de *A. platensis* PCC 9108

Hasta la fecha, pocos trabajos han conseguido la transformación de *Arthrospira platensis*. Al comienzo de esta Tesis Doctoral existían pocas publicaciones de transformación de espirulina (Jeamton *et al.*, 2017; Kawata *et al.*, 2004; Toyomizu *et al.*, 2001), por lo que un objetivo inicial fue el desarrollo de protocolos para esta cianobacteria. No obstante, pese a poder transformar las cianobacterias mencionadas anteriormente, ninguno de los protocolos habituales en cianobacterias y probados para *A. platensis* 9108 en el Capítulo 2 funcionó (Tabla D.2).

Por otro lado, la transformación mediante conjugación con *Agrobacterium tumefaciens* también se probó con *A. platensis*. Esta forma de transformación se ha empleado de manera extendida en plantas y microalgas (eucariotas), pero solo en un trabajo con *Spirulina platensis* UTEX LB 2340, publicado durante la realización de esta Tesis Doctoral (Dehghani *et al.*, 2018). Aunque se ensayaron diferentes condiciones y se emplearon diferentes cepas de *A. tumefaciens*, utilizadas con éxito en la transformación de varias microalgas, en ningún caso se obtuvieron transformantes para *A. platensis* 9108. Cabe señalar que, aunque *A. platensis* se considera con frecuencia una microalga, para este protocolo quizá sería necesario tener en cuenta que se trata de una bacteria. Así, el pCAMBIA 1301 expresa el gen de resistencia a higromicina B bajo el promotor de CaMV 35S, habitual en plantas. Podría ser interesante emplear otros promotores propios de *A. platensis*, como el de la ficocianina.

En general, en la transformación de cianobacterias, la metilación es un aspecto extremadamente relevante (Elhai *et al.*, 1997; Stucken *et al.*, 2013). En otras cianobacterias empleadas en esta Tesis Doctoral, esta barrera genética no ha sido importante o bien ha podido evadirse. Así, en las cepas de Helios utilizadas en este trabajo (Capítulos 1 y 3), la degradación de ADN exógeno por sistemas de restricción no parece ser una barrera importante para la manipulación genética pues la conjugación es posible sin metilación. En cambio, otros trabajos han señalado la presencia endonucleasas de restricción específicas como responsables de la imposibilidad de obtener transconjugantes en algunas cepas de *Chroococcidiopsis* sp. (Billi *et al.*, 2001). Por otro lado, para *Synechocystis* 6803 y *Synechococcus* 11901, el uso de un plásmido auxiliar con metilasas tampoco ha sido necesario. No obstante, se ha descrito tanto para

Synechocystis como para otras especies de *Synechococcus* que el uso de metilasas o de inhibidores de nucleasas mejora la eficiencia de transformación (Almeida *et al.*, 2017; B. Wang *et al.*, 2015). Lo mismo ocurre para otras cianobacterias, como *Leptolyngbya* sp. BL0092 (Taton *et al.*, 2012). En cambio, la metilación del ADN sí que es determinante en *Anabaena* 7120, pues solo la conjugación del pSEVA451 junto con el plásmido auxiliar pRL623 (que porta las metilasas M.Aval, M.Eco47II y M.EcoT22I propias de esta cianobacteria) permitió obtener transformantes en esta Tesis.

Tabla D.2. Resumen de trabajos donde se ha realizado la transformación de *Arthrospira* sp..

Cepa	Método	Preparación ADN	ADN transformado
Transformaciones descritas en la bibliografía			
<i>Spirulina platensis</i> UTEX LB 2340 ^a	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	Casete de Hyg ^R , GFP y GUS bajo promotor CaMV 35S
<i>Spirulina platensis</i> NIES-39 ^b	Electroporación	Linealización del plásmido	Plásmido pHSG399 (ori pBR322), Cm ^R , promotor <i>E. coli</i>
<i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i> C1 ^c	Electroporación	Transposasa Tn5, liposomas catiónicos	Transposón con casete de Cm ^R bajo promotor específico de <i>S. platensis</i> C1
<i>Arthrospira platensis</i> C1 ^d	Electroporación	Transposasa EZ-Tn5, liposomas catiónicos, inhibidor de RM tipo I	Transposón con casete de Spt ^R , GFP bajo promotor específico de <i>S. platensis</i> C1
<i>Arthrospira</i> spp. ^e	Electroporación	Integración por recombinación homóloga	Varios
<i>Spirulina</i> sp. UTEX LB 1926 y NIES-39 ^f	Transformación natural	Integración por recombinación homóloga	Dominios de unión a antígeno (VHH) anti- <i>Campylobacter</i> bajo promotor específico de <i>S. platensis</i>
Transformaciones realizadas en esta Tesis Doctoral			
<i>Arthrospira platensis</i> PCC 9108	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	Casete de Hyg ^R bajo promotor CaMV 35S
	Conjugación triparental	-	Plásmidos replicativos pSEVA ori: RK2, pBBR1, pRO1600/colE1, RSF1010. Casete de Spt ^R , promotor no específico.
	Conjugación triparental	-	Mini Transposasa Tn5. Transposón con: Casete de Spt ^R , bajo promotor no específico
	Electroporación	Transposasa EZ-Tn5, liposomas catiónicos, inhibidor de RM tipo I	Transposón con: Casete de Spt ^R , GFP bajo promotor específico
	Electroporación	Transposasa EZ-Tn5, liposomas catiónicos, inhibidor de RM tipo I	Transposón con: Casete de Cm ^R bajo promotor específico
	Electroporación	Metilasa comercial CviPI	Plásmido replicativo pSEVA ori RSF1010, Casete de Cm ^R bajo promotor no específico
<i>Arthrospira platensis</i> C1 ^d	Electroporación	Transposasa EZ-Tn5, liposomas catiónicos, inhibidor de RM tipo I	Transposón con: Casete de Spt ^R , GFP bajo promotor específico

^a Delghani *et al.*, 2018 (eficiencia 20-157 ufc/10⁶ células de cianobacteria); ^b Toyomizu *et al.*, 2001, ^c Kawata *et al.*, 2004, ^d Jeamton *et al.*, 2017 (eficiencias de 3.4x10⁵ a más de 1.5x10⁶ ufc/μg ADN), ^e Takeuchi y Roberts, 2018, ^f Jester *et al.*, 2022

En el caso de *A. platensis*, los sistemas de restricción-modificación parecen ser las principales “defensas” genéticas. Algunos estudios llevados a cabo en el laboratorio en paralelo a esta Tesis Doctoral, mostraron que *A. platensis* 9108 presenta sistemas RM de tipo I a IV, incluyendo 13 sistemas de restricción modificación de tipo II, todos ellos funcionales (Capítulo 2, Figura R.2.7). Las condiciones publicadas en la transformación de *A. platensis* C1 en Jeamton *et al.*, 2017 están centradas en evitar o mitigar la actuación de estos sistemas, como el uso de liposomas para proteger el ADN o un inhibidor de los sistemas de restricción modificación de tipo I. Además, emplear la transposasa como proteína puede ayudar a incrementar las posibilidades de éxito, ya que no depende de que se exprese desde un plásmido. Para *A. platensis* 9108 no ha parecido ser suficiente para lograr la transformación, aunque los sistemas de RM descritos son similares entre ambas especies. En la misma línea de evitar o proteger el ADN de estos sistemas, en el Capítulo 2 se probaron diferentes metilasas, tanto comerciales como con el plásmido pRL623. En ningún caso se obtuvieron transformantes. No obstante, en ambos casos el ADN transformado se empleó como plásmido replicativo con el origen RSF1010. Al igual que ocurre para *Synechococcus* 11901 es posible que la presencia de plásmidos replicativos no sea estable y se requiera de plásmidos integrativos para la transformación. La inclusión de los plásmidos en liposomas para protegerlos frente a los sistemas RM podría ser otra opción a valorar.

Dado que cada vez existen más cepas de *A. platensis* secuenciadas, y el éxito de transformación en *Anabaena* sp. empleando el pRL623, puede ser relevante obtener un plásmido con las metilasas de *A. platensis*. Si bien nuestro laboratorio trabajó en esta idea, se observó que solo 6 de las 13 metilasas de tipo II de *A. platensis* 9108 eran activas en *E. coli*. Además, cuando se trataron de clonar todas en un mismo plásmido para obtener una “plataforma” de metilación, el resultado fue tóxico para *E. coli*. Quizá, al igual que ocurre con *Anabaena* y el plásmido pRL623, podría ser viable obtener esta plataforma solo con algunas metilasas, por lo que conocer aquellas de mayor actividad en *A. platensis* podría ayudar en esta línea de trabajo.

En esta Tesis, para la transformación de *A. platensis*, la capa de polisacárido o las exonucleasas presentes en ella han tratado de evitarse mediante sonicación o lavados con NaCl, lo que ha supuesto el éxito en la transformación genética de otras cianobacterias como *Fischerella muscicola* PCC 7414 y *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 (Stucken *et al.*, 2012). No obstante, en *A. platensis* 9108 estas condiciones no funcionaron. Por otro lado, siguiendo un abordaje similar al realizado para *A. platensis* en el Capítulo 2, en Laurenceau *et al.*, 2020, pusieron a punto las condiciones para la transformación de *Prochlorococcus* sp. MED4. No obstante, emplearon ADN marcado con fluoresceína para evaluar las mejores condiciones de electroporación (Laurenceau *et al.*, 2020). Es posible que las condiciones de electroporación empleadas para *A. platensis* (2.5 kV/cm) no sean lo suficientemente intensas. Por ejemplo, para *Prochlorococcus* sp. MED4 y *Anabaena* sp. M131 los mejores resultados de electroporación se obtienen para intensidades de 6-8 kV/cm (Laurenceau *et al.*, 2020; T. Thiel y Poo, 1989). Alternativamente, otros protocolos que funcionan con microalgas pueden explorarse y adaptarse para tratar de modificar esta cianobacteria. Ejemplos de ello podrían ser la mezcla de ADN y perlas de vidrio en presencia de polietilenglicol (PEG) o el bombardeo de partículas con

ADN. Este último, se ha empleado con éxito en las cianobacterias *Fischerella muscicola* PCC 7414 y *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 (Stucken *et al.*, 2012).

A pesar de lo comentado anteriormente, se sigue intentando la transformación de *A. platensis* empleando condiciones alternativas. En un trabajo publicado recientemente (Jester *et al.*, 2022), han demostrado la transformación de dos cepas de *Spirulina* (cepas UTEX LB1926 and NIES-39) mediante competencia natural utilizando un plásmido integrativo. Estos resultados tienen una enorme implicación, no solo por las aplicaciones desarrolladas sino por el método para lograr la transformación de *Spirulina*. Al contrario de lo que suele emplearse en el laboratorio para transformación (cepas axénicas), los autores vieron que la competencia solo se daba en presencia de otras bacterias que vivían en consorcio con *Spirulina*, de tipo *Sphingomonas* y *Microcella* (Jester *et al.*, 2022). En dicho trabajo, una vez transformada, separan la cianobacteria y la utilizan con éxito para vehiculizar un compuesto terapéutico en ratones (Jester *et al.*, 2022). A raíz de estos resultados, el empleo de cepas industriales, que frecuentemente presentan asociadas otras bacterias podría ser una nueva línea de estudio en el desarrollo de nuevos protocolos de transformación.

2.3. Edición genética de cianobacterias mediante CRISPR-Cas

El desarrollo de la tecnología CRISPR-Cas ha mejorado las modificaciones genéticas en cianobacterias, pues los protocolos basados en CRISPR-Cas aceleran el proceso de selección de mutantes al evitar la integración de marcadores de selección, así como reducen el tiempo necesario para la segregación de las modificaciones en el genoma.

En referencia al uso de esta herramienta, Ungerer y Pakrasi aplicaron el sistema CRISPR-Cpf1 en tres cianobacterias diferentes expresando los componentes de CRISPR en el plásmido replicativo pSL2680, si bien este mostró ciertos problemas a la hora de obtener grandes cantidades (Addgene #85581) (Ungerer y Pakrasi, 2016). Dado el potencial de CRISPR y los resultados obtenidos con los plásmidos pSEVA, se desarrollaron plásmidos con la tecnología CRISPR-Cpf1, transformables en los tres géneros escogidos (Capítulo 3, Figura R.3.8). Aparte de *Synechocystis* 6803, en esta Tesis se muestra la replicación de los vectores pSEVA-Cpf1 en *Anabaena* 7120 y *Chroococcidiopsis* sp., y además, esta es la primera vez que se conjuga el pSL2680 en una cepa de *Chroococcidiopsis*. Como se ha descrito para otras cianobacterias (Ungerer y Pakrasi, 2016), en el laboratorio no se ha observado toxicidad en presencia de la nucleasa Cpf1. Por todo ello, los vectores SEVA-Cpf1 pueden ampliar las herramientas de edición genética existentes hasta ahora para las cianobacterias. Además, estos resultados también abren una puerta a la edición del genoma en el extremófilo *Chroococcidiopsis*, una cepa que se ha utilizado en los experimentos de la Agencia Espacial Europea por sus propiedades de alta resistencia a radiación y desecación (Billi, 2009) y para la que no existen hasta el momento estudios de este tipo. En cuanto a la aplicación de CRISPR, se ha editado con éxito el genoma *Synechocystis* 6803 eliminando las dos copias del gen *nblA* usando el plásmido pSEVA351-Cpf1. Además, el pSL2680 falló al ser utilizado en la transformación natural, pero no los vectores pSEVA que podrían ser asimilados por este procedimiento incluso cuando se realizó la edición genética de *Synechocystis* 6803.

En cuanto al uso de CRISPR para lograr varias modificaciones genéticas, es necesaria la eliminación del plásmido empleado. Ungerer y Pakrasi, 2016 encontraron que el plásmido de edición, basado en el plásmido pSL2680 (Capítulo 3, Figura R.3.7) se perdía en ~8-36% de las células, dependiendo de la modificación genética, en *Synechococcus* 2973. En la misma cepa, el plásmido que contenía Cas9 se perdía en los 8 clones analizados después 10 pases en medio no selectivo (Wendt *et al.*, 2016). Para pSEVACpf1 en *Synechocystis* 6803, tras 14 pases en ausencia de antibiótico, los 10 clones *ΔnblA* analizados seguían portando el plásmido. El crecimiento en medio líquido facilitó la obtención de colonias editadas sin pSEVA, obteniéndose un porcentaje de pérdida del 40 %, mejor al descrito en Niu *et al.*, 2019; Ungerer y Pakrasi, 2016. No obstante, se han descrito otros métodos para eliminar los plásmidos con las herramientas CRISPR. En Niu *et al.*, 2019 se ha descrito el uso del marcador de contraselección *sacB*, que codifica la levansacarasa de *Bacillus subtilis* para curar el vector de edición pCpf1 (un plásmido derivado de pSL2680) en *Anabaena* 7120. La expresión de *sacB* es letal en presencia de sacarosa al 5% y, por lo tanto, la supervivencia de los mutantes editados depende de los eventos de recombinación o, alternativamente, de la pérdida espontánea del vector que contiene *sacB*, lo que facilita la pérdida de los plásmidos usados en la edición en cianobacterias (Niu *et al.*, 2019). Por otra parte, en *Synechocystis* 6803 se ha publicado el uso de un promotor inducible para la expresión de Cas9, junto con un ARNg que permite auto-curar el plásmido una vez se ha editado la cianobacteria correctamente (Cengic *et al.*, 2022). Si bien en este caso es necesario disponer de un promotor inducible estricto, puede ser de gran utilidad en cianobacterias en las que no es posible el uso de *sacB*, al no ser capaces de crecer en presencia de sacarosa (Cheah *et al.*, 2013).

3. DESARROLLO DE HERRAMIENTAS DE BIOLOGÍA SINTÉTICA

3.1. Herramientas de control de la expresión génica en cianobacterias

La colección de plásmidos SEVA es particularmente interesante debido a la estructura modular e intercambiable de sus plásmidos (Martínez-García *et al.*, 2014; Silva-Rocha *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con los plásmidos SEVA para diferentes cianobacterias, además de emplearse en herramientas CRISPR-Cas, se utilizaron como base para desarrollar plásmidos de expresión. El plásmido pSEVA351 con el gen *yfp* bajo el promotor constitutivo P_{c223} mostró ser funcional para expresión en *Synechocystis* 6803 y las distintas *Chroococcidiopsis* sp. Helios (Capítulo 3, Figura R.3.5). Si bien este promotor se ha descrito en *Synechococcus* 7002 (Markley *et al.*, 2015), este es el primer trabajo donde se muestra que también puede emplearse en cianobacterias como *Synechocystis* o *Chroococcidiopsis* sp. En cuanto a la fuerza de promotor, se obtuvo una señal ~100 veces superior al WT en *Synechocystis* 6803 y de ~50 veces superior en la mayoría de las *Chroococcidiopsis* sp Helios. Estos resultados muestran que los pSEVA son una herramienta prometedora para la expresión en cianobacterias, incluyendo bacterias extremófilas. Por otra parte, teniendo en cuenta su arquitectura modular, diferentes combinaciones de promotores, genes reporteros o la posibilidad de clonar cualquier gen deseado en pSEVA supondría una fuente de múltiples posibilidades para obtener cianobacterias genéticamente modificadas. Además, dado que estos plásmidos han demostrado

ser funcionales en otras bacterias, podrían transferirse a diferentes microorganismos aumentando las herramientas de biología sintética disponibles.

Para *Synechococcus* 11901, los resultados obtenidos en esta Tesis usando utilizando un plásmido con ori RSF1010 no fue concluyente por la presencia de falsos positivos resistentes al antibiótico (Capítulo 4, Figura R.4.3), por lo que se evaluaron las herramientas de control de la expresión génica integrando diferentes construcciones en el genoma. En el Capítulo 4 de esta Tesis Doctoral, se evaluaron promotores constitutivos e inducibles que habían funcionado en otras cianobacterias de uso biotecnológico como *Synechocystis* 6803 y *Synechococcus* 7002. Al igual que en *Synechococcus* 7002, el promotor P_{c223} mostró ser fuerte en comparación con P_{J23110} (Markley *et al.*, 2015), siendo en *Synechococcus* 11901 hasta cinco veces más fuerte. Dado que P_{J23110} procede de una colección de promotores, probablemente otras alternativas permitan diferentes fuerzas de expresión (Vasudevan *et al.*, 2019). Markley *et al.*, 2015 mostró que el promotor P_{cLac94} es al menos 10 veces más débil que $P_{cLac143}$ en *Synechococcus* 7002, pero para *Synechococcus* 11901 parece que solo este segundo funciona adecuadamente al añadir IPTG. Por otro lado, de los promotores inducibles con ramnosa, solo el P_{Rha} (Behle *et al.*, 2020) permitió controlar la expresión de *yfp*. El uso del *riboswitch* con este promotor ($P_{Rha-RSW}$) se ha descrito en *Synechocystis* 6803 (Liu *et al.*, 2020) pero parece que esta herramienta no es transferible a *Synechococcus* 11901. Esto puede ser debido a que al insertar el *riboswitch* el RBS utilizado no sea el adecuado para esta cianobacteria. Además, si bien se incluyó el *riboswitch* para reducir las fugas del promotor P_{Rha} cuando se probó en *Synechocystis* 6803 en Liu *et al.*, 2020, en esta Tesis se ha visto que este promotor P_{Rha} de Behle *et al.*, 2020 es bastante estricto en *Synechococcus* 11901. Por otro lado, en *Synechocystis* 6803, la inducción obtenida fue de ~39 veces (Behle *et al.*, 2020), mientras que en esta Tesis fue de ~21 veces en *Synechococcus* 11901. Otras diferencias que pueden ser responsables del distinto funcionamiento de los dos promotores inducibles por ramnosa son el promotor empleado para la expresión del factor RhaS y la organización del casete de expresión. Estos resultados ponen de relieve la necesidad de comprobar y caracterizar las herramientas descritas en otras cianobacterias cuando se tienen que adaptar a otra especie.

3.2. Sistema de degradación de proteínas en *Synechococcus* 11901

Para completar el desarrollo de herramientas de biología sintética, en el Capítulo 4 se diseñó un sistema de degradación inducible y dirigida de proteínas en *Synechococcus* 1190, que se ensayó sobre la proteína fluorescente YFP. El uso de proteasas virales y etiquetas (en N o C terminal) ha sido probado previamente en *E. coli* con la finalidad de estudiar la dinámica y funcionalidad a nivel de proteínas (Cameron y Collins, 2014; Martínez *et al.*, 2017), en el desarrollo de circuitos genéticos (Cameron y Collins, 2014; Fernández-Rodríguez y Voigt, 2016) o con fines biotecnológicos (Durante-Rodríguez *et al.*, 2018). Si bien cuando se comenzó esta Tesis Doctoral no había publicaciones sobre el uso de estas herramientas en cianobacterias, actualmente existen dos sistemas de degradación dirigida de proteínas en la cianobacteria *Synechococcus elongatus* 7942 (Sakkos *et al.*, 2021; M. Y. Zhang *et al.*, 2021). Al igual que en el trabajo descrito en el Capítulo 4, en Sakkos *et al.*, 2021 y M. Y. Zhang *et al.*, 2021 el desarrollo de

la herramienta para controlar la degradación de proteínas se probó tomando como modelo una proteína fluorescente. La represión de la fluorescencia como consecuencia de la degradación de la proteína, de aproximadamente un ~86% obtenido en esta Tesis (Capítulo 4, Figura R.4.12) fue similar a los artículos mencionados, donde se obtuvo un 85% usando el sistema *mf-lon* (Sakkos *et al.*, 2021) y un 87% en la herramienta utilizada por M. Y. Zhang *et al.*, 2021. El trabajo descrito aquí es el primero en el que se aplica la proteasa TEV como sistema de degradación de proteínas en una cianobacteria y la primera vez que se describen herramientas de control de proteínas en *Synechococcus* 11901.

Por otra parte, uno de los efectos observados con esta técnica fue la reducción en la expresión de *yfp* simplemente por el hecho de añadir la etiqueta. Otros trabajos han mostrado que cuando la proteína está etiquetada, en general una proteína fluorescente, la señal observada nunca llega a ser igual al control sin marcar y parece depender de la proteína considerada (Durante-Rodríguez *et al.*, 2018; Martínez *et al.*, 2017; Sakkos *et al.*, 2021; M. Y. Zhang *et al.*, 2021). En función de la etiqueta empleada, la reducción de la fluorescencia de YFP varía entre 50-75% en *Synechococcus* 11901 (Capítulo 4, Figura R.4.11). Para *Synechococcus elongatus* 7942, la reducción es de un 70% aproximadamente cuando se añade solo la etiqueta en C-terminal en Sakkos *et al.*, 2021 y de entre el 30-50% en el sistema descrito por M. Y. Zhang *et al.*, 2021. Por otra parte, se ha descrito que solo la adición del sitio de reconocimiento de TEVp (sin un degrón) afecta también a la expresión de la proteína, ya que altera su traducción (Martínez *et al.*, 2017). Este efecto parece ocurrir también en cianobacterias, y no parece ser del todo consecuencia del promotor para el control de TEVp, pues la pérdida de fluorescencia en las cepas con TEVp no varió mucho entre P_{CLac143} y P_{Rha} (Figura R.4.12 y Figura R.4.13). Si bien este efecto no es deseable, no fue un impedimento para desviar el metabolismo de *E. coli* a la acumulación de PHB (Durante-Rodríguez *et al.*, 2018). En Sakkos *et al.*, 2021, por otra parte, estudiaron la dinámica de proteínas esenciales como FstZ y varios componentes del carboxisoma (microcompartimento donde se lleva a cabo la fijación de CO₂) en *Synechococcus elongatus* 7942 usando la herramienta de degradación de proteínas que habían desarrollado (Sakkos *et al.*, 2021). A la hora de fusionar FstZ con la etiqueta hicieron cambios en esta, con el fin de evitar una expresión reducida de la proteína. Esta solución también se llevó a cabo en *E. coli* para evitar el reconocimiento de las proteínas en ausencia de expresión de la proteasa TEV (Martínez *et al.*, 2017). Esta podría ser una estrategia que considerar en la mejora del sistema desarrollado en *Synechococcus* 11901.

En cuanto a la dinámica de esta herramienta, la etiqueta empleada juega un papel importante, siendo FR-G la etiqueta que permite la máxima degradación en ~8 h (Capítulo 4, Figura R.4.14). Los resultados de tiempo de degradación son similares a los observados en la degradación de la proteína verde fluorescente (mNeonGreen) en Sakkos *et al.*, 2021. Otro aspecto que señalar es que el sistema desarrollado tanto en *Synechococcus* 7942 (Sakkos *et al.*, 2021) como en esta Tesis, puede modularse variando la concentración de inductor para la proteasa empleada, igual que ocurre en *E. coli* (Martínez *et al.*, 2017). Por último, estos sistemas pueden aplicarse para generar circuitos genéticos más complejos; por ejemplo, utilizar como proteína diana un represor, como se ha descrito en *E. coli* y la proteasa TEVp (Martínez *et al.*, 2017) o en *Synechococcus elongatus* 7942 (M. Y. Zhang *et al.*, 2021). Por todo ello, los resultados confirman

que esta herramienta sintética podría ser prometedora para la degradación diana de las proteínas en *Synechococcus* 11901, así como podría aplicarse en otras cianobacterias.

4. PERSPECTIVAS FUTURAS

4.1. *Chroococcidiopsis* sp. y otras cianobacterias procedentes del panel solar

Pese al trabajo realizado en esta Tesis Doctoral con las cepas de *Chroococcidiopsis* sp. Helios, todavía quedan aspectos que estudiar más profundamente para desarrollar aplicaciones biotecnológicas reales con estas cianobacterias. A corto plazo, cabría analizar la expresión y producción del pigmento escitonemina, debido a su valor industrial como antioxidante. En esta línea, los plásmidos CRISPR-Cas desarrollados en el Capítulo 3 pueden contribuir a estudiar el proceso y a la generación de mutantes. Actualmente, no existen trabajos de edición por CRISPR-Cas en este tipo de cianobacterias.

Otro punto que es necesario validar tras el análisis *in silico* es la producción de metabolitos secundarios. Durante las últimas décadas ha existido un enorme interés en el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos de origen microbiano con aplicación en campos como la biomedicina, farmacología, agricultura y cosmética. En cianobacterias, la mayoría de los estudios de detección de compuestos bioactivos se han centrado en cepas de agua dulce o marinas mientras que las cepas terrestres apenas han sido estudiadas con este propósito, al igual que las cianobacterias de ambientes extremos (Witthohn *et al.*, 2021).

En Jeong *et al.*, 2020, analizaron 196 genomas de cianobacterias con la herramienta antiSMASH y encontraron en gran parte de las cianobacterias escogidas clústeres implicados en la síntesis de terpenos, bacteriocinas y péptidos no-ribosomales (Jeong *et al.*, 2020). En *Chroococcidiopsis cubana*, esta herramienta se empleó para la identificación de un clúster responsable de la síntesis de una bacteriocina, que mostró actividad frente a gram-positivas, especialmente *Staphylococcus auricularis* (Witthohn *et al.*, 2021). Por otro lado, otro trabajo investigó tanto *in silico* como la actividad de extractos de *Chroococcidiopsis* sp. aislados del desierto de Atacama, y mostraron que una cepa presentaba actividad antibacteriana contra *Enterococcus durans* y actividad citotóxica contra las células cancerosas T47D (Casero-Chamorro, 2019). De manera similar, en el Capítulo 1, se analizaron con esta misma herramienta los genomas de *Chroococcidiopsis* sp. Helios. Los resultados obtenidos muestran todas las cepas presentan diferentes clústeres para la síntesis de metabolitos secundarios, aunque de varios no se conoce la función (Capítulo 1, Tabla R.1.10).

Además del pigmento escitonemina, entre los metabolitos bioactivos de las cianobacterias, los carotenoides se consideran también compuestos bastante valiosos por su aplicación como antioxidantes. La producción de estos compuestos se ha estudiado en cianobacterias extremófilas del género *Chroococcidiopsis* (Antonopoulou *et al.*, 2005; Assunção *et al.*, 2021). Con estos antecedentes, un estudio más profundo de los clústeres encontrados en *Chroococcidiopsis* sp. Helios, así como el análisis bioquímico de los extractos podrían ser relevantes en la búsqueda de actividad antimicrobiana o antioxidante.

Finalmente, otros aspectos que podrían estudiarse en más detalle son (i) las microalgas y (ii) los consorcios cianobacteria/microalga-bacteria obtenidos del panel solar. Si bien la microalga *Diplosphaera chodatii* es de interés ecológico, *Coelastrella* spp. se ha utilizado en diferentes aplicaciones biotecnológicas como el tratamiento de aguas residuales, producción de lípidos y pigmentos, así como para la producción de antitumorales (Nayana *et al.*, 2022). Por ello, la microalga aislada del panel solar *Coelastrella* sp. D14 podría ser una cepa nueva de microalga de valor industrial.

Por otra parte, si bien de manera tradicional en biotecnología las bacterias se utilizan en monocultivo, las estrategias más recientes se enfocan a su uso formando parte de consorcios microbianos sintéticos en los que en lugar de depender de una sola especie, la producción química se logra combinando diferentes especies microbianas. En este tipo de enfoque, las cianobacterias tienen gran relevancia al acoplar su crecimiento a partir de luz y CO₂, con el metabolismo diverso de los heterótrofos. La aproximación de aislamiento realizado en esta Tesis Doctoral (Capítulo 1, Figura R.1.1) favorecía el crecimiento de cianobacterias, pero se observó que todas presentaban conviviendo con estas diferentes microorganismos. En esta línea, en Dorado-Morales *et al.*, 2016, evaluaron la complementación entre distintas bacterias aisladas del panel solar en resistencia a sal o UV. Varias cepas no sobrevivían solas, pero sí en consorcio con otras de las bacterias identificadas. Por ello, el estudio de las cianobacterias y también de las bacterias del Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral, que ya forman parte de consorcios naturales, puede servir para crear en un futuro consorcios sintéticos “a la carta”.

4.2. Uso del sistema TEVp con fines biotecnológicos

Como se ha comentado en la Introducción, la herramienta CRISPRi se ha utilizado para bloquear la transcripción de genes que compiten con el flujo metabólico implicado en la producción de compuestos de interés industrial, lo que ha permitido incrementar la obtención de dichos productos. Varios trabajos han aplicado CRISPRi con esta finalidad en cianobacterias como *Synechocystis* 6803, *Synechococcus* 7002 y *S. elongatus* 7942. No obstante, dado que CRISPRi bloquea la transcripción, se debe considerar un retraso entre la inducción del sistema y el efecto provocado por la represión génica (Shabestary *et al.*, 2018). Por otro lado, varios estudios proteómicos señalan que las abundancias de la mayoría de las proteínas permanecen relativamente estables en *Synechocystis* 6803 (W. Chen *et al.*, 2021; Karlsen *et al.*, 2021) y *Synechococcus* 7942 (Guerreiro *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta que el recambio de proteínas es lento, el control de los flujos metabólicos a través de la represión de CRISPRi podría ser limitado. Esto es especialmente importante pues las cianobacterias tienen una tasa de crecimiento más lenta en comparación con *E. coli*, por lo que una proteína objetivo permanecería un tiempo en el citoplasma antes de ser digerida o diluida naturalmente durante el crecimiento celular.

El sistema TEVp desarrollado en esta Tesis alcanza una represión máxima de fluorescencia, consecuencia de la degradación de YFP, en ~8 h (Capítulo 4; Figura R.4.14), al igual que el sistema desarrollado para *S. elongatus* 7942, donde el efecto máximo se observa a las en poco más de 5 h (Sakkos *et al.*, 2021). Estos resultados colocan estas técnicas de degradación de proteínas como alternativas a CRISPRi. Así, por ejemplo, la represión de proteínas fluorescentes mediante CRISPRi en *Synechococcus* 7002 alcanza el máximo en ~10-12 h (Gordon *et al.*, 2016) mientras que en *Synechocystis* 6803 se necesitan casi 4 días (Yao *et al.*, 2016).

Varios trabajos ya han empleado sistemas de degradación inducibles de proteínas con fines industriales. En Durante-Rodríguez *et al.*, 2018 se combinó la expresión de la proteasa NIa y una etiqueta *ssrA* para aumentar la tasa de acumulación específica de PHB al controlar la degradación de proteínas en *E. coli* (Durante-Rodríguez *et al.*, 2018). Por otro lado, el sistema reciente desarrollado en *S. elongatus* 7942 se empleó para aumentar la síntesis de glucógeno mediante el control de *GlgC*, aumentando el contenido de glucógeno en 2.2 veces (M. Y. Zhang *et al.*, 2021). En esta línea de trabajo, en un futuro se plantea utilizar el sistema TEVp en *Synechococcus* 11901 para incrementar la producción de L-lactato, de manera similar a la estrategia empleada en Shabestary *et al.*, 2021. En dicho trabajo, la represión de *gltA* mediante CRISPRi conduce a la detención del crecimiento en *Synechocystis* 6803, por lo que se ha utilizado como interruptor metabólico para la producción de L-lactato en cepas recombinantes que expresan la enzima lactato deshidrogenasa (Shabestary *et al.*, 2021). Sin embargo, debido a la estabilidad de la proteína *GltA*, se observó una detención total del crecimiento 48 horas después de la inducción de CRISPRi. Con el uso de una cepa de crecimiento más rápido (*Synechococcus* 11901) y el uso del sistema de degradación de proteínas, se pretende mejorar los resultados obtenidos para *Synechocystis* 6803.

Los resultados expuestos en los diferentes capítulos de esta Tesis Doctoral proporcionan nuevas cepas del género *Chroococcidiopsis*, así como otras resistentes a desecación. Además, se han obtenido y validado diferentes promotores, plásmidos, y las herramientas biotecnológicas como CRISPR-Cpf1 y el sistema TEVp, de edición genética y control de proteínas, respectivamente. La Figura D.1 recoge un resumen esquemático de las aportaciones fundamentales de la presente Tesis Doctoral. Los resultados obtenidos mejorarán la manipulación y control de la expresión génica en cianobacterias en varios campos.

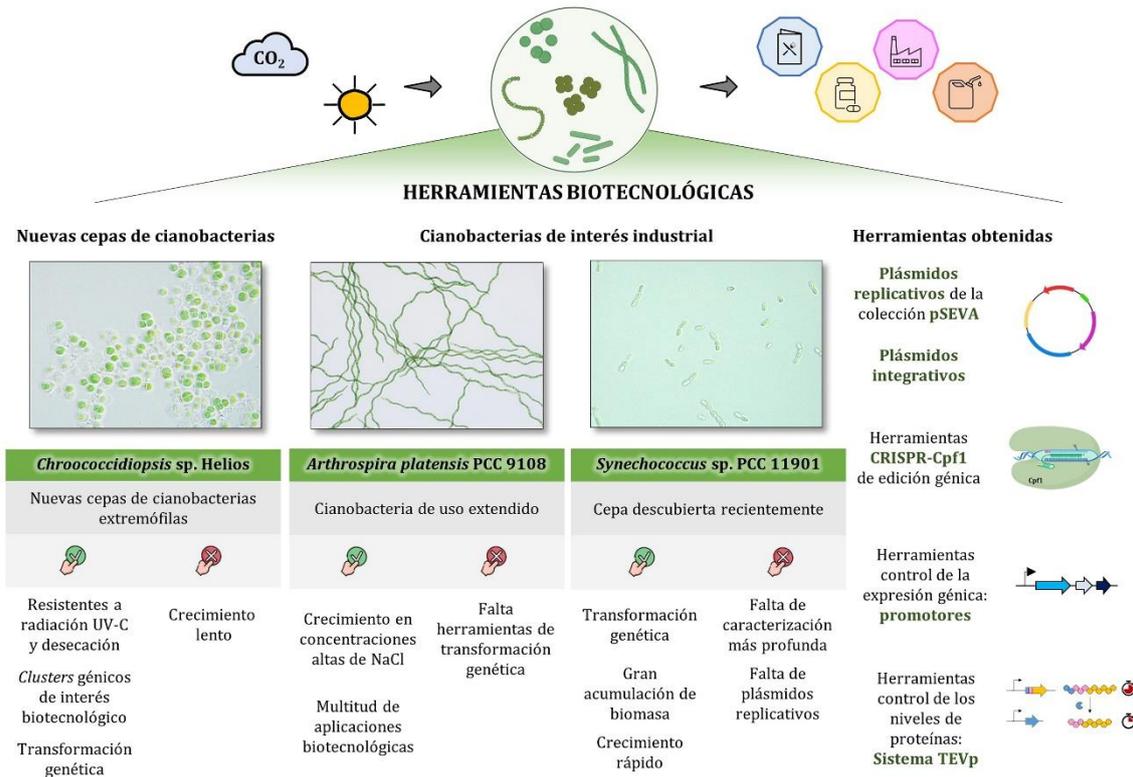


Figura D.1. Representación esquemática de las cianobacterias empleadas en esta Tesis Doctoral y las herramientas biotecnológicas obtenidas. Se muestra para las cianobacterias, las principales ventajas y desventajas.

VII. Conclusions

The work described in this Doctoral Thesis has led to the following main conclusions:

1. The taxonomic identification of the microorganisms isolated from the solar panel reveals the presence of cyanobacteria and microalgae frequent in areas with low water availability. The physiological characterization of the four *Chroococcidiopsis* sp. strains has confirmed that they are capable of growing under laboratory conditions in BG11 with concentrations between 0.1-0.25 M NaCl, pH 7.5 and 30°C temperature. Several of the isolates have been shown to be able to use nitrate and urea as nitrogen sources and all of them can grow heterotrophically using maltose or sucrose as carbon source. Regarding stress related to its ecological niche, the results validate that the four strains resist a prolonged desiccation process and UV-C irradiation.
2. The genomes of *Chroococcidiopsis* sp. Helios show different gene clusters common in microorganisms and cyanobacteria present in ecological niches subjected to low water availability and irradiation. The presence of these clusters opens technological possibilities for transfer to other model or industrial strains to make them more resistant.
3. It has been shown that the cyanobacterium *Arthrospira platensis* 9108 presents important genetic and physical barriers that prevent its transformation, either through standard protocols in cyanobacteria such as triparental conjugation with *E. coli* or others established for other *A. platensis* strains, such as electroporation or conjugation with *A. tumefaciens*.
4. SEVA plasmids with RSF1010 origin have been confirmed to be functional in the cyanobacteria *Synechocystis* 6803, *Anabaena* 7120 and *Chroococcidiopsis* sp. Helios. The transformation of Helios strains allows to be considered them as potential biotechnological chassis, thus expanding the existing study models of cyanobacteria.
5. An expression plasmid and an editing CRISPR-Cas plasmid has been validated in different cyanobacteria. The developed plasmid pSEVA351-Cpf1 has been successfully applied in the deletion of the two copies of the *nblA* gene in *Synechocystis* 6803. These plasmids extend the existing genetic tools for cyanobacteria.
6. In *Synechococcus* 11901, two new neutral sites for genome integration have been identified and validated. On the other hand, the functionality of the constitutive promoters P_{J23110} and P_{C223}, and the inducible promoters P_{rha} and P_{CLac143} has been demonstrated in this cyanobacteria. The capacity of controlling the degradation of YFP by the TEVp system developed in *Synechococcus* 11901, has been demonstrated. These systems are basic for the study and development of future biotechnological applications of this cyanobacteria because they allow the controlled regulation of proteins.

VIII. Conclusiones

El trabajo descrito en esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes conclusiones principales:

1. La identificación taxonómica de los microorganismos aislados del panel solar revela la presencia de cianobacterias y microalgas de géneros habituales en zonas características por presentar escasez de agua. La caracterización fisiológica de las cuatro cepas de *Chroococcidiopsis* sp. ha confirmado que son capaces de crecer en las condiciones de laboratorio en BG11 con concentraciones de entre 0.1-0.25 M de NaCl, pH 7.5 y 30°C de temperatura. Se ha demostrado que varias de las cepas aisladas son capaces de emplear nitratos y urea como fuente de nitrógeno y todas ellas pueden crecer heterotróficamente empleando maltosa o sacarosa como fuente de carbono. En cuanto a estrés relacionado con su nicho ecológico, los resultados validan que las cuatro cepas resisten un proceso de desecación prolongada e irradiación UV-C.
2. Los genomas de *Chroococcidiopsis* sp. Helios muestran diferentes clústeres génicos habituales en microorganismos y cianobacterias presentes en nichos ecológicos sometidos a escasez de agua e irradiación. La presencia de estos clústeres abre posibilidades tecnológicas de transferencia a otras cepas modelo o industriales para hacerlas más resistentes a la desecación.
3. Se ha demostrado que la cianobacteria *Arthrospira platensis* 9108 presenta importantes barreras genéticas y físicas que impiden su transformación, ya sea mediante protocolos habituales en cianobacterias como la conjugación triparental con *E. coli* como otros establecidos en otras cepas de *A. platensis*, como la electroporación o la conjugación con *A. tumefaciens*.
4. Se ha confirmado que los plásmidos SEVA con origen RSF1010 son funcionales para la transformación de las cianobacterias *Synechocystis* 6803, *Anabaena* 7120 y *Chroococcidiopsis* sp. Helios. La posibilidad de transformación permite que las cepas Helios sean también consideradas potenciales chasis biotecnológicos ampliando de esa manera los modelos de estudio de cianobacteria existentes.
5. Se han validado un plásmido de expresión y un plásmido para edición con CRISPR-Cas diferentes cianobacterias. El plásmido pSEVA351-Cpf1 desarrollado se ha aplicado con éxito en la delección de las dos copias del gen *nblA* en *Synechocystis* 6803. Estos plásmidos amplían las herramientas genéticas existentes para cianobacterias.

En *Synechococcus* 11901, se han identificado y validado dos sitios neutrales nuevos para la integración en el genoma. Por otro lado, se ha demostrado el funcionamiento en esta cianobacteria de los promotores constitutivos P_{J23110} y P_{c223}, y los promotores inducibles P_{rha} y P_{cLac143}. Se ha demostrado la capacidad del sistema TEVp desarrollado en *Synechococcus* 11901 en la degradación inducible de YFP, de manera dinámica y rápida. Estos sistemas son básicos para el estudio y desarrollo de futuras aplicaciones biotecnológicas de esta cianobacteria porque permiten la regulación controlada de proteínas.

IX. Referencias

- Adams, D. G. y Duggan, P. S. y Jackson, O. (2012). Cyanobacterial symbioses. In *Ecology of cyanobacteria II* (pp. 593–647). Springer.
- Aikawa, S. y Izumi, Y. y Matsuda, F. y Hasunuma, T. y Chang, J.-S. y Kondo, A. (2012). Synergistic enhancement of glycogen production in *Arthrospira platensis* by optimization of light intensity and nitrate supply. *Bioresource Technology*, *108*, 211–215.
- Algibe, L. A. (2021). *Aplicación de la biología de sistemas para mejorar las propiedades biotecnológicas de la cianobacteria Arthrospira platensis*. Universidad Autónoma de Madrid.
- Allen, C. J. y Lacey, R. F. y Binder Bickford, A. B. y Beshears, C. P. y Gilmartin, C. J. y Binder, B. M. (2019). Cyanobacteria respond to low levels of ethylene. *Frontiers in Plant Science*, 950.
- Almeida, D. V. y Martens, S. B. B. y Lanes, C. F. C. y Marins, L. F. (2017). Improved genetic transformation of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 using linear DNA fragments in association with a DNase inhibitor. *Biotechnology Research and Innovation*, *1*(1), 123–128.
- An, J. y Gao, F. y Ma, Q. y Xiang, Y. y Ren, D. y Lu, J. (2017). Screening for enhanced astaxanthin accumulation among *Spirulina platensis* mutants generated by atmospheric and room temperature plasmas. *Algal Research*, *25*, 464–472.
- Ananyev, G. y 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*.” *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(19), 6102–6113.
- Andersson, C. R. y Tsinoremas, N. F. y Shelton, J. y Lebedeva, N. v. y Yarrow, J. y Min, H. y Golden, S. S. (2000). Application of bioluminescence to the study of circadian rhythms in cyanobacteria. *Methods in Enzymology*, *305*, 527–542. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)05511-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)05511-7)
- Andreeva, A. y Budenkova, E. y Babich, O. y Sukhikh, S. y Dolganyuk, V. y Michaud, P. y Ivanova, S. (2021). Influence of Carbohydrate Additives on the Growth Rate of Microalgae Biomass with an Increased Carbohydrate Content. *Marine Drugs*, *19*(7), 381.
- Angermayr, S. A. y Rovira, A. G. y Hellingwerf, K. J. (2015). Metabolic engineering of cyanobacteria for the synthesis of commodity products. *Trends in Biotechnology*, *33*(6), 352–361.
- Antonopoulou, S. y Karantonis, H. C. y Nomikos, T. y Oikonomou, A. y Fragopoulou, E. y Pantazidou, A. (2005). Bioactive polar lipids from *Chroococcidiopsis* sp.(Cyanobacteria). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *142*(3), 269–282.
- Aparicio, T. y de Lorenzo, V. y Martínez-García, E. (2019). CRISPR/Cas9-enhanced ssDNA recombineering for *Pseudomonas putida*. *Microbial Biotechnology*, *12*(5), 1076–1089. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1751-7915.13453>

- Argueta, C. y Yuksek, K. y Summers, M. (2004). Construction and use of GFP reporter vectors for analysis of cell-type-specific gene expression in *Nostoc punctiforme*. *Journal of Microbiological Methods*, 59(2), 181–188.
- Assunção, J. y Amaro, H. M. y Lopes, G. y Tavares, T. y Malcata, F. X. y Guedes, A. C. (2021). Exploration of marine genus *Chroococcidiopsis* sp.: a valuable source for antioxidant industry? *Journal of Applied Phycology*, 1–19.
- Azua-Bustos, A. y Zúñiga, J. y Arenas-Fajardo, C. y Orellana, M. y Salas, L. y Rafael, V. (2014). *Gloeocapsopsis* AAB1, an extremely desiccation-tolerant cyanobacterium isolated from the Atacama Desert. *Extremophiles*, 18(1), 61–74.
- Baque, M. y Viaggiu, E. y Scalzi, G. y Billi, D. (2013). Endurance of the endolithic desert cyanobacterium *Chroococcidiopsis* under UVC radiation. *Extremophiles*, 17(1), 161–169. <https://doi.org/10.1007/s00792-012-0505-5>
- Bastet, L. y Dubé, A. y Massé, E. y Lafontaine, D. A. (2011). New insights into riboswitch regulation mechanisms. *Molecular Microbiology*, 80(5), 1148–1154.
- Becker, W. (2004). 21 Microalgae for aquaculture. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, 380.
- Begemann, M. B. y Zess, E. K. y Walters, E. M. y Schmitt, E. F. y Markley, A. L. y Pflieger, B. F. (2013). An organic acid based counter selection system for cyanobacteria. *PLoS One*, 8(10), e76594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076594>
- Behle, A. y Saake, P. y Germann, A. T. y Dienst, D. y Axmann, I. M. (2020). Comparative dose–response analysis of inducible promoters in cyanobacteria. *ACS Synthetic Biology*, 9(4), 843–855.
- Behler, J. y Vijay, D. y Hess, W. R. y Akhtar, M. K. (2018). CRISPR-based technologies for metabolic engineering in cyanobacteria. *Trends Biotechnol*, 36(10), 996–1010. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.05.011>
- Berla, B. M. y Saha, R. y Immethun, C. M. y Maranas, C. D. y Moon, T. S. y Pakrasi, H. B. (2013). Synthetic biology of cyanobacteria: unique challenges and opportunities. *Front Microbiol*, 4, 246. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00246>
- Bernheim, A. y Sorek, R. (2020). The pan-immune system of bacteria: antiviral defence as a community resource. *Nature Reviews Microbiology*, 18(2), 113–119.
- Bhaya, D. y Davison, M. y Barrangou, R. (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual Review of Genetics*, 45(1), 273–297.
- Billi, D. (2009). Subcellular integrities in *Chroococcidiopsis* sp. CCME 029 survivors after prolonged desiccation revealed by molecular probes and genome stability assays. *Extremophiles*, 13(1), 49–57. <https://doi.org/10.1007/s00792-008-0196-0>

- Billi, D. (2012). Plasmid stability in dried cells of the desert cyanobacterium *Chroococcidiopsis* and its potential for GFP imaging of survivors on Earth and in space. *Orig Life Evol Biosph*, 42(2–3), 235–245. <https://doi.org/10.1007/s11084-012-9277-2>
- Billi, D. y Caiola, M. G. (1996). Effects of nitrogen limitation and starvation on *Chroococcidiopsis* sp.(Chroococcales). *New Phytologist*, 133(4), 563–571.
- Billi, D. y Fernandez, B. G. y Fagiarone, C. y Chiavarini, S. y Rothschild, L. J. (2021). Exploiting a perchlorate-tolerant desert cyanobacterium to support bacterial growth for in situ resource utilization on Mars. *International Journal of Astrobiology*, 20(1), 29–35.
- Billi, D. y Friedmann, E. I. y Helm, R. F. y Potts, M. (2001). Gene transfer to the desiccation-tolerant cyanobacterium *Chroococcidiopsis*. *J Bacteriol*, 183(7), 2298–2305. <https://doi.org/10.1128/JB.183.7.2298-2305.2001>
- Billi, D. y Staibano, C. y Verseux, C. y Fagiarone, C. y Mosca, C. y Baque, M. y Rabbow, E. y Rettberg, P. (2019). Dried Biofilms of Desert Strains of *Chroococcidiopsis* Survived Prolonged Exposure to Space and Mars-like Conditions in Low Earth Orbit. *Astrobiology*, 19(8), 1008–1017. <https://doi.org/10.1089/ast.2018.1900>
- Bishé, B. y Taton, A. y Golden, J. W. (2019). Modification of RSF1010-based broad-host-range plasmids for improved conjugation and cyanobacterial bioprospecting. *IScience*, 20, 216–228.
- Blin, K. y Shaw, S. y Kloosterman, A. M. y Charlop-Powers, Z. y van Wezel, G. P. y Medema, M. H. y Weber, T. (2021). antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W29–W35.
- Bogard, M. J. y Vogt, R. J. y Hayes, N. M. y Leavitt, P. R. (2020). Unabated Nitrogen Pollution Favors Growth of Toxic Cyanobacteria over Chlorophytes in Most Hypereutrophic Lakes. *Environ Sci Technol*, 54(6), 3219–3227. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b06299>
- Boison, G. y Mergel, A. y Jolkver, H. y Bothe, H. (2004). Bacterial life and dinitrogen fixation at a gypsum rock. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7070–7077.
- Boone, D. R. y Castenholz, R. W. y Garrity, G. M. (2001). *Vol. 1: The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria*. Springer, New York.
- Bothe, H. (2019). The Cyanobacterium *Chroococcidiopsis* and Its Potential for Life on Mars. *Journal of Astrobiology and Space Science Reviews*, 2, 398–412.
- Brenes-Guillen, L. y Vidaurre-Barahona, D. y Morales, S. y Mora-Lopez, M. y Sittenfeld, A. y Uribe-Lorio, L. (2021). Novel Cyanobacterial Diversity Found in Costa Rican Thermal Springs Associated with Rincon de la Vieja and Miravalles Volcanoes: A Polyphasic Approach. *J Phycol*, 57(1), 183–198. <https://doi.org/10.1111/jpy.13077>
- Brennan, L. y Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557–577.

- Cai, F. y Axen, S. D. y Kerfeld, C. A. (2013). Evidence for the widespread distribution of CRISPR-Cas system in the Phylum Cyanobacteria. *RNA Biol*, 10(5), 687–693. <https://doi.org/10.4161/rna.24571>
- Cai, X. y Seitzl, I. y Mu, W. y Zhang, T. y Stressler, T. y Fischer, L. y Jiang, B. (2018). Biotechnical production of trehalose through the trehalose synthase pathway: current status and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(7), 2965–2976.
- Cameron, D. E. y Collins, J. J. (2014). Tunable protein degradation in bacteria. *Nature Biotechnology*, 32(12), 1276–1281.
- Cao, J. y Xu, Z. y Qiu, G. y Li, B. (1999). Studies on the sensitivity of *Spirulina platensis* to antibiotics and herbicide: relationship with selectable markers for genetic transformation. *Bioresource Technology*, 70(1), 89–93.
- Cao, Y.-Q. y Li, Q. y Xia, P.-F. y Wei, L.-J. y Guo, N. y Li, J.-W. y Wang, S.-G. (2017). AraBAD based toolkit for gene expression and metabolic robustness improvement in *Synechococcus elongatus*. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10.
- Casero, M. C. y Ascaso, C. y Quesada, A. y Mazur-Marzec, H. y Wierzchos, J. (2021). Response of endolithic Chroococciopsis strains from the polyextreme Atacama Desert to light radiation. *Frontiers in Microbiology*, 3607.
- Cassier-Chauvat, C. y Chauvat, F. (2018). Cyanobacteria: wonderful microorganisms for basic and applied research. *ELS*, 1–11.
- Castillo-López, M. y Galán, B. y Carmona, M. y Navarro Llorens, J. M. y Peretó, J. y Porcar, M. y Getino, L. y Olivera, E. R. y Luengo, J. M. y Castro, L. (2021). Xerotolerance: A New Property in *Exiguobacterium* Genus. *Microorganisms*, 9(12), 2455.
- Cengic, I. y Cañadas, I. C. y Minton, N. P. y Hudson, E. P. (2022). Inducible CRISPR/Cas9 allows for multiplexed and rapidly segregated single target genome editing in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *BioRxiv*, 2022.03.02.482598. <https://doi.org/10.1101/2022.03.02.482598>
- Cha, T. S. y Yee, W. y Aziz, A. (2012). Assessment of factors affecting *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1771–1779. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0991-0>
- Chauvat, F. y Astier, C. y Vedel, F. y Joset-Espardellier, F. (1983). Transformation in the cyanobacterium *Synechococcus* R2: Improvement of efficiency; Role of the pUH24 plasmid. *Molecular and General Genetics MGG*, 191(1), 39–45. <https://doi.org/10.1007/BF00330887>
- Cheah, Y. E. y Albers, S. C. y Peebles, C. A. M. (2013). A novel counter-selection method for markerless genetic modification in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnology Progress*, 29(1), 23–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/btpr.1661>

- Cheevadhanarak, S. y Paithoonrangarid, K. y Prommeenate, P. y Kaewngam, W. y Musigkain, A. y Tragoonrung, S. y Tabata, S. y Kaneko, T. y Chaijaruwanich, J. y Sangsrakru, D. (2012). Draft genome sequence of *Arthrospira platensis* C1 (PCC9438). *Standards in Genomic Sciences*, 6(1), 43–53.
- Chen, W. y Zheng, L. y Dong, J. y Ge, H. y Huang, X. y Wang, G. y Huang, C. y Wang, Y. y Lu, D. y Xu, W. y Wang, Y. (2021). A Systematic Survey of the Light/Dark-dependent Protein Degradation Events in a Model Cyanobacterium. *Mol Cell Proteomics*, 20, 100162. <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2021.100162>
- Chen, Y. y Taton, A. y Go, M. y London, R. E. y Pieper, L. M. y Golden, S. S. y Golden, J. W. (2016). Self-replicating shuttle vectors based on pANS, a small endogenous plasmid of the unicellular cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Microbiology (United Kingdom)*, 162(12), 2029–2041. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.000377/CITE/REFWORKS>
- Choi, G. y Bae, M.-S. y Ahn, C.-Y. y Oh, H.-M. (2008). Enhanced Biomass and γ -Linolenic Acid Production of Mutant Strain *Arthrospira platensis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(3), 539–544.
- Choi, S. Y. y Woo, H. M. (2020). CRISPRi-dCas12a: a dCas12a-mediated CRISPR interference for repression of multiple genes and metabolic engineering in cyanobacteria. *ACS Synthetic Biology*, 9(9), 2351–2361.
- Cobb, R. E. y Wang, Y. y Zhao, H. (2015). High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system. *ACS Synthetic Biology*, 4(6), 723–728.
- Cockell, C. S. y Brown, S. y Landenmark, H. y Samuels, T. y Siddall, R. y Wadsworth, J. (2017). Liquid water restricts habitability in extreme deserts. *Astrobiology*, 17(4), 309–318.
- Cogne, G. y Lehmann, B. y Dussap, C. y Gros, J. (2003). Uptake of macrominerals and trace elements by the cyanobacterium *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis* PCC 8005) under photoautotrophic conditions: culture medium optimization. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(5), 588–593.
- Cohen, Y. y Jorgensen, B. B. y Revsbech, N. P. y Poplawski, R. (1986). Adaptation to Hydrogen Sulfide of Oxygenic and Anoxygenic Photosynthesis among Cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 51(2), 398–407. <https://doi.org/10.1128/aem.51.2.398-407.1986>
- Corrêa, P. S. y Teixeira, C. M. L. L. (2021). Polyhydroxyalkanoates and pigments coproduction by *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* cultivated in crude glycerol. *Journal of Applied Phycology*, 33(3), 1487–1500.
- Costa, N. B. y Kolman, M. A. y Giani, A. (2016). Cyanobacteria diversity in alkaline saline lakes in the Brazilian Pantanal wetland: a polyphasic approach. *Journal of Plankton Research*, 38(6), 1389–1403.

- Coutinho, P. M. y Deleury, E. y Davies, G. J. y Henrissat, B. (2003). An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *Journal of Molecular Biology*, 328(2), 307–317.
- Crozet, P. y Navarro, F. J. y Willmund, F. y Mehrshahi, P. y Bakowski, K. y Lauersen, K. J. y Perez-Perez, M. E. y Auroy, P. y Gorchs Rovira, A. y Sauret-Gueto, S. y Niemeyer, J. y Spaniol, B. y Theis, J. y Trosch, R. y Westrich, L. D. y Vavitsas, K. y Baier, T. y Hubner, W. y de Carpentier, F. y ... Lemaire, S. D. (2018). Birth of a Photosynthetic Chassis: A MoClo Toolkit Enabling Synthetic Biology in the Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *ACS Synth Biol*, 7(9), 2074–2086. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00251>
- Cuellar-Bermudez, S. P. y Romero-Ogawa, M. A. y Vannela, R. y Lai, Y. S. y Rittmann, B. E. y Parra-Saldivar, R. (2015). Effects of light intensity and carbon dioxide on lipids and fatty acids produced by *Synechocystis* sp. PCC6803 during continuous flow. *Algal Research*, 12, 10–16.
- Cui, J. y Sun, T. y Chen, L. y Zhang, W. (2020). Engineering salt tolerance of photosynthetic cyanobacteria for seawater utilization. *Biotechnology Advances*, 43, 107578.
- Cumbers, J. y Rothschild, L. J. (2014). Salt tolerance and polyphyly in the cyanobacterium *Chroococidiopsis* (Pleurocapsales). *J Phycol*, 50(3), 472–482. <https://doi.org/10.1111/jpy.12169>
- D'amato, D. y Korhonen, J. (2021). Integrating the green economy, circular economy and bioeconomy in a strategic sustainability framework. *Ecological Economics*, 188, 107143.
- de Lorenzo, V. (2014). Biología sintética: la ingeniería al asalto de la complejidad biológica. *Arbor*, 190(768), a149–a149.
- de Lorimier, R. y Guglielmi, G. y Bryant, D. A. y Stevens Jr, S. E. (1987). Functional expression of plastid allophycocyanin genes in a cyanobacterium. *Journal of Bacteriology*, 169(5), 1830–1835.
- Dehghani, J. y Adibkia, K. y Movafeghi, A. y Barzegari, A. y Pourseif, M. M. y Maleki Kakelar, H. y Golchin, A. y Omid, Y. (2018). Stable transformation of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*: a promising microalga for production of edible vaccines. *Appl Microbiol Biotechnol*, 102(21), 9267–9278. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9296-7>
- del Arco, J. y Sánchez-Murcia, P. A. y Mancheno, J. M. y Gago, F. y Fernandez-Lucas, J. (2018). Characterization of an atypical, thermostable, organic solvent- and acid-tolerant 2'-deoxyribosyltransferase from *Chroococidiopsis thermalis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 102(16), 6947–6957. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9134-y>
- Derikvand, P. y Llewellyn, C. A. y Purton, S. (2017). Cyanobacterial metabolites as a source of sunscreens and moisturizers: A comparison with current synthetic compounds. *European Journal of Phycology*, 52(1), 43–56.
- Dillon, J. G. y Tatsumi, C. M. y Tandingan, P. G. y Castenholz, R. W. (2002). Effect of environmental factors on the synthesis of scytonemin, a UV-screening pigment, in a cyanobacterium

- (Chroococciopsis sp.). *Arch Microbiol*, 177(4), 322–331. <https://doi.org/10.1007/s00203-001-0395-x>
- Ditty, J. L. y Williams, S. B. y Golden, S. S. (2003). A cyanobacterial circadian timing mechanism. *Annu Rev Genet*, 37, 513–543. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.142716>
- Dor, L. y Carl, N. y Baldinger, I. (1991). Polymorphism and salinity tolerance as a criterion for differentiation of three new species of Chroococciopsis (Chroococcales). *Algol. Stud.*, 64, 411–421.
- Dorado-Morales, P. y Vilanova, C. y Pereto, J. y Codoner, F. M. y Ramon, D. y Porcar, M. (2016). A highly diverse, desert-like microbial biocenosis on solar panels in a Mediterranean city. *Sci Rep*, 6, 29235. <https://doi.org/10.1038/srep29235>
- Doron, L. y Segal, N. y Shapira, M. (2016). Transgene Expression in Microalgae—From Tools to Applications . In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 7). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.00505>
- Drugă, B. y Bica, A. y Coman, C. y Nicoară, A. y Dragoș, N. (2009). New primer combination for sequencing the cyanobacterial 16S rRNA gene. . *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 14(1).
- Dubois, M. y Gilles, K. A. y Hamilton, J. K. y Rebers, P. T. y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. . *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.
- Durante-Rodríguez, G. y de Lorenzo, V. y Nikel, P. I. (2018). A Post-translational Metabolic Switch Enables Complete Decoupling of Bacterial Growth from Biopolymer Production in Engineered *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 7(11), 2686–2697. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00345>
- Dvořák, P. y Casamatta, D. A. y Hašler, P. y Jahodářová, E. y Norwich, A. R. y Pouličková, A. (2017). Diversity of the cyanobacteria. In *Modern topics in the phototrophic prokaryotes* (pp. 3–46). Springer.
- Elhai, J. y Vepritskiy, A. y Muro-Pastor, A. M. y Flores, E. y Wolk, C. P. (1997). Reduction of conjugal transfer efficiency by three restriction activities of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol*, 179(6), 1998–2005. <https://doi.org/10.1128/jb.179.6.1998-2005.1997>
- Elhai, J. y Wolk, C. P. (1988). Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol*, 167, 747–754. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)67086-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)67086-8)
- Engler, C. y Marillonnet, S. (2014). Golden gate cloning. In *DNA cloning and assembly methods* (pp. 119–131). Springer.
- Englund, E. y Liang, F. y Lindberg, P. (2016). Evaluation of promoters and ribosome binding sites for biotechnological applications in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Scientific Reports*, 6(1), 1–12.

- Esbelin, J. y Santos, T. y Hébraud, M. (2018). Desiccation: an environmental and food industry stress that bacteria commonly face. *Food Microbiology*, 69, 82–88.
- Etzel, M. y Mörl, M. (2017). Synthetic riboswitches: from plug and pray toward plug and play. *Biochemistry*, 56(9), 1181–1198.
- Evangelista, V. y Barsanti, L. y Frassanito, A. M. y Passarelli, V. y Gualtieri, P. (2008). Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection. In *Springer Science & Business Media*. Springer Science & Business Media.
- Fabris, M. y Abbriano, R. M. y Pernice, M. y Sutherland, D. L. y Commault, A. S. y Hall, C. C. y Labeeuw, L. y McCauley, J. I. y Kuzhiuparambil, U. y Ray, P. y Kahlke, T. y Ralph, P. J. (2020). Emerging Technologies in Algal Biotechnology: Toward the Establishment of a Sustainable, Algae-Based Bioeconomy. *Front Plant Sci*, 11, 279. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00279>
- Fagliarone, C. y Mosca, C. y Ubaldi, I. y Verseux, C. y Baque, M. y Wilmotte, A. y Billi, D. (2017). Avoidance of protein oxidation correlates with the desiccation and radiation resistance of hot and cold desert strains of the cyanobacterium *Chroococcidiopsis*. *Extremophiles*, 21(6), 981–991. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0957-8>
- Fagliarone, C. y Napoli, A. y Chiavarini, S. y Baqué, M. y de Vera, J.-P. y Billi, D. (2020). Biomarker preservation and survivability under extreme dryness and Mars-like UV flux of a desert cyanobacterium capable of trehalose and sucrose accumulation. *Frontiers in Astronomy and Space Sciences*, 7, 31.
- Fang, M. y Jin, L. y Zhang, C. y Tan, Y. y Jiang, P. y Ge, N. y Li, H. y Xing, X. (2013). Rapid mutation of *Spirulina platensis* by a new mutagenesis system of atmospheric and room temperature plasmas (ARTP) and generation of a mutant library with diverse phenotypes. *PloS One*, 8(10), e77046.
- Fernández-Rodríguez, J. y Voigt, C. A. (2016). Post-translational control of genetic circuits using Potyvirus proteases. *Nucleic Acids Research*, 44(13), 6493–6502. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw537>
- Ferreira, E. A. y Pacheco, C. C. y Pinto, F. y Pereira, J. y Lamosa, P. y Oliveira, P. y Kirov, B. y Jaramillo, A. y Tamagnini, P. (2018). Expanding the toolbox for *Synechocystis* sp. PCC 6803: validation of replicative vectors and characterization of a novel set of promoters. *Synthetic Biology*, 3(1), ysy014.
- Fleming, E. D. y Castenholz, R. W. (2007). Effects of periodic desiccation on the synthesis of the UV-screening compound, scytonemin, in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 9(6), 1448–1455.
- Forján, E. y Navarro, F. y Cuaresma, M. y Vaquero, I. y Ruíz-Domínguez, M. C. y Gojkovic, Ž. y Vázquez, M. y Marquez, M. y Mogedas, B. y Bermejo, E. (2015). Microalgae: fast-growth sustainable green factories. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(16), 1705–1755.

- Friedmann, E. I. (1980). Endolithic microbial life in hot and cold deserts. In *Limits of life* (pp. 33–45). Springer.
- Fujisawa, T. y Narikawa, R. y Okamoto, S. y Ehira, S. y Yoshimura, H. y Suzuki, I. y Masuda, T. y Mochimaru, M. y Takaichi, S. y Awai, K. (2010). Genomic structure of an economically important cyanobacterium, *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* NIES-39. *DNA Research*, 17(2), 85–103.
- Furmaniak, M. A. y Misztak, A. E. y Franczuk, M. D. y Wilmotte, A. y Waleron, M. y Waleron, K. F. (2017). Edible Cyanobacterial Genus *Arthrospira*: Actual State of the Art in Cultivation Methods, Genetics, and Application in Medicine. *Front Microbiol*, 8, 2541. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02541>
- Gale, G. A. R. y Schiavon Osorio, A. A. y Mills, L. A. y Wang, B. y Lea-Smith, D. J. y McCormick, A. J. (2019). Emerging Species and Genome Editing Tools: Future Prospects in Cyanobacterial Synthetic Biology. *Microorganisms*, 7(10). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100409>
- Gao, Q. y Garcia-Pichel, F. (2011). Microbial ultraviolet sunscreens. *Nature Reviews Microbiology*, 9(11), 791–802.
- Gao, X. y Jing, X. y Liu, X. y Lindblad, P. (2021). Biotechnological production of the sunscreen pigment scytonemin in cyanobacteria: progress and strategy. *Marine Drugs*, 19(3), 129.
- Gaogen, W. y Xiaonan, Z. y Baohong, Z. y Xuecheng, Z. (2001). Study on sensitivities of *Spirulina* sp. to six antibiotics. *Gaojishu Tongxun*, 11(7), 6–12.
- García-Gutiérrez, C. y Aparicio, T. y Torres-Sanchez, L. y Martínez-García, E. y de Lorenzo, V. y Villar, C. J. y Lombo, F. (2020). Multifunctional SEVA shuttle vectors for actinomycetes and Gram-negative bacteria. *Microbiologyopen*, 9(6), 1135–1149. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1024>
- Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16–37.
- Gerasimenko, L. M. y Orleanskii, V. K. y Karpov, G. A. y Ushatinskaia, G. T. (2013). [Interaction of cyanobacteria with volcanic ash]. *Mikrobiologiya*, 82(1), 115–122. <https://doi.org/10.7868/s0026365612060067>
- Golakoti, T. y Yoshida, W. Y. y Chaganty, S. y Moore, R. E. (2001). Isolation and structure determination of nostocyclopeptides A1 and A2 from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. ATCC53789. *Journal of Natural Products*, 64(1), 54–59.
- Golden, S. S. y Sherman, L. A. (1984). Optimal conditions for genetic transformation of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Journal of Bacteriology*, 158(1), 36–42. <https://doi.org/10.1128/jb.158.1.36-42.1984>

- Gonçalves, A. L. (2021). The use of microalgae and cyanobacteria in the improvement of agricultural practices: a review on their biofertilising, biostimulating and biopesticide roles. *Applied Sciences*, *11*(2), 871.
- Gordon, G. C. y Korosh, T. C. y Cameron, J. C. y Markley, A. L. y Begemann, M. B. y Pflieger, B. F. (2016). CRISPR interference as a titratable, trans-acting regulatory tool for metabolic engineering in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Metabolic Engineering*, *38*, 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.07.007>
- Green, M. R. y Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Fourth edi). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Grefte, V. R. G. y Michiels, J. (2020). Desiccation-induced cell damage in bacteria and the relevance for inoculant production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(9), 3757–3770.
- Griese, M. y Lange, C. y Soppa, J. (2011). Ploidy in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Lett*, *323*(2), 124–131. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02368.x>
- Gross, W. y Heilmann, I. y Lenze, D. y Schnarrenberger, C. (2001). Biogeography of the Cyanodiaceae (Rhodophyta) based on 18S ribosomal RNA sequence data. *European Journal of Phycology*, *36*(3), 275–280.
- Guan, J. y Shen, S. y Wu, H. y Liu, X. y Shen, W. y He, Y. y Duan, R. (2017). Biomass and terpenoids produced by mutant strains of *Arthrospira* under low temperature and light conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *33*(2), 1–14.
- Guerreiro, A. C. L. y Benevento, M. y Lehmann, R. y van Breukelen, B. y Post, H. y Giansanti, P. y Altelaar, A. F. M. y Axmann, I. M. y Heck, A. J. R. (2014). Daily Rhythms in the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* Probed by High-resolution Mass Spectrometry-based Proteomics Reveals a Small Defined Set of Cyclic Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*, *13*(8), 2042–2055. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035840>
- Hagemann, M. y Gartner, K. y Scharnagl, M. y Bolay, P. y Lott, S. C. y Fuss, J. y Huettel, B. y Reinhardt, R. y Klahn, S. y Hess, W. R. y Gärtner, K. y Scharnagl, M. y Bolay, P. y Lott, S. C. y Fuss, J. y Huettel, B. y Reinhardt, R. y Klähn, S. y Hess, W. R. (2018). Identification of the DNA methyltransferases establishing the methylome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res*, *25*(4), 343–352. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsy006>
- Hanahan, D. y Jessee, J. y Bloom, F. R. (1991). [4] Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in Enzymology*, *204*, 63–113.
- Heidorn, T. y Camsund, D. y Huang, H. H. y Lindberg, P. y Oliveira, P. y Stensjo, K. y Lindblad, P. (2011). Synthetic biology in cyanobacteria engineering and analyzing novel functions. *Methods Enzymol*, *497*, 539–579. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385075-1.00024-X>
- Hein, S. y Scholz, I. y Voß, B. y Hess, W. R. (2013). Adaptation and modification of three CRISPR loci in two closely related cyanobacteria. *RNA Biology*, *10*(5), 852–864.

- Hellens, R. y Mullineaux, P. y Klee, H. (2000). Technical focus: a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*, 5(10), 446–451.
- Hena, S. y Znad, H. y Heong, K. T. y Judd, S. (2018). Dairy farm wastewater treatment and lipid accumulation by *Arthrospira platensis*. *Water Research*, 128, 267–277.
- Heneberg, P. y Jegorov Jr, A. y Šimek, P. (2020). Peroral administration of beauverolides allows their transport into the peripheral blood and urine. *CyTA-Journal of Food*, 18(1), 644–652.
- Herrmann, A. J. y Gehringer, M. M. (2019). An investigation into the effects of increasing salinity on photosynthesis in freshwater unicellular cyanobacteria during the late Archaean. *Geobiology*, 17(4), 343–359.
- Hess, W. R. (2011). Cyanobacterial genomics for ecology and biotechnology. *Curr Opin Microbiol*, 14(5), 608–614. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.07.024>
- Higo, A. y Isu, A. y Fukaya, Y. y Ehira, S. y Hisabori, T. (2018). Application of CRISPR Interference for Metabolic Engineering of the Heterocyst-Forming Multicellular Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Plant Cell Physiol*, 59(1), 119–127. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx166>
- Hitchcock, A. y Hunter, C. N. y Canniffe, D. P. (2020). Progress and challenges in engineering cyanobacteria as chassis for light-driven biotechnology. *Microbial Biotechnology*, 13(2), 363–367.
- Hoffmann, D. y Hevel, J. M. y Moore, R. E. y Moore, B. S. (2003). Sequence analysis and biochemical characterization of the nostopeptolide A biosynthetic gene cluster from *Nostoc* sp. GSV224. *Gene*, 311, 171–180.
- Hou, S. y Brenes-Álvarez, M. y Reimann, V. y Alkhnabashi, O. S. y Backofen, R. y Muro-Pastor, A. M. y Hess, W. R. (2019). CRISPR-Cas systems in multicellular cyanobacteria. *RNA Biology*, 16(4), 518–529.
- Huang, C. H. y Shen, C. R. y Li, H. y Sung, L. Y. y Wu, M. Y. y Hu, Y. C. (2016). CRISPR interference (CRISPRi) for gene regulation and succinate production in cyanobacterium *S-elongatus* PCC 7942. *Microbial Cell Factories*, 15. <https://doi.org/ARTN 196 10.1186/s12934-016-0595-3>
- Huang y Camsund, D. y Lindblad, P. y Heidorn, T. (2010). Design and characterization of molecular tools for a Synthetic Biology approach towards developing cyanobacterial biotechnology. *Nucleic Acids Res*, 38(8), 2577–2593. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq164>
- Huang, H.-H. y Lindblad, P. (2013). Wide-dynamic-range promoters engineered for cyanobacteria. *Journal of Biological Engineering*, 7(1), 1–11.
- Hussain, A. y Hasnain, S. (2011). Phytostimulation and biofertilization in wheat by cyanobacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(1), 85–92.

- Immethun, C. M. y Moon, T. S. (2018). Synthetic Gene Regulation in Cyanobacteria. *Adv Exp Med Biol*, 1080, 317–355. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0854-3_13
- Iwaki, T. y Haranoh, K. y Inoue, N. y Kojima, K. y Satoh, R. y Nishino, T. y Wada, S. y Ihara, H. y Tsuyama, S. y Kobayashi, H. y Wadano, A. (2006). Expression of foreign type I ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase (EC 4.1.1.39) stimulates photosynthesis in cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 cells. *Photosynthesis Research*, 88(3), 287. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9048-x>
- Izert, M. A. y Klimecka, M. M. y Górna, M. W. (2021). Applications of Bacterial Degrons and Degradors—Toward Targeted Protein Degradation in Bacteria. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 348.
- Jaiswal, D. y Sahasrabudde, D. y Wangikar, P. P. (2022). Cyanobacteria as cell factories: the roles of host and pathway engineering and translational research. *Curr Opin Biotechnol*, 73, 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.09.010>
- Jaiswal, D. y Sengupta, A. y Sohoni, S. y Sengupta, S. y Phadnavis, A. G. y Pakrasi, H. B. y Wangikar, P. P. (2018). Genome Features and Biochemical Characteristics of a Robust, Fast Growing and Naturally Transformable Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 11801 Isolated from India. *Sci Rep*, 8(1), 16632. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34872-z>
- Jeamton, W. y Dulsawat, S. y Tanticharoen, M. y Vonshak, A. y Cheevadhanarak, S. (2017). Overcoming intrinsic restriction enzyme barriers enhances transformation efficiency in *Arthrospira platensis* C1. *Plant and Cell Physiology*, 58(4), 822–830.
- Jeong, Y. y Cho, S. H. y Lee, H. y Choi, H. K. y Kim, D. M. y Lee, C. G. y Cho, S. y Cho, B. K. (2020). Current Status and Future Strategies to Increase Secondary Metabolite Production from Cyanobacteria. *Microorganisms*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121849>
- Jester, B. W. y Zhao, H. y Gewe, M. y Adame, T. y Perruzza, L. y Bolick, D. T. y Agosti, J. y Khuong, N. y Kuestner, R. y Gamble, C. (2022). Development of spirulina for the manufacture and oral delivery of protein therapeutics. *Nature Biotechnology*, 1–9.
- Jin, H. y Wang, Y. y Idoine, A. y Bhaya, D. (2018). Construction of a shuttle vector using an endogenous plasmid from the cyanobacterium *synechocystis* sp. PCC6803. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL), 1662. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01662/BIBTEX>
- Johansen, J. R. y Britton, C. y Rosati, T. C. y Xuesong, L. y StClair, L. L. y Webb, B. L. y Kennedy, A. J. y Yanko, K. S. (2001). Microbiotic crusts of the Mojave Desert: factors influencing distribution and abundance. *Nova Hedwigia Beiheft*, 123, 341–372.
- Jones, M. R. y Pinto, E. y Torres, M. A. y Dorr, F. y Mazur-Marzec, H. y Szubert, K. y Tartaglione, L. y Dell'Aversano, C. y Miles, C. O. y Beach, D. G. y McCarron, P. y Sivonen, K. y Fewer, D. P. y Jokela, J. y Janssen, E. M. (2021). CyanoMetDB, a comprehensive public database of secondary metabolites from cyanobacteria. *Water Res*, 196, 117017. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117017>

- Kachel, B. y Mack, M. (2020). Engineering of *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 for the photoautotrophic production of light-sensitive riboflavin (vitamin B2). *Metab Eng*, 62, 275–286. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.09.010>
- Kaczmarzyk, D. y Cengic, I. y Yao, L. y Hudson, E. P. (2018). Diversion of the long-chain acyl-ACP pool in *Synechocystis* to fatty alcohols through CRISPRi repression of the essential phosphate acyltransferase PlsX. *Metabolic Engineering*, 45, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.11.014>
- Kahne, S. C. y Darwin, K. H. (2021). Structural determinants of regulated proteolysis in pathogenic bacteria by ClpP and the proteasome. *Current Opinion in Structural Biology*, 67, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.09.012>
- Kapust, R. B. y Tözsér, J. y Fox, J. D. y Anderson, D. E. y Cherry, S. y Copeland, T. D. y Waugh, D. S. (2001). Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Engineering*, 14(12), 993–1000.
- Karlsen, J. y Asplund-Samuelsson, J. y Jahn, M. y Vitay, D. y Hudson, E. P. (2021). Slow Protein Turnover Explains Limited Protein-Level Response to Diurnal Transcriptional Oscillations in Cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/ARTN 657379> 10.3389/fmicb.2021.657379
- Kathiresan, S. y Sarada, R. (2009). Towards genetic improvement of commercially important microalga *Haematococcus pluvialis* for biotech applications. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 553. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9414-0>
- Katoh, H. y Shiga, Y. y Nakahira, Y. y Ohmori, M. (2003). Isolation and characterization of a drought-tolerant cyanobacterium, *Nostoc* sp. HK-01. *Microbes and Environments*, 18(2), 82–88.
- Kawata, Y. y Yano, S. y Kojima, H. y Toyomizu, M. (2004). Transformation of *Spirulina platensis* strain C1 (*Arthrospira* sp. PCC9438) with Tn5 transposase–transposon DNA–cation liposome complex. *Marine Biotechnology*, 6(4), 355–363.
- Kelly, C. L. y Taylor, G. M. y Hitchcock, A. y Torres-Mendez, A. y Heap, J. T. (2018). A rhamnose-inducible system for precise and temporal control of gene expression in cyanobacteria. *ACS Synthetic Biology*, 7(4), 1056–1066.
- Khomutovska, N. y de Los Ríos, A. y Jasser, I. (2020). Diversity and colonization strategies of endolithic cyanobacteria in the cold mountain desert of Pamir. *Microorganisms*, 9(1), 6.
- Kim, W. J. y Lee, S.-M. y Um, Y. y Sim, S. J. y Woo, H. M. (2017). Development of SyneBrick vectors as a synthetic biology platform for gene expression in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Frontiers in Plant Science*, 8, 293.
- Kimura, Y. y Kimura, S. y Sato, S. y Katoh, H. y Abe, T. y Arai, M. y Tomita-Yokotani, K. (2015). Evaluation of a cyanobacterium, *Nostoc* sp. HK-01, as food material for space agriculture on Mars. *Biological Sciences in Space*, 29, 24–31.

- Knoot, C. J. y Biswas, S. y Pakrasi, H. B. (2019). Tunable repression of key photosynthetic processes using Cas12a CRISPR interference in the fast-growing Cyanobacterium *Synechococcus* sp. UTEX 2973. *ACS Synthetic Biology*, 9(1), 132–143.
- Koonin, E. v y Makarova, K. S. (2019). Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 374(1772), 20180087.
- Kose, A. y Ozen, M. O. y Elibol, M. y Oncel, S. S. (2017). Investigation of in vitro digestibility of dietary microalga *Chlorella vulgaris* and cyanobacterium *Spirulina platensis* as a nutritional supplement. *3 Biotech*, 7(3), 170. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0832-4>
- Kumar, J. y Singh, D. y Tyagi, M. B. y Kumar, A. (2019). Cyanobacteria: Applications in biotechnology. In *Cyanobacteria* (pp. 327–346). Elsevier.
- Lacroix, B. y Citovsky, V. (2018). Beyond *Agrobacterium*-mediated transformation: horizontal gene transfer from bacteria to eukaryotes. *Agrobacterium Biology*, 443–462.
- Lang, J. D. y Haselkorn, R. (1991). A vector for analysis of promoters in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology*, 173(8), 2729–2731.
- Larson, M. H. y Gilbert, L. A. y Wang, X. y Lim, W. A. y Weissman, J. S. y Qi, L. S. (2013). CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nature Protocols*, 8(11), 2180–2196.
- Larsson, J. y Nylander, J. A. y Bergman, B. (2011). Genome fluctuations in cyanobacteria reflect evolutionary, developmental and adaptive traits. *BMC Evol Biol*, 11, 187. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-187>
- Laurenceau, R. y Bliem, C. y Osburne, M. S. y Becker, J. W. y Biller, S. J. y Cubillos-Ruiz, A. y Chisholm, S. W. (2020). Toward a genetic system in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Access Microbiology*, 2(4), acmi000107–acmi000107. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000107>
- Leino, H. y Kosourov, S. N. y Saari, L. y Sivonen, K. y Tsygankov, A. A. y Aro, E.-M. y Allahverdiyeva, Y. (2012). Extended H₂ photoproduction by N₂-fixing cyanobacteria immobilized in thin alginate films. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(1), 151–161.
- Liaimer, A. y Helfrich, E. J. N. y Hinrichs, K. y Guljamow, A. y Ishida, K. y Hertweck, C. y Dittmann, E. (2015). Nostopeptolide plays a governing role during cellular differentiation of the symbiotic cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(6), 1862–1867.
- Liaimer, A. y Jensen, J. B. y Dittmann, E. (2016). A genetic and chemical perspective on symbiotic recruitment of cyanobacteria of the genus *Nostoc* into the host plant *Blasia pusilla* L. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1693.

- Lin, P. C. y Zhang, F. y Pakrasi, H. B. (2020). Enhanced production of sucrose in the fast-growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. *Sci Rep*, 10(1), 390. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57319-5>
- Lin y Tan, S.-I. y Hsiang, C.-C. y Sung, P.-K. y Ng, I.-S. (2019). Challenges and opportunity of recent genome editing and multi-omics in cyanobacteria and microalgae for biorefinery. *Bioresource Technology*, 291, 121932.
- Lin, Z. y Li, H. y He, L. y Jing, Y. y Pistorozzi, M. y Wang, T. y Ye, Y. (2021). Efficient genome editing for *Pseudomonas aeruginosa* using CRISPR-Cas12a. *Gene*, 790, 145693. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145693>
- Liu, C. y Li, L.-J. y Wu, C.-Y. y Guo, K.-N. y Li, J.-H. (2016). Growth and antioxidant production of *Spirulina* in different NaCl concentrations. *Biotechnology Letters*, 38(7), 1089–1096.
- Liu, D. y Pakrasi, H. B. (2018). Exploring native genetic elements as plug-in tools for synthetic biology in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–8.
- Liu y Johnson, V. M. y Pakrasi, H. B. (2020). A Reversibly Induced CRISPRi System Targeting Photosystem II in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *ACS Synthetic Biology*, 9(6), 1441–1449. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00106>
- Liu, Q. y Huang, Y. y Zhang, R. y Cai, T. y Cai, Y. (2016). Medical application of *Spirulina platensis* derived C-phycoerythrin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.
- Ludwig, A. y Heimbucher, T. y Gregor, W. y Czerny, T. y Schmetterer, G. (2008). Transformation and gene replacement in the facultatively chemoheterotrophic, unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6714 by electroporation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(4), 729–735.
- Ludwig, M. y Bryant, D. A. (2012). *Synechococcus* sp. Strain PCC 7002 Transcriptome: Acclimation to Temperature, Salinity, Oxidative Stress, and Mixotrophic Growth Conditions. *Front Microbiol*, 3, 354. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00354>
- Lupatini, A. L. y Colla, L. M. y Canan, C. y Colla, E. (2017). Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. *J Sci Food Agric*, 97(3), 724–732. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7987>
- Ma, A. T. y Schmidt, C. M. y Golden, J. W. (2014). Regulation of gene expression in diverse cyanobacterial species by using theophylline-responsive riboswitches. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(21), 6704–6713.
- Markley, A. L. y Begemann, M. B. y Clarke, R. E. y Gordon, G. C. y Pflieger, B. F. (2015). Synthetic biology toolbox for controlling gene expression in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *ACS Synth Biol*, 4(5), 595–603. <https://doi.org/10.1021/sb500260k>
- Marraffini, L. A. (2015). CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*, 526(7571), 55–61.

- Marraffini, L. A. y Sontheimer, E. J. (2008). CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*, 322(5909), 1843–1845.
- Martínez, V. y Lauritsen, I. y Hobel, T. y Li, S. Y. y Nielsen, A. T. y Nørholm, M. H. H. y Martínez, V. y Lauritsen, I. y Hobel, T. y Li, S. Y. y Nielsen, A. T. y Nørholm, M. H. H. (2017). CRISPR/Cas9-based genome editing for simultaneous interference with gene expression and protein stability. *Nucleic Acids Research*, 45(20), e171–e171. https://doi.org/ARTN_e171_10.1093/nar/gkx797
- Martínez-García, E. y Aparicio, T. y de Lorenzo, V. y Nikel, P. I. (2014). New transposon tools tailored for metabolic engineering of Gram-negative microbial cell factories. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2, 46.
- Masuko, T. y Minami, A. y Iwasaki, N. y Majima, T. y Nishimura, S. y Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Anal Biochem*, 339(1), 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>
- Matsumoto, M. y Sugiyama, H. y Maeda, Y. y Sato, R. y Tanaka, T. y Matsunaga, T. (2010). Marine diatom, *Navicula* sp. strain JPCC DA0580 and marine green alga, *Chlorella* sp. strain NKG400014 as potential sources for biodiesel production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161(1), 483–490.
- Matsunaga, T. y Takeyama, H. (1995). Genetic engineering in marine cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology*, 7(1), 77–84.
- McGinness, K. E. y Baker, T. A. y Sauer, R. T. (2006). Engineering controllable protein degradation. *Molecular Cell*, 22(5), 701–707.
- Medwed, C. y Holzinger, A. y Hofer, S. y Hartmann, A. y Michalik, D. y Glaser, K. y Karsten, U. (2021). Ecophysiological, morphological, and biochemical traits of free-living *Diplosphaera chodatii* (Trebouxiophyceae) reveal adaptation to harsh environmental conditions. *Protoplasma*, 258(6), 1187–1199.
- Meliawati, M. y Schilling, C. y Schmid, J. (2021). Recent advances of Cas12a applications in bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(8), 2981–2990.
- Mikhailyuk, T. I. y Vinogradova, O. N. y Glaser, K. y Karsten, U. (2016). New taxa for the flora of Ukraine, in the context of modern approaches to taxonomy of Cyanoprokaryota/Cyanobacteria. *International Journal on Algae*, 18(4).
- Mishra, A. y Tandon, R. y Kesarwani, S. y Singh, R. y Tiwari, G. L. (2015). Emerging applications of cyanobacterial ultraviolet protecting compound scytonemin. *Journal of Applied Phycology*, 27(3), 1045–1051.
- Mishra, S. y Sinha, R. P. (2022). Biotechnological exploitation of cyanobacterial photoprotective metabolites. *Vegetos*, 1–17.

- Montero-Lobato, Z. y Fuentes, J. L. y Garbayo, I. y Ascaso, C. y Wierzchos, J. y Vega, J. M. y Vílchez, C. (2020). Identification, biochemical composition and phycobiliproteins production of *Chroococcidiopsis* sp. from arid environment. *Process Biochemistry*, 97, 112–120.
- Morin, N. y Vallaeys, T. y Hendrickx, L. y Natalie, L. y Wilmotte, A. (2010). An efficient DNA isolation protocol for filamentous cyanobacteria of the genus *Arthrospira*. *Journal of Microbiological Methods*, 80(2), 148–154.
- Morris, J. N. y Eaton-Rye, J. J. y Summerfield, T. C. (2017). Phenotypic variation in wild-type substrains of the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *New Zealand Journal of Botany*, 55(1), 25–35.
- Morseletto, P. (2020). Targets for a circular economy. *Resources, Conservation and Recycling*, 153, 104553.
- Mosca, C. y Fagliarone, C. y Napoli, A. y Rabbow, E. y Rettberg, P. y Billi, D. (2021). Revival of Anhydrobiotic Cyanobacterium Biofilms Exposed to Space Vacuum and Prolonged Dryness: Implications for Future Missions beyond Low Earth Orbit. *Astrobiology*, 21(5), 541–550. <https://doi.org/10.1089/ast.2020.2359>
- Mosca, C. y Rothschild, L. J. y Napoli, A. y Ferre, F. y Pietrosanto, M. y Fagliarone, C. y Baque, M. y Rabbow, E. y Rettberg, P. y Billi, D. (2019). Over-Expression of UV-Damage DNA Repair Genes and Ribonucleic Acid Persistence Contribute to the Resilience of Dried Biofilms of the Desert Cyanobacterium *Chroococcidiopsis* Exposed to Mars-Like UV Flux and Long-Term Desiccation. *Front Microbiol*, 10, 2312. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02312>
- Moscovici, M. (2015). Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1012.
- Mruk, I. y Kobayashi, I. (2014). To be or not to be: regulation of restriction–modification systems and other toxin–antitoxin systems. *Nucleic Acids Research*, 42(1), 70–86.
- Mühlenhoff, U. y Chauvat, F. (1996). Gene transfer and manipulation in the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Molecular and General Genetics MGG*, 252(1), 93–100.
- Muñoz-Martín, M. A. y Becerra-Absalon, I. y Perona, E. y Fernandez-Valbuena, L. y Garcia-Pichel, F. y Mateo, P. (2019). Cyanobacterial biocrust diversity in Mediterranean ecosystems along a latitudinal and climatic gradient. *New Phytol*, 221(1), 123–141. <https://doi.org/10.1111/nph.15355>
- Murik, O. y Oren, N. y Shotland, Y. y Raanan, H. y Treves, H. y Kedem, I. y Keren, N. y Hagemann, M. y Pade, N. y Kaplan, A. (2017). What distinguishes cyanobacteria able to revive after desiccation from those that cannot: the genome aspect. *Environmental Microbiology*, 19(2), 535–550.
- Mutalipassi, M. y Riccio, G. y Mazzella, V. y Galasso, C. y Somma, E. y Chiarore, A. y de Pascale, D. y Zupo, V. (2021). Symbioses of Cyanobacteria in Marine Environments: Ecological Insights

- and Biotechnological Perspectives. *Mar Drugs*, 19(4).
<https://doi.org/10.3390/md19040227>
- Nayana, K. y Sudhakar, M. P. y Arunkumar, K. (2022). Biorefinery potential of *Coelastrella* biomass for fuel and bioproducts—a review. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1–14.
- Neilan, B. A. (1995). Identification and phylogenetic analysis of toxigenic cyanobacteria by multiplex randomly amplified polymorphic DNA PCR. *Appl Environ Microbiol*, 61(6), 2286–2291. <https://doi.org/10.1128/aem.61.6.2286-2291.1995>
- Nelson, C. y Garcia-Pichel, F. (2021). Beneficial Cyanosphere Heterotrophs Accelerate Establishment of Cyanobacterial Biocrust. *Appl Environ Microbiol*, 87(20), e0123621. <https://doi.org/10.1128/AEM.01236-21>
- Ng, A. y Berla, B. y Pakrasi, H. y Wommack, K. (2015). Fine-Tuning of Photoautotrophic Protein Production by Combining Promoters and Neutral Sites in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(19), 6857–6863. <https://doi.org/10.1128/AEM.01349-15>
- Nies, F. y Mielke, M. y Pochert, J. y Lamparter, T. (2020). Natural transformation of the filamentous cyanobacterium *Phormidium lacuna*. *PLoS One*, 15(6), e0234440. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234440>
- Niu, T. C. y Lin, G. M. y Xie, L. R. y Wang, Z. Q. y Xing, W. Y. y Zhang, J. Y. y Zhang, C. C. (2019). Expanding the potential of CRISPR-Cpf1-based genome editing technology in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *ACS Synth Biol*, 8(1), 170–180. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00437>
- Norena-Caro, D. y Benton, M. G. (2018). Cyanobacteria as photoautotrophic biofactories of high-value chemicals. *Journal of CO2 Utilization*, 28, 335–366.
- Nozzi, N. E. y Case, A. E. y Carroll, A. L. y Atsumi, S. (2017). Systematic approaches to efficiently produce 2, 3-butanediol in a marine cyanobacterium. *ACS Synthetic Biology*, 6(11), 2136–2144.
- Nudler, E. y Mironov, A. S. (2004). The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(1), 11–17.
- Ohtake, S. y Wang, Y. J. (2011). Trehalose: current use and future applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(6), 2020–2053.
- Oliveira, A. M. M. (2016). DNA methylation: a permissive mark in memory formation and maintenance. *Learning & Memory*, 23(10), 587–593.
- Osorio-Santos, K. y Pietrasiak, N. y Bohunická, M. y Miscoe, L. H. y Kováčik, L. y Martin, M. P. y Johansen, J. R. (2014). Seven new species of *Oculatella* (Pseudanabaenales, Cyanobacteria): taxonomically recognizing cryptic diversification. *European Journal of Phycology*, 49(4), 450–470.

- Pade, N. y Hagemann, M. (2014). Salt acclimation of cyanobacteria and their application in biotechnology. *Life*, 5(1), 25–49.
- Patel, V. K. y Sundaram, S. y Patel, A. K. y Kalra, A. (2018). Characterization of seven species of cyanobacteria for high-quality biomass production. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 43(1), 109–121.
- Pawluk, A. y Davidson, A. R. y Maxwell, K. L. (2018). Anti-CRISPR: discovery, mechanism and function. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 12–17.
- Perez Rojo, F. y Nyman, R. K. M. y Johnson, A. A. T. y Navarro, M. P. y Ryan, M. H. y Erskine, W. y Kaur, P. (2018). CRISPR-Cas systems: ushering in the new genome editing era. *Bioengineered*, 9(1), 214–221.
- Pietrasiak, N. y Osorio-Santos, K. y Shalygin, S. y Martin, M. P. y Johansen, J. R. (2019). When is a lineage a species? A case study in *Myxocorys* gen. nov. (Synechococcales: Cyanobacteria) with the description of two new species from the Americas. *Journal of Phycology*, 55(5), 976–996.
- Poole, L. B. y Parsonage, D. y Sergeant, S. y Miller, L. R. y Lee, J. y Furdai, C. M. y Chilton, F. H. (2020). Acyl-lipid desaturases and Vipp1 cooperate in cyanobacteria to produce novel omega-3 PUFA-containing glycolipids. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 83. <https://doi.org/10.1186/S13068-020-01719-7>
- Porcar, M. y Louie, K. B. y Kosina, S. M. y van Goethem, M. W. y Bowen, B. P. y Tanner, K. y Northen, T. R. (2018). Microbial Ecology on Solar Panels in Berkeley, CA, United States. *Front Microbiol*, 9, 3043. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03043>
- Prasad, B. y Vadakedath, N. y Jeong, H.-J. y General, T. y Cho, M.-G. y Lein, W. (2014). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of haptophytes (*Isochrysis* species). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(20), 8629–8639. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5900-7>
- Prasanna, S. N. (2007). Soil pH and its role in cyanobacterial abundance and diversity in rice field soils. *Applied Ecology and Environmental Research*, 5(2), 103–113.
- Pratheesh, P. T. y Vineetha, M. y Kurup, G. M. (2014). An Efficient Protocol for the *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation of Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Biotechnology*, 56(6), 507–515. <https://doi.org/10.1007/s12033-013-9720-2>
- Puente-Sánchez, F. y Arce-Rodríguez, A. y Oggerin, M. y García-Villadangos, M. y Moreno-Paz, M. y Blanco, Y. y Rodríguez, N. y Bird, L. y Lincoln, S. A. y Tornos, F. (2018). Viable cyanobacteria in the deep continental subsurface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(42), 10702–10707.
- Puzorjov, A. y Unal, S. M. y Wear, M. A. y McCormick, A. J. (2022). Pilot scale production, extraction and purification of a thermostable phycocyanin from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Bioresource Technology*, 345, 126459.

- Qi, L. S. y Larson, M. H. y Gilbert, L. A. y Doudna, J. A. y Weissman, J. S. y Arkin, A. P. y Lim, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152(5), 1173–1183.
- Qiao, Y. y Wang, W. y Lu, X. (2020). Engineering cyanobacteria as cell factories for direct trehalose production from CO₂. *Metabolic Engineering*, 62, 161–171.
- Radeck, J. y Meyer, D. y Lautenschläger, N. y Mascher, T. (2017). Bacillus SEVA siblings: a Golden Gate-based toolbox to create personalized integrative vectors for Bacillus subtilis. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13.
- Ragusa, I. y Nardone, G. N. y Zanatta, S. y Bertin, W. y Amadio, E. (2021). Spirulina for skin care: A bright blue future. *Cosmetics*, 8(1), 7.
- Rasooli, I. (2013). Antimicrobial Potential of Leptolyngbya sp. and Its Synergistic Effects With Antibiotics. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(5).
- Rastogi, R. P. y Sinha, R. P. y Moh, S. H. y Lee, T. K. y Kottuparambil, S. y Kim, Y.-J. y Rhee, J.-S. y Choi, E.-M. y Brown, M. T. y Häder, D.-P. (2014). Ultraviolet radiation and cyanobacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 141, 154–169.
- Reaston, J. y van den Hondel, C. A. y van Arkel, G. A. y Stewart, W. D. P. (1982). A physical map of plasmid pDU1 from the cyanobacterium Nostoc PCC 7524. *Plasmid*, 7(1), 101–104.
- Rey, A. I. y De-Cara, A. y Rebolé, A. y Arija, I. (2021). Short-Term Spirulina (Spirulina platensis) Supplementation and Laying Hen Strain Effects on Eggs' Lipid Profile and Stability. *Animals*, 11(7), 1944.
- Richa, S. R. P. y SINHA, P. (2011). UV-mediated stress and its mitigation in cyanobacteria. *Int J Plant Animal Environ Sci*, 1, 155–166.
- Rigobello-Masini, M. y Masini, J. C. (2021). Metabolites with beneficial bioactivities and factors affecting their productivity in microalgae and cyanobacteria. *Exploratory Biotechnology Research*, 1(1), 1–21.
- Rippka, R. y Deruelles, J. y Waterbury, J. B. y Herdman, M. y Stanier, R. Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology*, 111(1), 1–61.
- Rippka, R. y Herdman, M. (1985). Division patterns and cellular differentiation in cyanobacteria. *Ann Inst Pasteur Microbiol (1985)*, 136A(1), 33–39. [https://doi.org/10.1016/s0769-2609\(85\)80018-1](https://doi.org/10.1016/s0769-2609(85)80018-1)
- Roh, H. y Lee, J. S. y Choi, H. I. y Sung, Y. J. y Choi, S. Y. y Woo, H. M. y Sim, S. J. (2021). Improved CO₂-derived polyhydroxybutyrate (PHB) production by engineering fast-growing cyanobacterium Synechococcus elongatus UTEX 2973 for potential utilization of flue gas. *Bioresour Technol*, 327, 124789. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124789>

- Rossi, F. y Mugnai, G. y de Philippis, R. (2022). Cyanobacterial biocrust induction: A comprehensive review on a soil rehabilitation-effective biotechnology. *Geoderma*, 415, 115766.
- Ruffing, A. M. (2014). Improved Free Fatty Acid Production in Cyanobacteria with *Synechococcus* sp. PCC 7002 as Host. *Front Bioeng Biotechnol*, 2, 17. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00017>
- Ruffing, A. M. y Jensen, T. J. y Strickland, L. M. (2016). Genetic tools for advancement of *Synechococcus* sp. PCC 7002 as a cyanobacterial chassis. *Microb Cell Fact*, 15(1), 190. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0584-6>
- Rzymiski, P. y Poniedzialek, B. y Hippmann, N. y Kaczmarek, L. (2022). Screening the Survival of Cyanobacteria Under Perchlorate Stress. Potential Implications for Mars In Situ Resource Utilization. *Astrobiology*. <https://doi.org/10.1089/ast.2021.0100>
- Sakkos, J. K. y Hernandez-Ortiz, S. y Osteryoung, K. W. y Ducat, D. C. (2021). Orthogonal Degron System for Controlled Protein Degradation in Cyanobacteria. *ACS Synthetic Biology*, 10(7), 1667–1681. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00035>
- Sánchez-Baracaldo, P. y Bianchini, G. y Wilson, J. D. y Knoll, A. H. (2022). Cyanobacteria and biogeochemical cycles through Earth history. *Trends Microbiol*, 30(2), 143–157. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.05.008>
- Sánchez-Bayo, A. y Morales, V. y Rodriguez, R. y Vicente, G. y Bautista, L. F. (2020). Cultivation of Microalgae and Cyanobacteria: Effect of Operating Conditions on Growth and Biomass Composition. *Molecules*, 25(12). <https://doi.org/10.3390/molecules25122834>
- Santos-Merino, M. y Singh, A. K. y Ducat, D. C. (2019). New Applications of Synthetic Biology Tools for Cyanobacterial Metabolic Engineering. *Front Bioeng Biotechnol*, 7, 33. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00033>
- Scharnagl, M. y Richter, S. y Hagemann, M. (1998). The cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 expresses a DNA methyltransferase specific for the recognition sequence of the restriction endonuclease Pvu I. *Journal of Bacteriology*, 180(16), 4116–4122.
- Schirmacher, A. M. y Hanamghar, S. S. y Zedler, J. A. Z. (2020). Function and benefits of natural competence in cyanobacteria: From ecology to targeted manipulation. *Life*, 10(11), 249.
- Schlösser, U. G. y Friedl, T. (2000). Additions to the culture collection of algae at Göttingen since 1997. *Nova Hedwigia*, 243–262.
- Scholz, I. y Lange, S. J. y Hein, S. y Hess, W. R. y Backofen, R. (2013). CRISPR-Cas systems in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 exhibit distinct processing pathways involving at least two Cas6 and a Cmr2 protein. *PloS One*, 8(2), e56470.
- Seneviratne, S. I. y Donat, M. G. y Pitman, A. J. y Knutti, R. y Wilby, R. L. (2016). Allowable CO2 emissions based on regional and impact-related climate targets. *Nature*, 529(7587), 477–483. <https://doi.org/10.1038/nature16542>

- Sengupta, A. y Pritam, P. y Jaiswal, D. y Bandyopadhyay, A. y Pakrasi, H. B. y Wangikar, P. P. (2020). Photosynthetic Co-Production of Succinate and Ethylene in A Fast-Growing Cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* PCC 11801. *Metabolites*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/metabo10060250>
- Shabestary, K. y Anfelt, J. y Ljungqvist, E. y Jahn, M. y Yao, L. y Hudson, E. P. (2018). Targeted Repression of Essential Genes To Arrest Growth and Increase Carbon Partitioning and Biofuel Titters in Cyanobacteria. *ACS Synthetic Biology*, 7(7), 1669–1675. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00056>
- Shabestary, K. y Hernandez, H. P. y Miao, R. y Ljungqvist, E. y Hallman, O. y Sporre, E. y dos Santos, F. B. y Hudson, E. P. (2021). Cycling between growth and production phases increases cyanobacteria bioproduction of lactate. *Metabolic Engineering*, 68, 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.09.010>
- Shang, J. y Chen, M. y Hou, S. y Li, T. y Yang, Y. y Li, Q. y Jiang, H. y Dai, G. y Zhang, Z. y Hess, W. R. (2019). Genomic and transcriptomic insights into the survival of the subaerial cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in arid and exposed habitats. *Environmental Microbiology*, 21(2), 845–863.
- Sharma, G. y Kumar, M. y Ali, M. I. y Jasuja, N. D. (2014). Effect of carbon content, salinity and pH on *Spirulina platensis* for phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrin accumulation. *Microbial and Biochemical Technology*, 6(4), 202–206.
- Shimura, Y. y Hirose, Y. y Misawa, N. y Osana, Y. y Katoh, H. y Yamaguchi, H. y Kawachi, M. (2015). Comparison of the terrestrial cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. NIES-2104 and the freshwater *Leptolyngbya boryana* PCC 6306 genomes. *DNA Research*, 22(6), 403–412.
- Shirnalli, G. G. y Kaushik, M. S. y Kumar, A. y Abraham, G. y Singh, P. K. (2018). Isolation and characterization of high protein and phycocyanin producing mutants of *Arthrospira platensis*. *Journal of Basic Microbiology*, 58(2), 162–171.
- Sili, C. y Torzillo, G. y Vonshak, A. (2012). *Arthrospira* (*Spirulina*). In *Ecology of Cyanobacteria II* (pp. 677–705). Springer.
- Silva-Rocha, R. y Martinez-Garcia, E. y Calles, B. y Chavarria, M. y Arce-Rodriguez, A. y de Las Heras, A. y Paez-Espino, A. D. y Durante-Rodriguez, G. y Kim, J. y Nikel, P. I. y Platero, R. y de Lorenzo, V. (2013). The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Res*, 41(Database issue), D666-75. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1119>
- Singh, H. (2018). Desiccation and radiation stress tolerance in cyanobacteria. *J Basic Microbiol*, 58(10), 813–826. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800216>
- Ślizewska, A. y Żymańczyk-Duda, E. (2021). Cyanobacteria as Valuable Tool in Biotechnology. *Catalysts*, 11(11), 1259.

- Smith, H. D. y Baque, M. y Duncan, A. G. y Lloyd, C. y McKay, C. y Billi, D. (2014). Comparative analysis of cyanobacteria inhabiting rocks with different light transmittance in the Mojave Desert: A Mars terrestrial analogue. *International Journal of Astrobiology*, 13(3), 271–277. <https://doi.org/10.1017/S1473550414000056>
- Soppa, J. (2022). Non-equivalent genomes in polyploid prokaryotes. *Nat Microbiol*, 7(2), 186–188. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-01034-3>
- Soule, T. y Garcia-Pichel, F. y Stout, V. (2009). Gene expression patterns associated with the biosynthesis of the sunscreen scytonemin in *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in response to UVA radiation. *Journal of Bacteriology*, 191(14), 4639–4646.
- Soule, T. y Shipe, D. y Lothamer, J. (2016). Extracellular polysaccharide production in a scytonemin-deficient mutant of *Nostoc punctiforme* under UVA and oxidative stress. *Current Microbiology*, 73(4), 455–462.
- Starr, R. C. y Zeikus, J. A. (1987). UTEX: the culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *Journal of Phycology*, 23(supp.), 1–47.
- Steen, A. D. y A., C.-C. y Carini, P. y DeAngelis, K. M. y Fierer, N. y Lloyd, K. G. y Thrash, J. C. (2019). High proportions of bacteria and archaea across most biomes remain uncultured. *ISME J.*, 13, 3126–3130. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0484-y>
- Stein, B. J. y Grant, R. A. y Sauer, R. T. y Baker, T. A. (2016). Structural Basis of an N-Degron Adaptor with More Stringent Specificity. *Structure*, 24(2), 232–242. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.12.008>
- Stevens, S. E. y Porter, R. D. (1980). Transformation in *Agmenellum quadruplicatum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(10), 6052–6056. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.10.6052>
- Stucken, K. y Ilhan, J. y Roettger, M. y Dagan, T. y Martin, W. F. (2012). Transformation and Conjugal Transfer of Foreign Genes into the Filamentous Multicellular Cyanobacteria (Subsection V) *Fischerella* and *Chlorogloeopsis*. *Current Microbiology*, 65(5), 552–560. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0193-5>
- Stucken, K. y Koch, R. y Dagan, T. (2013). Cyanobacterial defense mechanisms against foreign DNA transfer and their impact on genetic engineering. *Biol Res*, 46(4), 373–382. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602013000400009>
- Svoboda, J. y Cisneros, B. y Philmus, B. (2021). Evaluation of inducible promoter–riboswitch constructs for heterologous protein expression in the cyanobacterial species *Anabaena* sp. PCC 7120. *Synthetic Biology*, 6(1), ysab019.
- Swapnil, P. y Rai, A. K. (2018). Physiological responses to salt stress of salt-adapted and directly salt (NaCl and NaCl+ Na₂SO₄ mixture)-stressed cyanobacterium *Anabaena fertilissima*. *Protoplasma*, 255(3), 963–976.
- Swarts, D. C. y Jinek, M. (2018). Cas9 versus Cas12a/Cpf1: Structure–function comparisons and implications for genome editing. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 9(5), e1481.

- Takeuchi, R. y Roberts, J. (2018). *Targeted mutagenesis in Spirulina*. Google Patents.
- Tamagnini, P. y Axelsson, R. y Lindberg, P. y Oxelfelt, F. y Wünschiers, R. y Lindblad, P. (2002). Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(1), 1–20.
- Tanner, K. y Martí, J. M. y Belliure, J. y Fernández-Méndez, M. y Molina-Menor, E. y Peretó, J. y Porcar, M. (2018). Polar solar panels: Arctic and Antarctic microbiomes display similar taxonomic profiles. *Environmental Microbiology Reports*, 10(1), 75–79.
- Tao, Y. y Zhang, X. y Au, D. W. y Mao, X. y Yuan, K. (2010). The effects of sub-lethal UV-C irradiation on growth and cell integrity of cyanobacteria and green algae. *Chemosphere*, 78(5), 541–547. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.016>
- Taton, A. y Erikson, C. y Yang, Y. y Rubin, B. E. y Rifkin, S. A. y Golden, J. W. y Golden, S. S. (2020). The circadian clock and darkness control natural competence in cyanobacteria. *Nat Commun*, 11(1), 1688. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15384-9>
- Taton, A. y Lis, E. y Adin, D. M. y Dong, G. y Cookson, S. y Kay, S. A. y Golden, S. S. y Golden, J. W. (2012). Gene transfer in *Leptolyngbya* sp. strain BL0902, a cyanobacterium suitable for production of biomass and bioproducts. *PLoS One*, 7(1), e30901. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030901>
- Taton, A. y Unglaub, F. y Wright, N. E. y Zeng, W. Y. y Paz-Yepes, J. y Brahamsha, B. y Palenik, B. y Peterson, T. C. y Haerizadeh, F. y Golden, S. S. y Golden, J. W. (2014). Broad-host-range vector system for synthetic biology and biotechnology in cyanobacteria. *Nucleic Acids Res*, 42(17), e136. <https://doi.org/10.1093/nar/gku673>
- Temraleeva, A. D. y Dronova, S. A. y Moskalenko, S. v y Didovich, S. v. (2016). Modern methods for isolation, purification, and cultivation of soil cyanobacteria. *Microbiology*, 85(4), 389–399.
- Thiel, K. y Mulaku, E. y Dandapani, H. y Nagy, C. y Aro, E.-M. y Kallio, P. (2018). Translation efficiency of heterologous proteins is significantly affected by the genetic context of RBS sequences in engineered cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–12.
- Thiel, T. (2019). Organization and regulation of cyanobacterial *nif* gene clusters: implications for nitrogenase expression in plant cells. *FEMS Microbiology Letters*, 366(7), fnz077.
- Thiel, T. y Poo, H. (1989). Transformation of a filamentous cyanobacterium by electroporation. *Journal of Bacteriology*, 171(10), 5743–5746.
- Tock, M. R. y Dryden, D. T. F. (2005). The biology of restriction and anti-restriction. *Current Opinion in Microbiology*, 8(4), 466–472.
- Tomatsu, C. y Uesaka, K. y Yamakawa, H. y Tsuchiya, T. y Ihara, K. y Fujita, Y. (2018). In vivo transposon tagging in the nonheterocystous nitrogen-fixing cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *FEBS Letters*, 592(10), 1634–1642.

- Tomita-Yokotani, K. y Suzuki, T. y Kimura, S. y Katoh, H. y Ong, M. y Tokita, M. y Fujita, T. (2021). Plant nutrients in the denaturation substances in candidate organisms, cyanobacteria, mosses and trees, for habitation on Mars. *43rd COSPAR Scientific Assembly. Held 28 January-4 February, 43*, 2045.
- Topp, S. y Reynoso, C. M. K. y Seeliger, J. C. y Goldlust, I. S. y Desai, S. K. y Murat, D. y Shen, A. y Puri, A. W. y Komeili, A. y Bertozzi, C. R. (2010). Synthetic riboswitches that induce gene expression in diverse bacterial species. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(23), 7881–7884.
- Toyomizu, M. y Suzuki, K. y Kawata, Y. y Kojima, H. y Akiba, Y. (2001). Effective transformation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* using electroporation. *Journal of Applied Phycology*, *13*(3), 209–214.
- Tsolcha, O. N. y Patrinoú, V. y Economou, C. N. y Dourou, M. y Aggelis, G. y Tekerlekopoulou, A. G. (2021). Utilization of biomass derived from cyanobacteria-based agro-industrial wastewater treatment and raisin residue extract for bioethanol production. *Water*, *13*(4), 486.
- Tsujimoto, R. y Kamiya, N. y Fujita, Y. (2014). Transcriptional regulators ChlR and CnfR are essential for diazotrophic growth in nonheterocystous cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(18), 6762–6767.
- Tunca, H. y Hödük, K. y Köçkar, F. y Doğru, A. y Sevindik, T. O. (2021). Effects of two synthetic pyrethroids on *Arthrospira platensis* Gomont growth and antioxidant parameters. *Acta Botanica Croatica*, *80*(2), 117–124.
- Ungerer, J. y Pakrasi, H. B. (2016). Cpf1 is a versatile tool for CRISPR genome editing across diverse species of cyanobacteria. *Sci Rep*, *6*, 39681. <https://doi.org/10.1038/srep39681>
- Ungerer, J. y Wendt, K. E. y Hendry, J. I. y Maranas, C. D. y Pakrasi, H. B. (2018). Comparative genomics reveals the molecular determinants of rapid growth of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *115*(50), E11761–E11770. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814912115>
- Urrejola, C. y Alcorta, J. y Salas, L. y Vasquez, M. y Polz, M. F. y Vicuna, R. y Diez, B. (2019). Genomic Features for Desiccation Tolerance and Sugar Biosynthesis in the Extremophile *Gloeocapsopsis* sp. UTEX B3054. *Front Microbiol*, *10*, 950. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00950>
- Vasudevan, R. y Gale, G. A. R. y Schiavon, A. A. y Puzorjov, A. y Malin, J. y Gillespie, M. D. y Vavitsas, K. y Zulkower, V. y Wang, B. y Howe, C. J. (2019). CyanoGate: A modular cloning suite for engineering cyanobacteria based on the plant MoClo syntax. *Plant Physiology*, *180*(1), 39–55.
- Velichko, N. y Smirnova, S. y Averina, S. y Pinevich, A. (2021). A survey of Antarctic cyanobacteria. *Hydrobiologia*, *848*(11), 2627–2652.

- Velmurugan, R. y Incharoensakdi, A. (2020). Heterologous expression of ethanol synthesis pathway in glycogen deficient *Synechococcus elongatus* PCC 7942 resulted in enhanced production of ethanol and exopolysaccharides. *Frontiers in Plant Science*, 74.
- Verseux, C. y Baque, M. y Cifariello, R. y Fagiarone, C. y Raguse, M. y Moeller, R. y Billi, D. (2017a). Evaluation of the Resistance of *Chroococcidiopsis* spp. to Sparsely and Densely Ionizing Irradiation. *Astrobiology*, 17(2), 118–125. <https://doi.org/10.1089/ast.2015.1450>
- Verseux, C. y Baque, M. y Cifariello, R. y Fagiarone, C. y Raguse, M. y Moeller, R. y Billi, D. (2017b). Evaluation of the Resistance of *Chroococcidiopsis* spp. to Sparsely and Densely Ionizing Irradiation. *Astrobiology*, 17(2), 118–125. <https://doi.org/10.1089/ast.2015.1450>
- Verseux, C. y Baqué, M. y Lehto, K. y de Vera, J.-P. P. y Rothschild, L. J. y Billi, D. (2016). Sustainable life support on Mars—the potential roles of cyanobacteria. *International Journal of Astrobiology*, 15(1), 65–92.
- Vijay, D. y Akhtar, M. K. y Hess, W. R. (2019). Genetic and metabolic advances in the engineering of cyanobacteria. *Curr Opin Biotechnol*, 59, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.05.012>
- Vílchez, J. I. y García-Fontana, C. y Román-Naranjo, D. y González-López, J. y Manzanera, M. (2016). Plant drought tolerance enhancement by trehalose production of desiccation-tolerant microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1577.
- Vincent, W. F. (2009). *Cyanobacteria*.
- Vioque, A. (2007). Transformation of cyanobacteria. *Transgenic Microalgae as Green Cell Factories*, 12–22.
- Vogel, A. I. M. y Lale, R. y Hohmann-Marriott, M. F. (2017). Streamlining recombination-mediated genetic engineering by validating three neutral integration sites in *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Journal of Biological Engineering*, 11(1), 1–9.
- Wang, B. y Wang, J. y Zhang, W. y Meldrum, D. R. (2012). Application of synthetic biology in cyanobacteria and algae. *Frontiers in Microbiology*, 3, 344.
- Wang, B. y Yu, J. y Zhang, W. y Meldrum, D. R. (2015). Premethylation of foreign DNA improves integrative transformation efficiency in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(24), 8500–8506.
- Wang, F. y Gao, Y. y Yang, G. (2020). Recent advances in synthetic biology of cyanobacteria for improved chemicals production. *Bioengineered*, 11(1), 1208–1220. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1837458>
- Wang, J. y Zhang, P. y Bao, J.-T. y Zhao, J.-C. y Song, G. y Yang, H.-T. y Huang, L. y He, M.-Z. y Li, X.-R. (2020). Comparison of cyanobacterial communities in temperate deserts: A cue for artificial inoculation of biological soil crusts. *Science of The Total Environment*, 745, 140970.

- Wang, M. y Luan, G. D. y Lu, X. F. (2019). Systematic identification of a neutral site on chromosome of *Synechococcus* sp. PCC7002, a promising photosynthetic chassis strain. *Journal of Biotechnology*, 295, 37–40. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.02.007>
- Wang, X. y Zhou, H. y Chen, H. y Jing, X. y Zheng, W. y Li, R. y Sun, T. y Liu, J. y Fu, J. y Huo, L. (2018). Discovery of recombinases enables genome mining of cryptic biosynthetic gene clusters in Burkholderiales species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(18), E4255–E4263.
- Wanigatunge, R. P. y Magana-Arachchi, D. N. y Chandrasekharan, N. v y Kulasooriya, S. A. (2014). Genetic diversity and molecular phylogeny of cyanobacteria from Sri Lanka based on 16S rRNA gene. *Environmental Engineering Research*, 19(4), 317–329.
- Warren-Rhodes, K. A. y Rhodes, K. L. y Boyle, L. N. y Pointing, S. B. y Chen, Y. y Liu, S. y Zhuo, P. y McKay, C. P. (2007). Cyanobacterial ecology across environmental gradients and spatial scales in China's hot and cold deserts. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 61, 470–842.
- Watanabe, A. (1960). List of algal strains in collection at the Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 6(4), 283–292.
- Wendt, K. E. y Pakrasi, H. B. (2019). Genomics approaches to deciphering natural transformation in cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 1259.
- Wendt, K. E. y Ungerer, J. y Cobb, R. E. y Zhao, H. y Pakrasi, H. B. (2016). CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis of the fast growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. *Microb Cell Fact*, 15(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0514-7>
- Wendt, K. E. y Walker, P. y Sengupta, A. y Ungerer, J. y Pakrasi, H. B. (2022). Engineering Natural Competence into the Fast-Growing Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* Strain UTEX 2973. *Appl Environ Microbiol*, 88(1), e0188221. <https://doi.org/10.1128/AEM.01882-21>
- Whitton, B. A. (1992). Diversity, ecology, and taxonomy of the cyanobacteria. In *Photosynthetic prokaryotes* (pp. 1–51). Springer.
- Whitton, B. A. (2012). *Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time*. Springer Science & Business Media.
- Whitton, B. A. y Potts, M. (2012). Introduction to the cyanobacteria. In *Ecology of Cyanobacteria II* (pp. 1–13). Springer.
- Wierzos, J. y Ascaso, C. y McKay, C. P. (2006). Endolithic cyanobacteria in halite rocks from the hyperarid core of the Atacama Desert. *Astrobiology*, 6(3), 415–422.
- Witthohn, M. y Strieth, D. y Eggert, S. y Kins, S. y Ulber, R. y Muffler, K. (2021). Heterologous production of a cyanobacterial bacteriocin with potent antibacterial activity. *Current Research in Biotechnology*, 3, 281–287. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2021.10.002>

- Włodarczyk, A. y Selao, T. T. y Norling, B. y Nixon, P. J. (2020). Newly discovered *Synechococcus* sp. PCC 11901 is a robust cyanobacterial strain for high biomass production. *Communications Biology*, 3(1), 215. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0910-8>
- Włodarczyk, A. y Selão, T. T. y Norling, B. y Nixon, P. J. (2020). Newly discovered *Synechococcus* sp. PCC 11901 is a robust cyanobacterial strain for high biomass production. *Communications Biology*, 3(1), 1–14.
- Wolk, C. P. y Ernst, A. y Elhai, J. (1994). Heterocyst metabolism and development. In *The molecular biology of cyanobacteria* (pp. 769–823). Springer.
- Wu, D. y Wang, Y. y Xu, X. (2020). Effects of a type I RM system on gene expression and glycogen catabolism in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1258.
- Wu, H.-L. y Wang, G.-H. y Xiang, W.-Z. y Li, T. y He, H. (2016). Stability and antioxidant activity of food-grade phycocyanin isolated from *Spirulina platensis*. *International Journal of Food Properties*, 19(10), 2349–2362.
- Wu, S. y Yu, K. y Li, L. y Wang, L. y Liang, W. (2021). Enhancement of exopolysaccharides production and reactive oxygen species level of *Nostoc flagelliforme* in response to dehydration. *Environ Sci Pollut Res Int*, 28(26), 34300–34308. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13051-0>
- Xia, P. F. y Ling, H. y Foo, J. L. y Chang, M. W. (2019). Synthetic Biology Toolkits for Metabolic Engineering of Cyanobacteria. *Biotechnol J*, 14(6), e1800496. <https://doi.org/10.1002/biot.201800496>
- Xiao, Y. y Wang, S. y Rommelfanger, S. y Balassy, A. y Barba-Ostria, C. y Gu, P. y Galazka, J. M. y Zhang, F. (2018). Developing a Cas9-based tool to engineer native plasmids in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnol Bioeng*, 115(9), 2305–2314. <https://doi.org/10.1002/bit.26747>
- Xu, T. y Qin, S. y Hu, Y. y Song, Z. y Ying, J. y Li, P. y Dong, W. y Zhao, F. y Yang, H. y Bao, Q. (2016). Whole genomic DNA sequencing and comparative genomic analysis of *Arthrospira platensis*: high genome plasticity and genetic diversity. *DNA Research*, 23(4), 325–338.
- Xu, Y. y Alvey, R. M. y Byrne, P. O. y Graham, J. E. y Shen, G. y Bryant, D. A. (2011). Expression of Genes in Cyanobacteria: Adaptation of Endogenous Plasmids as Platforms for High-Level Gene Expression in *Synechococcus* sp. PCC 7002. In R. Carpentier (Ed.), *Photosynthesis Research Protocols* (pp. 273–293). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-925-3_21
- Yadav, I. y Rautela, A. y Kumar, S. (2021). Approaches in the photosynthetic production of sustainable fuels by cyanobacteria using tools of synthetic biology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(12), 1–17.
- Yao, L. y Cengic, I. y Anfelt, J. y Hudson, E. P. (2016). Multiple gene repression in cyanobacteria using CRISPRi. *ACS Synthetic Biology*, 5(3), 207–212.

- Yao, L. y Shabestary, K. y Bjork, S. M. y Asplund-Samuelsson, J. y Joensson, H. N. y Jahn, M. y Hudson, E. P. (2020). Pooled CRISPRi screening of the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803 for enhanced industrial phenotypes. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/ARTN166610.1038/s41467-020-15491-7>
- Yu, J. y Liberton, M. y Cliften, P. F. y Head, R. D. y Jacobs, J. M. y Smith, R. D. y Koppenaal, D. W. y Brand, J. J. y Pakrasi, H. B. (2015). *Synechococcus elongatus* UTEX 2973, a fast growing cyanobacterial chassis for biosynthesis using light and CO₂. *Sci Rep*, 5, 8132. <https://doi.org/10.1038/srep08132>
- Yu y You, L. y Liu, D. y Hollinshead, W. y Tang, Y. J. y Zhang, F. (2013). Development of *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a phototrophic cell factory. *Mar Drugs*, 11(8), 2894–2916. <https://doi.org/10.3390/md11082894>
- Yunus, I. S. y Anfelt, J. y Sporre, E. y Miao, R. y Hudson, E. P. y Jones, P. R. (2022). Synthetic metabolic pathways for conversion of CO₂ into secreted short-to medium-chain hydrocarbons using cyanobacteria. *Metab Eng*, 72, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2022.01.017>
- Yunus, I. S. y Wang, Z. y Sattayawat, P. y Muller, J. y Zemichael, F. W. y Hellgardt, K. y Jones, P. R. (2021). Improved Bioproduction of 1-Octanol Using Engineered *Synechocystis* sp. PCC 6803. *ACS Synth Biol*, 10(6), 1417–1428. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00029>
- Zahra, Z. y Choo, D. H. y Lee, H. y Parveen, A. (2020). Cyanobacteria: Review of current potentials and applications. *Environments*, 7(2), 13.
- Zandalinas, S. I. y Fritschi, F. B. y Mittler, R. (2021). Global Warming, Climate Change, and Environmental Pollution: Recipe for a Multifactorial Stress Combination Disaster. *Trends Plant Sci*, 26(6), 588–599. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.02.011>
- Zang, X. y Liu, B. y Liu, S. y Arunakumara, K. y Zhang, X. (2007). Optimum conditions for transformation of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Microbiology*, 45(3), 241–245.
- Zavilgelsky, G. B. y Kotova, V. Y. y Rastorguev, S. M. (2009). Antirestriction and antimodification activities of T7 Ocr: effects of amino acid substitutions in the interface. *Molecular Biology*, 43(1), 93–100.
- Zerulla, K. y Ludt, K. y Soppa, J. (2016). The ploidy level of *Synechocystis* sp. PCC 6803 is highly variable and is influenced by growth phase and by chemical and physical external parameters. *Microbiology (Reading)*, 162(5), 730–739. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000264>
- Zhang, F. y Man, Y. B. y Mo, W. Y. y Wong, M. H. (2020). Application of *Spirulina* in aquaculture: a review on wastewater treatment and fish growth. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 582–599.
- Zhang, M. Y. y Luo, Q. y Sun, H. L. y Fritze, J. y Luan, G. D. y Lu, X. F. (2021). Engineering a Controllable Targeted Protein Degradation System and a Derived OR-GATE-Type Inducible

- Gene Expression System in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *ACS Synthetic Biology*.
<https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00226>
- Zhang, Z. y Li, Z. y Yin, Y. y Li, Y. y Jia, Y. y Chen, M. y Qiu, B. (2019). Widespread occurrence and unexpected diversity of red-shifted chlorophyll producing cyanobacteria in humid subtropical forest ecosystems. *Environmental Microbiology*, 21(4), 1497–1510.
- Zhou, J. y Zhang, H. y Meng, H. y Zhu, Y. y Bao, G. y Zhang, Y. y Li, Y. y Ma, Y. (2014). Discovery of a super-strong promoter enables efficient production of heterologous proteins in cyanobacteria. *Scientific Reports*, 4(1), 1–6.
- Zhu, Y. y Cheng, J. y Zhang, Z. y Li, H. y Wang, Z. (2021). Promoting extracellular polymeric substances to alleviate phenol toxicity in *Arthrospira platensis* at high carbon dioxide concentrations. *Journal of Cleaner Production*, 290, 125167.
- Zinicovscaia, I. y Yushin, N. y Shvetsova, M. y Frontasyeva, M. (2018). Zinc removal from model solution and wastewater by *Arthrospira* (Spirulina) *Platensis* biomass. *International Journal of Phytoremediation*, 20(9), 901–908.

X. Anexos

Anexo 1. Secuencias para TEVp y variantes de YFP (CAPÍTULO 4).

Proteasa TEV (codones optimizados para *Synechocystis* 6803)

ATGtttgcctcaagaacagaagctgatctctgaagaggactaggcgagagcctattcaaaggcctcgggactataacccatcag tagtactatctgccactcacgaacgagtcgcacggacatactactagcctataggcattggtttggccattatcattacaataa acatttattccggcgaataatgggactttgttagtgagctctccacgggtattcaaggtaagaatacgaactctacaacagca ttgatcgacggagacatgatcatcatccgatgccaaagacttctccattcccagaaattgaaatccgtgaaccgcaac gcgaggaacggattgtctcgtcacaacaaatcagactaaaagcatgagttccatggtttctgatactagctgtacgttccctcctc cgatggtatttttggaaacattggtacaaacaaagacggacagtggtgctcccactcgttccacacgagatgggtcattgtgg gatccattctgcaagcaactttaacacgaacaactttcacgagtgctctaaaactttatggagctgtaactaatcaggag gcgcaacagtggtctccgggtggcgattaaacgagattccgtgctatggggaggccataaggttttatggttaagcctgaagaac cgtttcaaccggtgaaagaagcaacacaactcatgaactaa

En verde se indica la secuencia de la etiqueta myc.

Pj23110-FR-YFP

tttacggctagctcagtcctaggtacaatgctagctaaaagaggagaataactagATGgaaaatctgtattttcaatttcgattcgt caagtatccaaaggcgaggagctctttacgggcgttgttccaattctcgttgaactggacggcgatgtaaacggccacaaatctgt gagtggggaaggggaaggcgacgcaacttatgggaagctcactctgaagttcatttgacgactggcaaatgccgtgcccgtggc tacgctcgtgaccacctttggctatggtctacagtgtttggccgctacccgacatgaagctgcacgatttttaaaagcgccatg ccagaggggtatgtacaagaacgtacaatctttaaagatgatggcaattataaaacgctgctgaagttaaatcgaggggtata cattagtaatcgtatcgaattaagggtatcgattttaaagaagatggtaacatcttagggcacaactcgagtacaattacaatagt cacaacgtttatattatggccgataagcagaagaatgggattaaagtaactcaagatccgcataacatcgaggacggaggtgtg caactggccgaccattatcagcaaaataccctaatggcgatggaccagtgctttaccgataatcactatctgagctacaaagcg ccttgagtaaggaccctaatgaaaagcgtgaccacatggtcctcttagagttgtgacggccggtatcaccttaggcatggacga gttgtataagtagtaaccaggcatcaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggccttctgtttatctgtgtgttcggtgaac gctctactagagtcacactggctcaccttcgggtgggcctttctgcg

Pj23110-YA-YFP

tttacggctagctcagtcctaggtacaatgctagctaaaagaggagaataactagATGgaaaatctgtattttcaattatgcttctgta caagtatccaaaggcgaggagctctttacgggcgttgttccaattctcgttgaactggacggcgatgtaaacggccacaaatctgt gagtggggaaggggaaggcgacgcaacttatgggaagctcactctgaagttcatttgacgactggcaaatgccgtgcccgtggc tacgctcgtgaccacctttggctatggtctacagtgtttggccgctacccgacatgaagctgcacgatttttaaaagcgccatg ccagaggggtatgtacaagaacgtacaatctttaaagatgatggcaattataaaacgctgctgaagttaaatcgaggggtata cattagtaatcgtatcgaattaagggtatcgattttaaagaagatggtaacatcttagggcacaactcgagtacaattacaatagt cacaacgtttatattatggccgataagcagaagaatgggattaaagtaactcaagatccgcataacatcgaggacggaggtgtg caactggccgaccattatcagcaaaataccctaatggcgatggaccagtgctttaccgataatcactatctgagctacaaagcg ccttgagtaaggaccctaatgaaaagcgtgaccacatggtcctcttagagttgtgacggccggtatcaccttaggcatggacga gttgtataagtagtaaccaggcatcaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggccttctgtttatctgtgtgttcggtgaac gctctactagagtcacactggctcaccttcgggtgggcctttctgcg

P_{J23110}-YFP



ttacggctagctcagtcctaggtacaatgctagctaaaagaggagaaatactag**ATG**gtatccaaaggcgaggagctcttacggcgttgtccaattctcgttgaactggacggcgatgtaaacggccacaattttctgtgagtggggaaggggaaggcgacgcaacttatgggaagctcactctgaagttcatttgacgactggcaaatggcccgtgcccgtgacctcgtgaccacctttggctatggtctacagtgtttgccgctaccccaccatataagctgcacgatttttaaaagcgccatgccagaggggtatgtacaagaactacatctttaaagatgatggcaattataaaacgctgctgaagttaaattcgagggtgatacattagttaatcgtatcgaattaaagggtatcgatttaaagaagatggtaacatcttagggcacaactcgagtacaattaacaatgtcacaacgtttatattggccgataagcagaagaatgggattaaagtaacttcaagatccgcataacatcgaggacggaagtgtgcaactggccgaccattatagcaaaatacccccaattggcgatggaccagtctttaccgataatcactatctgagctaccaaaagcgccttgagtaaggacccaatgaaaagcgtgacacatggtcctcttagagtttgtagcggccggtatcaccttaggcattggacgagttgtataagtagtaaccaggcatcaataaaacgaaaggtcagtcgaaagactgggcctttcgtttatctgtgtttgctggtgaacgctctctactagagtcacactggctcaccttcgggtggcctttctgcg

P_{c223}-FR-G-YFP



ttaacaaaaagcaggaataaaattaacatgatgtaacagacataagtcccatcaccgttgataatgtaactgtggattgcaaaagaaagaggagaaatactag**ATG**ggagaaaatctgtattttcaatttcgattcgtacaaggaggagggtctgtatccaaaggcaggagctctttacggcggttcaattctcgttgaactggacggcgatgtaaacggccacaattttctgtgagtggggaaggggaaggcgacgcaacttatgggaagctcactctgaagttcatttgacgactggcaaatggcccgtgcccgtgacct/acgctcgtgaccacctttggctatggtctacagtgtttgccgctaccccaccatataagctgcacgatttttaaaagcgcctgccagaggggtatgtacaagaactacaattttcttaaagatgatggcaattataaaacgctgctgaagttaaattcgagggtgatacattagttaatcgtatcgaattaaagggtatcgatttaaagaagatggtaacatcttagggcacaactcgagtacaattacaatagtcacaacgtttatattatggccgataagcagaagaatgggattaaagtaacttcaagatccgcataacatcgaggacggaagtgtgcaactggccgaccattatcagcaaaatacccgaattggcgatggaccagtctttaccgataatcactatctgagctaccaaaagcgccttgagtaaggacccaatgaaaagcgtgaccacatggtcctcttagagtttgtagcggccggtatcaccttaggcattggacgagttgtataagtagtaacctcgggtaccaaatccagaaaaggcctcccgaagggggcctttttcgtttgttc

P_{c223}-L7-FR-YFP



ttaacaaaaagcaggaataaaattaacatgatgtaacagacataagtcccatcaccgttgataatgtaactgtggattgcaaaagaaagaggagaaatactag**ATG**gtatccaaaggcgaggaggagaaaatctgtattttcaatttcgattcgtacaaggaggactctttacggcggttcaattctcgttgaactggacggcgatgtaaacggccacaattttctgtgagtggggaaggggaaggcgacgcaacttatgggaagctcactctgaagttcatttgacgactggcaaatggcccgtgcccgtgacctcgtgaccacctttggctatggtctacaggtttgccgctaccccaccatataagctgcacgatttttaaaagcgcctgccagaggggtatgtacaagaactacaattttcttaaagatgatggcaattataaaacgctgctgaagttaaattcgagggtgatacattagttaatcgtatcgaattaaagggtatcgatttaaagaagatggtaacatcttagggcacaactcgagtacaattacaatagtcacaacgtttatattatggccgataagcagaagaatgggattaaagtaacttcaagatccgcataacatcgaggacggaagtgtgcaactggccgaccattatcagcaaaatacccgaattggcgatggaccagtctttaccgataatcactatctgagctaccaaaagcgccttgagtaaggacccaatgaaaagcgtgaccacatggtcctcttagagtttgtagcggccggtatcaccttaggcattggacgagttgtataagtagtaacctcgggtaccaaatccagaaaaggcctcccgaagggggcctttttcgtttgttc

P_{c223}-YFP

ttaacaaaaagcaggaataaaattaacatgatgtaacagacataagtcctcaccgttgataatgtaactgtgggattgcaaaa
 gaaagaggagaaatactag**ATG**gatccaaaggcgaggagctcttacgggcgttgccaattctcgttgaactggacggcgatg
 aaacggccacaaatctctgtgagtgagggaaggggaaggcgacgcaacttatgggaagctcactctgaagttcattgcacgactgg
 caaattgcccggtccgtggcctacgctcgtgaccacctttggctatggtctacagtgtttgcccgctaccccgaccatgaagctgca
 cgatTTTTTaaagcgccatgccagaggggatgtacaagaacgtacaatTTTaaagatgatggcaattataaaacgctgctg
 aagTaaattcgagggtgatacattagTaatcgtatcgaattaaagggtatcgatTTTaaagaagatggaacatcttagggcacaaa
 ctcgagtacaattacaatagtcacaacgtttatattatggccgataagcagaagaatgggattaaagtcaactcaagatccgcata
 acatcgaggacggaagtgtgcaactggccgaccattatcagcaaaatacccaattggcgatggaccagtgtttaccgataatca
 ctatctgagctacaaagcgcttgagtaaggacccaatgaaagcgtgaccacatggtcctcttagagttgtgacggccgctggt
 atcacttaggcagtgacgagttgtataagtagtaacc**tc**ggtaccaattccagaaaagaggcctcccgaagggggcctTTTTTc
 gTTTTgtcc

Para las variantes de YFP, el promotor se muestra en verde, el terminador en amarillo, la secuencia de reconocimiento TEVp (TEV_R) en gris y el degrón en azul. El *linker* está representado en rosa y la secuencia codificante de YFP en naranja.

*“La recompensa de nuestro trabajo no es lo que obtenemos,
sino en lo que nos convertimos.”*

Paulo Coelho