



CIENCIAS AMBIENTALES
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN SOSTENIBLE DE BIOPLÁSTICOS A PARTIR DE CIANOBACTERIAS: ENFOQUES Y DESAFÍOS

TRABAJO DE FIN DE GRADO

CURSO ACADÉMICO 2022/23

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA APLICADA

ÁREA DE BOTÁNICA

Autora: Cristina Martínez Gutiérrez

Tutora: Esther Berrendero Gómez

Modalidad: Revisión bibliográfica

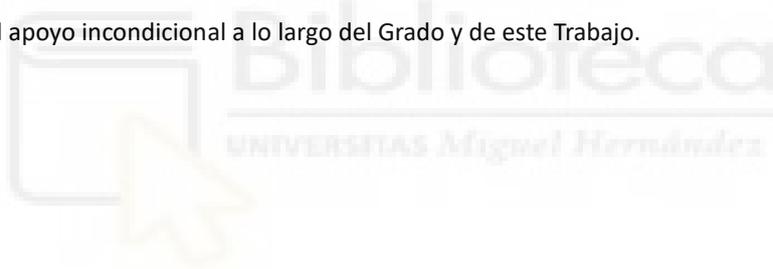
Código de Investigación Responsable (COIR): TFG.GCA.EBG.CMG.230626

AGRADECIMIENTOS:

Este Trabajo de Fin de Grado se ha realizado gracias a la participación del grupo de investigación del Área de Botánica (Departamento de Biología Aplicada), junto al grupo GEMMA de la UPC y al Departamento de Ingeniería Química de la UAL, en el proyecto coordinado Cyan2Bio (PID2021-126564OB) sobre la producción sostenible de bioproductos a partir de cianobacterias tratando aguas residuales. Agradecer la oportunidad de conocer y participar de esta manera en un proyecto de gran interés como éste.

Gracias a mi tutora Esther Berrendero Gómez, por la confianza, la dedicación y el apoyo en todo momento, y darme la oportunidad de realizar este Trabajo de Fin de Grado del que he podido aprender tanto. Gracias también a Rocío Valera, por su disposición, ayuda y motivación desde el principio. Todo ello ha sido fundamental para mi crecimiento académico y personal.

Gracias a mi familia, amigos y pareja, que de una forma u otra han sido partícipes de cada logro, por la comprensión y el apoyo incondicional a lo largo del Grado y de este Trabajo.



RESUMEN:

El uso generalizado e indiscriminado de los plásticos convencionales, con origen en fuentes no renovables, es actualmente objeto de gran preocupación desde el punto de vista ambiental y de protección de la salud pública, causando una problemática a nivel global. Ésta contempla los residuos generados y la contaminación asociada al ciclo de vida de estos plásticos, con persistencia durante cientos de años y que suponen una amenaza al producir un impacto ambiental negativo, influencia en el cambio climático y afección a la salud humana. En respuesta, junto con la necesidad de avanzar hacia un modelo de economía circular y cumplir con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), existe un interés creciente en la búsqueda y desarrollo de alternativas sostenibles a los plásticos convencionales. Una de las cuales son los bioplásticos, derivados de fuentes renovables y que pueden ser producidos por diferentes organismos como las cianobacterias, microorganismos fotoautótrofos capaces de producir de forma sostenible PHB.

En este trabajo se presenta una revisión bibliográfica sobre el enfoque y los desafíos de esta alternativa que, a pesar de la dificultad para la comparación de resultados, presenta rendimientos prometedores a escala de laboratorio, recopilando conocimientos sobre su producción y las ventajas de las cianobacterias frente a otros organismos. De esta forma, se conocen los puntos críticos de su producción, con el fin de actuar sobre ellos y conseguir un proceso óptimo y sostenible integrando nuevas estrategias de mejora, y se insiste en la necesidad de ampliar las investigaciones para su industrialización.

Palabras clave: bioplásticos, Polihidroxitirato (PHB), cianobacterias, optimización, sostenibilidad.

ABSTRACT:

The widespread and indiscriminate use of conventional plastics, originating from non-renewable sources, is currently the subject of great concern from the environmental and public health protection point of view, causing global problems. This contemplates the waste generated and the pollution associated with the life cycle of these plastics, with persistence for hundreds of years and which pose a threat by producing a negative environmental impact, influencing climate change and affecting human health. In response, along with the need to move towards a circular economy model and meet the Sustainable Development Goals (SDG), there is growing interest in finding and developing sustainable alternatives to conventional plastics. One of which are bioplastics, derived from renewable sources and that can be produced by different organisms such as cyanobacteria, photoautotrophic microorganisms capable of sustainably producing PHB.

This paper presents a bibliographical review on the approach and challenges of this alternative that, despite the difficulty in comparing results, presents promising performance at laboratory scale, gathering knowledge about its production and the advantages of cyanobacteria over to other organisms. In this way, the critical points of its production are known, in order to act on them and achieve an optimal and sustainable process integrating new improvement strategies, and the need to expand research in this field for its industrialization.

Key words: bioplastics, Polyhydroxybutyrate (PHB), cyanobacteria, optimization, sustainability.

ABREVIATURAS:

Símbolo o abreviatura	Descripción
3HB	3-hidroxi-butiril-CoA
3-PGA	3-fosfoglicerato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEMA	Agencia Europea de Medio Ambiente
ATP	Adenosín trifosfato
BPA	Bisfenol A
C	Carbono
CCAP	Culture Collection of Algae & Protozoa
CE	Comisión Europea
CH ₄	Metano
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de Carbono
CO _{2eq}	Dióxido de Carbono equivalente
CoA	Coenzima A
COVs	Compuestos orgánicos volátiles
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
dcw	Peso de la célula seca
DIC	Carbono inorgánico disuelto
ED	Ruta Entner Doudoroff
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EMP	Vía de Embden-Meyorroh-Parnas
EMS	Metanosulfonato de etilo
EPI	Equipo de protección individual
EUMOFA	Observatorio Europeo del Mercado de los Productos de Pesca y Acuicultura
FBR o PBR	Fotobiorreactor o Photobioreactor
g	Gramos
GEI	Gases de efecto invernadero
GEO	Gran Efecto de Oxidación
H ₂ O	Agua
HCO ₃ ⁻	Anión bicarbonato
HDPE	Polietileno de baja densidad
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
Kg	Kilogramos
L	Litros
lcl-PHA	Polihidroxialcanoatos de cadena larga (long chain length)
LDPE	Polietileno de baja densidad
mcl-PHA	Polihidroxialcanoatos de cadena media (medium chain length)
m ³	Metros cúbicos
mg	Miligramos
mm	Milímetros

Símbolo o abreviatura	Descripción
MNNG	N-metil-N-nitro-nitrosoguanidina
N	Nitrógeno
NaCl	Cloruro de sodio
O ₂	Oxígeno molecular
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
OMG	Organismos modificados genéticamente
ONU	Organización de las Naciones Unidas
OPP	Ruta de pentosa fosfato oxidasa
P	Fósforo
PA	Poliamida
PBAT	Polibutilén adipato-co-terftalato
PCC	Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria
PCL	Policaprolactona
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDH	Enzima piruvato deshidrogenasa compleja
PEF	Polietilen-furonato
PET	Tereftalato de polietileno
PHAs	Polihidroxialcanoatos
PHB	Polihidroxibutirato
PLA	Ácido poliláctico
PM	Materia particulada
PP	Polipropileno
PRTR	Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia
PS	Poliestireno
PTT	Tereftalato de politrimetileno
PVC	Cloruro de polivinilo
RAE	Real Academia Española
scl-PHA	Polihidroxialcanoatos de cadena corta (short chain length)
SO _x	Óxidos de azufre
sp	Especie
TCA	Ciclo del ácido tricarbóxico
TFG	Trabajo de Fin de Grado
UAL	Universidad de Almería
UE	Unión Europea
UMH	Universidad Miguel Hernández
UPC	Universitat Politècnica de Catalunya
UV	Ultravioleta

ÍNDICE:

1. INTRODUCCIÓN:	7
2. ANTECEDENTES:	14
3. OBJETIVOS:	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS:	16
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:	20
5.1. Etapa 1. Investigación preliminar a escala de laboratorio:	20
a) Cepas empleadas:	21
b) Fuentes de nutrientes:	21
c) Condiciones de cultivo:	23
5.2. Etapas 2 y 3. Estrategias para la industrialización de media a gran escala:	25
a) Herramientas de simulación:	25
b) Elección de los fotobiorreactores (FBRs):	26
5.3. Etapa 4. Nuevas tendencias de estrategias de mejora:	29
a) Consorcios microbianos:	29
b) Herramientas genéticas y moleculares:	30
c) Fuentes de nutrientes alternativas:	33
d) Biorrefinería:	34
6. CONCLUSIONES:	36
7. PROYECCIÓN FUTURA:	37
8. BIBLIOGRAFÍA:	38

1. INTRODUCCIÓN:

Los plásticos convencionales son materiales compuestos por polímeros procedentes en su gran mayoría de combustibles fósiles, como el petróleo y el gas natural, combinados con aditivos químicos que modifican, optimizan y mejoran sus propiedades. Desde 1950, este material ha experimentado un crecimiento exponencial en su producción, uso y comercialización, que se sigue observando en la actualidad. Esta tendencia creciente está condicionada por un modelo de economía lineal y por sus características específicas (ligereza, dureza, durabilidad y resistencia a la degradación entre otras), junto a un bajo coste de producción y gran versatilidad.

Este crecimiento se ha visto potenciado por la pandemia de COVID-19, que provocó un aumento repentino de la demanda mundial de equipos de protección individual (EPIs) y de productos plásticos de un solo uso, según la Agencia Europea de Medio Ambiente (AEMA) (2021). Un claro ejemplo se produjo en el año 2020, con un uso mensual aproximado de 76 millones de guantes, 1,6 millones de gafas de protección y 89 millones de mascarillas, como recoge Chaib (2020). Además, los ensayos clínicos realizados para la obtención de la vacuna y el programa de vacunación global generaron grandes cantidades de residuos, como las 800-1000 mil millones de jeringas necesarias para vacunar solo al 60% de la población mundial (Nanda y Bharadvaja, 2022).

Los plásticos convencionales se han convertido en un pilar fundamental de la economía, con gran relevancia en múltiples industrias como el embalaje, la edificación y construcción, y el automóvil, que representan alrededor del 70% de los plásticos empleados en Europa. A su vez, suponen una fuente de empleo y riqueza alcanzando en 2021 más de 1,5 millones de puestos de trabajo y un volumen de negocio de 405.000 millones de euros solo en la Unión Europea, según datos del informe “Plásticos – Situación 2022” de *Plastics Europe* (2022). En 2015, se desecharon y dejaron de ser útiles 6.300 millones de toneladas de plástico de las más de 8.000 millones acumuladas a nivel global desde los años 50. Se estima, que para 2050, si se sigue esta proyección, se podrían generar más de 25.000 millones de toneladas de este material, de las que gran parte podría llegar a los vertederos y filtrarse al medio ambiente (Geyer *et al.*, 2017). Los plásticos más empleados y sus principales usos se indican en la siguiente figura:

TIPO DE PLÁSTICO	SÍMBOLO	APLICACIONES
Tereftalato de polietileno (PET)		Botellas de bebidas, recipientes de medicamentos, fibras textiles, piezas de carrocería.
Polietileno de alta densidad (HDPE)		Envases para leche, aceites de motor y productos de higiene personal; recipientes de detergentes y lejías; conductos de fluidos y agua.
Cloruro de polivinilo (PVC)		Todo tipo de tuberías y tejas, ordenadores y carcasas de teléfonos, ventanas e interiores de vehículos.
Polietileno de baja densidad (LDPE)		Bolsas alimentación, film transparente, mangueras, juguetes u revestimientos de cables.
Polipropileno (PP)		Tapas de botellas, vasos de plástico, fiambreras, recipientes de medicamentos, juguetes, envases de alimentos y piezas de automóvil.
Poliestireno (PS)		Tazas de café desechables, espuma de embalaje, envases de alimentos, cubiertos de plástico y envases de un solo uso.

Figura 1. Tipos de plásticos más empleados, simbología y sus aplicaciones más comunes.

Como se menciona en el informe “*Plastics, the circular economy and Europe’s environment – A priority for action*” (AEMA, 2021), los impactos significativos del plástico han provocado que sea objeto de una mayor atención y preocupación desde el punto de vista ambiental y de protección de la salud pública. Esto es debido a su impacto ambiental, influencia en el cambio climático y afección a la salud humana, junto con la necesidad de avanzar hacia un modelo de economía circular, que maximice los recursos disponibles y minimice la generación de residuos, y la consecución de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), impulsados por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) en su Agenda 2030.

Los impactos negativos del plástico no solo se producen por su condición de residuo al final de su vida útil, sino que se dan en todo su Ciclo de Vida (ver Figura 2), que se define como la serie de etapas consecutivas e interrelacionadas de un producto y que contempla: (1) la extracción y adquisición de materias primas, en este caso finitas al tratarse de combustibles fósiles; (2) procesos y fabricación; (3) uso, reutilización y mantenimiento, siendo de preocupación los plásticos de un solo uso; (4) reciclaje y gestión de sus residuos, todo un reto al tener los plásticos un tiempo de degradación elevado.

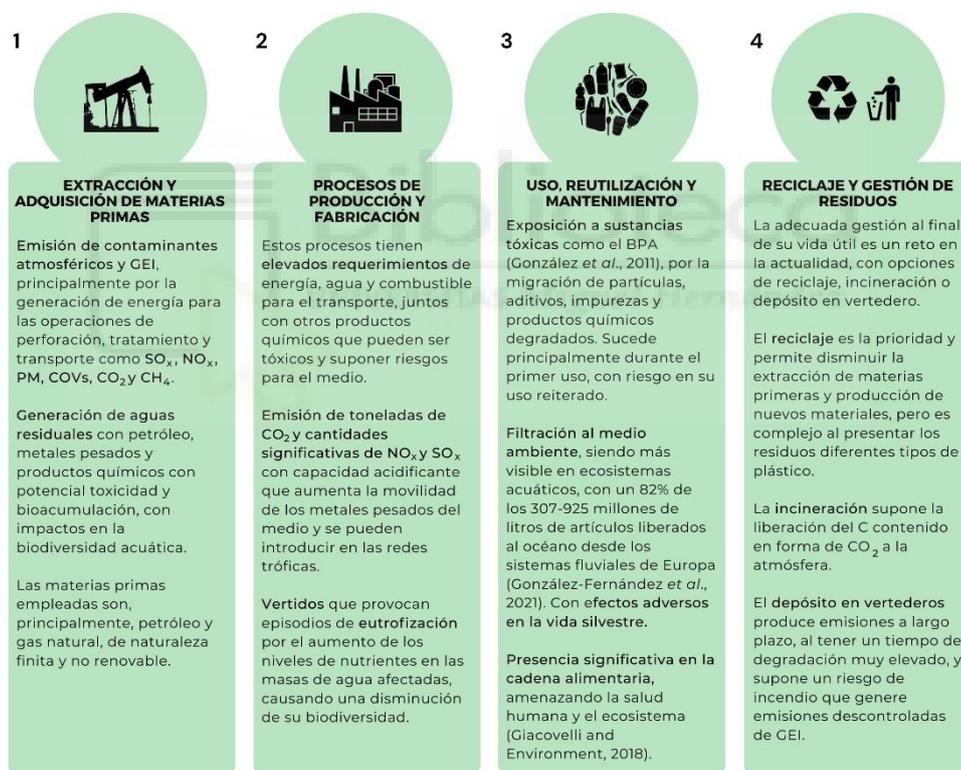


Figura 2. Impactos negativos del plástico a lo largo de su ciclo de vida.

Los esfuerzos de las instituciones, industrias, agentes sociales y de los consumidores por avanzar hacia un consumo más sostenible y circular que frene la contaminación plástica son hasta ahora insuficientes, por lo que es necesaria la búsqueda de alternativas a estos plásticos convencionales con origen en fuentes no renovables.

En esta búsqueda de alternativas viables aparecen los polímeros de base biológica, definidos como bioplásticos por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), al no utilizar combustibles fósiles para su producción. Uno de los retos al que se enfrenta esta alternativa sostenible es la producción de bioplásticos biodegradables, es decir, que todos sus componentes orgánicos puedan ser degradados por acción biológica a CO₂, CH₄, H₂O, biomasa y otras sustancias naturales (Zhong *et al.*, 2020), ya que no todos lo son, como se contempla en la Figura 3. Los bioplásticos no biodegradables predominan en una industria en crecimiento, que actualmente representa menos del 1% de los aproximadamente 367 millones de toneladas de plástico producidos en el mundo anualmente (Plastics Europe, 2022), y que cuenta con un alto potencial económico y ecológico para una bioeconomía circular baja en carbono (European Bioplastics, 2023).

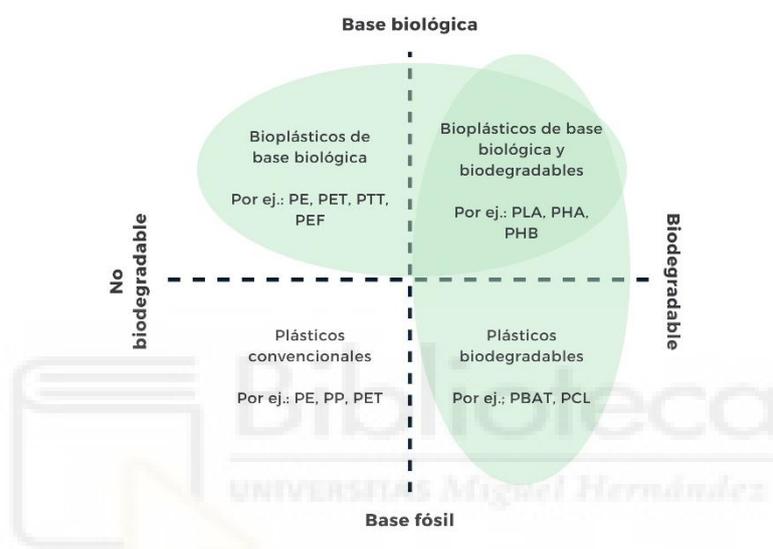


Figura 3. Clasificación de plásticos y bioplásticos por su procedencia y biodegradabilidad.
Fuente: Elaboración propia basada en el informe de 2016 de *European Bioplastics*.

Los bioplásticos se dividen en tres grupos en función de su origen: Polímeros bioquímiosintéticos, cuyos monómeros son sintetizados biológicamente y se polimerizan químicamente; polímeros biosintéticos, con la síntesis de monómeros y polimerización llevada a cabo por procesos biológicos; polímeros naturales modificados, que requieren de una modificación química y/o física de sus propiedades para su uso.

Los polímeros biosintéticos, bioplásticos de interés en el presente trabajo, se clasifican en diferentes grupos según las materias primas empleadas, encontrando: (1) de primera generación, basados en biomasa agrícola de uso alimentario; (2) de segunda generación, elaborados con biomasa no alimentaria; (3) de tercera generación, generados a partir de microalgas y bacterias.

La mayoría de los bioplásticos que se producen son de primera generación, y provienen, por ejemplo, del maíz o de la caña de azúcar (ej.: 2%-7% por peso seco con caña azúcar, Ferreira *et al.*, 2018). A pesar de obtener buenos rendimientos, el uso de cultivos agrícolas empleados en la alimentación presenta una problemática por su potencial amenaza para la seguridad alimentaria, al aumentar la demanda y ampliar la superficie destinada a los cultivos, poniendo en riesgo la calidad y el recurso de suelo agrícola. Además,

esta fuente puede verse afectada por el crecimiento poblacional, la influencia social, el cambio climático y otros aspectos que no permiten la estabilidad requerida.

Esto mismo ocurre con los bioplásticos de segunda generación, que emplean por ejemplo bagazo, rastrojo de maíz y residuos de papel, ya que la biomasa no alimentaria también compite por el recurso de suelo. Las macroalgas también se emplean como materia prima (ej.: 2,8% en peso seco con *Saccharina latissima*, Olsen *et al.*, 2017), a pesar de las competencias con otras aplicaciones más rentables económicamente como el biocombustible, y aun su difícil disponibilidad, elevado coste y complejidad de los procesos, vulnerabilidad frente a la contaminación y un impacto ambiental negativo al generar aguas residuales y emitir cantidades considerables de gases de efecto invernadero (GEI).

Debido a que estas materias primas de primera y segunda generación también son utilizadas para otras aplicaciones, como la producción de biocombustible, su uso supone una competencia entre las diferentes aplicaciones y una amenaza para la estabilidad de la producción de los diferentes bioproductos. Es por ello que se avanza en la producción de bioplásticos a partir de microorganismos, los denominados bioplásticos de tercera generación. Entre estos microorganismos destacan las microalgas, que conforman un grupo diverso de organismos unicelulares que realizan la fotosíntesis, donde se incluyen algas eucariotas, principalmente algas verdes conocidas como clorofíceas, y cianobacterias (ej.: 4,3% en peso seco con *Synechocystis* sp, PCC 6803, Singh y Mallick, 2017). Además, son los principales productores primarios de los hábitats acuáticos, y suponen el 70% de la biomasa total del planeta.

Dentro de las microalgas, las cianobacterias están adquiriendo gran interés en los últimos años como productores de bioplásticos por ser autótrofos y por su versatilidad. Las cianobacterias han sido consideradas tradicionalmente como algas (Aproximación Botánica), de hecho, se siguen conociendo como algas verdeazuladas debido a su fisiología, capacidad fotosintética y contenido en clorofila-a y ficocianina, pigmento que les otorga su color característico. Sin embargo, gracias al desarrollo de las herramientas moleculares a mediados del S.XX, se demostró que estos organismos presentan características e historia evolutiva propias similares a las de bacterias Gram negativas, por lo que comenzaron a denominarse cianobacterias por el Sistema Bacteriológico (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2001). Otros nombres por las que son conocidas son cianofitas y cianofíceas, aunque la tendencia actual es denominarlas cianoprocaritas, término que empezó a utilizarse en 1993 por investigadores como Jiří Komárek, con el fin de unificar los criterios microbiológicos y botánicos.

Las cianobacterias se localizan en una gran diversidad de ambientes acuáticos iluminados, suelos y roca desnuda (Whitton, 2012), así, se encuentran especies cosmopolitas de amplia distribución geográfica y otras que habitan en ambientes extremos, donde han desarrollado estrategias de adaptación para sobrevivir y prosperar. Algunos de estos ambientes extremos son aguas termales (ej.: *Cyanocohniella calida*, Kastovský *et al.*, 2014), desiertos y zonas semiáridas (ej.: *Arthronema africana*, Asencio y Aboal, 2003), regiones polares (ej.: *Phormidium autumnaley*, Strunecký *et al.*, 2012) y ambientes hipersalinos (ej.: Figura 4).

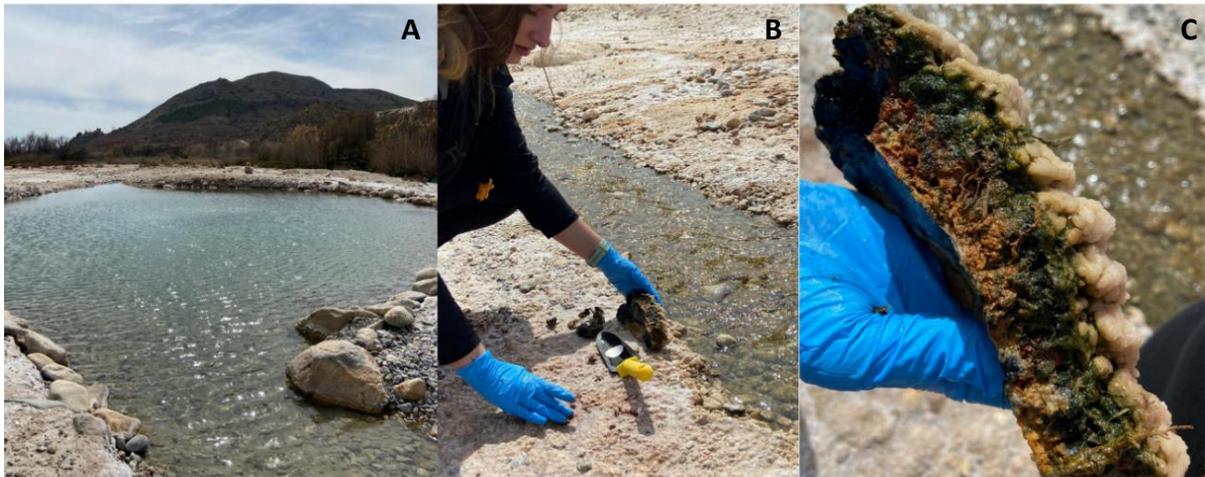


Figura 4. Recogida de muestras biológicas para la búsqueda de nuevas cepas de cianobacterias, dentro del proyecto coordinado Cyan2Bio, en Les Salinetes (Novelda): (A) vista general el Clot Negre, estanque natural de agua sulfurosa; (B) recogida de muestras; (C) tapete microbiano.

En la naturaleza podemos encontrar cianobacterias con una gran diversidad morfológica (Figura 5), como células individuales de vida libre o agrupadas en colonias (Figura 5a), o filamentosas con o sin ramificaciones (Figuras 5b y 5c), creciendo en costras, tapetes microbianos (Figura 4c) o bien en crecimientos masivos como floraciones o *blooms*. En algunas cianobacterias se observan heterocistos (Figura 5d), células donde se fija el nitrógeno (N) atmosférico, y acinetos, células de resistencia para sobrevivir en condiciones adversas.

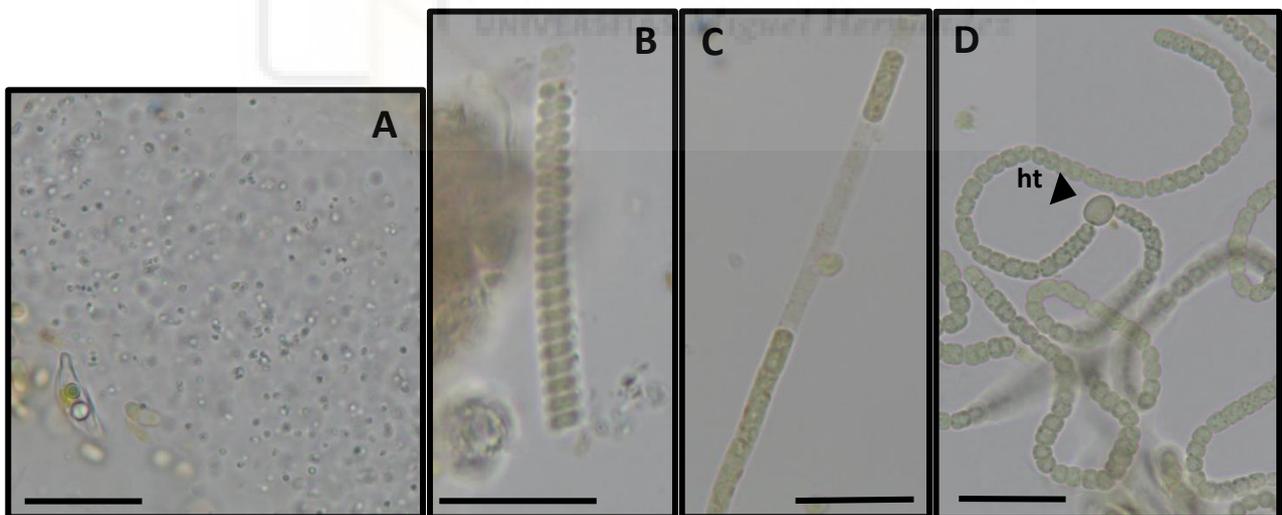


Figura 5. Microfotografías a escala de 10 micras de cianobacterias con microscopio óptico, sacadas de las muestras biológicas recogidas en el Clot Negre, concretamente del tapete microbiano: (A) *Aphanocapsa* sp., en forma células individuales de vida libre y colonias; (B) *Spirulina* sp.; (C) *Phormidium* sp., cianobacteria filamentosas no ramificadas; (D) *Nostoc* sp., cianobacteria filamentosas con heterocistos. Las microfotografías A, B y C pertenecen a muestras ambientales, y la microfotografía D corresponde a un cultivo para el aislamiento de la cianobacteria a partir de las muestras ambientales. Fuente: fotografías propias del grupo de investigación.

Las cianobacterias existen desde, al menos, 3.500 millones de años (García-Pichel *et al.*, 2003), y tuvieron un papel fundamental en la oxigenación de la atmósfera durante el Gran Evento de Oxidación (GEO), clave para la historia evolutiva de la Tierra. Durante este evento, la actividad fotosintética oxigénica de las

cianobacterias provocó un gran aumento de los niveles de O₂ en la atmósfera y permitió una gran diversificación biológica, pero también llevó a la extinción masiva y restricción de ambientes en especies anaerobias. A su vez, se ha sugerido la participación de estos organismos en la formación de depósitos de petróleo (Whitton, 2012), al encontrarse especies capaces de producir hidrocarburos similares a los presentes en el petróleo crudo cuando son sometidas a altas presiones y temperaturas, como las que pudieron producirse en los procesos de diagénesis. Desde entonces, la importancia de las cianobacterias radica en su condición de microorganismos fotosintéticos y base de la cadena trófica, junto con su alta tasa de crecimiento, gran cantidad de ácidos grasos y metabolitos activos, muchos de ellos con interés farmacológico e industrial como los bioplásticos.

De los diferentes tipos de bioplásticos, los polihidroxicanoatos (PHAs) (ver Figura 6) se enmarcan como los más prometedores al ser biodegradables y biocompatibles, presentando propiedades que se asemejan a los plásticos convencionales (Naser *et al.*, 2021). Los PHAs se acumulan en forma de gránulos refráctiles (Figuras 6a y 6b) por algunas bacterias, arqueas y microalgas como material de reserva fuente de carbono y energía (González García *et al.*, 2013). Se trata de poliésteres alifáticos biodegradables, compuestos por hasta 150 monómeros de ácidos grasos hidroxilados en su carbono 3 y esterificado su grupo carboxilo (Figura 6c), lo que permite la unión con el grupo hidroxilo del monómero contiguo (Prados y Maicas, 2016).

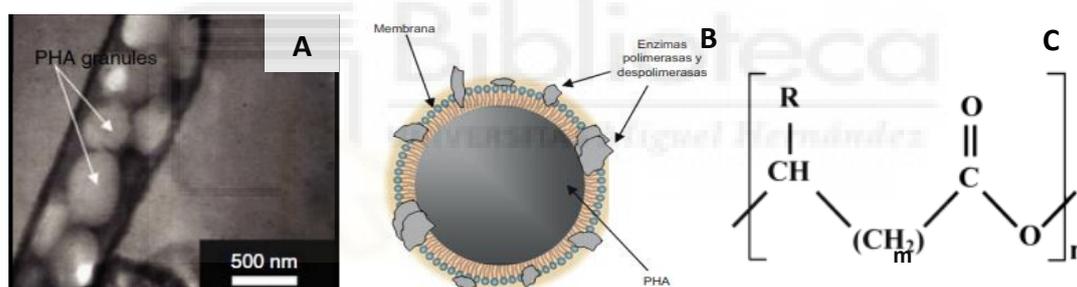


Figura 6. Almacenamiento y estructura de Polihidroxicanoatos. (a) Gránulo de PHB en el interior de una cianobacteria (Abed *et al.*, 2008); (b) Representación del gránulo de PHA (Sudesh *et al.*, 2000); (c) Estructura química de los PHAs (Prados y Maicas, 2016).

Los PHAs se clasifican según su composición o su longitud de cadena lateral. La primera de ellas diferencia entre PHAs homopolímeros, si están formados por monómeros de la misma naturaleza, y PHAs copolímeros, si se trata de dos o más monómeros diferentes; mientras que la segunda, que es la más utilizada, viene resumida en la siguiente figura:

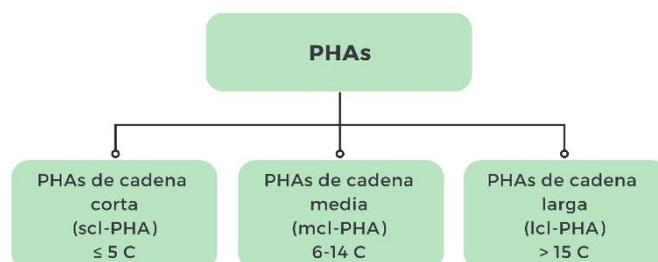


Figura 7. Clasificación PHAs según longitud de cadena de carbono. Fuente: Elaboración propia con información extraída de Cardona, 2012.

El PHA más estudiado es el polihidroxiбутirato o PHB (Gumel *et al.*, 2013). Se trata de un PHA de cadena corta, que destaca por sus buenas propiedades térmicas y mecánicas similares a las del polipropileno (PP). Además, durante su producción se puede emitir hasta un 70% menos de emisiones CO_{2eq} que en la producción del plástico convencional PP (Walker y Rothman, 2020). El PHB ya se comercializa, concretamente el producido por distintas bacterias heterótrofas, con un coste estimado entre 5 y 18 veces más que la producción del PP (Singh *et al.*, 2017), y un 47% del coste procedente de la suplementación de fuentes de carbono y oxígeno para su crecimiento (Costa *et al.*, 2019). Debido a los elevados costes, se busca una alternativa más rentable y con menores requerimientos, como el uso de cianobacterias, que son capaces de producir PHB directamente de forma fotoautótrofa a partir de luz solar y CO₂.

La producción de PHB en cianobacterias se produce en respuesta a situaciones ambientales cambiantes, que provocan condiciones de estrés, tales como una limitación de nutrientes, una relación C/N desequilibrada y un exceso de iluminación. Sin embargo, su función exacta en la célula y la totalidad de los reguladores de la ruta metabólica que produce PHB no están definidos (Koch y Frochhammer, 2021), por lo que es necesario continuar con las investigaciones al respecto, con el fin de obtener un mayor rendimiento en los procesos de producción y avanzar en esta alternativa sostenible de producción de bioplásticos.



2. ANTECEDENTES:

La producción de bioplásticos de primera generación presenta ventajas potenciales respecto a los plásticos convencionales, relacionadas con su impacto negativo menor. En cuanto al rendimiento, los estudios realizados indican que varía según las condiciones de procesamiento, del proceso de producción y de la materia prima empleada, por ejemplo, el rendimiento es del: 2,7% al utilizar harina de soja (Arias *et al.*, 2019), de 2% a 6% por peso seco con almidón de maíz (Koller *et al.*, 2017), y de 2% al 7% por peso seco de caña azúcar (Ferreira *et al.*, 2018). Además, tienen un alto coste y elevada complejidad en las fases de extracción y purificación.

En cuanto a la producción de bioplásticos de segunda generación, también se emplean macroalgas, al no competir con los cultivos terrestres y presentar una mayor productividad. En todos los casos, los bioplásticos se obtienen mediante fermentación bacteriana, ya que el uso de bacterias es necesario en estos procesos para degradar los polisacáridos de la biomasa vegetal a monosacáridos, que posteriormente se emplean para producir el biopolímero. Algunos de los rendimientos obtenidos son del: 2,8% en peso seco en el alga parda *Saccharina latissima* (Olsen *et al.*, 2017); y en las algas rojas *Pyropia yezoensis* y *Gracilaria gracilis* del 3,2% en peso seco (Kang *et al.*, 2017) y del 8,5% en peso seco (Mokhtarani *et al.*, 2021), respectivamente.

Como se ha mencionado en la introducción, las materias primas de segunda generación presentan ventajas frente a las de primera generación, pero su utilización presenta inconvenientes. Por ello, las investigaciones actuales se centran en los bioplásticos de tercera generación, principalmente PHAs, producidos de forma naturales por microorganismos, como es el caso de la bacteria heterótrofa *Cupriavidus metallidurans*, con la que se han obtenido buenos rendimientos, tanto en las cepas silvestres como las modificadas genéticamente (Chen G-Q. *et al.*, 2009).

Los elevados costes de producción de los sistemas heterótrofos, provenientes de factores biológicos limitantes, como el requerimiento de una fuente de carbono orgánico para su biosíntesis y la necesidad de aireación (Costa *et al.*, 2018), han hecho que las investigaciones se centren en el uso de cianobacterias. Éstas producen PHB de forma autótrofa, a diferencia de las algas eucariotas, y lo acumulan en condiciones de estrés, sin necesidad de oxigenación intensiva y con menores requerimientos nutricionales, lo que se traduce en menores costes.

El primer estudio relacionado con la biosíntesis de PHB fue publicado en 1966, y en él se utilizaba la cianobacteria *Chlorogloea fristschii* (Balaji, 2013). Posteriormente, se realizaron numerosos estudios en los que se evaluó la cantidad de PHBs a escala de laboratorio en diferentes cepas de laboratorio. Destacan los rendimientos obtenidos en: *Synechocystis* sp. PCC 6803, con un 4,3% en peso seco (Singh y Mallick, 2017) realizado en medio BG11 a temperatura estándar; *Spirulina platensis*, con 6% en peso seco; *Oscillatoria limnosa*, con 6% en peso seco (Bhati *et al.*, 2010); *Nostoc muscorum*, con 8,5% en peso seco (López, 2010); y *Synechococcus* sp. MA19, hasta un 27% en peso seco a temperaturas de 50°C, lo que dificulta su producción industrial.

Los rendimientos obtenidos de producción de PHB a partir de cianobacterias son prometedores, pero su proceso de producción no está tan estudiado y desarrollado, como los procesos llevados a cabo por bacterias heterótrofas. Además, el rendimiento de PHB es en general muy bajo, normalmente por debajo del 10% del peso seco de la célula (dcw) (Rueda *et al.*, 2022). De esta forma, las investigaciones actuales se están centrando en la optimización de la producción para obtener un proceso más competitivo y económico, que maximice su rendimiento. En este sentido, las condiciones de cultivo, sus requerimientos abióticos y bióticos, el estudio de las rutas metabólicas y los factores implicados, y la búsqueda de nuevas fuentes de nutrientes y estrategias de mejora, toman un papel relevante para la reducción de costes e impacto del proceso de producción.

3. OBJETIVOS:

El objetivo principal del presente Trabajo de fin de Grado (TFG) es recopilar conocimientos sobre la producción de forma óptima y sostenible de bioplásticos, concretamente de PHB, a partir de cianobacterias, con el fin de conocer los puntos críticos del proceso en los que se puede actuar, para frenar la contaminación plástica causada por los plásticos convencionales, favoreciendo así la consecución de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

Para alcanzar el objetivo principal de este trabajo, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- Dar una visión general sobre la problemática actual de los plásticos convencionales y sus alternativas sostenibles, su influencia en los ODS y en una bioeconomía circular baja en carbono.
- Conocer la relevancia de los factores abióticos y bióticos que influyen en la producción de PHB en cianobacterias, para favorecer la actuación sobre ellos.
- Analizar las estrategias que permiten aumentar la acumulación de PHB en la célula, optimizando los procesos de producción, tanto a nivel molecular como de parámetros fisicoquímicos, incluyendo infraestructuras.

4. MATERIALES Y MÉTODOS:

Para la elaboración de este Trabajo de Fin de Grado (TFG), y por su modalidad de revisión bibliográfica, se ha llevado a cabo una búsqueda de literatura científica relacionada con las cianobacterias y la producción de bioplásticos, como la alternativa sostenible a los plásticos convencionales con origen en fuentes no renovables que generan la actual problemática por su impacto en el medio ambiente, afección de la salud humana e influencia en el cambio climático.

Para ello, han sido considerados diferentes criterios de búsqueda utilizando palabras clave y conceptos relativos al tema tratado en el presente trabajo, principalmente en inglés, destacando “plastics”, “bioplastics”, “PHA”, “PHB”, “microalgae”, “cyanobacteria”, “PHB metabolism”, “photobioreactor”, “genetic modification”, “wastewater”, entre otras. Todo ello recogido en la siguiente figura, mapa conceptual del presente Trabajo:

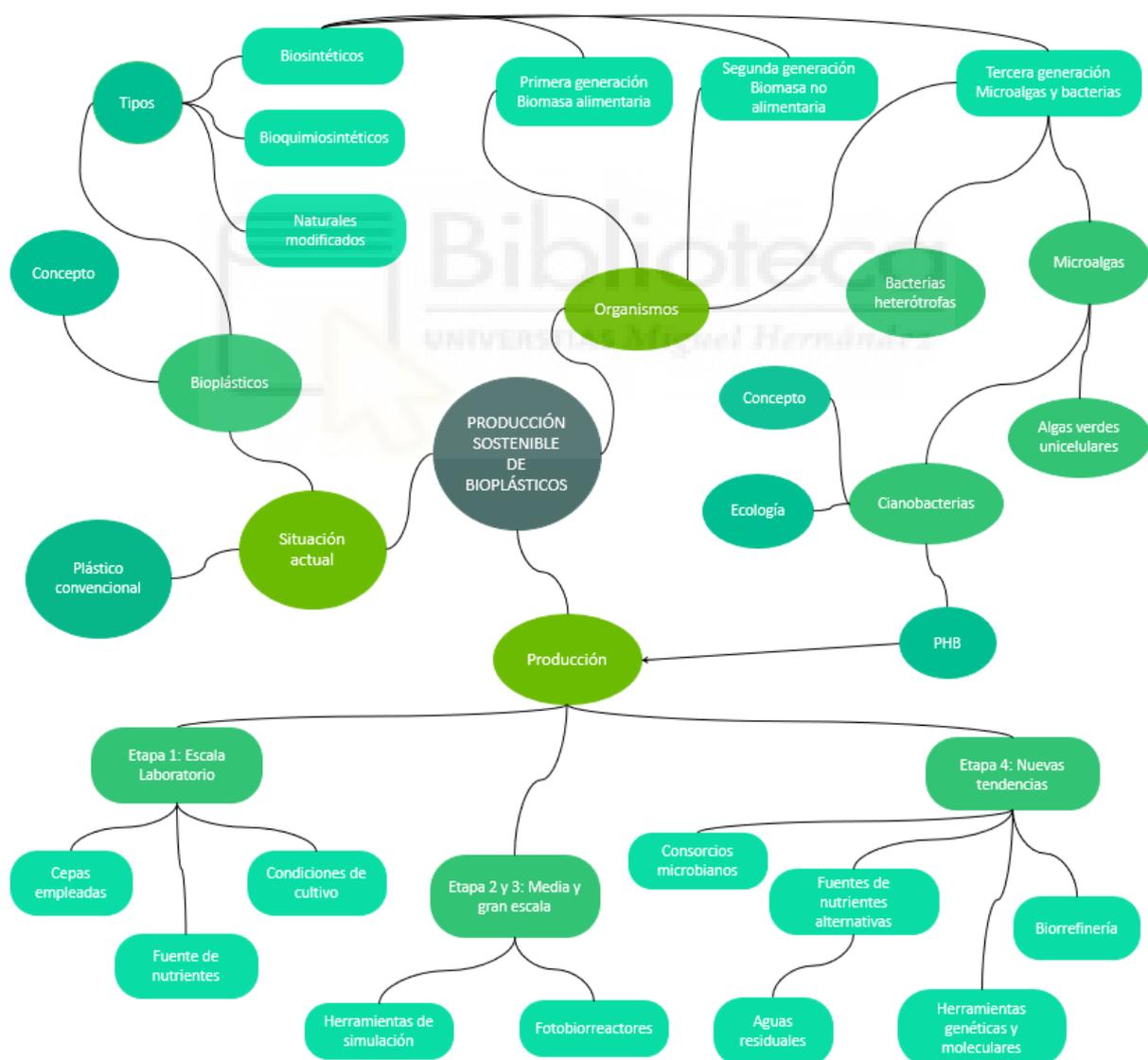


Figura 8. Mapa conceptual que relaciona las ideas y conceptos del presente Trabajo de Fin de Grado.

En la revisión bibliográfica llevada a cabo se han empleado diferentes bases de datos, utilizando la conjunción “AND” y “OR” para facilitar la búsqueda e interrelacionar palabras clave y conceptos, entre las que se encuentran:

- Base de datos propia del grupo de investigación, de la que se han consultado 26 artículos.
- Base de datos externas:
 1. PubMed, filtrando por la aparición de los términos indicados en el título y/o abstract, realizando las siguientes búsquedas:
 - plastic problem[Title/Abstract], para la que se obtienen 24 resultados.
 - plastic pollution[Title/Abstract], para la que se aplicó el filtro *Review*, obteniendo 357 resultados.
 - types of bioplastics[Title/Abstract] OR classification of bioplastics[Title/Abstract], para la que se obtienen 102 resultados.
 - bioplastics[Title/Abstract] AND sustainability[Title/Abstract], para la que se obtienen 76 resultados.
 - bioplastics[Title/Abstract] AND circular economy[Title/Abstract], para la que se obtienen 73 resultados.
 - cyanobacteria[Title/Abstract] AND bioplastic[Title/Abstract], para la que se obtienen 27 resultados.
 - bacteria[Title/Abstract] AND cyanobacteria[Title/Abstract] AND bioplastics[Title/Abstract], para la que se obtienen 4 resultados.
 - microalgae[Title/Abstract] AND cyanobacteria[Title/Abstract] AND bioplastics[Title/Abstract], para la que se obtienen 13 resultados.
 - cyanobacteria[Title/Abstract] AND PHB[Title/Abstract], para la que se obtienen 77 resultados.
 - PHB synthesis in cyanobacteria[Title/Abstract], para la que se obtienen 59 resultados.
 - genetic modification of cyanobacteria[Title/Abstract], para la que se obtienen 3 resultados.
 - cyanobacteria[Title/Abstract] AND bioplastics[Title/Abstract] AND genetic manipulation[Title/Abstract], para la que se obtiene 1 resultado.
 - culture conditions cyanobacteria[Title/Abstract] AND PHB[Title/Abstract], para la que se obtienen 14 resultados.
 - cyanobacteria[Title/Abstract] AND wastewater[Title/Abstract], para la que se obtienen 319 resultados.
 - cyanobacteria[Title/Abstract] AND simulation[Title/Abstract], para la que se obtienen 139 resultados.
 - cyanobacteria[Title/Abstract] AND biorefinery[Title/Abstract], para la que se obtienen 46 resultados.

- cyanobacteria[Title/Abstract] AND photobioreactors[Title/Abstract], para la que se obtienen 99 resultados.
 - cyanobacteria[Title/Abstract] AND microbial consortia[Title/Abstract], para la que se obtienen 36 resultados.
 - cyanobacteria[Title/Abstract] AND PHB[Title/Abstract] AND improvements[Title/Abstract], para la que se obtiene 1 resultado.
2. Google Scholar – Google Académico, filtrando por la aparición de los términos indicados en el título, realizando las siguientes búsquedas:
- allintitle: plastic pollution, para la que se filtró por artículos de revisión con el fin de reducir la búsqueda, obteniendo 213 resultados.
 - allintitle: plastics AND bioplastics, para la que se obtienen 132 resultados.
 - allintitle: classification of bioplastics, para la que se obtiene 1 resultado.
 - allintitle: bioplastics AND sustainability, para la que se obtienen 59 resultados.
 - allintitle: bioplastics AND circular economy, para la que se obtienen 37 resultados.
 - allintitle: cyanobacteria AND bioplastic, para la que se obtienen 7 resultados.
 - allintitle: cyanobacteria AND bioplastics, para la que se obtienen 8 resultados.
 - allintitle: cyanobacteria AND PHB, para la que se obtienen 31 resultados.
 - allintitle: cyanobacteria AND photobioreactor, para la que se obtienen 51 resultados.
 - allintitle: cyanobacteria AND wastewater AND PHB, para la que se obtienen 4 resultados.

Se han revisado las anteriores publicaciones científicas, entre artículos científicos, revisiones, libros, trabajos de fin de grado y tesis doctorales relacionadas con los temas a tratar, y defendidas en distintas universidades públicas españolas. De todas ellas, han sido seleccionadas 98.

Para completar la búsqueda, han sido consultadas páginas web e informes elaborados por fuentes oficiales y entidades gubernamentales a nivel global, europeo, nacional y local, como la Comisión Europea, diferentes Ministerios del Gobierno español, el Ayuntamiento de Novelda y la Universidad de Almería. De esta forma se ha obtenido información rigurosa, actualizada, oficial y concreta de los temas de interés en las siguientes fuentes:

- Organización de las Naciones Unidas, referente a sus Objetivos de Desarrollo Sostenible incluidos en la Agenda 2030 (www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/).
- Unión Europea – Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), referente a la legislación sobre Organismos Modificados Genéticamente (OMG) (www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/gmo).
- Comisión Europea – European Commission, (commission.europa.eu/index_es), referente a:
 1. Bioeconomía y los sectores de base biológica.
 2. Bioeconomía Azul.
 3. Green Deal o Pacto Verde Europeo.

- Agencia Europea de Medio Ambiente (AEMA) – European Union (www.eea.europa.eu/es), en su informe *“Plastics, the circular economy and Europe’s environment – A priority for action”* (www.eea.europa.eu/publications/plastics-the-circular-economy-and/download)
- Observatorio Europeo del Mercado de los Productos de Pesca y Acuicultura (EUMOFA) (www.eumofa.eu/es/).
- Plastics Europe, asociación de productores plásticos en Europa (plasticseurope.org/), y su informe *“Plásticos – Situación 2022”* (plasticseurope.org/es/knowledge-hub/plasticos-situacion-en-2022/).
- European Bioplastics, asociación de la industria de bioplásticos en Europa (www.european-bioplastics.org/), y su informe de 2016 (www.european-bioplastics.org/news/publications/).
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España (MAPA) (www.mapa.gob.es/es/).
- Ministerio para la Transición Ecológica y Reto Demográfico (MITECO), Gobierno de España (www.miteco.gob.es/es/).
- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), agencia estatal española adscrita al Ministerio de Ciencia e Innovación, Biblioteca Virtual (csic-primo.hosted.exlibrisgroup.com/primo-explore/search?vid=34CSIC_VU1).
- Concejalía de Medio Ambiente del Ayuntamiento de Novelda (Alicante) (novelda.es/tu-ayuntamiento/concejalias/medio-ambiente).
- Universidad de Almería (UAL), con respecto a los fotobiorreactores a emplear (w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/index.html).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

En los estudios llevados a cabo sobre la producción de PHB se han obtenido resultados prometedores a escala de laboratorio (del 4,3% en peso seco en *Synechocystis* sp. PCC 68034, Singh y Mallick, 2017), pero los rendimientos son bajos y presentan dificultades en la producción industrial. Para aumentar la competitividad frente a los diferentes bioplásticos producidos por bacterias heterótrofas, es necesario desarrollar nuevos estudios. Las investigaciones hasta el momento se centran en la mejora y la optimización de los procesos, centrándose en los siguientes factores: las condiciones de estrés que promueven una mayor acumulación de PHB, su función exacta en la célula y la de los reguladores de su ruta metabólica; sus requerimientos y condiciones de cultivo óptimas; y la búsqueda de estrategias que reduzcan los costes y el impacto del proceso de producción.

A la hora de mejorar y optimizar los procesos de producción de PHB en cianobacterias es necesaria realizar una investigación preliminar. Ésta se lleva a cabo a escala de laboratorio (Etapa 1), que incluye el estudio y la selección de las cepas de cianobacterias con mayor rendimiento, el estudio de las diferentes fuentes de nutrientes y de las condiciones de cultivo óptimas para conseguir una mayor producción (ej.: la salinidad y la luz).

A continuación (Etapa 2 y 3), se estudian las estrategias de industrialización del cultivo de cianobacterias y producción de PHBs, tanto a media como a gran escala. Para ello se emplean herramientas de simulación que permiten conocer las respuestas de las cepas seleccionadas al exponerse a diferentes condiciones, y se eligen y diseñan los fotobiorreactores adecuados en función de la escala y la cepa.

Por último (Etapa 4), se estudian las nuevas tendencias para la mejora de los procesos, como son: la formación de consorcios microbianos, que simulan a las comunidades encontradas en la naturaleza, y la utilización de herramientas genéticas y moleculares, que permiten incidir en los códigos genéticos y controlar los niveles de expresión génica en las cepas seleccionadas, para aumentar la acumulación de PHB en el interior de la célula, a pesar de las dificultades por motivos legislativos y burocráticos que suponen su uso. Otras tendencias son el empleo de fuentes de nutrientes alternativas, destacando las aguas residuales, ya que reducen los costes y el impacto ambiental, consiguiendo un proceso de bioeconomía circular donde este tipo de aguas se trata con una alta efectividad; y, por último, la biorrefinería, que integra procesos y equipos de conversión de biomasa para la producción de bioproductos con distinto valor añadido.

5.1. Etapa 1. Investigación preliminar a escala de laboratorio:

En esta primera etapa se realiza la investigación preliminar, que incluye: el estudio y selección de las cepas; las fuentes de nutrientes, que incluyen el carbono orgánico y el carbono inorgánico; y el estudio y selección de las condiciones de cultivo óptimas para el crecimiento de las cianobacterias y una mayor acumulación de PHB. En este tipo de investigaciones, generalmente se trabaja con volúmenes de pequeña escala, que van desde los 50 ml a 1 L.

a) Cepas empleadas:

Las cianobacterias pueden adquirirse por distintas vías. La más común es la de comprar las cepas a una colección de cultivos, como *Culture Collection of Algae & Protozoa* (CCAP) y *Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria* (PCC), o bien solicitarlas a través de colaboraciones a las colecciones privadas de grupos de investigación de institutos y universidades. Los motivos principales para utilizar este tipo de organismos es que no es necesario el proceso de aislamiento, debido a que las cepas ya están adaptadas a las condiciones de cultivo, de tal forma que su cultivo es relativamente sencillo y se conocen sus condiciones óptimas para un crecimiento rápido.

Las cepas de cianobacterias más empleadas y estudiadas para la producción de PHB pertenecen a especies de los géneros *Nostoc*, *Arthrospira*, *Synechococcus* y *Synechocystis* (Afreen *et al.*, 2021). De todas ellas, *Synechocystis* sp., es la más utilizada, especialmente la cepa PCC 6803, cuya ruta metabólica de PHB ya está caracterizada (Takeya *et al.*, 2017). Además, su secuencia genómica y sus otras rutas metabólicas también se conocen al ser una de las primeras cianobacterias en las que se secuenció el genoma completo (Kaneko *et al.*, 1996).

Los rendimientos obtenidos hasta ahora no están cerca de los que se consideran valores óptimos (15%-30% a escala de laboratorio), para que la cepa analizada se considere candidata para su uso en la producción de PHB a mayor escala. Como el rendimiento todavía es bajo, resulta de interés el aislamiento y estudio de nuevas cepas que se encuentran en la naturaleza, concretamente en ambientes dominados por condiciones extremas, donde las cianobacterias están en condiciones de estrés. Para ello es necesario recoger muestras biológicas directamente del medio y medir los parámetros ambientales, que permiten conocer las condiciones que generan estrés a estas cianobacterias. Una vez en el laboratorio, se preparan las muestras para ser cultivadas en diferentes medios de cultivo específicos y, posteriormente, se aíslan las colonias individuales para conseguir un cultivo puro, requiriendo de una identificación taxonómica mediante un enfoque polifásico en los que se combinan aspectos morfológicos, ecológicos y moleculares (Berrendero Gómez *et al.*, 2016). También es necesario un estudio de sus características biológicas, ya que algunas producen toxinas y los estudios sobre la alergenicidad de la biomasa, definida por la RAE como “la capacidad de desencadenar una respuesta inmunitaria anormal que provoca una reacción alérgica”, son limitados.

b) Fuentes de nutrientes:

Las cianobacterias cuentan con rutas metabólicas implicadas en la asimilación del carbono (C), por las que son capaces de acumular PHB en condiciones de estrés derivadas de situaciones ambientales adversas. El PHB es uno de los principales compuestos de almacenamiento de energía y de carbono junto con el glucógeno, con el que está relacionado (Rueda *et al.*, 2022). Se han descrito dos vías de síntesis de PHB en función del tipo de nutrición: una directa (nutrición autótrofa) en la que la ruta metabólica comienza con la fijación de C, y otra indirecta (nutrición heterótrofa) muy relacionada con la síntesis del glucógeno, que es oxidado y convertido en PHB en determinadas situaciones de limitación de nutrientes.

Como se acaba de comentar, la primera etapa para la síntesis de PHB por vía directa o autótrofa, consiste en la fijación de C, seguida de un proceso de glucólisis y la conversión del piruvato obtenido a Acetil-CoA hasta llegar a la síntesis del biopolímero. Esta fijación de C, en forma de CO₂, se da a través del Ciclo de Calvin, utilizando la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco).

I. Efectos de la adición de carbono orgánico:

Es posible aumentar la acumulación de PHB con la adición de una fuente de carbono orgánico, como glucosa, acetato o fructosa, entre otros, como se ha visto en diferentes investigaciones (Carpine *et al.*, 2020). Al adicionar carbono orgánico, las cianobacterias producen una mayor cantidad de Acetil-CoA, que se acumula, aumentando la relación Acetil-CoA/CoA, lo que activa la síntesis de PHB para volver al equilibrio, tal y como recoge Yashavanth *et al.* (2021).

En la mayoría de las cianobacterias estudiadas, se observa que la adición de carbono orgánico tiene impacto positivo sobre la producción de PHB, sin embargo, los rendimientos obtenidos varían dependiendo de la especie e incluso la cepa elegida. Rueda *et al.* (2022a), estudió la adición de 1,2g de acetato en una cepa de *Synechococcus* sp., obteniendo hasta un 26,1% dcw que corresponde a un aumento de 7,2 veces la producción de PHB, mayor que el obtenido por Miyake *et al.* en 1997 con la cepa *Synechococcus* sp. MA11 (18% dcw) aunque empleando un contenido de acetato mucho mayor (1,2g frente a 82 mg empleados por Rueda *et al.*, 2022a). Por otro lado, Rueda *et al.* (2022a) no observaron diferencias en el contenido de PHB en una cepa de *Synechocystis* sp. (5,6% dcw) tras la adición de acetato, mientras que Panda y Mallick (2007a) con *Synechocystis* sp. PCC 6803 sí que observaron un aumento, pero hay que tener en cuenta que la cantidad de acetato añadida era mayor (4g frente a 1,2g del primer estudio).

Los resultados muestran la gran influencia de la cantidad de carbono orgánico aportado, pero también influye en el proceso el tipo de fuente de carbono. Por ejemplo, se obtiene una producción mayor de PHB adicionando ácido valérico (Samantaray y Mallick, 2014) y combinando diferentes fuentes de carbono, como citrato y acetato o fructosa y acetato. Este aumento en la producción de PHB conlleva un aumento de los costes, presentando una desventaja competitiva frente a otros microorganismos, y puede ocasionar contaminaciones en la producción a gran escala cuando las condiciones no son estériles.

II. Efectos de la adición de carbono inorgánico:

La adición de fuentes de carbono inorgánico tiene un papel importante en la fotosíntesis, pero para la producción de PHB los requerimientos son moderados (Troschl *et al.*, 2018). Son pocos estudios que evalúen su efecto en la biosíntesis de PHB, y además los resultados obtenidos son contradictorios (Rueda *et al.*, 2022b).

Algunos estudios dictaminan que su adición impacta negativamente, como en *Synechocystis* sp. PCC 6714, para la que el contenido óptimo de C es del 2% (con rendimientos del 16,4% dcw) disminuyendo su rendimiento a un mayor contenido de C inorgánico, y en *Thermosynechococcus elongatus* cuyo rendimiento disminuyó cuando se incrementó el CO₂ al 5-20%, pasando del 14,5% dcw al 2% dcw (Eberly

y Ely, 2012). Además, altas concentraciones de CO₂ pueden causar una disminución del pH del cultivo, posible causante de inviabilidad de la biomasa.

A su vez, otros estudios confirman un impacto positivo al aumentar los niveles de CO₂, como el de Rueda *et al.* (2020), que observó una mayor oxidación del glucógeno a PHB tras el aumento de la concentración de C inorgánico disuelto (DIC) en régimen de “*feast-famine*” o “banquete-hambruna”, con una sobreexpresión de los genes relacionados con la síntesis de estos dos compuestos con respecto al cultivo en el que no se adicionó. Pero a su vez, observó un efecto negativo para *Synechococcus* sp., que puede justificarse con el uso de una diferente fuente de C inorgánico, CO₂ o NaHCO₃, pero debido al pH habitual al que se cultivan las cianobacterias, el CO₂ se transforma en HCO₃⁻. La única diferencia detectada es la fuerza iónica, por lo que los diferentes resultados se pueden explicar por las distintas capacidades de las distintas cepas a resistir el choque osmótico.

III. Efectos del nitrógeno y del fósforo:

Por otro lado, a nivel experimental la adición inicial de nitrógeno (N) y fósforo (P) y su posterior restricción se realiza de forma general para todas las cepas. El proceso de producción de PHB consta de dos fases experimentales: la fase de crecimiento, donde las cianobacterias son cultivadas en un medio con disponibilidad de N para obtener biomasa, y una fase de acumulación, que comienza cuando se ha consumido el N disponible en el medio de cultivo, que promueve la acumulación de PHB en la célula. En ambas fases, los niveles de P son bajos para evitar o reducir la contaminación del cultivo por otros organismos, como las algas verdes.

c) Condiciones de cultivo:

Las investigaciones recientes se están centrando en estudiar otras regulaciones metabólicas que puedan influir en la síntesis y degradación del PHB y del glucógeno. Algunas de ellas, han revelado información relacionada con la capacidad de las cianobacterias de cambiar el metabolismo para sobrevivir a los ciclos día-noche (Selim *et al.*, 2021) y de dirigirlo hacia la síntesis de glucógeno y PHB en condiciones de limitación de N (Orthwein *et al.*, 2021). En otros casos, se han centrado en la fase de acumulación, donde se pueden aplicar diferentes condiciones de cultivo para maximizar la producción y acumulación de PHB. Las más empleadas son la limitación de nutrientes y la adición de carbono orgánico (Carpine *et al.*, 2020) e inorgánico (ya comentadas), así como cambios de las condiciones de salinidad y de luz.

I. Efectos de la salinidad:

Las cianobacterias presentan diferentes estrategias para paliar los efectos de estrés osmótico provocado por condiciones de salinidad extremas, que le permiten sobrevivir en hábitats extremos como las salinas. Entre las estrategias identificadas se distinguen: la producción de solutos compatibles que influyen en su tolerancia a la salinidad (Keshari *et al.*, 2019); mecanismos de activación y desactivación de los transportadores de iones de tal forma que regulan el contenido de agua intracelular (Pade y Hagemann, 2015); reorganización de la estructura de sus tilacoides; aumento de las proteínas de unión a nutrientes en membrana; y modificación de las capas extracelulares en el espacio periplásmico (Pandhal *et al.*, 2008).

Las estrategias observadas en cianobacterias muestran similitud con las observadas en las bacterias heterótrofas, organismos en los que la acumulación de PHB en estas condiciones de alta salinidad les permite mantener el contenido de agua y modificar su estructura, reduciendo el daño en la membrana celular y aumentando su capacidad de supervivencia (Obruca *et al.*, 2017). Sin embargo, en los estudios realizados en cianobacterias, la influencia de la salinidad sobre la producción de PHB se ha visto que es limitada.

En *Nostoc muscorum* NCCU-442, Ansari y Fatma (2016) observaron un aumento del contenido de PHB de 0,55% dcw al adicionar 1g de NaCl. En *Spirulina subsala*, el rendimiento aumentó un 1,55% dcw con 50g de NaCl (Shrivastav *et al.*, 2010a). Rueda *et al.* (2022), estudió la adición de NaCl en *Synechococcus* sp. y *Synechocystis* sp., con efecto positivo en la producción de PHB, pero con una concentración óptima que varía según la cepa. En este mismo estudio, se encontró diferencias en cultivos de la misma cepa, uno adaptado a la alta salinidad y otro no, con diferentes adiciones para inducir un mayor rendimiento. Estos resultados advierten de una mayor estimulación de la producción de PHB por un aumento repentino de la salinidad, y un requerimiento mayor de la salinidad en cultivos adaptados a la salinidad o halotolerantes, que toleran estas condiciones hipersalinas.

II. Efectos de la luz:

La luz es un factor clave en la fotosíntesis, por lo que tiene una influencia en la producción de PHB. Diferentes estudios muestran que las características de este parámetro ambiental tienen efectos sobre la síntesis de PHB, y emplean intensidades inferiores a la proporcionada por la luz natural, como Carpine *et al.* (2018), Rueda *et al.* (2020a), y Rueda y García (2021). Rueda *et al.* (2022) recoge el efecto de la intensidad de la luz y la duración de los ciclos día-noche, evaluado en los diferentes estudios. Éstos aportan información sobre el aumento de la producción de PHB en presencia de estos ciclos, observando una necesidad de los ciclos de oscuridad relacionados con un posible aumento en condiciones anóxicas, o de bajo oxígeno, del catabolismo del glucógeno para la producción de ATP. Tras la glucólisis, el C obtenido se almacena como PHB y no es consumido en otros procesos.

En contraposición, los últimos estudios reflejan resultados opuestos al respecto. Troschl *et al.* (2018), entre otros, indica que inducir un periodo de oscuridad de 3 a 5 días tras la fase de acumulación de PHB, estimula esta producción. Por otro lado, Rueda *et al.* (2022a) estudió su efecto en *Synechococcus* sp. y *Synechocystis* sp, obteniendo resultados negativos para la producción. Esta diferencia entre los resultados de los diferentes estudios puede explicarse por la presencia de oxígeno en los experimentos de este segundo estudio, lo que evidencia la necesidad del requerimiento de condiciones anóxicas en periodos de oscuridad para la estimulación de producción de PHB, ya que por el contrario las cianobacterias utilizan el glucógeno cuando realizan la respiración.

Por otro lado, el efecto de la intensidad de la luz influye en la selección del modo de cultivo, pudiendo ser mixotróficos o autótrofos. Al aumentar la intensidad de la luz en condiciones mixotróficas se obtiene una mayor producción de PHB (Gracioso *et al.*, 2021), mientras que, en condiciones autótrofas, el contenido en PHB es similar, aunque con una mayor productividad (Rueda *et al.*, 2022c), es decir, una mejor relación

entre la cantidad de PHB producida y los recursos empleados. Rueda *et al.* (2022) recalca que son necesarias nuevas investigaciones para conocer el efecto positivo de la luz sobre los cultivos mixotróficos.

5.2. Etapas 2 y 3. Estrategias para la industrialización de media a gran escala:

Después de seleccionar las especies con mayor tasa de crecimiento y mayor capacidad de producción de PHB, y además conocer las condiciones óptimas de cultivo (Etapa 1), se procede al escalado para la producción de biomasa y, por consiguiente, de PHB a escalas cada vez mayores. Así, en la Etapa 2 los volúmenes varían desde los 3 L hasta los cultivos de 100 L, mientras que en la Etapa 3 se trabaja a gran escala, con volúmenes de 10 a 100 m³ para su producción industrial.

Para que el proceso de producción sea seguro, reproducible y económico se ve necesario: el uso de estrategias de simulación que, como ya se ha comentado, permiten conocer las respuestas de las cepas cuando son expuestas a determinadas condiciones, además es importante la elección y diseño de los fotobiorreactores más adecuados según la escala y la cepa de trabajo.

a) Herramientas de simulación:

La simulación es una herramienta esencial que se emplea en la actualidad para el diseño y análisis de los procesos industriales para que sean óptimos, incluidos los biotecnológicos. Un desarrollo de modelos rigurosos es de utilidad para conocer la producción de biomasa y PHB, contemplando una gran variedad de situaciones y permitiendo optimizar las condiciones de cultivo, simular cambios y adaptar operaciones de los fotobiorreactores a condiciones ambientales cambiantes (Rueda *et al.*, 2022), de tal forma que se reduce el trabajo experimental, ahorrando en tiempo y costes.

Las ecuaciones matemáticas necesarias para la descripción de la producción de PHB dependen del microorganismo y del proceso de producción (Rueda, 2022). A pesar de existir diversos modelos en la literatura científica con capacidad de simular la producción de PHB, en su mayoría contemplan microorganismos heterótrofos, y solo dos lo hacen con cianobacterias, y son los referentes a Carpine *et al.* (2018) y a Rueda y García (2021).

Carpine *et al.* (2018), propuso un modelo para *Synechocystis* sp. PCC 6803, asumiendo dos tipos de células: unas de crecimiento y otras productoras de PHB, cuya formación es proporcional al contenido de CO₂ y a la inicial de nitrato. La limitación en su aplicabilidad se encuentra en el contenido inicial de nitrato, ya que la tasa de consumo de nutrientes depende de muchos factores, sirviendo únicamente de modelo en situaciones muy concretas. Además, se describió un modelo sin crecimiento de cianobacterias en NH₄⁺, por lo que su utilidad se da en situaciones en las que se utiliza NO₃⁻, y, por otro lado, no se tuvo en cuenta la producción de PHB a través del glucógeno.

Posteriormente, Rueda y García (2021) describieron otro modelo de producción de PHB con una cepa de *Synechocystis* sp., obteniendo una acumulación de glucógeno y PHB proporcional al contenido de carbono inorgánico y una limitación por el contenido interno de N y P, en el que también se contó con el catabolismo del glucógeno para la producción de PHB (Rueda *et al.*, 2022). Además, tuvieron en cuenta el

efecto del pH y la temperatura en el medio de cultivo. En los resultados obtenidos se vio un catabolismo de glucógeno a PHB que aumentaba gradualmente al mantener la limitación de nutrientes, alcanzando un 45% del PHB total producido (Rueda y García, 2021). También se observó que el carbono acumulado es empleado para el crecimiento celular en ausencia de carbono inorgánico. Esto lo enmarca como una herramienta de utilidad en la verificación de resultados experimentales previos a la producción de PHB a partir del glucógeno.

Rueda (2022) resalta la necesidad de desarrollar un modelo general, con el fin de predecir la producción de PHB en situaciones más variadas y dispares. A su vez, destaca la incapacidad de los modelos actuales a prever cambios en la producción de PHB por modificaciones en las condiciones de cultivo y por la presencia de otros microorganismos en la producción industrial de cianobacterias, y la interacción de éstos con ellas.

Un ejemplo de estas herramientas de simulación es el modelo BIO_ALGAE, utilizado para la simulación del crecimiento de microalgas. Se trata de un modelo biocinético para la simulación de procesos de tratamiento de aguas residuales que se basa en microalgas, desarrollado por el Grupo de Ingeniería Ambiental y Microbiología (GEMMA) de la Universitat Politècnica de Catalunya (Solimeno *et al.*, 2017), y que se utiliza implantándose en el software COMSOL Multiphysics.

b) Elección de los Fotobiorreactores (FBRs):

Para el cultivo de cianobacterias en grandes cantidades se utilizan los diferentes tipos fotobiorreactores (FBR). Como recoge la Universidad de Almería (2014), éstos son dispositivos destinados al cultivo masivo de microalgas, manteniendo un medio estable y proporcionando los nutrientes y luz necesarios para su crecimiento. Se dividen principalmente en cerrados y abiertos, en función del volumen de trabajo y las condiciones que se requieren para el cultivo de las diferentes cepas empleadas, en este caso, para la producción de PHB.

El diseño de los FBRs y su desarrollo, con el fin de obtener la producción máxima de cianobacterias, tiene gran complejidad y es necesario estudiar aspectos como la distribución de la luz y la biología de la cepa empleada. Estos aspectos tienen que optimizarse, junto con el espacio requerido para su instalación, los requerimientos de energía para su puesta en marcha y funcionamiento, y los costes de mantenimiento.

I. FBR cerrados:

Los fotobiorreactores cerrados son sistemas que mantienen el cultivo aislado, y están equipados generalmente con sistemas de agitación, aireación, control de pH, intercambiador de calor, adición de medio y CO₂, permitiendo un control del medio relativamente preciso y una menor superficie de instalación que los FBRs abiertos. Se trata de dispositivos muy especializados, que son diseñados de forma específica para especies concretas, presentando una gran variedad de diseños que son clasificados principalmente en: FBR de tanque agitado, FBR de superficie plana y FBR tubulares verticales u horizontales. Son utilizados a escala de laboratorio y media escala, hasta un volumen de 100 L, iluminados

por lámparas internas o externas, pero han presentado inconvenientes como la difusión de luz limitada a volúmenes superiores a estos 100 L, el desarrollo de biopelículas en la superficie que limita la penetración de la luz, y el elevado coste inicial, de operación y de mantenimiento, como recoge Gupta *et al.* (2015). Éstos FBRs cerrados aparecen en la siguiente figura y se comentan a continuación:

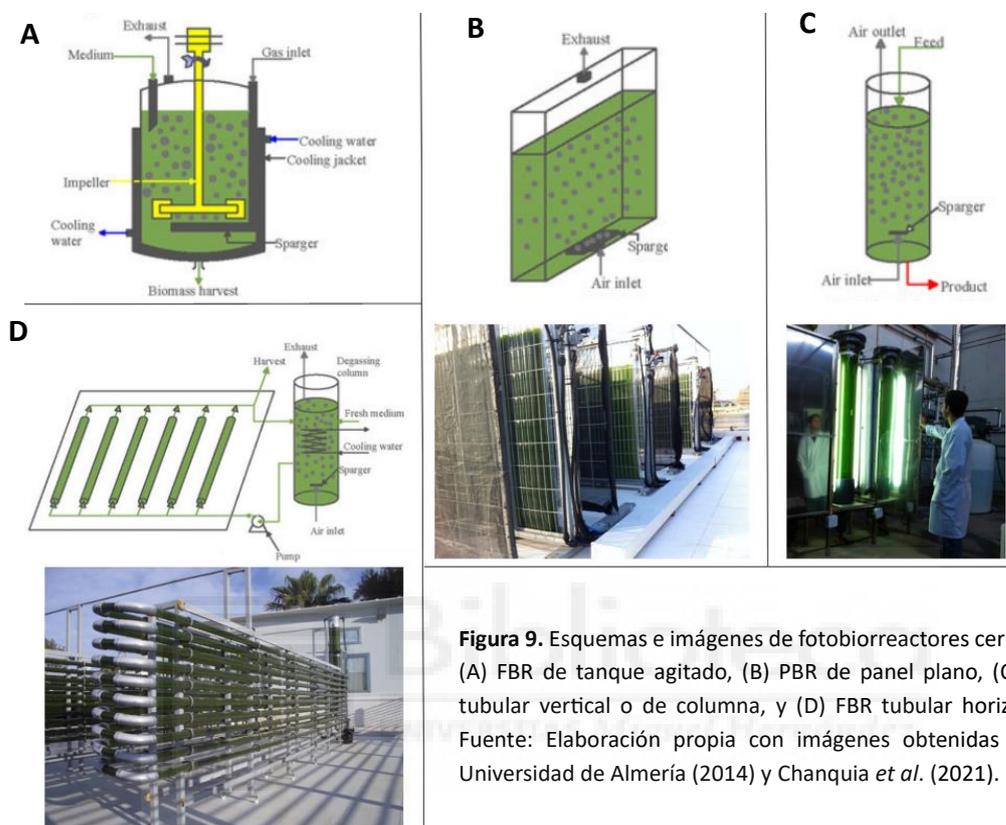


Figura 9. Esquemas e imágenes de fotobiorreactores cerrados: (A) FBR de tanque agitado, (B) PBR de panel plano, (C) FBR tubular vertical o de columna, y (D) FBR tubular horizontal. Fuente: Elaboración propia con imágenes obtenidas de la Universidad de Almería (2014) y Chanquia *et al.* (2021).

▪ **FBR de tanque agitado:**

Los FBRs de tanque agitado son el sistema convencional y el más estudiado (Figura 9a). La agitación, que puede ser axial, radial o mixta (Tapio *et al.*, 2019), se lleva a cabo de forma mecánica con uno o más impulsores, y se emplea desde escala de laboratorio hasta un volumen de 250L (Carvalho *et al.*, 2006). Sus principales ventajas se han observado en su eficiente transferencia de calor y masa, y en la dispersión homogénea de nutrientes en una agitación óptima (Guler *et al.*, 2020). Sus inconvenientes aparecen en la insuficiente capacidad de captación de luz por su relación superficie/volumen generalmente baja, que Heining *et al.* (2015) mejoró con iluminación interna, y en el posible daño al cultivo por una excesiva agitación mecánica.

A pesar de su amplio uso, y de funcionar con éxito en el cultivo de *Synechococcus sp.* (Sero *et al.*, 2020), presentan dificultades a gran escala por su alta demanda de energía y baja relación superficie/volumen que puede reducir la capacidad fotosintética, con una productividad baja de 30-50 mg/L-d, como recoge Chanquia *et al.* (2021). Este tipo de FBRs tienen buenos resultados al utilizarse para el tratamiento de un

efluente industrial, que permite reciclar sus desechos al mismo tiempo que cultiva biomasa, siendo un ejemplo de bioeconomía circular (Sero *et al.*, 2020).

▪ **FBR de panel plano:**

Los FBRs de panel plano se conforman por dos paneles planos, transparentes y paralelos dispuestos para formar un canal rectangular (Figura 9b), de tal forma que se maximiza el área iluminada por volumen al aportar una iluminación eficiente (Thajuddin *et al.*, 2016). La suspensión de las células en este FBR se realiza a través de un rociador que se encuentra en el fondo, y que proporciona un burbujeo de aire.

Varios grupos de investigación, recogidos por Sero *et al.* (2020), han implementado estrategias para filtrar la luz mediante tinciones del medio interior con colorantes o recubrimientos sobre los paneles del FBR. También se ha estudiado la diferente alineación del panel, con el objetivo de maximizar la eficiencia de la fotosíntesis, en su equilibrio con el espacio disponible, y la fotoinhibición como inconveniente para generar grandes cantidades de biomasa (Thajuddin *et al.*, 2016). Wang *et al.* (2019) y Sagir *et al.* (2021) han estudiado la inmovilización de las celdas del panel con rejillas, aumentando el área de superficie del reactor para aumentar su eficiencia.

Son adecuados para la producción de biomasa, pero no son considerados la opción más rentable al ampliar la escala, por el aumento significativo del coste. Sí lo son para la investigación y producción a pequeña y media escala, a pesar de presentar dificultades para el mantenimiento de la temperatura, la bioincrustación en la superficie y el posible estrés hidrodinámico en ciertas cepas, entre otros (Sero *et al.*, 2020).

▪ **FBR tubulares:**

Los FBRs tubulares son los más empleados y se distinguen principalmente dos tipos, los verticales o de columnas (Figura 9c) y los horizontales (Figura 9d) (Sero *et al.*, 2020).

Los verticales o de columnas están formados por tubos verticales de vidrio o polietileno que permiten una mayor penetración de la luz (Chang *et al.*, 2017), y disponen de un sistema de adición de CO₂ y de mezcla de oxígeno. El diámetro es de entre 20cm y 30cm para tener un volumen suficiente para el cultivo y una buena eficiencia en la transferencia de gases, lo que disminuye la relación superficie/volumen, minimizando la exposición lumínica. Sus principales ventajas las recoge Gupta *et al.* (2015), con una simplicidad, bajo coste y una buena eficiencia de transferencia de calor y masa, lo que facilita su uso comercial.

Los horizontales son los más utilizados, con muchas aplicaciones comerciales por su alta productividad y densidad de biomasa generada (Deruyck *et al.*, 2019). Están formados por tubos transparentes de polímero vinílico o acrílico, con un diámetro interior máximo de 60 mm (Grupta *et al.*, 2015), que permite una penetración de la luz máxima, ya que su disposición permite una alta relación superficie/volumen, presentando una ventaja competitiva junto con un aumento de residencia del aire, que ayuda a proporcionar una mayor cantidad de CO₂ disuelto (Deruyck *et al.*, 2019). A pesar de ofrecer unas densidades de biomasa altas, al ampliar su escala se requiere de sistemas de enfriamiento que eviten el sobrecalentamiento del FBR (Mirón *et al.*, 2019), además de altos niveles de fotoinhibición por la

acumulación de oxígeno y la alta intensidad de luz, que lleva a una productividad menor a la de los reactores verticales, como recoge Chanquia *et al.* (2021).

Las últimas investigaciones están desarrollando diseños de fotobiorreactores tubulares que mejoran la transferencia de masa y la relación superficie/volumen, con el fin de optimizar el proceso de cultivo de biomasa obteniendo mayor productividad, como el desarrollado por Cui *et al.* (2021).

II. FBR abiertos:

Los reactores abiertos son instalaciones de bajo coste, fáciles de construir y de operar. Presentan un contacto directo del cultivo con la atmósfera y limitaciones en el control de la luz el pH, la temperatura, la pérdida de agua por la evaporación, la difusión de CO₂ a la atmósfera, y la susceptibilidad a la contaminación por otros microorganismos, junto al requerimiento de grandes espacios (Chisti, 2007). Se trata de instalaciones de baja productividad, pero de un gran uso al permitir grandes volúmenes de trabajo. Entre ellos destacan: los *open ponds* (Figura 10a), balsas de forma y profundidad adecuadas que contienen medio con los nutrientes requeridos, y donde se inocula y crece la cepa en un proceso muy económico y de baja productividad; y los *raceways* (Figura 10b), capaces de suministrar agitación y mezcla, facilitar el intercambio de gases e incluso controlar el pH en cierta medida con el suministro de CO₂ al cultivo, siendo relativamente eficiente y con pocas pérdidas.

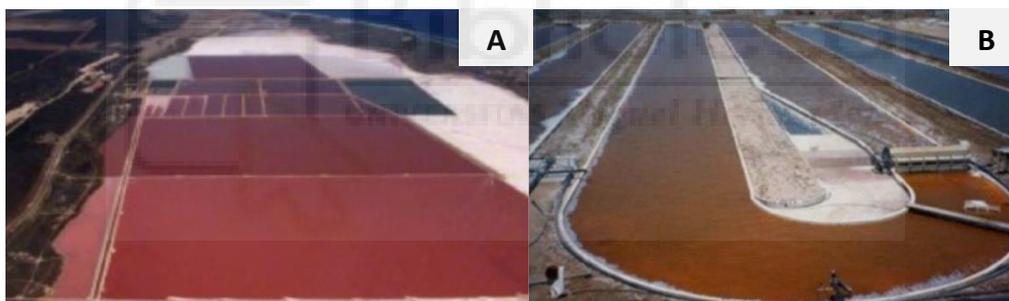


Figura 10. Imágenes aéreas de reactores abiertos: (A) *open ponds* y (B) *raceways*.

Fuente: Elaboración propia con imágenes obtenidas de *Microalgal Biotechnology*, Universidad de Almería (2014).

5.3. Etapa 4. Nuevas tendencias de estrategias de mejora:

Los rendimientos obtenidos a escala de laboratorio y media escala son prometedores, pero como se ha comentado anteriormente, presentan dificultades en su escalada a volúmenes de gran escala. En este sentido, las nuevas tendencias de la investigación se centran en la implementación de estrategias de mejora, que permitan la optimización e industrialización de los procesos de producción de PHB, entre las que destacan:

a) Consorcios microbianos:

En los estudios llevados a cabo, generalmente, se emplean monocultivos de una determinada cepa de cianobacterias, pero en la naturaleza las microalgas se encuentran en simbiosis con otras especies y microorganismos. Cada una posee una capacidad diferente para la producción de metabolitos de interés

biotecnológico, por lo que, si se aplican consorcios microbianos, permitiendo la coexistencia de dos o más microorganismos, se puede obtener mejores resultados frente a los monocultivos, cuando tradicionalmente la presencia de bacterias se ha considerado como una contaminación (Barreiro, 2019).

El uso de consorcios de microalgas-bacterias se emplea para el tratamiento de aguas residuales, en agricultura como promotores del crecimiento vegetal y recientemente en la producción de bioplásticos, como recoge un estudio realizado por investigadores del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). En éste, Baldanta *et al.* (2021) apuntan al uso de consorcios microbianos sintéticos como una estrategia de mejora de los procesos, desarrollando un consorcio, formado por la cianobacteria *Synechococcus elongatus* y la bacteria heterótrofa *Azohydromonas lata*, para la producción de bioplásticos. En el consorcio, la cianobacteria produce sacarosa a partir de luz y CO₂, secretada al medio de cultivo y utilizada para el crecimiento de la bacteria, que acumula PHA. Los resultados obtenidos muestran el consorcio como una estrategia prometedora en la obtención de bioproductos de interés a partir de CO₂.

b) Herramientas genéticas y moleculares:

Las cianobacterias por lo general presentan dos vías de síntesis de PHB en las que se observan diferencias entre las distintas especies de cianobacterias, influenciadas por la expresión génica y la regulación de las enzimas involucradas en las rutas metabólicas, como ya se ha comentado anteriormente (Ver Etapa 1).

Con mayor detalle, la primera vía de síntesis de PHB se da de forma directa por una ruta metabólica descrita y que puede dividirse en cuatro etapas: fijación de carbono, glucólisis, conversión de piruvato a Acetil-CoA, y síntesis de PHB. La fijación del carbono, en forma de CO₂, se da a través del Ciclo de Calvin, utilizando la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco). Estos compuestos orgánicos pasan a glucosa-6-fosfato por acción de la enzima glucosa-6-fosfato isomerasa. Durante el proceso de glucólisis, similar a la de otros microorganismos, la glucosa-6-fosfato es descompuesta y se genera ATP y piruvato. A través de la acción de la enzima piruvato deshidrogenasa compleja (PDH), el piruvato pasa a Acetil-CoA. El comienzo de la síntesis del PHB se da con la condensación catalizada por la enzima PhaA de dos moléculas de Acetil-CoA generadas, dando lugar a Acetoacetil-CoA. En el siguiente paso, mediado por la enzima PhaB, el Acetoacetil-CoA se reduce a 3-hidroxiacetil-CoA (3HB). Por último, el 3HB pasa a PHB por la acción de las enzimas PHA sintetasas (PhaE y PhaC) en un proceso de polimerización (Rueda *et al.*, 2022).

Paralelamente, la síntesis del PHB se encuentra muy relacionada con la síntesis del glucógeno, ofreciendo otra posible ruta para su producción. En la síntesis de ambos participa un metabólico que se produce durante la etapa de fijación de CO₂, concretamente en el Ciclo de Calvin, el 3-fosfoglicerato (3-PGA), y que es utilizado principalmente para la producción del glucógeno (Singh y Mallick, 2017). Cuando se sintetiza glucógeno, éste puede ser posteriormente oxidado y convertido en PHB (Rueda *et al.*, 2022). Estas vías metabólicas entre el glucógeno y el PHB las recoge Koch *et al.* (2019), y son paralelas y conocidas como la vía de Embden-Meyerroh-Parnas (EMP), ruta de la pentosa fosfato oxidativa (OPP) y ruta Entner

Doudoroff (ED). Éste muestra la expresión de los genes referentes a estas vías durante el paso de glucógeno a PHB, con mayor relevancia la vía EMP y la ruta OPP, y demuestra que el glucógeno es epistático sobre el PHB, es decir, su síntesis interfiere en la de PHB. De la misma forma, certifica una menor producción con una menor degradación de glucógeno, lo que demuestra la relación entre ambos.

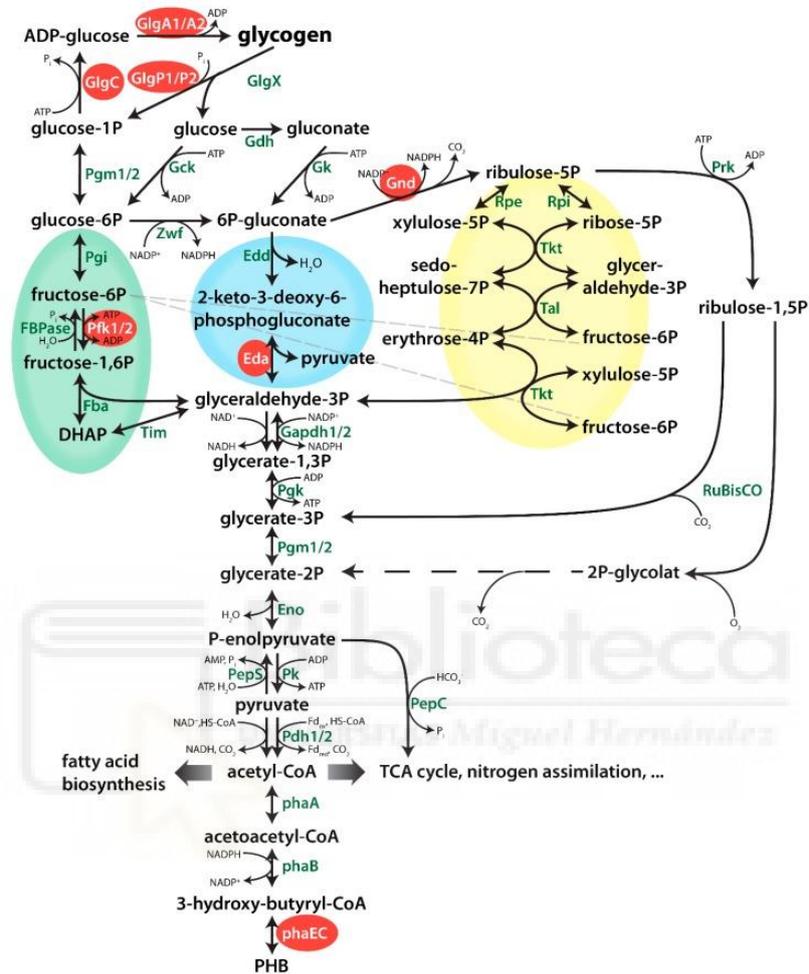


Figura 11. Descripción del metabolismo central de *Synechocystis* sp. en las que se resalta la vía EMP (verde), la ruta ED (azul) y la ruta OPP (amarillo). Las líneas discontinuas hacen referencia a reacciones enzimáticas. Los genes en rojo son los genes eliminados del estudio del que se extrae la figura. Fuente: Koch *et al.*, 2019.

La síntesis de PHB está estrictamente regulada y su tasa de producción se ve influenciada por diferentes factores ambientales (Ver Etapa 1) y moleculares. En el caso de *Synechocystis* sp. PCC 6803, los genes que codifican la biosíntesis de PHB en limitación de N están identificados: la β -cetotiolasa PhaA (*slr1993*), y la acetoacetyl-CoA reductasa PhaB (*slr1994*), ambas organizadas en un operón; y la PHB sintasa, heterodímero de PhaE (*slr1829*) y PhaC (*slr1830*), se codifica en un segundo operón. La expresión de estos dos operones se regula por la falta de N, tratándose de una red reguladora compleja que integra diferentes señales de entrada y controla la actividad biosintética de PHB y la formación de sus gránulos (Hauf *et al.*, 2013).

Existen diferentes técnicas de ingeniería genética que permiten la manipulación de los códigos genéticos y el control de los niveles de expresión génica en cianobacterias, microorganismos caracterizados por presentar varias copias del genoma. Este control se puede realizar a nivel transcripcional, traduccional o postraduccional, y se enmarca como una estrategia de mejora. De este modo, varias especies de cianobacterias han sido manipuladas genéticamente para eliminar o modificar genes nativos e inducir la expresión de genes heterólogos (Baldanta, 2022), que de forma natural no presentaban, en un proceso relativamente sencillo.

La herramienta más empleada para este fin son los vectores integrativos, plásmidos que carecen de habilidad de replicar en cianobacterias (Baldanta, 2022), como en *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Ng *et al.*, 2015) y *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Wang *et al.*, 2019), y los plásmidos replicativos, como en *Leptolyngbya* sp. BL0902 (Taton *et al.*, 2012). Otros métodos de transferencia génica, recogidos por Baldanta (2022) son: la transformación natural, al existir cianobacterias capaces de incorporar ADN exógeno del medio; la conjugación, siendo el más empleado; y la electroporación.

A pesar de conocer especies de cianobacterias en las que se han aplicado fácilmente estas herramientas, en otros casos el proceso es complicado, especialmente cuando las cepas son cianobacterias filamentosas. Esto es debido a que estas cianobacterias presentan barreras que impiden o dificultan la transferencia genética (Stucken *et al.*, 2013). Además, presentan desafíos en relación con los costes, la escalabilidad y la estabilidad en las nuevas cepas.

La mutagénesis, que puede ser dirigida o al azar (Koch *et al.*, 2020b), se ha utilizado como sustituta de la ingeniería genética con éxito para la obtención de cepas mejoradas (Kamravamanesh *et al.*, 2018) para la producción de PHB. Pero existe una compleja regulación europea sobre los organismos modificados genéticamente (OMG) (Figura 11), definidos por la Unión Europea (UE) como “organismos cuyo material genético ha sido modificado de una forma que no se produce naturalmente”, que dificulta el uso de estos organismos y los productos derivados.

LEGISLACIÓN SOBRE ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE EN LA UE	
Directiva 2001/18/CE	Sobre la liberación intencional de OMG en el medio ambiente.
Reglamento (CE) 1829/2003	Sobre alimentos y piensos modificados genéticamente.
Directiva (UE) 2015/412	Modifica la Directiva 2001/18/CE en lo que respecta a la posibilidad de que los Estados miembros restrinjan o prohíban el cultivo de OMG en su territorio.
Directiva 2009/41/CE	Sobre el uso confinado de OMC.
Reglamento (CE) 1964/2003	Sobre movimientos transfronterizos de OMG.
Directiva (UE) 2018/350 de la CE	Modifica la Directiva 2001/18/CE en lo que respecta a la evaluación del riesgo medioambiental de los OMG.

Figura 11. Componentes básicos de la legislación sobre Organismos Modificados Genéticamente (OMG) en la Unión Europea (UE). Fuente: Elaboración propia basada en la información publicada por la Comisión Europea (CE) consultada en 2023.

La mutación dirigida presenta una mayor complejidad legislativa y burocrática, que paralizan en muchos casos el avance de las investigaciones, por lo que una alternativa viable es la mutagénesis al azar. La utilización de ésta induce variaciones en los cromosomas empleando diferentes agentes mutágenos. Estas mutaciones se realizan *in vitro* y, como son al azar, se desconoce qué tipo de mutaciones van a producir ni en qué región del genoma tendrá lugar, lo que puede llevar a la aparición de nuevos caracteres de interés. Para inducir las mutaciones se utiliza un agente mutágeno, y posteriormente se lleva a cabo la detección, selección y caracterización de los mutantes obtenidos. Entre las ventajas que presenta esta técnica destacan las condiciones controladas y la reducción de los costes frente a otros procesos de manipulación genética.

Se han llevado a cabo diferentes estudios que emplean la mutagénesis al azar para la obtención de fenotipos deseables en microalgas y cianobacterias, recogidos por Kamravamanesh *et al.* (2018). Cordero *et al.*, (2011) demostró una mejora en la producción del pigmento luteína en el alga verde *Chlorella sorokiniana* utilizando como mutágeno N-metil-n-nitro-nitrosoguanidina (MNNG), y Doan y Obbard (2012) y Jaeger *et al.* (2014) obtuvieron mutantes de *Nannochloropsis* sp. con metanosulfonato de etilo (EMS) y de *Scenedesmus obliquus* con radiación UV. También se ha utilizado mutagénesis aleatoria en *Synechocystis* sp. PCC 6803, una de las cianobacterias más manipuladas genéticamente, para promover la fototolerancia (Narusaka y col., 1990). Kamravamanesh *et al.* (2018) empleó esta mutagénesis como herramienta para aumentar la producción de PHB en esta cepa, capaz de producir hasta un 16% dcw de PHB en limitación de N y P con el control de los parámetros y la adición de CO₂ como fuente de carbono (Kamravamanesh *et al.*, 2017). Posteriormente comparó los mutantes más prometedores en referencia al crecimiento de biomasa y contenido de PHB con la cepa de tipo salvaje, lo que permitió recopilar información de relevancia sobre el proceso de acumulación de este biopolímero, a través de la secuenciación del genoma y el uso de PCRs cuantitativas tras la mutagénesis.

c) Fuentes de nutrientes alternativas:

Uno de los procesos que generan mayor coste en la producción de PHB a partir de cianobacterias es la adición de fuentes de nutrientes. Para la obtención de un proceso de producción más competitivo y rentable, reduciendo este elevado coste, la tendencia actual es la búsqueda de alternativas a las fuentes de nutrientes convencionales empleadas hasta ahora, destacando entre ellas las aguas residuales.

El uso de aguas residuales para el cultivo de cianobacterias se considera como una alternativa prometedora para la reducción de costes e impacto ambiental del proceso de producción de PHB, dando paso a un proceso de bioeconomía circular. Estos efluentes actúan como fuente de nutrientes, dejando atrás los medios de cultivo sintéticos que se utilizan generalmente, ya que están compuestos principalmente de N, C y P, que son los que presentan una mayor inversión económica, y que reducen los costes de producción entre 1,80€/kg y 3€/kg de biomasa (Acién *et al.*, 2012).

A su vez, se cumple un doble objetivo, al tratar al mismo tiempo estas aguas residuales, con un bajo coste y con una gran disminución de la concentración de contaminantes (Li *et al.*, 2019) al participar como

bioacumuladores en la biorremediación de colorantes, hidrocarburos, compuestos fenólicos, pesticidas y herbicidas (Touliabah *et al.*, 2022), y producir bioproductos de interés. Como recogen Li *et al.* (2019) y Arias *et al.* (2020), se han empleado hasta ahora aguas residuales municipales, aguas residuales industriales, efluentes secundarios y aguas de escorrentía agrícola.

Los estudios se han centrado en el tratamiento de aguas residuales por cianobacterias, y solo algunos de ellos han evaluado la utilización de los nutrientes presentes en estas aguas para el cultivo de estos microorganismos y la producción de PHB. En estos estudios se mostraron resultados prometedores, destacando: Krasausueb *et al.*, (2019) que usaron aguas residuales de acuicultura con una cepa modificada genéticamente de *Synechocystis* sp. PCC 6803, alcanzando una acumulación de 32,5% dcw de PHB en 14 días; y Samantaray *et al.* (2011) que utilizaron aguas residuales de acuicultura para iniciar el crecimiento de *Aulosira fertilissima* durante 27 días, que posteriormente fue transferida a un medio específico, obteniendo una acumulación de 80% dcw.

Además, es posible cultivar nuevas cianobacterias utilizando como medio de cultivo los desechos generados durante la producción de PHB, que están compuestos por productos químicos y biomasa no polimérica, y que normalmente son considerados como residuos y requieren de un tratamiento posterior. De esta forma, se promueve en mayor medida la bioeconomía circular.

A pesar de las ventajas que presenta la utilización de aguas residuales como fuente de nutrientes alternativa, es necesario el estudio del impacto ambiental de estos procesos (Arashiro *et al.*, 2022) y solucionar los desafíos sociológicos y legislativos que surgen de su uso. Estos desafíos están relacionados con la falta de confianza y seguridad, por parte de los consumidores, del uso de los productos obtenidos a partir de estas aguas, y con la falta de normativa clara y de inversores, que dependerán de la aplicación que tendrá la biomasa obtenida.

d) Biorrefinería:

En el cultivo a gran escala de cianobacterias aparece el concepto de biorrefinería, que es una instalación que integra los procesos y equipos de conversión de biomasa para la producción de combustibles, energía y productos químicos de forma sostenible y de valor añadido, diferenciándose bioproductos de valor alto, medio y bajo. Se trata de un concepto análogo a las refinerías de petróleo, ya que se obtienen una gran variedad de productos que maximizan el valor derivado de la materia prima utilizada.

En la mayoría de los casos se producen bioproductos de alto valor, como productos farmacéuticos, cosméticos y suplementos alimenticios y nutraceúticos, pero el mayor potencial se encuentra en la obtención de bioproductos de valor medio como los bioplásticos, al tener en cuenta el coste de producción, tamaño de mercado y la menor restricción en términos de cepas y tecnología empleadas. Respecto a los bioproductos de valor bajo, el valor de la biomasa aún es despreciable para considerar su obtención como objetivo principal en procesos de producción. En este sentido, la biorrefinería permite

producir múltiples bioproductos a partir de una sola biomasa (Sivaramakrishnan *et al.*, 2022), como se muestra en la siguiente figura:

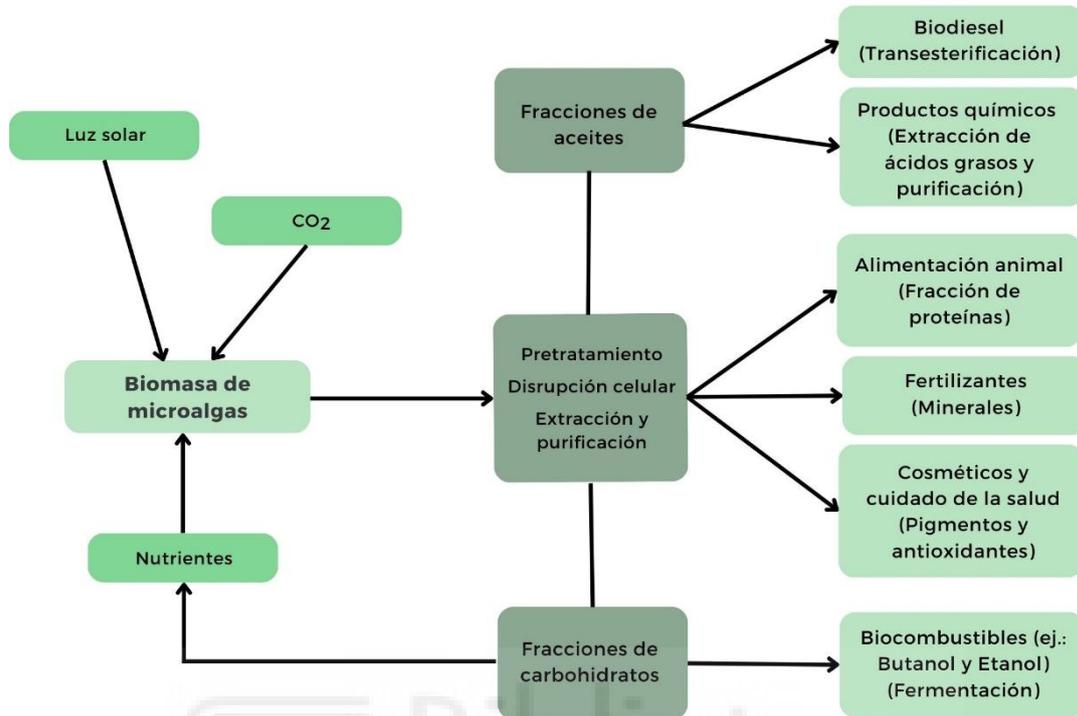


Figura 12. Alternativa del proceso de producción de bioproductos en biorrefinería utilizando microalgas como biomasa. Fuente: Elaboración propia basada en Sivaramakrishnan *et al.*, 2022.

Los inconvenientes a los que se enfrenta para su implementación se asocian al alto coste de producción y la complejidad del cultivo y almacenamiento de la biomasa requerida, para lo que se necesita un avance en el uso y diseño de fotobiorreactores, utilizados como tecnología para el cultivo de los microorganismos fotosintéticos empleados.

6. CONCLUSIONES:

El impacto negativo de los plásticos convencionales está ampliamente demostrado, con una influencia en el cambio climático y afección a la salud pública que los coloca como objeto de nueva legislación y restricciones de uso. Los bioplásticos se presentan como alternativa prometedora para frenar la contaminación plástica, comercializando los de primera y segunda generación, pero su producción no es sostenible y presenta inconvenientes, lo que centra las investigaciones en los de tercera generación. Entre ellos destacan los PHAs, y más concretamente el PHB por su biodegradabilidad, biocompatibilidad y la similitud de propiedades con las de algunos plásticos convencionales.

Se han obtenido resultados prometedores para la producción de PHAs a escala de laboratorio, pero falta realizar estudios para conocer cómo llevar a cabo su producción industrial. Las bacterias heterótrofas son los organismos más empleados, sin embargo, presentan grandes requerimientos que suponen un elevado coste de producción. En este sentido, las cianobacterias han surgido como la mejor alternativa, ya que al ser capaces de producir y acumular PHB de forma natural por su metabolismo autótrofo reducirían esos costes, pero los rendimientos obtenidos hasta el momento por esta vía metabólica son bajos.

La comparación entre los resultados de los estudios realizados es complicada por las diferencias en función de la cepa y las condiciones de cultivo. En general, las cianobacterias producen y acumulan mayor cantidad de PHB en condiciones de estrés, que pueden inducirse controlando los diferentes parámetros en su cultivo, entre los que se encuentran el uso de carbono orgánico como fuente de nutrientes, la limitación de N y de P, la salinidad y la disponibilidad e intensidad de la luz. También es importante seleccionar el FBR adecuado, destacando aquellos en los que los parámetros puedan ser controlados, de tal forma que predominan los cerrados, con un mayor rendimiento a escala de laboratorio, aunque al ampliar la escala presentan problemas por la difusión de la luz y los elevados costes. De todos los sistemas cerrados, los tubulares horizontales son los que presentan una mayor productividad y densidad de biomasa.

La tendencia actual es la implementación de nuevas estrategias para la optimización de los procesos, que incluyen: el uso de consorcios microbianos, con mejoras frente a los monocultivos al imitar la simbiosis natural; el uso de herramientas genéticas y moleculares, obteniendo cepas mejoradas cuyo uso a escala industrial no está muy extendido todavía debido a las dificultades legislativas y de burocracia existentes; la simulación de los procesos, convertida en herramienta esencial al reducir el número de experimentos, tiempo y costes; el uso de fuentes alternativas de nutrientes, como las aguas residuales que reducen los costes y su uso apuesta por la bioeconomía circular; y por último, la biorrefinería, que permite conjugar los procesos de obtención de biproductos de diferente valor.

A pesar de los resultados prometedores, son necesarias más investigaciones en este campo, con el fin de industrializar y optimizar los procesos de producción, que incluyan la búsqueda de nuevas cepas en la naturaleza capaces de producir mayor cantidad de PHB de las ya estudiadas. Estas búsquedas se deberían centrar en ambientes donde las cianobacterias se encuentran en condiciones de estrés, como Les Salinetes de Novelda, ambiente estresado por su elevada salinidad.

7. PROYECCIÓN FUTURA:

Las cianobacterias emergen como una fuente potencial y sostenible de producción de bioplásticos, frente a la problemática actual y la búsqueda de alternativas a los plásticos convencionales. Es por ello por lo que se espera una amplia investigación de cara a los próximos años, que permita la optimización de los procesos y el paso de su producción en laboratorio a una escala industrial, motivada por el aumento estimado de la demanda de los bioplásticos por parte de los países desarrollados principalmente.

Actualmente, la Comisión Europea está impulsando diferentes iniciativas para el uso de las algas, incluyendo las cianobacterias, como la plataforma EU4Algae que, mediante un plan de acción de tres años, pretende fomentar su uso en los Estados miembros. Estas acciones, entre otras, promueven el fortalecimiento y desarrollo de sectores de base biológica en su Estrategia de Bioeconomía (Comisión Europea, 2018), la cual contribuye a la mayoría de los ODS (Comisión Europea, 2022).

De la misma forma, el Green Deal o Pacto Verde Europeo, paquete de iniciativas políticas que tiene como objetivo final alcanzar la neutralidad climática en 2050, establece áreas prioritarias donde este sector puede contribuir. En concreto, resulta de gran interés la Bioeconomía Azul, que incluye cualquier actividad económica asociada al uso de recursos biológicos acuáticos renovables para la fabricación de productos. En la última edición del informe de Bioeconomía Azul de la UE (2022), elaborado por el Observatorio Europeo del Mercado de los Productos de Pesca y Acuicultura (EUMOFA), se confirma que el subsector más destacado es el de las algas. La facturación de su producción alcanza más de 10 millones de euros anuales en los Estados miembros. Como resultado, la Iniciativa de Algas de la UE se fundamenta en que su cultivo puede contribuir a la consecución de los objetivos europeos en, por ejemplo, descarbonización, contaminación y circularidad, al permitir reemplazar los productos de origen fósil y ser utilizados como materia prima para producir bioproductos, como recoge EUMOFA (2022). Así, el sector se vincula estrechamente con la economía circular y la sostenibilidad ambiental, aumentando la financiación pública y privada para el desarrollo de proyectos vinculados.

Uno de estos proyectos a destacar es el proyecto coordinado Cyan2Bio (PID2021-126564OB) sobre la producción sostenible de bioproductos a partir de cianobacterias tratando efluentes residuales, en el que participan el grupo de investigación del Área de Botánica de la Universidad Miguel Hernández, junto al grupo GEMMA de la UPC, y el Departamento de Ingeniería Química de la UAL. Se trata de un proyecto multidisciplinar que requiere de aspectos genéticos, biológicos y de ingeniería, y cuyas primeras actuaciones se centran en la búsqueda de nuevas cepas de cianobacterias capaces de producir bioplásticos siguiendo un enfoque polifásico, en la optimización de las condiciones de operación, en la identificación de las rutas metabólicas de estas cepas, y en la evaluación de su estabilidad y viabilidad.

Esto refleja que los avances en genómica y biología de sistemas pueden favorecer la producción industrial de bioplásticos en los próximos años, simplificando el diseño de FBRs, material y requerimiento energético. Además, la integración de sistemas de producción, de tal forma que la producción de PHB por cianobacterias se combine con otros procesos biotecnológicos, pueden mejorar su eficiencia y viabilidad.

8. BIBLIOGRAFÍA:

Singh, A.K., Sharma, L., Mallick N., Mala J., 2017. Progress and challenges in producing polyhydroxyalkanoate biopolymers from cyanobacteria, *J. Appl. Phycol.* 29 1213–1232.

Singh, A.K., Mallick N., 2017. Advances in cyanobacterial polyhydroxyalkanoates production, *FEMS Microbiol. Lett.* 364 1–13.

Acién, F.G., Fernández, J.M., Magán, J.J., Molina, E., 2012. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnol. Adv.* 30, 1344–1353

Afreen, R., Tyagi, S., Singh, G., Singh, M., 2021. Challenges and Perspectives of Polyhydroxyalkanoate Production From Microalgae/Cyanobacteria and Bacteria as Microbial Factories: An Assessment of Hybrid Biological System. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9, 624885.

Ansari, S., Fatma, T., 2016. Cyanobacterial polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, optimization and characterization. *PLoS One* 11, 1–20.

Arashiro, L.T., Josa, I., Ferrer, I., Van Hulle, S.W.H., Rousseau, D.P.L., Garfí, M., 2022. Life cycle assessment of microalgae systems for wastewater treatment and bioproducts recovery: natural pigments, biofertilizer and biogas. *Sci. Total Environ.* 847, 157615.

Araújo, R., Vázquez Calderón, F., Sánchez López, J., Azevedo, I. C., Bruhn, A., Fluch, S., Garcia Tasende, M., Ghaderiardakani, F., Ilmjärv, T., Laurans, M., Mac Monagail, M., Mangini, S., Peteiro, C., Rebours, C., Stefansson, T., & Ullmann, J., 2021b. Current Status of the Algae Production Industry in Europe.

Solimeno, A., Parker, L., Lundquist, T., García, J., 2017. Integral microalgae-bacteria model (BIO_ALGAE): application to wastewater high rate algal ponds. *Sci. Total Environ.* 601, 646–657.: An Emerging Sector of the Blue Bioeconomy. *Frontiers in Marine Science*, 7.

Arias, D.M., García, J., Uggetti, E., 2020. Production of polymers by cyanobacteria grown in wastewater: current status, challenges and future perspectives. *N. Biotechnol.* 55, 46–57.

Asencio, A.D., Aboal, M., 2003. The presence of *Arthronema africanum* (Cyanophyceae) in Almería desert, SE Spain with implications on its biogeographical distribution. *Arch. für Hydrobiol.* 146,7-14.

Aslanbay Guler, B., Deniz, I., Demirel, Z., Oncel, S. S., *et al.*, 2020. Computational fluid dynamics modelling of stirred tank photobioreactor for *Haematococcus pluvialis* production: Hydrodynamics and mixing conditions.

Balaji, S., Gopi, K., Muthuvelan, B., 2013. A review on production of poly β hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. *Algal Research.* 2 (3), 278-285.

Baldanta, S., Agulló, L., Fernández, B., Martínez, I., Nogales, J., García, J.L., Galán, B., 2020. Desarrollo de un consorcio sintético *Synechococcus Elongatus* - *Azohydromonas Lata* para la producción de bioplásticos a partir de luz Y CO₂.

Baldanta, S., Guevara, G., & Navarro-Llorens, J. M., 2022. SEVA-Cpf1, a CRISPR-Cas12a vector for Genome Editing in Cyanobacteria.

Berrendero Gómez, E., Johansen, J. R., Kaštovský, J., Bohunická, M. & Čapková, K., 2016. *Macrochaete* gen. nov. (*Nostocales*, Cyanobacteria), a taxon morphologically and molecularly distinct from *Calothrix*. *J. Phycol.* 52: 638– 655.

Bhati, R., Samantaray, S., Sharma, L., Mallick, N., 2010. Poly- β -hydroxybutyrate accumulation in cyanobacteria under photoautotrophy. *Biotechnology Journal.* 5 (11), 1181-1185.

Cardona, M. y Agudelo, L.M., 2012. Producción de bioplásticos a partir de bacterias empleando sustratos no convencionales. Grupo de Biotransformación Escuela de Microbiología. Universidad de Antioquia.

Carpine, R., Olivieri, G., Hellingwerf, K.J., Pollio, A., Marzocchella, A., 2020. Industrial production of poly- β -hydroxybutyrate from CO₂: Can cyanobacteria meet this challenge? *Processes* 8, 1–23.

Carpine, R., Raganati, F., Olivieri, G., Hellingwerf, K., Pollio, A., Salatino, P., Marzocchella, A., 2018. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by *Synechocystis* PCC6803 from CO₂. Model development *Algal Res.* 29, 46–60.

Carvalho, A. P., Meireles, L. A., Malcata, F. X., 2006. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol. Prog.* 2006, 22, 1490–1506.

Castenholz RW. Phylum BX. Cyanobacteria. 2001. Bergey's manual of systematic bacteriology. Boone DR, Castenholz RW, editors. New York: Springer.

Chaib, F., 2020. Shortage of personal protective equipment endangering health workers worldwide. In: World Heal Organ.

Chang, J.-S., Show, P.-L., Ling, T.-C., Chen, C.-Y., *et al.*, 2017. Photobioreactors. In *Current developments in biotechnology and bioengineering*, Elsevier; pp 313–352.

Chanquia, S.N., Vernet, G., Kara, S., 2021. Photobioreactors for cultivation and synthesis: Specifications, challenges, and perspectives. *Eng Life Sci.* 2021 Oct 27;22(12):712-724.

Chen, G.-Q., 2009. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chem. Soc. Rev.* 38:2434–2446.

Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 2007, 25, 294–306.

Cordero, B.F., Obratsova, I., Couso, I., Leon, R., Vargas, M.A., Rodriguez, H., 2011. Enhancement of Lutein Production in *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyta) by Improvement of Culture Conditions and Random Mutagenesis. *Marine Drugs* 9(9):1607-1624.

Costa, J.A.V., Moreira, J.B., Lucas, B.F., Braga, V.S, Cassuriaga, A.P.A., Morais, M.G., 2018. Recent advances and future perspectives of PHB production by cyanobacteria. *Ind Biotechnol.* 14(5):249–56.

Costa, S.S., *et al.*, 2019. Microalgae as source of polyhydroxyalkanoates (PHAs) — a review. *Int. J. Biol. Macromol.* 131, 536–547.

Cui, X., Yang, J., Cui, M., Zhang, W., *et al.*, 2021. Comparative experiments of two novel tubular photobioreactors with an inner aerated tube for microalgal cultivation: Enhanced mass transfer and improved biomass yield. *Algal Research* 58, 102364.

de Jaeger, L., Verbeek, R.E., Draaisma, R.B. *et al.*, 2014. Superior triacylglycerol (TAG) accumulation in starchless mutants of *Scenedesmus obliquus*: (I) mutant generation and characterization. *Biotechnol Biofuels* 7, 69.

Deruyck, B., Nguyen, K. H.T., Decaestecker, E., Muylaert, K., 2019. Modeling the impact of rotifer contamination on microalgal production in open pond, photobioreactor and thin layer cultivation systems. *Algal Research* 38, 101398.

Doan, T.T.Y., Obbard, J.P., 2012. Enhanced intracellular lipid in *Nannochloropsis* sp. via random mutagenesis and flow cytometric cell sorting. *Algal Res.*, 1(1), 17–21.

Eberly, J.O., Ely, R.L., 2012. Photosynthetic accumulation of carbon storage compounds under CO₂ enrichment by the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 39, 843–850.

García-Pichel, F., Belnap, J., Neuer, S. y Schanz, F., 2003, Estimaciones de la biomasa global de cianobacterias y su distribución: Estudios Algológicos, v. 109, p. 213-227.

Geyer, R., Jambeck, J.R., and Law, K.L., 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci Adv* 3: e1700782.

González García, Y., Meza Contreras, J.C., González Reynoso, O., Córdova López, J.A., 2013. Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. Rev. Int. Contam. Ambient. 29, 77–115.

Gracioso, L.H., Bellan, A., Karolski, B., Cardoso, L.O.B., Perpetuo, E.A., Nascimento, C.A.O. do, Giudici, R., Pizzocchero, V., Basaglia, M., Morosinotto, T., 2021. Light excess stimulates Poly-beta-hydroxybutyrate yield in a mangrove-isolated strain of *Synechocystis* sp. *Bioresour. Technol.* 320, 124379.

Gumel, A.M., Annuar, M.S.M., Chisti, Y., 2013. Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and the Environment* 21,580–605.

Gupta, P. L., Lee, S. M., Choi, H. J., 2015 A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 1409–1417.

Hauf, W., Schlebusch, M., Hüge, J., Kopka, J., Hagemann, M., Forchhammer, K., 2013. Metabolic changes in *Synechocystis* PCC 6803 upon nitrogen-starvation: excess NADPH sustains polyhydroxybutyrate accumulation. *Metabolites.* 3(1): 101–18.

Heining, M., Sutor, A., Stute, S., Lindenberger, C., *et al.*, 2015. Internal illumination of photobioreactors via wireless light emitters: a proof of concept. *J. Appl. Phycol.* 27, 59–66.

Kamravamanesh, D., Kovacs, T., Pflügl, S., Druzhinina, I., Kroll, P., Lackner, M., Herwig, C., 2018. Increased poly-β-hydroxybutyrate production from carbon dioxide in randomly mutated cells of cyanobacterial strain *Synechoeystis* sp. PCC 6714: Mutant generation and characterization. *Bioresour Technol.* 266, 34 44.

Kamravamanesh, D., Pflügl, S., Nischkauer, W., Limbeck, A., Lackner, M., Herwig, C., 2017. Photosynthetic poly-β-hydroxybutyrate accumulation in unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6714. *AMB Express*, 7(1), 143.

Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, *et al.*, 1996. Sequence Analysis of the Genome of the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. II. Sequence Determination of the Entire Genome and Assignment of Potential Proteincoding Regions. *DNA Research* 3 (3), 109-136.

Kaštovský, J., Berrendero, E., Hldil, J., Johansen, J.R. 2014. *Cyanocohniella calida* gen. et sp. nov. (Cyanobacteria: *Aphanizomenonaceae*) a new cyanobacterium from the thermal springs from Karlovy Vary, Czech Republic.

Keshari, N., Gugger, M., Zhu, T., Lu, X., 2019. Compatible solutes profiling and carbohydrate feedstock from diversified cyanobacteria. *Algal Res.* 43, 101637.

Koch, M., Bruckmoser, J., Scholl, J., Hauf, W., Rieger, B., Forchhammer, K., 2020b. Maximizing PHB content in *Synechocystis* sp. PCC 6803: development of a new photosynthetic overproduction strain.

Koch, M., Doello, S., Gutekunst, K., Forchhammer, K., 2019. PHB is produced from Glycogen turn-over during nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Int. J. Mol. Sci.* 20.

- Koch, M., Forchhammer, K., 2021. Polyhydroxybutyrate: A Useful Product of Chlorotic Cyanobacteria. *Microb Physiol* 31 (2), 67-77.
- Koller, M., Maršálek, L., de Sousa Días, M. M., Braunegg, G., 2017. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnol* 37:24–38.
- Krasaueseb, N., Incharoensakdi, A., Khetkorn, W., 2019. Utilization of shrimp wastewater for poly- β -hydroxybutyrate production by *Synechocystis* sp. PCC 6803 strain $\Delta SphU$ cultivated in photobioreactor. *Biotechnol. Reports* 23, e00345.
- Li, K., Liu, Q., Fang, F., Luo, R., Lu, Q., Zhou, W., Huo, S., Cheng, P., Liu, J., Addy, M., Chen, P., Chen, D., Ruan, R., 2019. Microalgae-based wastewater treatment for References 355 nutrients recovery: A review. *Bioresour. Technol.* 291, 121934.
- López, C. A., 2010. Cyanobacterial diversity in extreme environments in Baja California, Mexico: a polyphasic study. *International Microbiology*. 4, 227-236.
- Miyake, M., Kataoka, K., Shirai, M., Asada, Y., 1997. Control of poly-beta-hydroxybutyrate synthase mediated by acetyl phosphate in cyanobacteria. *Bacteriology* 179, 5009– 5013.
- Moscoviz et. al. 2018. The environmental biorefinery: state-of-the-art on the production of hydrogen and value-added biomolecules in mixed culture fermentation. *Green Chem.*, 20, 3159.
- Nanda, N., Bharadvaja, N., 2022. Algal bioplastics: current market trends and technical aspects. *Clean Techn Environ Policy* 24, 2659–2679.
- Narusaka, Y., Narusaka, M., Satoh, K., Kobayashi, H., 1999. In vitro random mutagenesis of the d1 protein of the photosystem ii reaction center confers phototolerance on the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 274 (33), 23270–23275.
- Naser, A. Z., Deiab, I., Darras, B. M., 2021. Poly(lactic acid) (PLA) and polyhydroxyalkanoates (PHAs), green alternatives to petroleum-based plastics: a review. *RSC Advances*, 11(28), 17151–17196.
- Ng, A., Berla, B., Pakrasi, H., 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.
- Nishioka, M., Nakai, K., Miyake, M., Asada, Y., Taya, M., 2001. Production of poly- β hydroxybutyrate by thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19, under phosphate-limited conditions. *Biotechnol. Lett.* 23, 1095–1099.
- Strunecký, O., Elster, J., Komárek, J., 2012. Molecular clock evidence for survival of Antarctic cyanobacteria (Oscillatoriales, *Phormidium autumnale*) from Paleozoic times. *FEMS Microbiol Ecol* 82, 482-90.
- Obruca, S., Sedlacek, P., Mravec, F., Krzyzanek, V., Nebesarova, J., Samek, O., Kucera, D., Benesova, P., Hrubanova, K., Milerova, M., Marova, I., 2017. The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments. *N. Biotechnol.* 39, 68–80.
- Orthwein, T., Scholl, J., Spät, P., Lucius, S., Koch, M., Macek, B., Hagemann, M., Forchhammer, K., 2021. The novel PII-interactor PirC identifies phosphoglycerate mutase as key control point of carbon storage metabolism in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118, 1–9.
- Pade, N., Hagemann, M., 2015. Salt acclimation of cyanobacteria and their application in biotechnology. *Life* 5, 25–49.

- Panda, B., Mallick, N., 2007a. Enhanced poly- β -hydroxybutyrate accumulation in a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Lett. Appl. Microbiol.* 44, 194–198.
- Pandhal, J., Wright, P.C., Biggs, C.A., 2008. Proteomics with a pinch of salt: A cyanobacterial perspective. *Saline Systems* 4, 1–18.
- Prados, E., Maicas, S., 2016. Bacterial production of hydroxyalkanoates (PHA). *Univers. J. Microbiol. Res.* 4, 23-30.
- Raeid, M. M., Abed (2008): Applications of cyanobacteria in biotechnology. Biology Department, College of Science, Sultan Qaboos University.
- Rueda, E., Altamira-Algarra, B., García, J., 2022a. Process optimization of the polyhydroxybutyrate and glycogen production in the cyanobacteria *Synechocystis* sp. and *Synechococcus* sp. *Bioresour. Technol.* 356.
- Rueda, E., Álvarez-González, A., Vila, J., Díez-Montero, R., Grifoll, M., García, J., 2022b. Inorganic carbon stimulates the metabolic routes related to the Polyhydroxybutyrate (PHB) production in Cyanobacteria *Synechocystis* isolated from wastewater. *Sci. Total Environ.* 829.
- Rueda, E., García, J., 2021. Optimization of the phototrophic Cyanobacteria polyhydroxybutyrate (PHB) production by kinetic model simulation. *Sci. Total Environ.* 800, 149561.
- Rueda, E., García-Galán, M.J., Díez-Montero, R., Vila, J., Grifoll, M., García, J., 2020a. Polyhydroxybutyrate and glycogen production in photobioreactors inoculated with wastewater borne cyanobacteria monocultures. *Bioresour. Technol.* 295, 122233.
- Rueda, E., González-Flo, E., Roca, L., Carretero, J., García, J., 2022c. Accumulation of polyhydroxybutyrate in *Synechocystis* sp. isolated from wastewaters: Effect of salinity, light, and P content in the biomass. *J. Environ. Chem. Eng.* 107952.
- Sagir, E., Alipour, S., 2021. Photofermentative hydrogen production by immobilized photosynthetic bacteria: Current perspectives and challenges. *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 141, 110796.
- Samantaray, S., Mallick, N., 2014. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer by the diazotrophic cyanobacterium *Aulosira fertilissima* CCC 444. *J. Appl. Phycol.* 26, 237–245.
- Samantaray, S., Nayak, J.K., Mallick, N., 2011. Wastewater utilization for poly- β hydroxybutyrate production by the cyanobacterium *Aulosira fertilissima* in a recirculatory aquaculture system. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8735–8743.
- Selim, K.A., Haffner, M., Burkhardt, M., Mantovani, O., Neumann, N., Albrecht, R., Seifert, R., Krüger, L., Stülke, J., Hartmann, M.D., Hagemann, M., Forchhammer, K., 2021. Diurnal metabolic control in cyanobacteria requires perception of second messenger signaling molecule c-di-AMP by the carbon control protein SbtB. *Sci. Adv.* 7, 1–14.
- Sero, E. T., Siziba, N., Bunhu, T., Shoko, R., *et al.*, 2020. Biophotonics for improving algal photobioreactor performance: A review. *Int. J. Energy Res.*, 44, 5071–5092.
- Shrivastav, A., Mishra, S.K., Mishra, S., 2010a. Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of India. *Int. J. Biol. Macromol.* 46, 255– 260.
- Sivaramkrishnan, R., Suresh, S., Kanwal, S., Ramadoss, G., Ramprakash, B., Incharoensakdi, A., 2022. Microalgal Biorefinery Concepts' Developments for Biofuel and Bioproducts: Current Perspective and Bottlenecks. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 2623.

- Solimeno, A., Parker, L., Lundquist, T., García, J., 2017. Integral microalgae-bacteria model (BIO_ALGAE): application to wastewater high rate algal ponds. *Sci. Total Environ.* 601, 646–657.
- Stucken, K., Koch, R., Dagan, T., 2013. Cyanobacterial defense mechanisms against foreign DNA transfer and their impact on genetic engineering. *Biol Res*, 46(4), 373–382.
- Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y., 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Progress in Polymer Science* 25 (10), 1503-1555.
- Takeya, M., Iijima, H., Sukigara, H., Osanai, T., 2017. Cluster-Level Relationships of Genes Involved in Carbon Metabolism in *Synechocystis* sp. PCC 6803: Development of a Novel Succinate-Producing Strain. *Plant Cell Physiol.* 59 (1), 72-81.
- Tapio, S., Jyri-Pekka, M., Johan, W., Chemical reaction engineering and reactor technology. Chapman and Hall/CRC: 2019.
- Taton, A., Lis, E., Adin, D. M., Dong, G., Cookson, S., Kay, S. A., Golden, S. S., 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.
- Thajuddin, N., Dhanasekaran, D., 2016. *Algae: Organisms for Imminent Biotechnology*.
- Toribio, A.J., Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López, M.J., López-González, J.A., Moreno, J., 2021. Seed biopriming with cyanobacterial extracts as an eco-friendly strategy to control damping off caused by *Pythium ultimum* in seedbeds. *Microbiological Research*, 248, 126766.
- Touliabah, H.E.S., El-Sheekh, M.M., Ismail, M.M., El-Kassas, H., 2022. A Review of Microalgae-and Cyanobacteria-Based Biodegradation of Organic Pollutants. *Molecules* 27.
- Troschl, C., Meixner, K., Fritz, I., Leitner, K., Romero, A.P., Kovalcik, A., Sedlacek, P., Drosig, B., 2018. Pilot-scale production of poly- β -hydroxybutyrate with the cyanobacterium *Synechocystis* sp. CCALA192 in a non-sterile tubular photobioreactor. *Algal Res.* 34, 116–125.
- Wang, M., Luan, G. D., 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.
- Wang, Y., Tahir, N., Cao, W., Zhang, Q., *et al.*, 2019. Grid columnar flat panel photobioreactor with immobilized photosynthetic bacteria for continuous photofermentative hydrogen production. *Bioresour Technol.* 291, 121806.
- Whitton, B.A. (Ed.). 2012. *Ecology of Cyanobacteria II*.
- Yashavanth, P.R., Das, M., Maiti, S.K., 2021. Recent progress and challenges in cyanobacterial autotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB), a bioplastic. *J. Environ. Chem. Eng.* 9, 105379.
- Zhong, Y., Godwin, P., Jin, Y., Xiao, H., 2020. Biodegradable polymers and green-based antimicrobial packaging materials: A mini-review. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, 3(1), 27–35.