



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y TRANSCRIPTÓMICA DE LA
RESPUESTA METABÓLICA A VARIACIONES DE pH EN LA
DIATOMEA *Phaeodactylum tricornutum*.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

P r e s e n t a

Carlos Alejandro Pérez Rojas

La Paz, Baja California Sur, junio de 2023.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 02 del Mes de junio del 2023, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y TRANSCRIPTÓMICA DE LA RESPUESTA METABÓLICA A VARIACIONES DE pH EN LA DIATOMEA *Phaeodactylum tricornutum*"


Presentada por el alumno:

Carlos Alejandro Pérez Rojas

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuicultura**.

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



Dra. Elena Palacios Mechetnov
Co-Directora de Tesis



Dra. María Concepción Lora Vilchis
Co-Directora de Tesis



Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Co-Tutora de Tesis



Dr. Rubén Lara Lara
Co-Tutor de Tesis



Dr. Sébastien Artigaud
Co-Tutor de Tesis

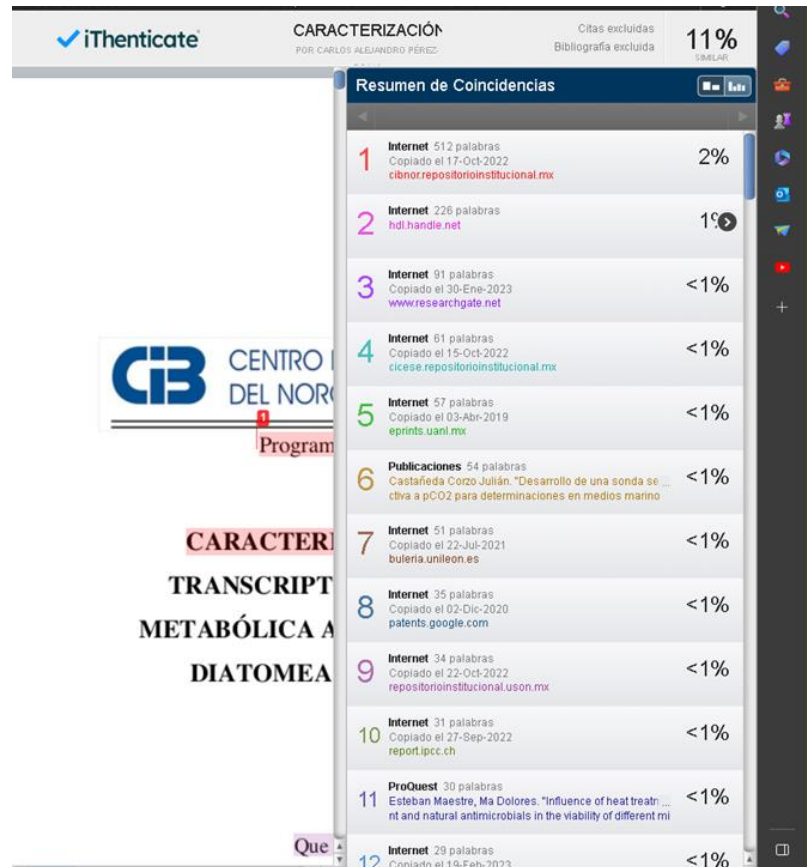


Dra. Alejandra Nieto Garibay,
Encargada del Despacho de la Dirección de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

La Paz, Baja California Sur, a 02 de junio de 2023.

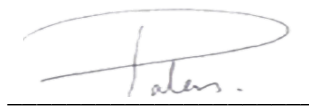
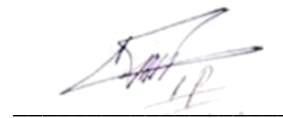
Los miembros del comité de tesis del estudiante Carlos Alejandro Pérez Rojas del Programa de Doctorado en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio: iThenticate
- Filtros utilizados: Citas excluidas
Bibliografía excluida
- Porcentajes de similitud: 11% de similitud
Se muestra captura de pantalla



Match	Source	Words	Copied	Similarity
1	Internet	512 palabras	Copiado el 17-Oct-2022	2%
2	Internet	226 palabras	Copiado el 17-Oct-2022	1%
3	Internet	91 palabras	Copiado el 30-Ene-2023	<1%
4	Internet	81 palabras	Copiado el 15-Oct-2022	<1%
5	Internet	57 palabras	Copiado el 03-Abr-2019	<1%
6	Publicaciones	54 palabras	Copiado el 03-Abr-2019	<1%
7	Internet	51 palabras	Copiado el 22-Jul-2021	<1%
8	Internet	35 palabras	Copiado el 02-Dic-2020	<1%
9	Internet	34 palabras	Copiado el 22-Oct-2022	<1%
10	Internet	31 palabras	Copiado el 27-Sep-2022	<1%
11	ProQuest	30 palabras	Copiado el 27-Sep-2022	<1%
12	Internet	29 palabras	Copiado el 19-Feb-2023	<1%

Firmas del Comité

Dra. María Concepción Lora Vilchis Dra. Elena Palacios Mechetnov Dra. Crisalejandra Rivera Pérez



Dr. Sébastien Artigaud



Dr. Rubén Lara Lara

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. María Concepción Lora Vilchis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
Co-Directora de Tesis

Dra. Elena Palacios Mechetnov
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
Co-Directora de Tesis

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
Co-Tutora de Tesis

Dr. Sébastien Artigaud
Université de Bretagne Occidentale
Co-Tutor de Tesis

Dr. Rubén Lara Lara
Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dra. María Concepción Lora Vilchis
Dra. Elena Palacios Mechetnov
Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Dr. Sébastien Artigaud
Dr. Rubén Lara Lara

Jurado de Examen

Dra. María Concepción Lora Vilchis
Dra. Elena Palacios Mechetnov
Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Dr. Sébastien Artigaud
Dr. Rubén Lara Lara

Suplentes

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
Dr. Salvador Emilio Lluch Cota

Resumen

Las microalgas desempeñan un papel crucial en el medio marino debido a su actividad fotosintética oxigénica ya que son las productoras de biomasa y oxígeno; y por su capacidad para producir compuestos bioactivos esenciales se han considerado como organismos de gran importancia en la naturaleza y de gran interés por sus posibles aplicaciones biotecnológicas y acuícolas. Sin embargo, estas microalgas son sensibles a los cambios ambientales, como la acidificación oceánica, una problemática global. Este fenómeno puede tener efectos negativos en el crecimiento y la producción de compuestos bioactivos de las microalgas. Con el objetivo de comprender los posibles impactos de la acidificación oceánica en las microalgas, se llevó a cabo un estudio centrado en la microalga modelo *Phaeodactylum tricornutum*, analizando su respuesta a los niveles de pH 8.1 y 7.8 (representando las condiciones actuales y las estimadas para el año 2100, respectivamente). Para ello, se diseñó y construyó un pH-stat que permitió regular automáticamente el pH del medio de cultivo. Esto permitió determinar las tasas de crecimiento, fotosíntesis y consumo de nutrientes, así como los perfiles de ácidos grasos de *P. tricornutum* manteniendo ambos niveles de pH. Además, se realizó un metaanálisis de biología de sistemas utilizando bases de datos públicas de experimentos que consideraron condiciones similares. Los resultados revelaron que *P. tricornutum* posee mecanismos de aclimatación a la acidificación oceánica, donde participan diversos ácidos grasos insaturados que actúan en sistemas de señalización y regulación. Estos mecanismos permiten a la microalga reducir su tasa de crecimiento y aumentar su tasa fotosintética. Sin embargo, se observó que *P. tricornutum* requirió mayores cantidades de fosfato y hierro, lo cual puede representar una limitación para una aclimatación exitosa en un entorno natural.

Palabras clave: Microalgas, acidificación oceánica, biología de sistemas, aclimatación.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3020-1458>

Vo. Bo. Co-Directoradas de Tesis



Dra. María Concepción Lora Vilchis



Dra. Elena Palacios Mechetnov

Summary

Microalgae play a crucial role in the marine environment for their ability to produce oxygen from photosynthesis, but also because of their ability to produce essential bioactive compounds, making them organisms of interest in both nature and biotechnological and aquacultural applications. However, microalgae are sensitive to environmental changes, such as ocean acidification, which is a global issue. This phenomenon can have negative effects on the growth and production of bioactive compounds in microalgae. To understand the potential impacts of ocean acidification on microalgae, a study focused on the model microalga *Phaeodactylum tricornutum* was conducted, analyzing its response to pH levels of 8.1 and 7.8 (representing current conditions and those estimated for the year 2100, respectively). To achieve this, a pH-stat was designed and constructed to automatically regulate the pH of the culture medium. This allowed for the determination of growth rates, photosynthesis, nutrient consumption, and fatty acid profiles of *P. tricornutum* under both pH levels. In addition, a system biology meta-analysis was performed using public databases of experiments with similar conditions. The results revealed that *P. tricornutum* has adaptation mechanisms to ocean acidification involving various unsaturated fatty acids participating in signaling and regulatory systems. These mechanisms enable the microalga to reduce its growth rate and increase its photosynthetic rate. However, it was observed that *P. tricornutum* required higher amounts of phosphate and iron, which could pose a limitation for successful adaptation in a natural environment.

Keywords: Microalgae, ocean acidification, systems biology, acclimation.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3020-1458>



Dra. María Concepción Lora Vilchis

Vo. Bo. Co-Directoradas de Tesis



Dra. Elena Palacios Mechetnov

Dedicatoria

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que han sido fundamentales en la culminación de este trabajo de tesis. Aunque el esfuerzo principal provino de mí, reconozco que no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de aquellos que estuvieron a mi lado en todo momento.

En primer lugar, quiero agradecer a Verónica, quien estuvo presente noche y día, desde el principio hasta el final, compartiendo conmigo tanto los momentos de éxito como los desafíos que enfrenté. Su constante apoyo y compañía fueron vitales para alcanzar este logro.

También quiero extender mi gratitud a mi familia: mis Padres, mi Hermano y mi Hermana. A pesar de la distancia, siempre encontraron tiempo para comunicarse conmigo, ya sea a través de llamadas o medios virtuales, brindándome su apoyo inquebrantable. Sus enseñanzas, crianza y amor son los cimientos que me han llevado hasta este punto.

Asimismo, me gustaría agradecer a las doctoras Cony y Elena, quienes no solo actuaron como codirectoras de este trabajo, sino que también me brindaron su amistad y apoyo en situaciones fuera del entorno académico. Les estoy personalmente agradecido por su contribución invaluable.

Finalmente, quiero expresar mi reconocimiento a Gaby y Roberto, quienes han sido grandes amigos y siempre han estado dispuestos a ayudarme desde mi llegada a La Paz. Su apoyo incondicional ha sido de gran importancia en mi trayectoria académica.

A todos ustedes, dedico este trabajo, ya que reconozco que no hubiera sido posible lograrlo de la misma manera sin su presencia constante y su apoyo inquebrantable.

Agradecimientos

Este proyecto no podría haber finalizado satisfactoriamente sin el apoyo de muchas personas e instituciones que siempre estuvieron dispuestos a cooperar.

Se hace especial mención a los técnicos de CIBNOR que aportaron sus habilidades y conocimientos. Al técnico del Departamento de Electrónica Ing. **Carlos Alonso Martínez Martínez**, quien participó en el diseño del pH-stat, y construyó y programó el firmware que utilizó este mismo equipo; al responsable técnico del Cepario de Microalgas Q.F.B. **Marte Virgen Félix**, que apoyó facilitando la cepa cada que se la requerí; a la responsable técnico del Laboratorio de Metabolismo de Lípidos M.C. **Olivia Arjona López**, por su apoyo en la extracción y cuantificación de lípidos y ácidos grasos; al técnico del Laboratorio de Bioquímica Fisiológica M.C. **Roberto Hernández Herrera**, quien dio su apoyo para la liofilización de las muestras y la lectura de las muestras para la determinación de nutrientes, a los técnicos del Taller de Maquinados **Guillermo Cortés García** y **Jorge Cobos Anaya**, quienes ayudaron con el diseño del sistema de cultivo y la construcción de piezas importantes como la mezcladora de gases que se utilizó.

También tuvieron una participación muy importante a los Doctores de la unidad de Filogenómica Eucariótica de la Universidad de Lieja (ULiège) **Denis Baurain** y **Demian Sirjacobs**, quienes amablemente me recibieron en esta Universidad Belga, y me proporcionaron el entrenamiento, guía y sugerencias para realizar los análisis bioinformáticos empleados.

Tampoco se puede dejar pasar a todos los integrantes del Comité Tutorial, por su tiempo, paciencia, guía y sabiduría durante la realización de este proyecto: Dra. **María Concepción Lora Vilchis**, Dra. **Elena Palacios Mechetnov**, Dra. **Crisalejandra Rivera Pérez**, Dr. **Sébastien Artigaud** y Dr. **Rubén Lara Lara**.

Finalmente, pero no menos importante, agradezco al **Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.** y a la **Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos** por permitirme realizar mis estudios y experimentos en las instalaciones de esta institución, así como los apoyos económicos recibidos.

Al **CONACyT** por la beca de manutención otorgada con número de CVU 565323 y el financiamiento a los proyectos del CIBNOR 20367 y Proy_CB_2016_286252. A la **ULiège** por permitirme realizar una estancia en sus instalaciones con la que aprendí las técnicas de análisis bioinformáticos aplicadas y conocí mucha gente nueva.

A todos **MUCHAS GRACIAS.**

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	ix
Abreviaturas	x
1.INTRODUCCIÓN	1
2.ANTECEDENTES	3
2.1 Importancia de las algas	3
2.1.1 Microalgas.....	5
2.1.2 Diatomeas	7
2.2 Estrés en microalgas: Homeostasis, aclimatación y adaptación.....	8
2.3 Efectos del incremento de CO ₂ atmosférico	10
2.3.1 Cambios físicos y químicos en el océano.....	10
2.3.2 Efectos observados del cambio de pH en <i>P. tricornutum</i> y otras microalgas	12
2.3.3 Métodos de regulación de pH	16
2.4 Biología de sistemas para el análisis de efecto del pH en diatomeas.....	17
2.4.1 Investigación en biología de sistemas con conjuntos de datos experimentales	18
2.4.1.1 Caso 1.....	18
2.4.1.2 Caso 2.....	19
2.4.1.3 Caso 3.....	19
2.4.1.4 Caso 4.....	20
2.4.2 Metanálisis utilizando conjuntos de datos públicos.	22
2.4.2.1 Caso 1. Redes metabólicas de <i>P. tricornutum</i>	22
2.4.2.2 Caso 2. MinOmics, una plataforma para visualizar e integrar datos.....	23
2.4.2.3 Caso 3. PhaeoNet, un retrato holístico basado en RNA-seq	24
2.4.2.4 Caso 4. Meta-ensamblaje <i>de Novo</i> de transcriptomas.....	24
2.4.3 Herramientas para el análisis de datos en Microalgas.....	25
3.JUSTIFICACIÓN	29
4.HIPÓTESIS	31
5.OBJETIVOS	32
5.1 Objetivo general	32
5.2 Objetivos particulares	32
6.MATERIAL Y MÉTODOS	33
6.1 Inóculos	33
6.1.1 Cepa y medio de cultivo	33
6.1.2 Preparación y mantenimiento de inóculos	33
6.2 Regulación de pH.....	33
6.2.1 Planeación y diseño del sistema de regulación de pH	33
6.2.2 Evaluación del desempeño del pH-stat	34
6.2.3 Determinación de la eficiencia del pH-Stat	35
6.3 Determinación del crecimiento y consumo de nutrientes	36
6.3.1 Medición de densidad celular.....	36
6.3.2 Medición de nutrientes en el medio de cultivo	37
6.3.3 Regresión no lineal para cálculo de parámetros de crecimiento.....	37

6.3.4 Determinación de eficiencia fotosintética	38
6.4 Caracterización del perfil lipídico	38
6.5 Análisis de biología de sistemas	39
7.RESULTADOS	41
7.1 Diseño final y evaluación del pH-stat	41
7.1.1 Detalles de diseño y funcionamiento	41
7.1.2 Eficiencia en la regulación de pH.....	43
7.2 Cambios en crecimiento y consumo de nutrientes.....	43
7.2.1 Crecimiento celular.....	43
7.2.2 Eficiencia fotosintética	44
7.2.3 Consumo de nitrato	45
7.2.4 Consumo de fosfato.....	46
7.2.5 Consumo de hierro	47
7.2.6 Consumo de silicato.....	48
7.3 Perfiles de ácidos grasos	49
7.4 Expresión diferencial de genes.....	52
7.4.1 Análisis clúster y PCA para agrupación de los SRA por pH	52
7.4.2 Identificación de DEGs y rutas metabólicas enriquecidas.....	55
8.DISCUSIÓN	58
8.1 Evaluación del pH-stat.....	58
8.2 Efectos en el crecimiento, fotosíntesis y consumo de nutrientes	59
8.3 Efectos del cambio de pH en el perfil de ácidos grasos	62
8.4 Enriquecimiento de rutas metabólicas	63
9.CONCLUSIONES	66
10.LITERATURA CITADA	68
11.ANEXOS	78
Anexo A. Formulación del Medio f/2 de Guillard	78
Anexo B. Componentes utilizados en la construcción del pH-stat	79
Anexo C. Lista de términos ontológicos enriquecidos a nivel de procesos biológicos	80
Anexo D. Genes de los 30 procesos biológicos enriquecidos con mayor significancia	85
Anexo E. Design of a low-cost pH-Stat to study effects of ocean acidification on growth and nutrient consumption of diatoms.	89
Anexo F. Systems biology approach to reveal novel pathways in diatom metabolism for ocean acidification acclimation.....	97

Lista de figuras

Figura 1. Cadena trófica marina.....	4
Figura 2. Representación esquemática la bomba biológica en el océano.	5
Figura 3. Productos obtenidos con biomasa de microalgas	6
Figura 4. Representación simplificada de la respuesta a estresores en función del tiempo. ...	9
Figura 5. Efectos del incremento de CO ₂ en el océano.....	11
Figura 6. Cambio en la concentración de CO ₂ y HCO ₃ ⁻ con respecto al pH.	13
Figura 7. Cambio en la concentración de H ₂ PO ₄ ⁻ con respecto al pH.....	14
Figura 8. Cambio en la concentración de Fe ²⁺ con respecto al pH.	15
Figura 9. Flujo de trabajo de iDEP v.0.951	27
Figura 10. Representación gráfica de efectos esperados en respuesta a la acidificación.....	31
Figura 11. Fotografía del pH-stat.	34
Figura 12. Sistema de cultivo de microalgas con regulación automática de pH.	36
Figura 13. Parámetros de la curva de crecimiento.	37
Figura 14. Esquema del controlador del pH-stat.	41
Figura 15. Cambio de pH en cultivos regulados.....	43
Figura 16. Curvas de crecimiento de <i>P. tricornutum</i>	44
Figura 17. Tasa de producción de O ₂ como correlato de la actividad fotosintética en función de la irradiancia o PPFD.....	45
Figura 18. Curvas de consumo de nitrato de <i>P. tricornutum</i>	46
Figura 19. Curvas de consumo de fosfato de <i>P. tricornutum</i>	47
Figura 20. Curvas de consumo de hierro de <i>P. tricornutum</i>	48
Figura 21. Curvas de consumo de silicato de <i>P. tricornutum</i>	49
Figura 22. Perfil de ácidos grasos clasificados por sus insaturaciones de <i>P. tricornutum</i>	49
Figura 23. Perfil completo de ácidos grasos de <i>P. tricornutum</i>	50
Figura 24. Ácidos grasos con diferencias significativas de <i>P. tricornutum</i>	52
Figura 25. Análisis clúster de las muestras de los SRA.....	53
Figura 26. PCA de los experimentos A y B.	54
Figura 27. Grupos de procesos biológicos enriquecidos y su porcentaje de DEGs.	55
Figura 28. Mapa metabólico de procesos biológicos enriquecidos con DEGs en <i>P. tricornutum</i>	56
Figura 29. Funciones biológicas enriquecidas con mayor significancia de los SRA de los experimentos A y B.	57

Lista de tablas

Tabla 1. Clasificación de las algas	3
Tabla 2. Clasificación taxonómica <i>P. tricornutum</i>	7
Tabla 3. Condiciones de cultivo en estudios de biología de sistemas en microalgas.....	21
Tabla 4. Bioproyectos seleccionados.	39
Tabla 5. Parámetros de crecimiento celular.	44
Tabla 6. Parámetros de consumo de nitrato de <i>P. tricornutum</i>	45
Tabla 7. Parámetros de consumo de fosfato de <i>P. tricornutum</i>	46
Tabla 8. Parámetros de consumo de hierro de <i>P. tricornutum</i>	47
Tabla 9. Parámetros de consumo de silicato de <i>P. tricornutum</i>	48

Abreviaturas

Todas las abreviaturas se definen también en su primera aparición en el texto, exceptuando las de las unidades. En el texto no se especifica si es por sus siglas en inglés ya que se indica en esta lista.

Sustancias

DIC *	Carbono inorgánico disuelto
ARA *	Ácido araquidónico
CO ₂	Dióxido de carbono
CO ₃ ²⁻	Ion carbonato
DHA *	Ácido docosahexaenoico
DNA *	Ácido desoxirribonucleico
EPA *	Ácido eicosapentaenoico
Fe ²⁺	Ion ferroso
Fe ³⁺	Ion férrico
GBSSI *	Sintetasa de almidón unida a gránulos
H ₂ PO ₄ ⁻	Ion dihidrógeno fosfato
HCO ₃ ⁻	Ion bicarbonato
HUFA *	Ácidos grasos altamente insaturados
MUFA *	Ácidos grasos monoinsaturados
n-3	Ácidos grasos omega 3
n-6	Ácidos grasos omega 6
O ₂	Oxígeno
PUFA *	Ácidos grasos poliinsaturados
RNA *	Ácido ribonucleico
RNA-seq *	Secuenciación de RNA
SFA *	Ácidos grasos saturados
TAG	Triglicéridos

Organismos

<i>A. carterae</i>	<i>Amphidinium carterae</i>
<i>E. gracilis</i>	<i>Euglena gracilis</i>
<i>P. tricornutum</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
<i>S. marinoi</i>	<i>Skeletonema marinoi</i>

Términos estadísticos y de modelos

μ	Tasa de crecimiento
ANOVA *	Análisis de varianza
k	Tasa de consumo de nutrientes
m	pendiente de regresión lineal
PC *	Componente principal
PCA *	Análisis de componentes principales
R^2	Coefficiente de determinación
S_f	Densidad o concentración final
S_i	Densidad o concentración inicial
λ	Duración de fase de latencia

* Abreviaturas acordes a sus siglas en inglés

Unidades

°C	Grados Celsius
μM	Micromolar
μmol m ⁻² s ⁻¹	Micromoles de fotones por metro cuadrado por segundo
cel mL ⁻¹	Células por mililitro
D	Días
d-1	Unidad de frecuencia (p. ej. duplicaciones por día)
g L ⁻¹	Gramo por litro
L	Litros
L min ⁻¹	Litros por minuto
mg	Miligramos
mL	Mililitros
Ppm	Partes por millón
psi *	Libra-fuerza por pulgada cuadrada
Rpm	Revoluciones por minuto
x10 ⁶ pmol O ₂ cel ⁻¹ s ⁻¹	Picomoles de O ₂ por millón de células por segundo

Otros

GO *	Ontología de genes (Se incluye en ClueGO)
iDEP *	Análisis integrado de expresión diferencial y análisis de vías
IPCC *	Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático
pCO ₂	Presión parcial de CO ₂
PPFD *	Densidad de flujo de fotones fotosintéticos
PTM *	Modificaciones postraduccionales
RCP *	Trayectorias de Concentración Representativas
SRA *	Archivos de Lectura de Secuencias
TF *	Factores de transcripción
TRN *	Red reguladora transcripcional
UV	Ultravioleta
WGCNA *	Análisis ponderado de redes de coexpresión génica
C:N	Relación Carbono-Nitrógeno

* Abreviaturas acordes a sus siglas en inglés

1. INTRODUCCIÓN

El fitoplancton está compuesto por algas, la mayoría fotosintéticas, que acoplan los procesos atmosféricos y oceánicos del ciclo del carbono (Basu y Mackey, 2018). Las microalgas son la fracción más grande del fitoplancton, aportando el 50% de la productividad primaria global (producción de biomasa a partir de la fotosíntesis; Levine, 2018) y afectan directamente el ciclo del carbono (Bautista-Chamizo *et al.*, 2018). Las diatomeas, son el grupo de microalgas más abundante en el fitoplancton, están distribuidas por todo el mundo, aportan el 40% de la productividad primaria marina y la cuarta parte del oxígeno (O₂) terrestre (Yi *et al.*, 2017).

La productividad primaria en los océanos depende del carbono inorgánico disuelto (DIC) disponible en el ambiente marino, haciendo del secuestro de dióxido de carbono (CO₂) un paso importante en la generación de biomasa. Lo que convierte a los océanos en el mayor sumidero de este gas en nuestro planeta (McKinley *et al.*, 2020). El aumento de los niveles de CO₂ en la atmósfera y su absorción en el mar tienen diversos efectos, como el aumento de la temperatura y la acidificación oceánica, lo que afecta en forma particular a la zona fótica (Li *et al.*, 2012). Estos factores alteran las características de los ecosistemas marinos (Virta y Teittinen, 2022), lo que puede modificar el metabolismo de los organismos.

Las microalgas son el primer nivel de la cadena trófica y proveen de materia orgánica y compuestos bioactivos a los organismos de niveles superiores. Entre esos compuestos se incluyen los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), minerales, carotenoides y compuestos fenólicos (Foo *et al.*, 2017). El consumo de estas moléculas influye en la fisiología de los animales marinos, ya que algunas son esenciales para ellos. Dado, que solo las algas pueden producirlos, deben adquirirse a partir de la dieta. Estas moléculas son necesarias para su respuesta inmune, la función intestinal digestiva y absorbente, la conversión alimenticia, la capacidad reproductiva y el control de peso (Bellou *et al.*, 2014), entre otras funciones.

Además de su importancia en las cadenas tróficas, estos mismos compuestos bioactivos y la materia orgánica de microalgas tienen gran número de aplicaciones en diferentes industrias. Algunas de estas incluyen su uso como alimento vivo en acuicultura de invertebrados, la producción de biocombustibles, su inclusión en medicamentos, la fabricación de cosméticos y suplementos alimenticios, entre otros. Por lo que, determinar las condiciones de cultivo

para incrementar su biomasa y la producción de compuestos bioactivos ha tomado relevancia en los últimos años (Khan *et al.*, 2018).

Debido a su importancia principal en los ambientes marinos, es crítico determinar cómo afecta la acidificación oceánica a las microalgas en su metabolismo y, por tanto, en su fisiología (Basu y Mackey, 2018). Este análisis nos proporcionará información sobre su repercusión en las cadenas tróficas, así como en un potencial uso como materias primas. En particular, el empleo de diatomeas puede permitir la evaluación del impacto de esos cambios en los ecosistemas marinos, los cuales podrían tener efecto incluso en alteraciones a la biodiversidad (Feijão *et al.*, 2017).

2. ANTECEDENTES

2.1 Importancia de las algas

La mayoría de las algas son organismos fotosintéticos oxigénicos. Pueden ser clasificados en una amplia variedad de grupos (Tabla 1). Este conjunto incluye tanto organismos procariontes como eucariontes, y van desde formas unicelulares hasta las macroalgas marinas pluricelulares parenquimatosas, que pueden alcanzar más de 50 metros de longitud (McFadden, 2001). Su característica principal es la capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica, con lo que forman el primer nivel de la cadena trófica marina. Generan casi la mitad del O₂ terrestre (Foo *et al.*, 2017) y sintetizan compuestos orgánicos complejos de interés para su uso en biotecnología y nutrición (Guedes *et al.*, 2011).

Tabla 1. Clasificación de las algas (elaboración propia con datos de Hoek *et al.*, 1995; Pulz y Gross, 2004).

Grupo	Características
Cyanobacteria	<ul style="list-style-type: none"> • 2,000 especies conocidas - 150 géneros. • Único de naturaleza procariota. • Pigmentos característicos: ficocianinas, ficoeritrina. • Órdenes: Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales y Stigonematales. • Fotótrofas estrictas, mixotróficas y heterotróficas. • Almacenan gran cantidad de fósforo, nitrógeno, carbono y energía. • Reproducción: fisión celular.
Verdes	<ul style="list-style-type: none"> • Grupos: Chlorophyta y Conjugaphyta. • Subgrupos de Chlorophyta: Prasinophyceae (algas unicelulares flageladas), Chlorophyceae (unicelulares o filamentosas), Ulvophyceae y Charophyceae (algas macroscópicas).
Heterocontas	<ul style="list-style-type: none"> • Grupos: Phaeophyta (algas café), Xanthophyta (algas verde-amarillas), Chrysophyta (algas doradas) y Bacillariophyta (diatomeas; subdivisión: Coscinodiscophyceae, Fragilariophyceae y Bacillariophyceae). • Pigmento característico: Fucoxantina (carotenoide). • Reservas de energía: crisolaminarina y lípidos.
Cryptophyta	<ul style="list-style-type: none"> • 60 especies - 20 géneros. • Unicelulares y móviles. • Pigmentos característicos: Clorofila, carotenoides y ficobiliproteínas.
Dinoflagellata	<ul style="list-style-type: none"> • 4,000 especies y 550 géneros. • Agua dulce y salada. • Casi la mitad son fotosintéticas, pocas son autótrofas, la mayoría son mixotróficas, el resto son heterotróficas. • Pigmentos característicos: clorofila a, c2, peridina (carotenoide). • Reservas de almidón, lípidos, esteroides, ácidos grasos y otros metabolitos.
EUGLENOPHYTA	<ul style="list-style-type: none"> • >800 especies y 40 géneros. • Agua dulce. • Fotosintéticas, mixotróficas, heterotróficas. • Pigmentos característicos: Clorofila a y b, carotenoides. • Productos de almacenaje: paramilon (betaglucano).
Extremófilas	<ul style="list-style-type: none"> • Crecimiento más lento que el de las algas comunes.

Las algas son organismos altamente adaptables y se pueden encontrar en una amplia variedad de ambientes en todo el mundo. Además, las diferentes cepas tienen la capacidad de sobrevivir en ambientes adversos, como el calor, el frío, la sequía, la alta salinidad, la fotooxidación, la anaerobiosis, la presión osmótica y la exposición a rayos ultravioleta (UV; Guedes *et al.*, 2011).

Las algas son organismos muy importantes desde una perspectiva ecológica, ya que son los productores primarios en los océanos, cuerpos de agua dulce y salobre; lo que las convierte en la base de las cadenas tróficas en esos ambientes (Fig. 1). Además, se pueden encontrar en diversas superficies con diversos grados de humedad, como el suelo, las rocas, el hielo, la nieve, las plantas y los animales (Desingurajan *et al.*, 2018).



Figura 1. Cadena trófica marina (modificado de Lukaves, 2014).

Otra función esencial de las algas es su papel en la bomba biológica del carbono, que es un proceso natural clave en el ciclo global del carbono. Este proceso contribuye en la regulación de los niveles de CO_2 atmosférico y consiste en transferir parte del carbono orgánico e inorgánico fijado por el fitoplancton en la capa fótica, hacia el fondo marino donde se acumula (Fig. 2 ; Basu and Mackey, 2018).

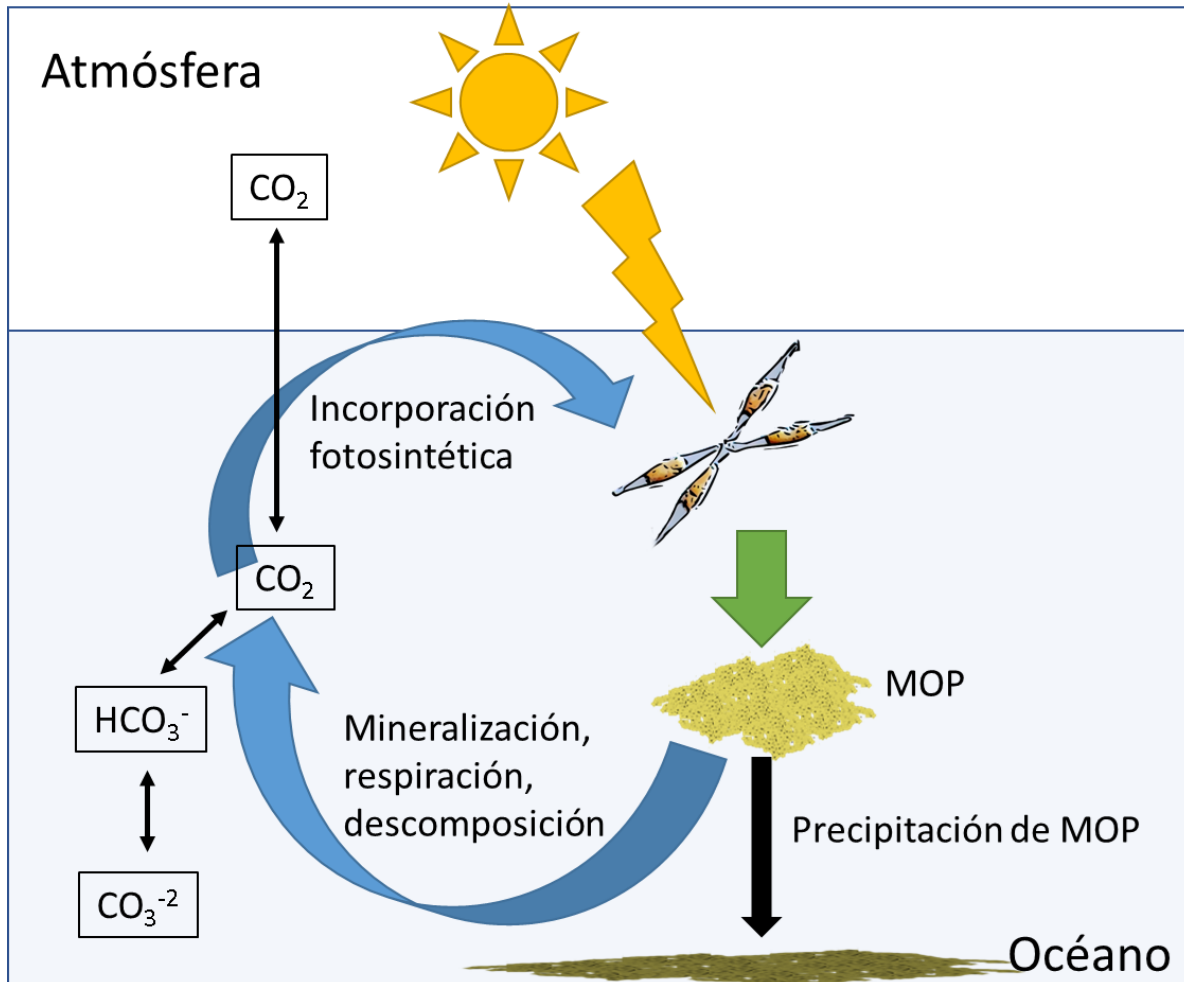


Figura 2. Representación esquemática la bomba biológica en el océano. Sólo una pequeña fracción del CO_2 fijado precipita hacia el sedimento, donde queda depositado en forma de materia orgánica particulada (MOP) durante mucho tiempo (Modificado de Mercado, 2002 con información de Vega-Moreno *et al.*, 2012).

2.1.1 Microalgas

Las algas microscópicas, ya sean unicelulares o filamentosas, se conocen como microalgas, y forman una gran biodiversidad, estimada entre 200,000 y varios millones de especies, en comparación con las plantas superiores, que tienen cerca de 250,000 especies (Pulz y Gross, 2004). Estos organismos tienen propiedades únicas que permiten su cultivo en una amplia

variedad de ambientes, incluyendo tierras marginales, acuíferos salinos, aguas residuales y océanos, para la producción de recursos biológicos (Wilkie *et al.*, 2011).

Las microalgas combinan propiedades típicas de las plantas superiores, como la eficiente fotosíntesis oxigénica, los requerimientos nutricionales simples y la rapidez de crecimiento, con la capacidad de acumular o secretar metabolitos primarios y secundarios, de forma similar a los microorganismos (Guedes *et al.*, 2011). Además, algunas especies de microalgas presentan una respuesta fisiológica a estímulos constantes de estrés, que pueden implicar grandes modificaciones a su composición bioquímica, adaptándose a distintas situaciones y produciendo compuestos de interés para la industria (Fig. 3; Khan *et al.*, 2018).

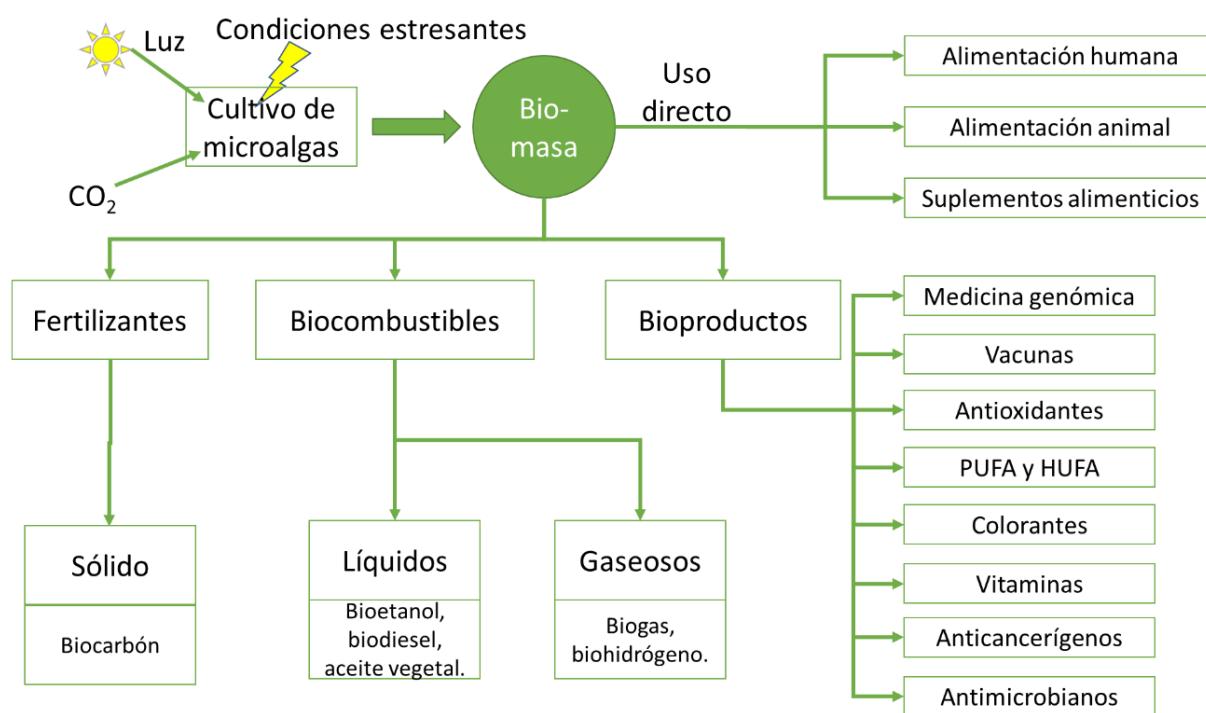


Figura 3. Productos obtenidos con biomasa de microalgas (Modificado de Khan *et al.*, 2018).

Gracias a estas propiedades, se han establecido cultivos con diferentes cepas de microalgas para obtener productos específicos de alto valor, como β -glucanos, que interactúan con el sistema inmune de vertebrados e invertebrados, activando al sistema complemento e incrementando la función de los macrófagos y de las células natural killer. Por lo tanto, pueden actuar como agentes anticancerígenos (Akramiene *et al.*, 2007; Espinoza-Gallardo *et al.*, 2017). Además, las microalgas también producen carotenoides, ácidos fenólicos, vitaminas C y E, que son antioxidantes; ácidos grasos esenciales para otros organismos, tales

como el araquidónico (20:4n-6, ARA), eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA) y docosahexaenoico (22:6n-3, DHA), entre otros (Pulz y Gross, 2004).

2.1.2 Diatomeas

Las diatomeas son el grupo más abundante dentro las microalgas constituido por más de 8000 especies en todo el mundo. Se caracterizan por poseer una pared celular o frústula constituida por dos valvas que ajustan como una caja de Petri, conformadas por una matriz de sílice amorfa que sintetiza la célula a partir de los silicatos disueltos en el agua y que exocita durante la reproducción celular. Esta pared es característica de cada especie y se emplea para su identificación taxonómica. La fracción inorgánica que constituye la pared celular puede ser del 10-50 por ciento del peso seco celular (Hildebrand *et al.*, 2018). Gracias a su actividad fotosintética, las diatomeas contribuyen con el 20% de la producción primaria global y desempeñan un papel importante en los ciclos del carbono y silicio en los océanos. En términos generales, las diatomeas se pueden dividir en dos grupos: las penadas con simetría bilateral y las céntricas con simetría radial (Yi *et al.*, 2017).

Phaeodactylum tricornutum es una especie de diatomea penada, perteneciente a la clase Bacillariophyceae (Tabla 2). Se encuentra en aguas costeras y oceánicas en abundancia (Bautista-Chamizo *et al.*, 2018) y puede adoptar tres formas distintas: fusiforme, tri-radiada y oval (Tesson *et al.*, 2009).

Tabla 2. Clasificación taxonómica *P. tricornutum* (WoRMS Editorial Board, 2023).

Reino	Chromista
Phylum	Bacillariophyta
Clase	Bacillariophyceae
Subclase	Bacillariophycidae
Familia	Phaeodactylaceae
Género	<i>Phaeodactylum</i>

Su genoma ha sido totalmente secuenciado (Bowler *et al.*, 2008), por lo que es considerada un organismo modelo por ecologistas de plancton, biólogos celulares y fisiólogos (Sabir *et al.*, 2018). Se utiliza comúnmente en bioensayos para evaluar los impactos de distintas condiciones estresantes en las comunidades de fitoplancton y como bio-monitor, por su relativa facilidad de cultivo, su rápida respuesta a los cambios ambientales y ser tolerante a un amplio intervalo de temperaturas, salinidades, calidades y cantidades de luz (Kräbs y

Büchel, 2011; Feijão *et al.*, 2017). Por estos motivos, *P. tricornutum* es una diatomea excelente para estudiar cambios metabólicos causados por el estrés al que se someten por la acidificación del medio.

2.2 Estrés en microalgas: Homeostasis, aclimatación y adaptación

Las perturbaciones en factores como la luz, temperatura, pH, nutrientes, salinidad, etc., son detectadas por los organismos, generando una señal de alarma o estrés para modificar sus procesos fisiológicos y dar una respuesta a ese estímulo estresante (Russek y Cabanac, 1990). Estas respuestas son parte de un sistema de regulación, donde los factores que se regulan son variables del organismo fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis. Esto se logra mediante el control de las variables de entrada o de salida que afectan a la variable y la mantienen entre límites estrechos.

Adicionalmente, se considera que la estabilidad bioquímica de un cultivo de microalgas es crucial para el mantenimiento de la homeostasis del cultivo, un proceso fisiológico que responde a factores ambientales y orgánicos (Borowitzka, 2018).

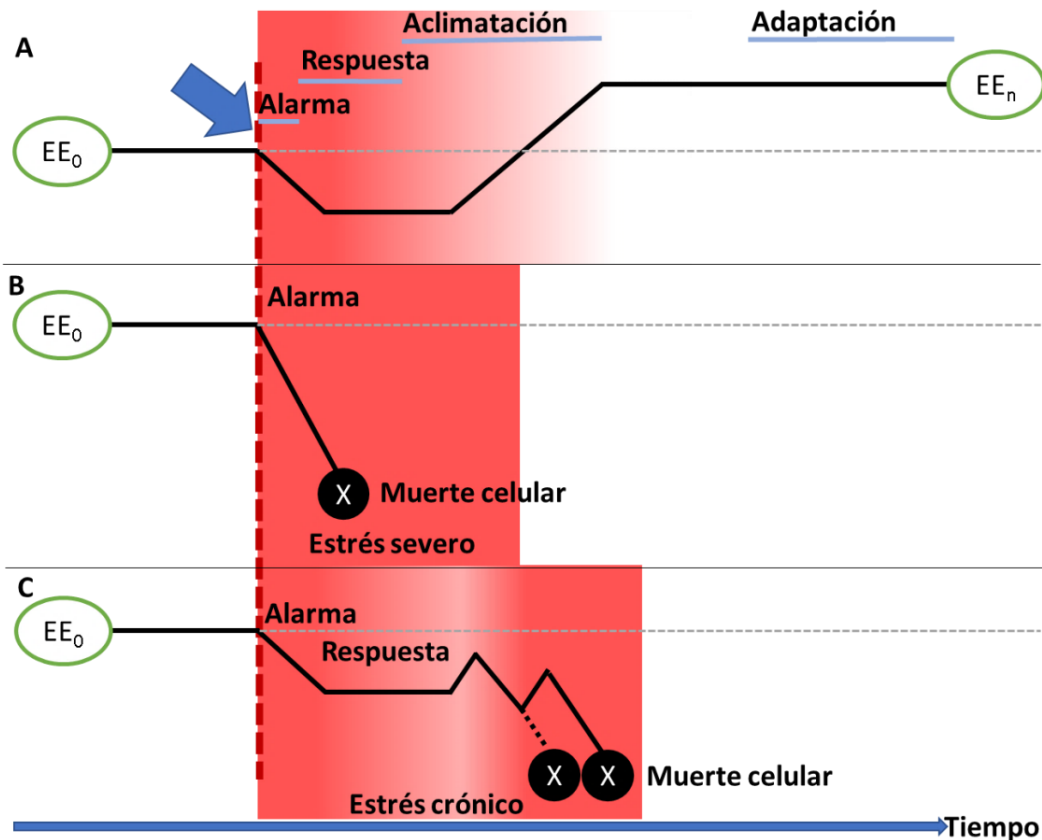


Figura 4. Representación simplificada de la respuesta a estresores en función del tiempo. **A)** Aclimatación y adaptación: Cuando un estímulo (flecha) altera el estado estable original (EE_0) de las células, inician una “respuesta al estrés” para alcanzar un nuevo estado estable (EE_n) que puede ser superior o inferior al EE_0 . **B)** Estrés severo: Si el estresor es demasiado disruptivo no se genera una respuesta a tiempo, llevando a la muerte celular. **C)** Estrés crónico: La muerte celular puede ocurrir si la respuesta de aclimatación requiere más recursos de los que están disponibles para una aclimatación completa (Modificada de Borowitzka, 2018).

En caso de una perturbación temporal, las microalgas interrumpen la homeostasis durante la perturbación y luego vuelven a su estado anterior cuando ésta desaparece. Sin embargo, en caso de perturbaciones continuas, las microalgas buscan alcanzar un nuevo estado de homeostasis mediante una respuesta adaptativa (Fig. 4A; Russek y Cabanac, 1990; Borowitzka, 2018).

Las microalgas tienen la capacidad de mantener la homeostasis a través de procesos de regulación que implican variaciones metabólicas a corto plazo, sin la necesidad de cambios en la expresión génica, lo que resulta en una reducción temporal de la fotosíntesis durante periodos cortos de tiempo que van desde segundos hasta minutos (Raven y Geider, 2003). Si el estímulo persiste y no es compensado por la respuesta o modificación metabólica, las

microalgas inician una respuesta adicional para alcanzar un nuevo estado de homeostasis conocida como aclimatación, lo que implica cambios en la composición bioquímica, demanda energética y expresión génica (Russek y Cabanac, 1990; Raven y Geider, 2003). Cuando un cultivo de microalgas se aclimata con éxito a un estímulo ambiental, puede surgir una adaptación que se mantiene a lo largo del tiempo, con cambios genéticos que adoptan el fenotipo aclimatado por mutación y selección (Borowitzka, 2018).

La regulación, aclimatación y adaptación en las microalgas tienen como objetivo maximizar la tasa fotosintética por unidad de recursos utilizada en la construcción del aparato fotosintético, maximizar la cantidad de CO₂ fijada por fotón incidente cuando se limita la fotosíntesis por luz y minimizar el daño que puede surgir por fotooxidación, radiación UV o radicales de O₂ (Raven y Geider, 2003).

El proceso de aclimatación puede tomar desde horas hasta días, y una vez que se logra el estado de homeostasis, el cultivo se considera libre de estrés. Sin embargo, si los cambios generados no pueden alcanzar un nuevo estado de homeostasis, algunas especies de microalgas cuentan con estrategias como la formación de quistes y gametos, incremento en la producción de pigmentos antioxidantes (ej. Beta-caroteno, luteína y astaxantina entre otros) e incremento en la producción de lípidos, en el caso de las flageladas (Borowitzka, 2018).

2.3 Efectos del incremento de CO₂ atmosférico

2.3.1 Cambios físicos y químicos en el océano

La integración del CO₂ antropogénico en los océanos provoca la formación de ácido carbónico, lo que ha disminuido el pH del mar de 8.2 a 8.1 desde la primera revolución industrial (Sosdian *et al.*, 2018). Este fenómeno es conocido como acidificación oceánica, junto con el cambio climático y otras alteraciones, conforman el cambio global (Abram *et al.*, 2019).

Existen diversos escenarios de emisiones de CO₂ llamados Trayectorias de Concentración Representativas (RCP) utilizados para estimar el cambio global, incluyendo el pH en la superficie del mar; uno de los más empleados por considerar acciones poco efectivas en la

mitigación de emisiones de CO₂ es el escenario RCP 8.5 planteado por el Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC). Los escenarios planteados por el IPCC consideran los intervalos de tiempo definidos como “período actual (2006-2015)” y “fin de siglo (2081-2100)” por su relevancia en la planeación de infraestructuras y vías de desarrollo resilientes al clima (IPCC, 2019). En este escenario se espera que para el año 2100 el pH alcance un valor promedio de 7.8.

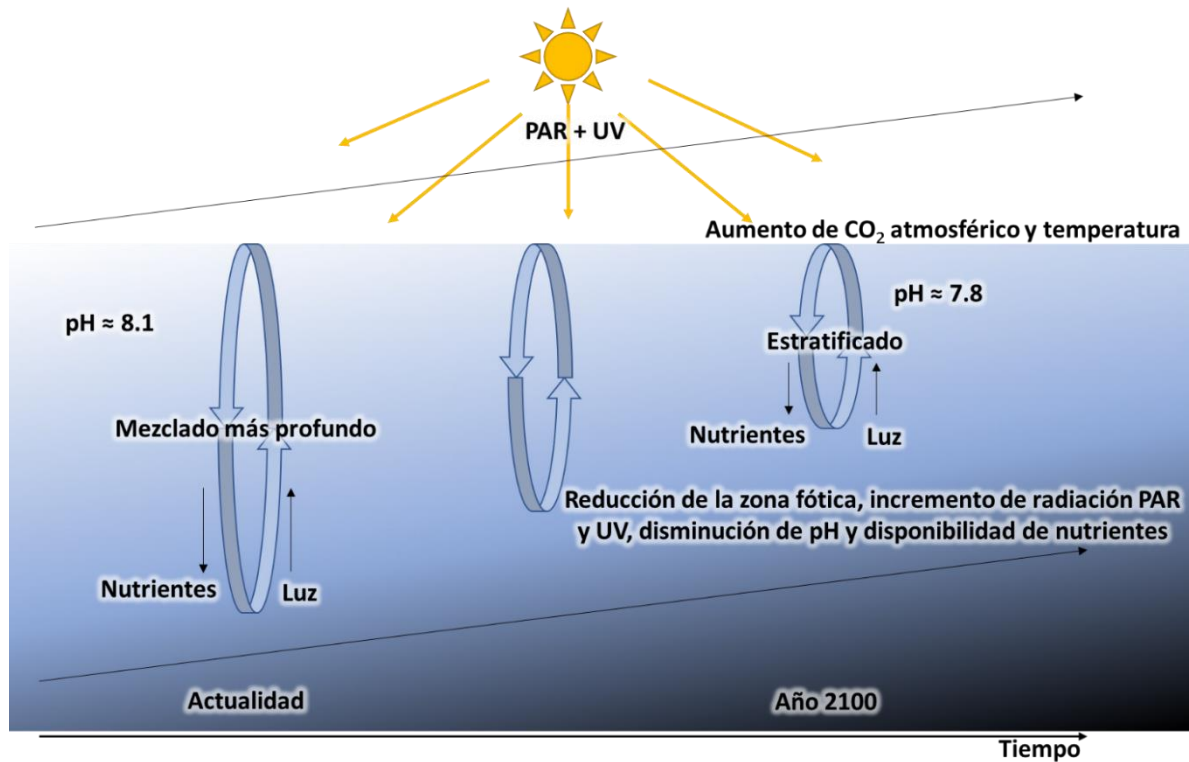


Figura 5. Efectos del incremento de CO₂ en el océano. PAR: Radiación fotosintéticamente activa (modificado de Basu and Mackey, 2018).

Los cambios de temperatura y pH en el mar prolongan los períodos de estratificación y reducen la mezcla en profundidad, como se ha documentado durante fenómenos de cambio climático como “El niño” (Zhang *et al.*, 2021b). Generando un secuestro y acumulación de fitoplancton en zonas menos profundas, lo cual genera mayor demanda de nutrientes y exposición a la irradiancia o densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) solar en la zona fótica (Li *et al.*, 2012). Con el aumento de CO₂ en la atmósfera y en el mar, dichos efectos serán cada vez más acentuados (Fig. 5), alterando las características de los ecosistemas marinos y afectando de distintas maneras a los organismos (Virta y Teittinen, 2022).

Además, el incremento del CO₂ en la atmósfera causa un calentamiento que incrementa la temperatura media de la superficie del mar y se estima un aumento de 5 °C en los primeros 200 m de profundidad para finales de siglo (Bautista-Chamizo *et al.*, 2018).

2.3.2 Efectos observados del cambio de pH en *P. tricornutum* y otras microalgas

El pH del medio ambiente tiene un efecto significativo en la disponibilidad de nutrientes, pues altera el equilibrio iónico y la solubilidad de compuestos y elementos importantes (IPCC, 2019). Entre estos nutrientes, el CO₂ de la atmósfera y el que se produce por la respiración de los organismos marinos son el origen del DIC. Este CO₂ disuelto comúnmente representa también al ácido carbónico (H₂CO₃). Sin embargo, el H₂CO₃ se puede disociar para formar distintos iones cuya concentración en el agua depende del pH (Fig. 6). Formándose así, el ion carbonato (CO₃²⁻) que se encuentra principalmente en pH alcalino y el ion bicarbonato (HCO₃⁻) que es el más abundante en los pH comunes de las aguas naturales, incluyendo el intervalo de 7.8 a 8.1 en agua marina (Eby, 2016). Las microalgas utilizan preferentemente el HCO₃⁻ como fuente de carbono (Raven y Geider, 2003).

El aumento de CO₂ conduce a una relación menor de O₂/CO₂, lo cual ha sido observado como un factor que incrementa la eficiencia fotosintética en las microalgas, debido a una mayor disponibilidad de CO₂ y a la reducción en la fotorrespiración (Masojídek *et al.*, 2021). Esta eficiencia fotosintética está estrechamente relacionada con el crecimiento, y se ha evidenciado que una baja tasa fotosintética puede inhibir el crecimiento de las microalgas (Wostrikoff y Mackinder, 2023). Sin embargo, en ciertos casos, una disminución del pH ambiental obliga a las microalgas a regular su pH intracelular, lo que conlleva un gasto energético que puede limitar su crecimiento. Este fenómeno ha sido observado en algunas especies de microalgas (Ihnken *et al.*, 2014). Por otro lado, también se ha observado un aumento en la producción de carbohidratos y otros compuestos para el almacenamiento de energía, sin un correspondiente incremento en el crecimiento (Janssen, 2016).

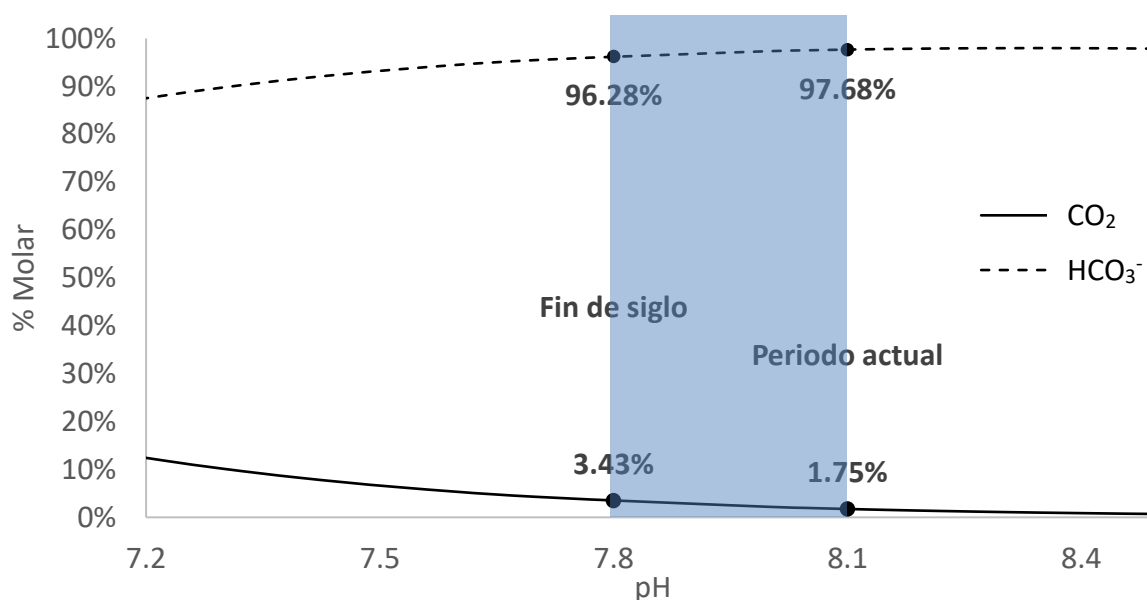


Figura 6. Cambio en la concentración de CO₂ y HCO₃⁻ con respecto al pH. Se representa el porcentaje molar (%molar) respecto a las especies iónicas de DIC. La barra azul representa el intervalo de cambio respecto al escenario RCP 8.5 (elaboración propia).

Las diatomeas requieren del nitrógeno como segundo nutriente más importante para su crecimiento, ya que se utiliza en la biosíntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos, lípidos y azúcares (Orefice *et al.*, 2019). El nitrógeno se absorbe generalmente en forma de nitrato y su solubilidad y equilibrio iónico no se ven afectados por el pH. Sin embargo, el aumento de CO₂ afecta significativamente las reacciones de transformación del nitrógeno en aguas naturales (Wannicke *et al.*, 2018).

Las diatomeas, como todas las algas, también requieren del fósforo, otro nutriente importante que se absorbe en forma de fosfato y se utiliza en la transferencia de energía, síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos (Orefice *et al.*, 2019). El equilibrio iónico del fosfato se ve fuertemente afectado por el pH, siendo el ion dihidrógeno fosfato (H₂PO₄⁻) más abundante a pH más bajo (Fig. 7; Tréguer y De La Rocha, 2013), lo que podría aumentar su disponibilidad para las diatomeas, ya que muestran una preferencia por este ion (Hendrix, 1967).

El hierro es el micronutriente esencial más importante para las algas y las diatomeas, lo requieren para el metabolismo del nitrógeno, la fotosíntesis y la síntesis del citocromo (Schoffman *et al.*, 2016). Las diatomeas consumen el hierro como ion ferroso (Fe²⁺) ya que es su forma soluble, pero el ion férrico insoluble (Fe³⁺) es dominante debido a la baja

estabilidad del Fe^{2+} , por lo que es un nutriente limitante en aguas naturales (Rana y Prajapati, 2021). El estado de oxidación del hierro se ve influenciado por el pH, aumentando su disponibilidad en pH más ácido (Fig. 8). El consumo de hierro por *P. tricornutum* no es directo y requiere un paso de acumulación en la superficie celular, siendo el estado de oxidación de los iones de hierro un factor importante en este proceso (Sutak *et al.*, 2012).

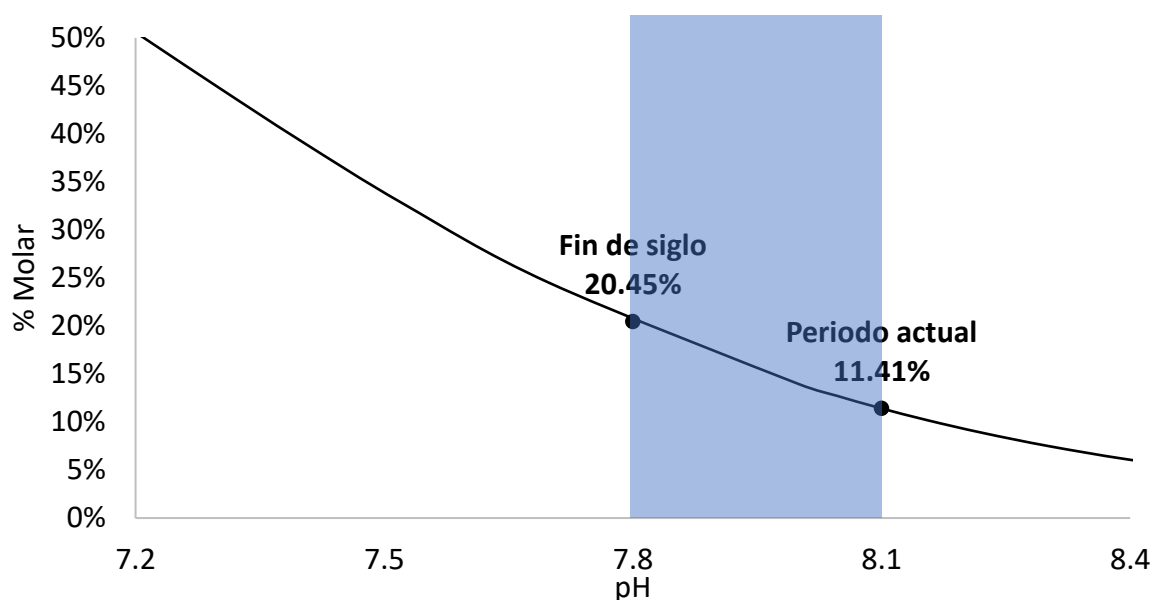


Figura 7. Cambio en la concentración de H_2PO_4^- con respecto al pH. Se representa el porcentaje molar (%molar) respecto a las especies iónicas de fosfato. La barra azul representa el intervalo de cambio respecto al escenario RCP 8.5 (elaboración propia).

En las diatomeas, el silicio es esencial para la construcción de la pared celular y está estrechamente relacionado con el ciclo celular. Se absorbe en forma de silicato y la cantidad depende de la especie de diatomea, siendo estas las principales productoras de sílice biogénica (Tréguer y De La Rocha, 2013). El equilibrio iónico del silicato no se ve significativamente afectado por el pH hasta un valor de 9 (Belton *et al.*, 2012). Sin embargo, los efectos de la acidificación sobre el consumo del silicato podrían depender de la especie de diatomea (Petrou *et al.*, 2019). Hablando específicamente de *P. tricornutum*, esta diatomea no requiere de silicato en grandes cantidades, ya que su pared celular es muy delgada (Nelson *et al.*, 1984). No obstante, se ha observado que la presencia de silicato en el medio de cultivo mejora el crecimiento y la producción de antioxidantes en esta diatomea (Zhao *et al.*, 2014). Por lo tanto, es un nutriente importante a considerar dado que se ha encontrado que el pH ácido induce estrés oxidativo en algunas microalgas (Yangüez *et al.*, 2015; Ismaiel *et al.*, 2016).

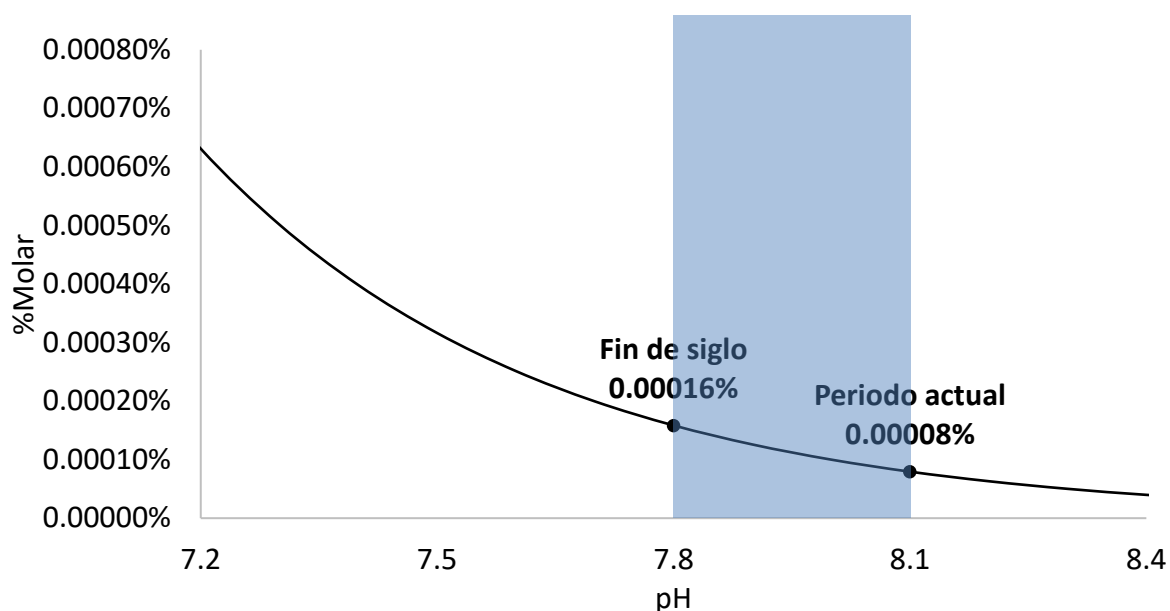


Figura 8. Cambio en la concentración de Fe^{2+} con respecto al pH. Se representa el porcentaje molar (%molar) respecto estado de oxidación del hierro. La barra azul representa el intervalo de cambio respecto al escenario RCP 8.5 (elaboración propia).

El crecimiento de *P. tricornutum* ha sido óptimo con un pH cercano a 8, logrando concentraciones de biomasa de hasta 0.5 g L^{-1} y una tasa de crecimiento (μ) de 0.5 d^{-1} cultivada en medio f/2. Estos valores fueron menores al cultivarla con pH 9, alcanzando solo 0.2 g L^{-1} en la concentración de biomasa y 0.2 d^{-1} para la μ (Song *et al.*, 2014). En otro estudio cultivaron a *P. tricornutum* en agua del Río San Pedro, ubicado en España, inicialmente utilizaron el pH natural del agua, el cuál fue 8, observando una densidad celular de $60 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ después de 2 días de cultivo, posteriormente acidificaron el agua, observando densidades celulares menores. Con pH 7.3 la densidad celular fue solo de $50 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ y con pH 6 se inhibió el crecimiento (Bautista-Chamizo *et al.*, 2018).

Los ácidos grasos son metabolitos importantes para todos los organismos, especialmente los PUFA y los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) que, en el mar, solo son producidos por las microalgas; y su importancia para todos los ecosistemas es que su adquisición por los organismos en los niveles superiores de la cadena trófica está limitada al consumo a través de la dieta, ya que no los pueden sintetizar (Sargent *et al.*, 1997). Su consumo se ha relacionado con beneficios para la salud humana y animal, incluyendo efectos hipotriglicéridémicos, hipocolesterolémicos, antitrombóticos, antiinflamatorios, reguladores de procesos inmunológicos y protectores de la función del sistema nervioso, reduciendo la neurodegeneración, entre otros (Kumari *et al.*, 2013; Valenzuela *et al.*, 2014).

Se ha observado, en *P. tricornutum*, que los ácidos grasos saturados (SFA) aumentan del 44.9% al 54.0% del total de ácidos grasos, con una disminución de pH de 8.1 a 7.9. Por otro lado, los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) disminuyen del 57.8% a 45.8% con el mismo cambio de pH. Los PUFA alcanzan su producción más alta a pH 8, representando el 1.1% del total de ácidos grasos, mientras que a pH 7.9 no pudieron ser detectados (Song *et al.*, 2014). Sin embargo, este estudio solo consideró la fase estacionaria, en la que se ha comprobado que los PUFA disminuyen considerablemente (Hamilton *et al.*, 2014). En otro estudio se evaluó el efecto del incremento del pH de 7.5 a 10 durante la fase exponencial, observando una producción mayor de ácidos grasos a pH 7.5. El porcentaje de SFA con pH 10 fue de 36.7% del total de ácidos grasos, mientras que a pH 7.5 incrementaron a 41.7%. El porcentaje de MUFA no presentó grandes variaciones, registrando un cambio de 41.1% al 41.7%, mientras que los PUFA disminuyeron su porcentaje del total de ácidos grasos de 22.2% a 16.6% (Spilling *et al.*, 2013). Demostrando que el pH del medio influye en la composición de ácidos grasos de las diatomeas.

Las funciones principales de los ácidos grasos, que pueden estar relacionadas con su aumento o disminución en las microalgas en respuesta al cambio de pH, se relacionan principalmente con la regulación del transporte celular en las membranas. Por ejemplo, el ácido oleico (18:1n-9) contribuye a mantener la fluidez de la membrana cuando está presente en los fosfolípidos (Nakamura y Nara, 2004). Además, los ácidos grasos omega-3 (n-3) de cadena larga tienen influencia en las biotransformaciones enzimáticas de eicosanoides/docosanoides, los cuales actúan como moléculas de señalización intracelular. Asimismo, están involucrados en la actividad de enzimas unidas a membranas, canales iónicos y receptores (Hashimoto *et al.*, 2018).

De esta manera, el aumento de SFA y la disminución de MUFA y/o PUFA pueden resultar en un menor flujo de iones H^+ a través de la membrana, ya sea por transporte activo o pasivo (Bienert *et al.*, 2006).

2.3.3 Métodos de regulación de pH

La regulación del pH en estudios con microalgas se logra mediante el uso de ácidos y bases o el burbujeo de gas CO_2 puro o mezclado con el aire suministrado al cultivo.

La adición de ácidos y bases como el ácido clorhídrico, hidróxido de sodio o bicarbonato de sodio modifica la alcalinidad total y altera la concentración de DIC debido al intercambio de CO₂ en la interfaz aire-agua en sistemas abiertos. Estos sistemas son ampliamente utilizados en investigaciones (Gattuso *et al.*, 2011; Mus *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2019; Uddin *et al.*, 2020).

El burbujeo de CO₂ modifica solo el DIC mientras que la alcalinidad total permanece constante. Además, este método compensa los cambios de pH relacionados con la fotosíntesis y la respiración. Existen muchos estudios que documentan el uso de estos sistemas (Goldman *et al.*, 1982; Gattuso y Lavigne, 2009; Nguyen y Rittmann, 2015; Dogaris *et al.*, 2016; Bautista-Chamizo *et al.*, 2018; Galès *et al.*, 2020).

2.4 Biología de sistemas para el análisis de efecto del pH en diatomeas

La biología de sistemas es un campo interdisciplinario que utiliza enfoques computacionales y matemáticos para comprender sistemas biológicos complejos a diferentes escalas y analizar las interacciones entre sus componentes, como genes, proteínas y otras moléculas, y cómo estas interacciones conducen a procesos biológicos específicos (Tavassoly *et al.*, 2018).

Este enfoque tiene diversas aplicaciones en distintos campos de la biología. En el campo de la medicina los investigadores utilizan la biología de sistemas para identificar posibles objetivos farmacológicos y optimizar la eficacia de los medicamentos mediante el análisis de las interacciones moleculares y las vías de señalización (Yue y Dutta, 2022). Además, es posible crear tratamientos individualizados para los pacientes en función de su genotipo y estado de enfermedad (Dhillon *et al.*, 2020). En biotecnología se han diseñado y optimizado procesos industriales para producir biocombustibles, bioplásticos y otros productos en muchos tipos de organismos (Martins-Santana *et al.*, 2018).

La biología de sistemas ambientales ha sido empleada para comprender el impacto de los factores ambientales en los sistemas biológicos y para desarrollar estrategias para la remediación ambiental (Hazen, 2019). En microalgas, la biología de sistemas tiene como

objetivo estudiar las interacciones y relaciones entre el sistema de microalgas, incluidos genes, proteínas, metabolitos y factores ambientales.

2.4.1 Investigación en biología de sistemas con conjuntos de datos experimentales

En el campo de la investigación de microalgas, se han llevado a cabo numerosos estudios utilizando enfoques -ómicos, aunque solo unos pocos han aplicado métodos de biología de sistemas o multiómicos. Con el fin de comparar cuatro de estos estudios (Smallwood *et al.*, 2018; Dorrell *et al.*, 2019; Panahi *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021a), se organizaron las condiciones de cultivo y los factores de estrés evaluados (Tabla 3).

Se observó que, cuando no se considera la fase de cosecha como variable, los investigadores prefieren cosechar durante la fase de crecimiento logarítmico o durante la fase exponencial tardía, que es la fase donde se puede obtener la máxima productividad de una microalga. Además, se han estudiado múltiples especies y grupos de microalgas, sin enfocarse en una especie en específico. No obstante, se seleccionan especies con características metabólicas interesantes para aplicaciones industriales o como organismos modelo. Para cumplir con los requisitos específicos de cada especie se ajustan factores como el medio de crecimiento, la irradiancia (PPFD), el fotoperiodo y la agitación. En cuanto al enfoque más utilizado, destaca la transcriptómica, la cual permite identificar ácido ribonucleico (RNA) codificante y no codificante, modificaciones postranscripcionales y mutaciones, según describe Morozova *et al.* (2009).

Los principales descubrimientos de cada uno de estos estudios se resumen a continuación:

2.4.1.1 Caso 1

Se evaluaron los mecanismos de almacenamiento de carbono y transformación de energía de la microalga *Ostreococcus tauri* en respuesta a diferentes proporciones de carbono, suministrado como carbonato, y nitrógeno mediante bioimagen, proteómica y lipidómica. Los resultados indican que la microalga regula su metabolismo de carbono y nitrógeno en función de la relación C:N disponible, lo que afecta la biogénesis lipídica. El análisis lipidómico confirmó la presencia de triglicéridos (TAG) de cadena larga, ideales para la

producción de biocombustibles. La sobreexpresión de las vías de síntesis de carbohidratos no se vio afectada por la relación C:N. Además, se identificaron nuevas proteínas, incluida una proteína quinasa involucrada en la fosforilación del aminoácido serina/treonina, que podría regular el ciclo diurno o la respuesta al estrés. La sintetasa de almidón unida a gránulos (GBSSI) fue la tercera proteína más sobreexpresada en todas las condiciones, especialmente en las condiciones enriquecidas con carbonato y déficit de nitrógeno. El *knock-down* de GBSSI podría favorecer una mayor acumulación de lípidos bajo suministro continuo de carbono en forma de carbonato. Finalmente, se identificaron varias proteínas con funciones e identidades desconocidas que podrían ser objetivos potenciales para comprender su papel fundamental en esta microalga (Smallwood *et al.*, 2018).

2.4.1.2 Caso 2

Se caracterizó el genoma plastidial y el transcriptoma del dinoflagelado peridinino *Amphidinium carterae* utilizando técnicas de secuenciación masiva de RNA (RNA-seq) y de ácido desoxirribonucleico (DNA). Este organismo tiene un plastidio derivado de algas rojas con un genoma multipartita compuesto por minicírculos. Durante el estudio, se identificó un nuevo minicírculo y se perfilaron transcripciones que abarcaban regiones no codificantes de dos minicírculos, lo que proporcionó una visión más completa del genoma plastidial de *A. carterae*. Además, se comparó su expresión génica plastidial con la de otros dinoflagelados, demostrando que *A. carterae* presenta un mayor nivel de expresión génica de plastidios y un nivel más bajo de expresión génica de plastidios codificados nuclearmente. Estos hallazgos proporcionan nuevos conocimientos sobre la evolución y regulación del plastidio peridiniano y sus implicaciones en la biología y ecología de *A. carterae* (Dorrell *et al.*, 2019).

2.4.1.3 Caso 3

Para identificar los módulos funcionales y los centros reguladores involucrados en la acumulación de metabolitos secundarios después de la transición del crecimiento autótrofo al heterótrofo, se realizó un análisis de RNA-seq y metabolitos en *Auxenochlorella protothecoides* durante tres fases de crecimiento: logarítmica, transición y pico de producción. Utilizaron el análisis ponderado de redes de co-expresión génica (WGCNA) para identificar 12 módulos significativos con patrones de co-expresión y características de

conectividad en diferentes condiciones. También identificaron factores de transcripción (TF) clave y genes metabólicos que actúan como centros reguladores en cada módulo. Estos resultados proporcionan información detallada sobre los mecanismos moleculares y las vías metabólicas utilizadas por las microalgas en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Panahi *et al.*, 2020).

2.4.1.4 Caso 4

Se investigaron los efectos de la acidificación de los océanos en la diatomea *Skeletonema marinoi*, una de las especies del fitoplancton más exitosas respecto a su abundancia en zonas costeras templadas, (Smallwood *et al.*, 2018; Dorrell *et al.*, 2019; Panahi *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021a) utilizando análisis integrados de RNA-seq y proteómica en muestras expuestas a dos niveles diferentes de presión parcial de CO₂ (pCO₂ ; 400 y 1000 ppm). Los resultados revelaron que *S. marinoi* asignó más recursos al metabolismo energético mitocondrial y los mecanismos de defensa, mejorando así la síntesis de proteínas y la resistencia al estrés oxidativo bajo alto CO₂. También encontraron que la acidificación del océano reduce la fotosíntesis y el crecimiento en *S. marinoi*, lo que resulta en una pérdida de sus ventajas competitivas (Zhang *et al.*, 2021a).

Tabla 3. Condiciones de cultivo en estudios de biología de sistemas en microalgas.

Referencia	Especie	Grupo	Fase de cosecha	Medio	Temp. (°C)	pH	PPFD ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Fotoperiodo (h:h)	Agitación	Análisis ómicos	Nutrientes	Régimen trófico
Estudios realizados únicamente con datos experimentales												
Smallwood et al., 2018	Ot	CH	LG	KI	25	-	20	12:12	C/24	P+L	N↓+C↑	Ph
Dorrell et al., 2019	Ac	DF	LG	f/2	20	8	30	12:12	-	G+T	-	Ph
Panahi et al., 2020	Ap	CH	LG+TR+PR	BS+BM	20	-	60	24:0	-	T	-	Ph+Ht
Zhang et al., 2021	Sm	CD	LG	f/2	20	7.8-8.1	80	12:12	Burbujeo	T+P	CO ₂ ↑	Ph
Metaanálisis de datos públicos y experimentales												
Levering et al., 2017	Pt	PD	LG	-	17	7.7-8.2	0-125	14:10	-	D+R+L	N+B ₁₂ +Fe	Ph
Maes et al., 2018	Cr	CH	-	-	-	-	-	-	-	P	-	Ph
Zaffagnini et al., 2012	Cr	CH	LG	TAP	25	-	100	24:0	120 rpm	P	-	Ph
Morisse et al., 2014	Cr	CH	LG	TAP	25	-	100	24:0	120 rpm	P	-	Ph
Pérez-Pérez et al., 2017	Cr	CH	LG	TAP	25	-	80	24:0	120 rpm	P	-	Ph
Ait-Mohamed et al., 2020	Pt	PD	-	-	-	-	-	-	-	R	-	Ph
Cruz de Carvalho et al., 2016	Pt	PD	LG	f/2	20	-	100	12:12	100 rpm	R	P↓	Ph
Smith et al., 2016	Pt	PD	Multi	Aq	18	-	320	12:12	Burbujeo	R	Fe↓	Ph
McCarthy et al., 2017	Pt	PD	LG	f/2	19	-	150	14:10	Burbujeo	R+L	NRKO	Ph
Cordoba et al., 2021	Eg	EU	LG	TMP	25	7	0-50-200	24:0	100 rpm	R	-	Ph+Ht+Mx
O'Neill et al., 2015	Eg	EU	-	EG+JM	21-30	-	Ambiental	Ambiental	0-200 rpm	R	-	Ph+Ht
Yoshida et al., 2016	Eg	EU	ST	KH	26	-	100	24:0	120 rpm	R	-	Mx+Fr
Ebenezer et al., 2019	Eg	EU	LG+ST	KH	Ambiental	-	0-35	24:0	-	D+R+P	-	Ht+Mx

Notas: Especie: Ot - *Ostreococcus tauri*; Ac - *Amphidinium carterae*; Ap - *Auxenochlorella protothecoides*; Sm - *Skeletonema marinoi*; Cr - *Chlamydomonas reinhardtii*; Pt - *Phaeodactylum tricornutum*; Eg - *Euglena gracilis*. Grupo: CH – Chlorophyta; DF – Dinoflagellata; CD – Diatomea céntrica; PD – Diatomea penada; EU - Euglenoide. Fase de cosecha: LG – Logarítmica; TR – Transición; PR – Pico de productividad; ST – Estacionaria; Multi – Múltiples fases. Medio: KI – Keller; f/2 – f/2 de Guillard; BS – Sales de Bristol; BM – Medio Basal; TAP – Tris-Acetato-Fosfato; Aq – Aquil; TMP – Tris-Minimum-Fosfato; EG – Medio para E, gracilis; JM – Jaworski; KH – Koren-Hutner. Agitación: C/24 – cada 24 horas. Análisis ómicos: G – Genómica; T – Transcriptómica; P – Proteómica; L – Lipidómica. Nutrientes: N – Fuente de nitrógeno; C – Fuente de carbono distinta a CO₂; B₁₂ – Fuente de vitamina B12; Fe – Fuente de hierro; P – Fuente de fósforo; NRKO – Mutante Nitrato reductasa knock-out; flecha abajo indica déficit y flecha arriba adición. Régimen trófico: Ph – Fototrófico; Ht – Heterotrófico; Mx – Mixotrófico; Fr - Fermentación. Guiones son datos no mencionados en la referencia.

2.4.2 Metanálisis utilizando conjuntos de datos públicos

Utilizando el enfoque de biología de sistemas, se han realizado metaanálisis de datos de varios estudios independientes disponibles públicamente para proporcionar una estimación general del impacto de las variables basada en varios estudios comparables (Esterhuizen y Thabane, 2016).

Este método ha sido utilizado para mejorar la visualización de datos y detectar los efectos de la privación de nutrientes, cambios en la PPFD y regímenes tróficos en las microalgas (Tabla 3). Un estudio en particular se centró en el efecto del CO₂ sobre *P. tricornutum*, generando una red metabólica que permite evaluar el efecto de las alteraciones ambientales sobre el metabolismo. Para entender de mejor manera las aportaciones de esta metodología se presentan cuatro casos y sus principales resultados:

2.4.2.1 Caso 1. Redes metabólicas de *P. tricornutum*

Para comprender cómo responde *P. tricornutum* a los cambios ambientales, como el aumento de los niveles atmosféricos de CO₂, y cómo están interconectados los mecanismos metabólicos y reguladores, se ha implementado una red reguladora transcripcional (TRN) a partir de datos de RNA-seq (Levering *et al.*, 2017). Esta estrategia integra la TRN con un modelo metabólico a escala genómica, previamente desarrollado para *P. tricornutum* (Levering *et al.*, 2016), que permite analizar y predecir las relaciones genotipo-fenotipo. El conjunto de datos de RNA-seq integró las condiciones ambientales como diferentes niveles de pCO₂, hierro o nitrógeno. Los resultados permitieron identificar los genes coexpresados en subconjuntos de condiciones ambientales en *biclusters* y posibles TF como reguladores. La TRN se validó y complementó con un análisis diferencial de expresión y conectividad basado en los metabolitos compartidos entre los *biclusters*.

En total, la TRN global inferida consistió en 121 *biclusters* con un promedio de 20 genes por clúster y diez TF potenciales. La TRN y el modelo metabólico mostraron una fuerte correlación en esta diatomea. Este modelo metabólico permitió identificar reacciones con diferentes patrones de flujo y expresión diferencial en varios subsistemas metabólicos, como pigmentos, nucleótidos, aminoácidos y metabolismo de lípidos.

2.4.2.2 Caso 2. MinOmics, una plataforma para visualizar e integrar datos

MinOmics es una herramienta novedosa que integra la visualización y el análisis de datos multiómicos en un entorno de realidad virtual inmersiva. Sus desarrolladores utilizaron MinOmics para analizar conjuntamente los datos de tres estudios previos sobre modificaciones postraduccionales (PTM) redox en *Chlamydomonas reinhardtii* (Maes *et al.*, 2018), que incluyen glutationilación (Zaffagnini *et al.*, 2012), nitrosilación (Morisse *et al.*, 2014) y enlaces disulfuro reducidos por tiorredoxinas (Pérez-Pérez *et al.*, 2017).

En el estudio de Zaffagnini *et al.* (2012), se identificaron 225 proteínas glutationiladas mediante espectrometría de masas, sugiriendo que la glutationilación de proteínas es un mecanismo generalizado de regulación redox y señalización en condiciones de estrés oxidativo.

En la investigación de Morisse *et al.* (2014), se caracterizó la regulación redox dependiente de tiorredoxina de la fosfoglicerato quinasa cloroplástica, una enzima implicada en el ciclo de Calvin-Benson. Por su parte, Pérez-Pérez *et al.* (2017) realizaron una identificación a gran escala de sitios de unión de tiorredoxina utilizando un enfoque de biotilación específico de tiol, revelando 1188 proteínas potenciales reguladas por tiorredoxina involucradas en diversas vías metabólicas y procesos celulares.

El uso de MinOmics permite explorar datos de *Chlamydomonas reinhardtii* de forma interactiva e intuitiva. Maes *et al.* (2018) descubrieron que existe superposición entre las proteínas de las diferentes PTMs. Sin embargo, para cada PTM de *Chlamydomonas reinhardtii* se observó que hasta un 68.8% de las proteínas fueron reguladas por un solo tipo de PTM en cada caso. Lo que indica que los diferentes PTMs redox son específicos de diferentes subconjuntos de proteomas.

La herramienta MinOmics permite mejorar el análisis de los resultados de los estudios originales mediante la visualización de múltiples capas de información simultáneamente, como sitios PTM, anotaciones funcionales, localización subcelular, interacciones proteína-proteína y vías metabólicas. Además, su uso provee beneficios que incluyen la navegación

espacial y la visión estereoscópica, que mejoran su percepción y cognición de conjuntos de datos complejos.

2.4.2.3 Caso 3. PhaeoNet, un retrato holístico basado en RNA-seq

El sistema PhaeoNet es un recurso público que se desarrolló empleando datos de tres estudios independientes para construir una red de co-expresión de genes involucrados en diversas vías metabólicas y respuestas ambientales en *P. tricornutum*. Este estudio incluyó un análisis de correlación de redes ponderadas para identificar módulos de genes co-expresados y sus características asociadas. Además, realizaron análisis de expresión diferencial para comparar las respuestas de diferentes módulos a diversas condiciones experimentales (Ait-Mohamed *et al.*, 2020).

El estudio empleó datos de RNA-seq de cultivos de *P. tricornutum* expuestos a fluctuaciones de fosfato (Cruz de Carvalho *et al.*, 2016), fotoperiodo combinado con limitación de hierro (Smith *et al.*, 2016) y silenciamiento de nitrato reductasa (McCarthy *et al.*, 2017).

El estudio de Cruz de Carvalho *et al.* (2016) describió cómo el agotamiento de fosfato desencadena una respuesta transcripcional compleja que involucra transportadores de fosfato, fosfatasas, TF y RNA no codificantes. Smith *et al.* (2016) revelaron, con su experimento, como el fotoperiodo bajo limitación de hierro reduce la μ , disminuye la adquisición de energía y aumenta la adquisición de hierro, lo que protege la función metabólica central. La investigación de McCarthy *et al.* (2017) demostró que la falta de nitrato reductasa afecta el transporte y la asimilación de nitratos, el flujo de carbono y la biosíntesis de lípidos.

2.4.2.4 Caso 4. Meta-ensamblaje *de Novo* de transcriptomas

Euglena gracilis es un alga verde que se distingue por su flexibilidad metabólica, reflejada en su capacidad para prosperar en una variedad de entornos hostiles. Utilizando diferentes estrategias y herramientas se realizó un meta-ensamblaje de nuevos datos de RNA-seq y datos públicos (O'Neill *et al.*, 2015; Yoshida *et al.*, 2016; Ebenezer *et al.*, 2019). El análisis permitió validar los transcritos resultantes mediante anotación funcional, análisis de expresión, comparación con otros dos transcriptomas disponibles públicamente y análisis

taxonómicos. El meta-ensamblaje contenía 91,040 secuencias que codifican 49,922 proteínas, conformando el catálogo de genes más completo para esta especie. El estudio también reveló nuevas perspectivas sobre la diversidad metabólica y la historia evolutiva de *E. gracilis* (Cordoba *et al.*, 2021).

En el estudio de O'Neill *et al.* (2015) presentaron una secuenciación y análisis de transcriptoma *de novo* de *E. gracilis*, revelando aspectos de su metabolismo de carbohidratos, lípidos, aminoácidos y vitaminas. El estudio también identificó varios genes involucrados en la biosíntesis de productos naturales, como poliquetidos. El meta-ensamblaje amplió los resultados sobre el metabolismo de carbohidratos al identificar más genes relacionados con la síntesis de paramilon en una amplia gama de condiciones de cultivo simultáneamente (Cordoba *et al.*, 2021).

Yoshida *et al.* (2016) realizaron un análisis comparativo de transcriptoma de *E. gracilis* bajo condiciones anaeróbicas para elucidar los mecanismos moleculares que le permiten acumular paramilon y ésteres de cera. El estudio encontró que los eventos de splicing alternativo regulan las vías metabólicas de paramilon y ésteres de cera a nivel postranscripcional. El meta-ensamblaje identificó algunos grupos significativos de genes que cubren parte de la falta de datos en el metabolismo de paramilon y ésteres de cera (Cordoba *et al.*, 2021).

Ebenezer *et al.* (2019) reportan, en su estudio, un transcriptoma detallado y un genoma parcial de *E. gracilis*, con más de 36,000 proteínas codificadas por menos del 1% del genoma. Los autores también identificaron vías metabólicas relacionadas con varias líneas de fotosíntesis. El meta-ensamblaje confirmó algunos de estos hallazgos sobre vías metabólicas.

2.4.3 Herramientas para el análisis de datos en Microalgas

Con el aumento en la importancia de los análisis -ómicos, se han generado diversas herramientas bioinformáticas gratuitas on-line que pueden facilitar el análisis de este tipo de datos. Un ejemplo es el script utilizado en el estudio de Levering *et al.* (2016), con el cual realizaron sus simulaciones del crecimiento de *P. tricornutum* en diferentes combinaciones de condiciones, entre las que incluyeron cambios en el pH. Este script puede ser utilizado

libremente en el programa *RStudio*, sin embargo, requiere de conocimientos en lenguaje de programación ya que no cuenta con una interfaz gráfica que lo haga más amigable para el usuario.

iDEP (análisis integrado de expresión diferencial y análisis de vías) es una herramienta web para analizar datos de RNA-seq, disponible en <http://ge-lab.org/idep/> (Ge *et al.*, 2018). Gracias a su interfaz gráfica es fácil de usar. Integra muchos paquetes ampliamente utilizados de R/Bioconductor para analizar datos de expresión de genes. Realiza análisis exploratorio de datos, análisis de expresión diferencial, análisis de vías, biclustering, análisis de redes de coexpresión e identifica términos enriquecidos de ontología génica (Fig. 9). Esta herramienta puede identificar genes de las microalgas *P. tricornutum*, *Thalassiosira pseudonana* y *Pseudo-nitzschia multistriata*. Entre sus paquetes, iDEP incluye el algoritmo *DESeq2*, diseñado específicamente para el análisis de datos de RNA-seq, que aborda las características únicas de estos datos, como la sobredispersión y la variabilidad dependiente de la media. También incorpora la transformación logarítmica regularizada (*rlog*), un método utilizado en el análisis de datos de RNA-seq para normalizar y estabilizar los datos de expresión génica (Love *et al.*, 2014).

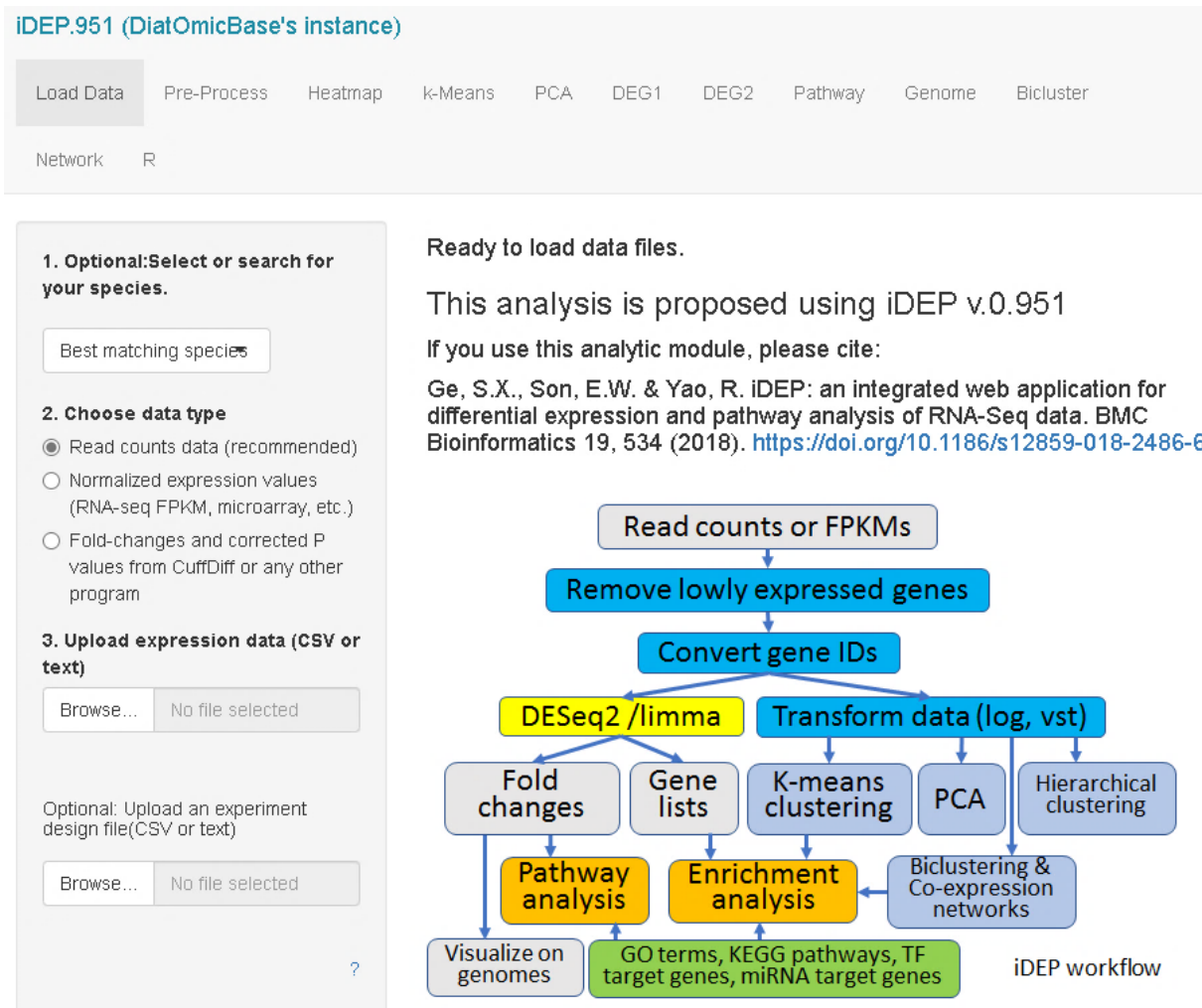


Figura 9. Flujo de trabajo de iDEP v.0.951

ClueGO es un complemento de *Cytoscape* que visualiza los términos biológicos no redundantes para grandes grupos de genes en una red agrupada funcionalmente (Bindea *et al.*, 2009). Los identificadores se pueden cargar desde un archivo de texto o interactuando desde una red de *Cytoscape*. El tipo de identificadores admitidos se puede ampliar fácilmente por el usuario. *ClueGO* realiza análisis de un solo grupo y comparación de varios grupos, utilizando listas de genes.

De las fuentes de ontología utilizadas, los términos se seleccionan mediante diferentes criterios de filtro. Los términos relacionados que comparten genes asociados similares se pueden fusionar para reducir la redundancia. La red *ClueGO* se crea con estadísticas kappa y refleja las relaciones entre los términos basadas en la similitud de sus genes asociados. Las gráficas de *ClueGO* subyacen la especificidad y los aspectos comunes del papel biológico. La significancia de los términos y grupos se calcula automáticamente. *ClueGO* es fácilmente

actualizable con los archivos más recientes de Gene Ontology, KEGG, WikiPathways y Reactome.

Como se mencionó anteriormente, existen beneficios de integrar lotes de datos genómicos para aumentar el poder estadístico de los análisis. Sin embargo, a menudo se ve obstaculizado por el “efecto de lote” o variaciones no deseadas en los datos causadas por diferencias en factores técnicos entre lotes. Para reducir este tipo de efectos existe las herramientas *Combat* y *Combat_seq*, que procesan los datos genómicos y transcriptómicos, respectivamente. Estas herramientas se incluyen en el paquete *SVA* (Análisis de Variables Sustitutas) para RStudio (Zhang *et al.*, 2020).

3. JUSTIFICACIÓN

La acidificación de los océanos debido al aumento del CO₂ atmosférico es un problema global que puede tener consecuencias graves en las comunidades de microalgas, afectando especialmente a las diatomeas, las cuales son importantes productores primarios en los ecosistemas acuáticos y constituyen aproximadamente la mitad del fitoplancton en el mar. Por esta razón, es importante estudiar cómo la disminución del pH afecta el metabolismo de las diatomeas.

En este sentido, el estudio del efecto de la disminución de pH sobre el metabolismo de *P. tricornutum*, permitirá inferir sobre algunos de los efectos potenciales del incremento de CO₂ atmosférico en las comunidades de microalgas (Bautista-Chamizo *et al.*, 2018, 2019). Además, permitirá determinar la factibilidad de utilizar cambios en el pH como condiciones estresantes para la producción de compuestos de interés comercial en estas diatomeas, así como su aplicación para el suministro de alimento vivo de alto valor nutricional en acuicultura (Khan *et al.*, 2018). Para tal fin, es necesario diseñar un sistema de regulación de pH en los sistemas de cultivo de la especie en estudio.

Aunque ya se han realizado investigaciones sobre el efecto del cambio de pH en *P. tricornutum* y otras diatomeas, el efecto sobre la disponibilidad de los nutrientes en el medio de cultivo (variable de gran importancia en medios naturales) y su consumo por *P. tricornutum* en relación con su contenido lipídico (metabolitos relacionados con respuestas a estrés) y la expresión diferencial de genes no se ha descrito aún en el intervalo de pH de 7.8 (1000 ppm CO₂) a 8.1 (400 ppm CO₂).

La biología de sistemas es un enfoque valioso para comprender la interacción entre las microalgas y su entorno, y cómo esto afecta su metabolismo, lo que podría tener aplicaciones importantes. Actualmente existe un estudio muy completo que describe los efectos del aumento de CO₂ en *P. tricornutum* utilizando biología de sistemas. Sin embargo, en este trabajo utilizaron valores muy extremos en los niveles de CO₂ (de 100 a 5000 ppm CO₂) para interpolar sus resultados mediante una simulación (Levering *et al.*, 2017). Además, en su modelo, incluyen variables de estudios independientes que no consideran al CO₂ o al pH como variables, lo que podría agregar sesgos o ruido a su modelo.

En resumen, el estudio de los efectos de la disminución del pH en el metabolismo de *P. tricornutum* puede proporcionar información valiosa sobre los efectos de la acidificación oceánica en las comunidades de microalgas, así como para la producción de compuestos de interés comercial y su uso como alimento vivo de alto valor nutritivo para la acuicultura.

4. HIPÓTESIS

Si se disminuye el pH en cultivos de *P. tricornutum*, estas microalgas reducirán su crecimiento, fotosíntesis, la producción de PUFA y el consumo de nitratos, no habrá cambios en el porcentaje de MUFA o serán muy leves y el porcentaje de SFA incrementará al igual que el consumo de fosfatos y hierro como parte de su proceso de aclimatación. Además, se identificarán cambios en su expresión génica relacionados con dichas respuestas.

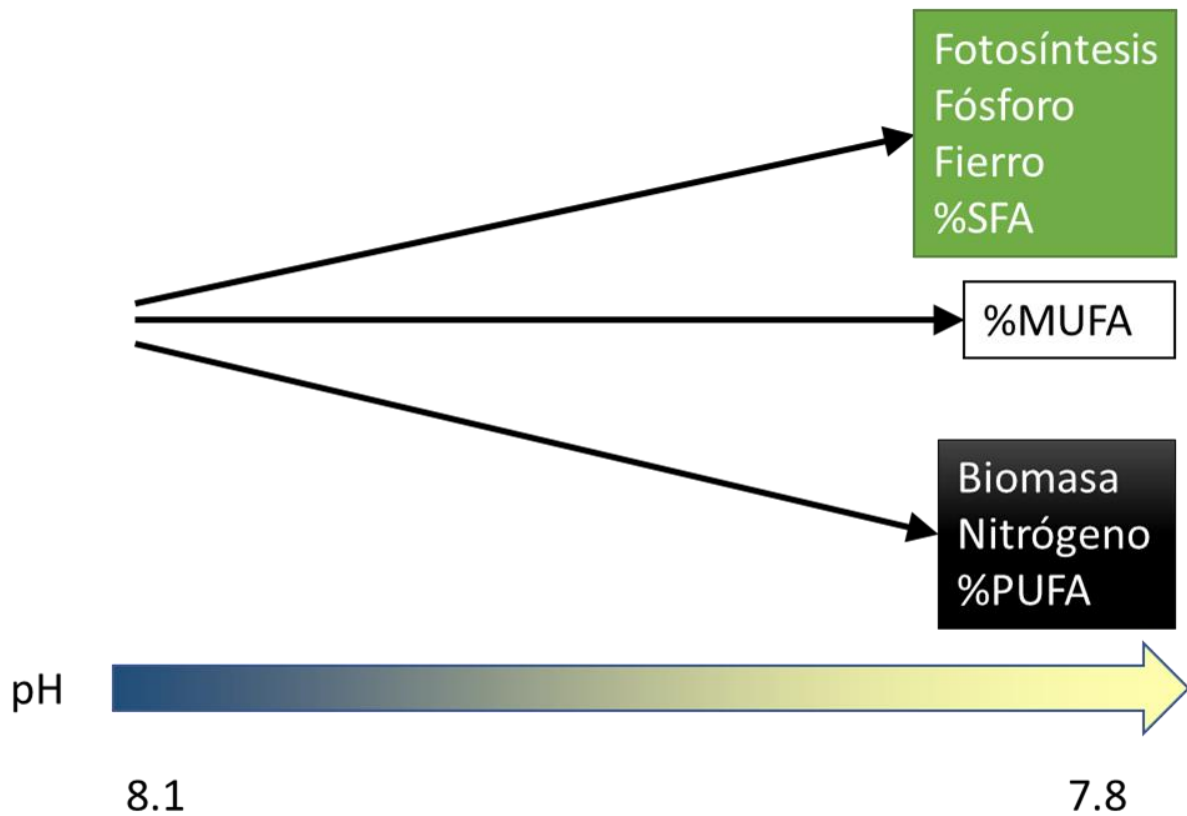


Figura 10. Representación gráfica de efectos esperados en respuesta a la acidificación.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la respuesta fisiológica sobre el crecimiento, tasa fotosintética, tasas de consumo de los nutrientes y producción ácidos grasos de *P. tricornutum* ante cambios de pH que permitan estructurar un modelo de respuesta metabólica.

5.2 Objetivos particulares

- 1.- Diseñar un equipo para la regulación automática del pH mediante el suministro de CO₂.
- 2.- Analizar la tasa de crecimiento, la tasa fotosintética y el consumo de nutrientes en diferentes condiciones de pH (7.8 y 8.1) de *P. tricornutum*.
- 3.- Caracterizar los perfiles de ácidos grasos de *P. tricornutum* en las diferentes condiciones de pH.
- 4.- Analizar la expresión diferencial de genes de *P. tricornutum* utilizando bases de datos públicas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Inóculos

6.1.1 Cepa y medio de cultivo

La cepa empleada pertenece al taxón *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, 1897, resguardada en el cepario de microalgas del CIBNOR con la clave CIB 41 y fue proporcionada por el técnico del cepario. El medio de cultivo empleado fue: f/2 de Guillard (Guillard, 1975; Anexo A).

6.1.2 Preparación y mantenimiento de inóculos

P. tricornutum fue cultivada con un sistema estático en matraces de vidrio de 1 L con 500 mL de medio f/2 esterilizado en autoclave. Se utilizaron 50 mL de inóculo con una densidad celular de 2×10^6 cel mL⁻¹, para alcanzar una densidad inicial de 2×10^5 cel mL⁻¹. Se mantuvo una temperatura constante de 22°C. Se aplicó una iluminación con una densidad de flujo de fotones fotosintética o irradiancia (PPFD) promedio de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mediante lámparas fluorescentes de luz blanca y con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 de oscuridad (12:12). Cada cuatro días se realizó una resiembra de los inóculos para mantenerlos en fase exponencial trabajando en la atmósfera estéril de una campana de flujo laminar (Virgen-Félix y Lora-Vilchis, 2017).

6.2 Regulación de pH

6.2.1 Planeación y diseño del sistema de regulación de pH

El sistema de regulación de pH, también llamado pH-stat, se diseñó en colaboración con el laboratorio de electrónica del CIBNOR (Fig. 11) tomando como modelo el pH-stat utilizado por Goldman *et al.* (1982).

Se analizaron y establecieron los requisitos técnicos del pH-stat, incluyendo el intervalo de variación de pH, resolución y precisión. Después, se seleccionaron los componentes electrónicos necesarios para el diseño, teniendo en cuenta el costo, la disponibilidad y la calidad (Anexo B).

Posteriormente, se implementó el diseño utilizando la tecnología de código abierto de Arduino. El firmware necesario para el control y la lectura del pH-stat fue programado y provisto por el técnico del laboratorio de electrónica, teniendo en cuenta los requisitos identificados previamente. Se realizaron pruebas para verificar el correcto funcionamiento del dispositivo y se realizaron ajustes necesarios en el firmware para optimizar su desempeño.

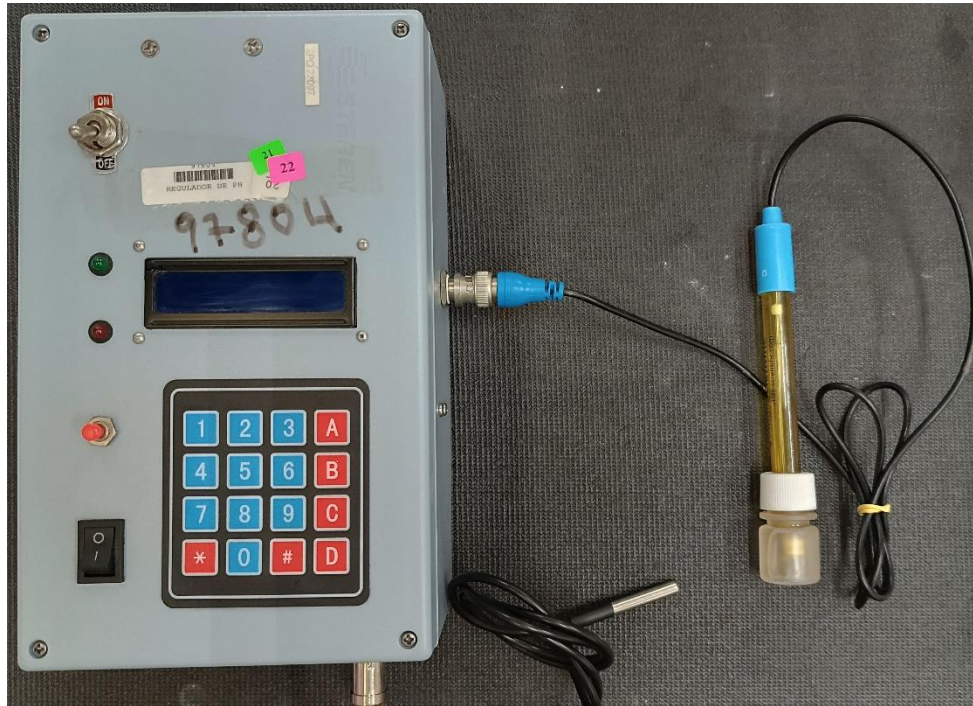


Figura 11. Fotografía del pH-stat. El diseño actual se ha actualizado para agregar funciones, en la sección de resultados se describe el diseño utilizado durante la experimentación.

6.2.2 Evaluación del desempeño del pH-stat

Se seleccionaron los puntos de regulación de pH 7.8 ± 0.1 y 8.1 ± 0.1 emulando el cambio global de pH en la superficie del mar estimado en el escenario RCP 8.5 de emisiones de CO₂ planteado por el IPCC para los intervalos de “período actual (2006-2015)” y el de “fin de siglo (2081-2100)” (IPCC, 2019; Abram *et al.*, 2019).

P. tricornutum se sometió a esos puntos de regulación durante su cultivo, para lo cual se colocaron 900 mL de medio f/2 recién inoculado (densidad celular de 2×10^5 cel mL⁻¹) y pH ajustado al punto de regulación correspondiente en biorreactores transparentes de PET de 1 L. La temperatura se reguló a 22 °C introduciendo los biorreactores en un baño María en contenedores de vidrio transparente con agua corriente desinfectada con hipoclorito de

sodio. La temperatura del laboratorio se mantuvo en 22 °C por medio de un sistema de aire acondicionado tipo minisplit y se colocaron calentadores Ebbo Jagger para regular la temperatura de los contenedores y por lo tanto en los biorreactores.

Se colocaron tres contenedores de vidrio, cada uno con cinco biorreactores (Fig. 12F) y se les suministró iluminación de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con fotoperiodo 12:12. La aireación fue por burbujeo a un flujo de 1 L min^{-1} . El CO_2 que se suministró a los cultivos se mezclaba previamente con el aire (Fig. 12E) y era dosificado con una electroválvula normalmente cerrada (Fig. 12C) que permitía su salida a 29 psi de presión cada vez que el pH-stat detectaba el aumento de pH. El pH-stat detectó y registró el pH en tiempo real por medio de un sensor de pH de grado científico de Ag/AgCl que se introdujo en la parte superior de uno de los biorreactores seleccionado al azar. La señal de apertura para la electroválvula fue enviada por el pH-stat cada vez que detectaba un cambio de 0.1 por arriba del punto de regulación y el tiempo de apertura de la válvula se estableció de manera que el CO_2 suministrado no llegara al pH 0.1 unidades por debajo del punto de regulación, con lo que se busca mantener un error de ± 0.1 en la regulación de pH. De esta forma, el pH fue regulado de manera sincronizada y simultánea en los 15 biorreactores.

6.2.3 Determinación de la eficiencia del pH-Stat

Para determinar la exactitud y la precisión de regulación del pH-stat, se midió diariamente el pH en 15 biorreactores para cada punto de regulación durante 7 días, por la mañana después del cambio de fase de oscuridad a luz. Mediante una regresión lineal se calcularon el coeficiente de determinación (R^2) y el error estándar de la Y calculada (SE_Y), que en este caso representa el error estándar de la medición del pH, lo que indica la exactitud en su regulación (Zar, 2010). Asimismo, se calculó el estadístico T^2 de Hotelling para determinar diferencias significativas entre las regresiones y las diferencias entre los parámetros calculados se establecieron realizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía.

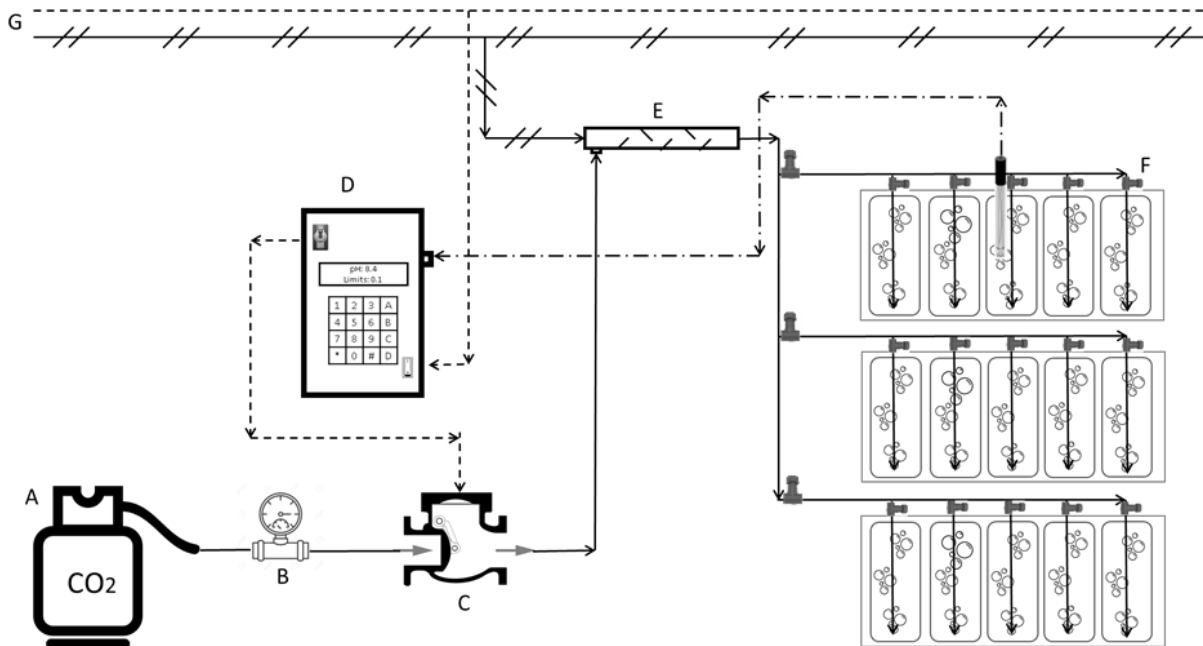


Figura 12. Sistema de cultivo de microalgas con regulación automática de pH. **A)** Tanque de CO₂ para regulación de pH, **B)** Regulador de presión para suministro del CO₂, **C)** Válvula de apertura automática, **D)** pH-Stat para medir y controlar el pH de los cultivos en el valor establecido, **E)** Mezcladora de aire-CO₂, **F)** Cultivos de microalgas sincronizados en tres grupos. **G)** Suministro de energía eléctrica (línea punteada) y aire (línea con diagonal doble; elaboración propia).

6.3 Determinación del crecimiento y consumo de nutrientes

Para calcular estas variables se tomaron muestras de 5 mL cada día. A partir de esas muestras se extrajeron 2 submuestras de 2 mL que fueron centrifugadas a 4,000 rpm. Los sobrenadantes fueron congelados a -20 °C y reservados para la determinación de nutrientes, con el 1 mL restante de la muestra original se determinó la densidad celular.

6.3.1 Medición de densidad celular

La densidad celular se determinó por conteos celulares en cámara de Neubauer, con un microscopio óptico y aumento de 40x. Se realizaron diluciones seriadas 1:1 para facilitar el conteo de algunas muestras (Arredondo-Vega *et al.*, 2017). Se graficaron las curvas de crecimiento y se realizó una regresión no lineal para calcular la μ y la duración de la fase de latencia (λ ; Fig. 13) como se menciona en la sección 0.

6.3.2 Medición de nutrientes en el medio de cultivo

Los nutrientes se midieron a partir de los sobrenadantes obtenidos anteriormente. Se emplearon micrométodos espectrofotométricos para determinar nitratos, fosfatos, fierro y silicatos (Lora-Vilchis *et al.*, 2017). Se graficaron las curvas y se realizó una regresión no lineal para calcular las tasas de consumo (k) y las λ (Fig. 13) para cada nutriente como se menciona en la sección 0.

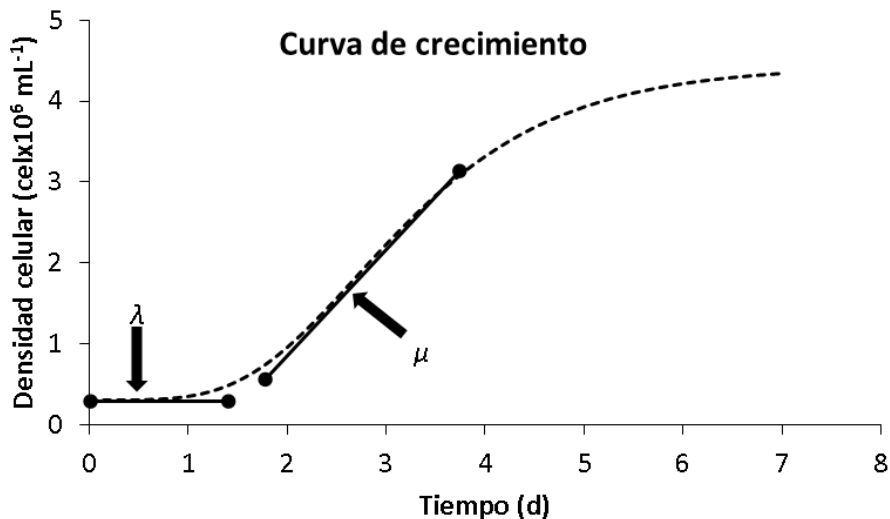


Figura 13. Parámetros de la curva de crecimiento. λ : Es la duración de la fase de latencia, caracterizada por un crecimiento muy lento y es la primera de las fases del crecimiento microbiano. μ : Es la pendiente durante la fase de crecimiento exponencial, representa la mayor velocidad de crecimiento que alcanza un microorganismo durante su cultivo (elaboración propia).

6.3.3 Regresión no lineal para cálculo de parámetros de crecimiento

La regresión no lineal se realizó en el programa RStudio utilizando la Eq. (1) que corresponde al modelo de Gompertz, utilizado para describir el crecimiento de microalgas (Gonçalves *et al.*, 2016):

$$S(t) = S_i + (S_f - S_i)e^{-e^{j(\lambda-t)+1}} \quad (1)$$

Dónde:

$S(t)$ = Densidad o concentración de un nutriente respecto a t

S_i = Densidad o concentración inicial

S_f = Densidad o concentración final

j = Tasa de crecimiento (μ) o de consumo de nutrientes (k ; d^{-1})

λ = Duración de la fase de latencia (d)

t = Tiempo (d)

Se utilizó un método de ajuste iterativo para calcular los parámetros del modelo de Gompertz, el cual estaba integrado en el script utilizado para la regresión no lineal. Se permitió el cálculo de la densidad o concentración inicial (S_i) y la densidad o concentración final (S_f) para mejorar la bondad del ajuste al modelo. Sin embargo, se estableció un valor mínimo de ajuste de 0 para evitar valores negativos, que no tendrían sentido en la práctica (Queiroz *et al.*, 2011). Se utilizaron el estadístico T^2 de Hotelling y un ANOVA de una vía para identificar y establecer las diferencias significativas entre las regresiones y los parámetros calculados.

6.3.4 Determinación de eficiencia fotosintética

La eficiencia fotosintética se determinó midiendo el O_2 disuelto como correlato de la actividad fotosintética en función de la PPF, mediante un oxímetro (Rank Brothers, Model 10) y un equipo PicoLog 1010 para la captura de datos. Se utilizaron muestras de 5 mL de cultivo con una densidad aproximada de 4×10^6 cel mL⁻¹. Se suministró luz con diferentes PPF (empleando un sistema de iluminación variable, diseñado por el taller de maquinados del CIBNOR). Se determinó la eficiencia fotosintética empleando la pendiente derivada de la gráfica tasa de producción del O_2 en función de la PPF (Masojídek *et al.*, 2013).

6.4 Caracterización del perfil lipídico

Después de 7 días de cultivo, se recuperó la biomasa de los biorreactores mediante centrifugación a 2,500 rpm durante 5 minutos a 10 °C, y posteriormente se congeló a -20 °C. Los lípidos se extrajeron a partir de 20 mg de biomasa previamente liofilizada utilizando una mezcla de metanol y cloroformo (Arjona *et al.*, 2008).

Posteriormente, se realizó una reacción de transesterificación directa a los lípidos extraídos con una solución de boro trifluoruro-metanol. Finalmente, los metil-ésteres resultantes de esta reacción se cuantificaron mediante cromatografía de gases (Palacios *et al.*, 2005; Arjona *et al.*, 2008).

Se aplicó el estadístico t de student para identificar diferencias significativas entre los ácidos grasos obtenidos con cada condición de pH.

6.5 Análisis de biología de sistemas

Para determinar la expresión diferencial de genes y el enriquecimiento de procesos biológicos debido a la acidificación del medio de cultivo, se realizó un metaanálisis utilizando 18 Archivos de Lectura de Secuencias (SRA) que contienen las lecturas RNA-seq de tres bioproyectos independientes disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) que emplearon condiciones de cultivo similares a las mencionadas en la sección 0 (Tabla 4).

Se obtuvieron los archivos correspondientes al ensamblaje del genoma de *P. tricornutum* (Bowler *et al.*, 2008) como genoma de referencia y la versión más actualizada de la anotación de genes para esta diatomea denominada Phtr3 (Rastogi *et al.*, 2018).

Tabla 4. Bioproyectos seleccionados.

Código de experimento	Número de accesión	Código de muestra	Medio	pH	Temp. (°C)	Luz ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Referencia
A	PRJEB34512	A11	f/2	7.8	20±1	120	Zhang, 2019
		A12	f/2	7.8	20±1	120	
		A13	f/2	7.8	20±1	120	
		A21	f/2	8.1	20±1	120	
		A22	f/2	8.1	20±1	120	
		A23	f/2	8.1	20±1	120	
B	PRJNA573555	B11	f/2	7.8	20±1	120	Xu <i>et al.</i> , 2021
		B12	f/2	7.8	20±1	120	
		B13	f/2	7.8	20±1	120	
		B21	f/2	8.1	20±1	120	
		B22	f/2	8.1	20±1	120	
		B23	f/2	8.1	20±1	120	
C	PRJNA484278	C11	Aquil	7.8	20	150	Huang <i>et al.</i> , 2019
		C12	Aquil	7.8	20	150	
		C13	Aquil	7.8	20	150	
		C21	Aquil	8.1	20	150	
		C22	Aquil	8.1	20	150	
		C23	Aquil	8.1	20	150	

Se realizó un control de calidad de las lecturas de los SRA utilizando con el software *FastQC* (Andrews, 2010). Las secuencias con calidad baja fueron recortadas y/o filtradas con el software *Trimmomatic* (Bolger *et al.*, 2014), utilizando los parámetros: leading=3, trailing=3, slidingwindow=4:15, crop=120, y minlen=120.

El mapeo de las secuencias preprocesadas se realizó con el software *tophat* (Kim *et al.*, 2013) para alinear las lecturas RNA-seq con el genoma de referencia para identificar las uniones exones-exones. Se establecieron los siguientes parámetros para en el programa: `min-intron-length=40`, `max-intron-length=2000`, `num-threads=2`, `report-secondary-alignments`, y `no-novel-juncs`.

Posteriormente, se realizó un conteo de lecturas para cada secuencia identificada utilizando el software *htseq-count*, usando el valor predeterminado para el parámetro de calidad mínima de alineación. Se generó una matriz con los conteos de los 18 SRA. Esta matriz fue procesada para eliminar el “efecto de lote” con el programa *ComBat_seq* (Zhang *et al.*, 2020).

Utilizando la plataforma iDEP v.0.951 disponible en el sitio de DiatOmicBase (<https://www.diatomicsbase.bio.ens.psl.eu/>), se llevó a cabo una transformación *rlog* para ajustar el tamaño por biblioteca y estabilizar las varianzas. Además, se realizó un filtrado de los genes para aumentar la correlación entre el cambio de pH y estos genes. La correlación obtenida se validó mediante análisis de clúster y análisis de componentes principales (PCA). Además, en la misma plataforma se identificaron los genes diferencialmente expresados (DEGs) mediante el análisis de la matriz corregida con *ComBat_seq* con el algoritmo *DESeq2*. Se consideró que los genes con un cambio de pliegue logarítmico (Log2FoldChange, LFC) mayor a 1 estaban sobreexpresados, mientras que aquellos con un LFC menor a -1 estaban reprimidos. Se utilizó un valor de $p < 0.05$ al comparar el pH 7.8 con el de 8.1, considerando el de 8.1 como control.

El análisis de enriquecimiento de ontología de genes (GO) a nivel de procesos biológicos se realizó con dos métodos. En primer lugar, se utilizó la lista de DEGs en la aplicación *ClueGo* v.2.5.8 previamente instalada en el software *Cytoscape* v.3.9.1 (Fu *et al.*, 2021), para identificar los términos ontológicos se utilizó la base de datos de EBI-UniProt-GOA-ACAP-ARAP actualizada al 17 de mayo de 2023. En segundo lugar, se realizó un análisis de rutas metabólicas identificando las 30 más significativas aplicando la metodología de análisis de enriquecimiento de conjunto de genes (Subramanian *et al.*, 2005).

7. RESULTADOS

7.1 Diseño final y evaluación del pH-stat

7.1.1 Detalles de diseño y funcionamiento

La interfaz de usuario del pH-stat fue de un diseño simple. Se compone de un teclado numérico como dispositivo de entrada, y una pantalla LCD como dispositivo de salida. Además, cuenta con varios conectores que permiten la conexión de distintos periféricos, y se ha incorporado interruptores para facilitar el control de operación (Fig. 14).

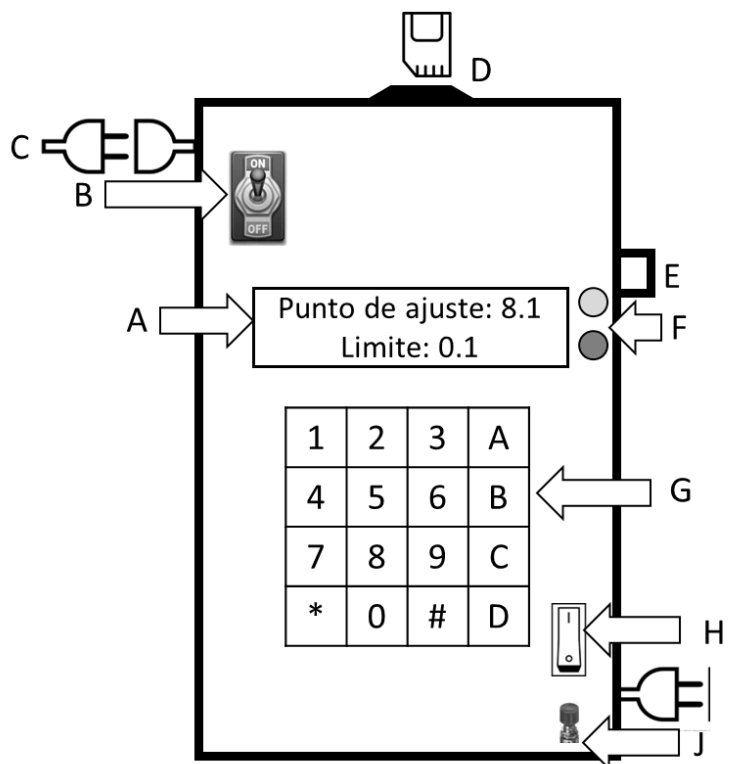


Figura 14. Esquema del controlador del pH-stat. **A)** Pantalla LCD. **B)** Interruptor de electroválvula. **C)** Fuente de alimentación para electroválvula. **D)** Ranura para tarjeta microSD. **E)** Conector del sensor de pH. **F)** Luces indicadoras led verde y roja. **G)** Teclado. **H)** Interruptor de encendido del equipo. **I)** Cable de alimentación. **J)** Botón Restablecer (Elaboración propia).

El sistema de operación del pH-stat requiere de cuatro parámetros que son esenciales para el control del pH. En primer lugar, se establece el punto de regulación del pH, que representa el valor de pH que se desea alcanzar en los biorreactores. En segundo lugar, se configura el límite o desviación del punto de regulación del pH, que determina el intervalo dentro del cual el sistema puede aceptar variaciones antes de que se suministre CO₂ a los biorreactores, es decir, representa la sensibilidad del equipo. El tercer parámetro se refiere al tiempo que la electroválvula que permanecerá activada para dosificar el CO₂. El cuarto parámetro corresponde a un tiempo mínimo de espera entre una dosis de CO₂ y otra, este

tiempo es necesario para alcanzar un nivel estable en la lectura de pH, equivale al tiempo de respuesta del sistema una vez suministrada una dosis de CO₂.

La configuración de estos parámetros se realiza mediante un menú de fácil navegación que utiliza las teclas "A", "B", "C" y "D", mientras que las teclas numéricas se utilizan para introducir los valores correspondientes. La tecla hash funciona como tecla de confirmación y la tecla asterisco se utiliza para abrir manualmente la válvula solenoide. Además, el intervalo de registro de datos se puede ajustar desde 1 hasta 999 segundos y se puede programar la inyección de CO₂ solo durante la fase de luz del fotoperíodo.

La tecla asterisco también permite la operación manual de la válvula solenoide o una combinación de operación automatizada/manual. La apertura automatizada de la válvula se puede activar o desactivar mediante el menú, permitiendo la manipulación de los biorreactores para muestreo sin cambios bruscos en el pH debido a la dosificación de CO₂. Además, el pH-Stat cuenta con un interruptor incorporado que permite cortar el suministro eléctrico a la válvula solenoide en caso de necesitar detener su operación sin interrumpir otras funciones del pH-stat.

El pH-stat cuenta con una ranura para insertar una tarjeta microSD para almacenar los datos de lectura y puede ser removida de manera segura para copiar los datos a cualquier computadora utilizando la opción de detener la grabación de datos disponible en el menú. Los datos se almacenan en un archivo de texto (con extensión ".txt"), por lo tanto, pueden ser leídos por los programas estadísticos y de hojas de cálculo más comunes. Los datos deben ser eliminados manualmente de la tarjeta microSD para comenzar un nuevo registro. Para verificar el pH del cultivo y el funcionamiento del sistema se colocó una luz LED verde que, al estar encendida, indica un pH dentro de los límites y una luz roja para indicar valores fuera.

El pH-Stat cuenta con un botón de reinicio incorporado para reiniciar su operación en caso de problemas con la interfaz o con su respuesta. Al reiniciarlo quedan guardados los últimos ajustes con los que se trabajó.

7.1.2 Eficiencia en la regulación de pH

Durante los 7 días de cultivo, el pH promedio utilizando los puntos de regulación de 7.8 y 8.1 fue de 7.82 ± 0.09 y 8.06 ± 0.10 , respectivamente, determinando una exactitud de 99% respecto a los puntos de regulación y una precisión de ± 0.10 . Los valores de pendiente de la regresión lineal (m), que indican la velocidad de cambio, fueron menores a 0.01 en ambos casos (Fig. 15). El coeficiente b , que representa el cruce de la línea de regresión en el eje de las ordenadas, fue de 8.08 y 7.85, lo que representa una diferencia menor al 0.5% comparando con el promedio en ambos casos. El R^2 fue menor a 0.05 en ambos casos. El estadístico T^2 de Hotelling mostró que hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las regresiones lineales de cada punto de regulación y el ANOVA detectó diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los promedios obtenidos.

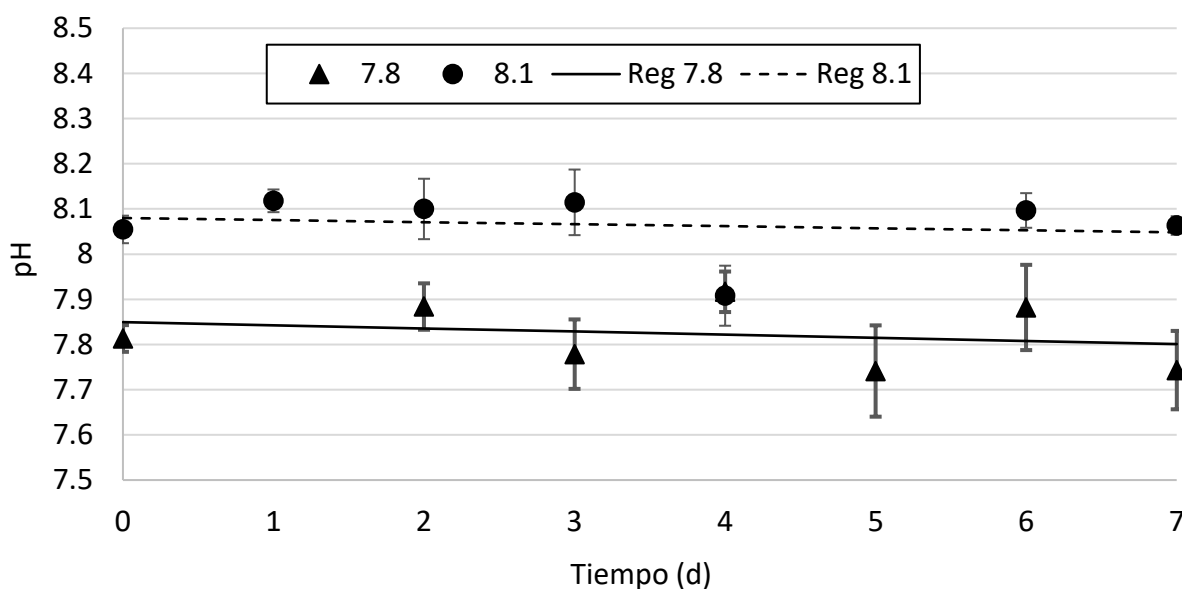


Figura 15. Cambio de pH en cultivos regulados. Los puntos representan los promedios ($n = 15$) y las líneas verticales las desviaciones estándar. Reg 7.8: Corresponde a la línea de regresión para el punto de regulación de pH 7.8. Reg 8.1: Corresponde a la línea de regresión para el punto de regulación de pH 8.1.

7.2 Cambios en crecimiento y consumo de nutrientes

7.2.1 Crecimiento celular

Se observó un incremento en la densidad celular que siguió el modelo de Gompertz en ambos puntos de regulación, alcanzando un valor de R^2 cercano a uno. Con el aumento del pH, se encontró una disminución significativa ($p < 0.05$) en el parámetro λ , siendo un 34.0% mayor en el caso del punto de regulación de pH 7.8 en comparación con el punto de regulación de pH 8.1, considerando este último como el 100.0%. Por otro lado, la μ fue

significativamente mayor ($p < 0.05$) con el punto de regulación de pH 8.1, siendo 50.0% más pequeña con 7.8. Sin embargo, se observó que el punto de regulación de pH 7.8 tuvo un valor significativamente más alto ($p < 0.05$) en el parámetro S_f en comparación con el punto de regulación de pH 8.1 (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros de crecimiento celular. Se indican valores promedio ($n = 15$) \pm desviación estándar calculados a partir del modelo.

Punto de regulación (pH)	S_i ($\times 10^6$ cel mL $^{-1}$)	S_f ($\times 10^6$ cel mL $^{-1}$)	μ (d $^{-1}$)	λ (d)	R^2
7.8	0.31 ± 0.07	8.34 ± 0.40	0.44 ± 0.03	2.09 ± 0.90	0.99
8.1	0.31 ± 0.02	4.44 ± 0.03	0.88 ± 0.02	1.56 ± 0.04	0.99

Las densidades celulares finales determinadas por conteo, es decir, las mediciones reales en lugar de los valores calculados de S_f . Con el punto de regulación de pH 8.1, el crecimiento alcanzó la fase de meseta al día cinco, mientras que con el punto de regulación de pH 7.8, alcanzó la fase de meseta al día 7 (Fig. 16).

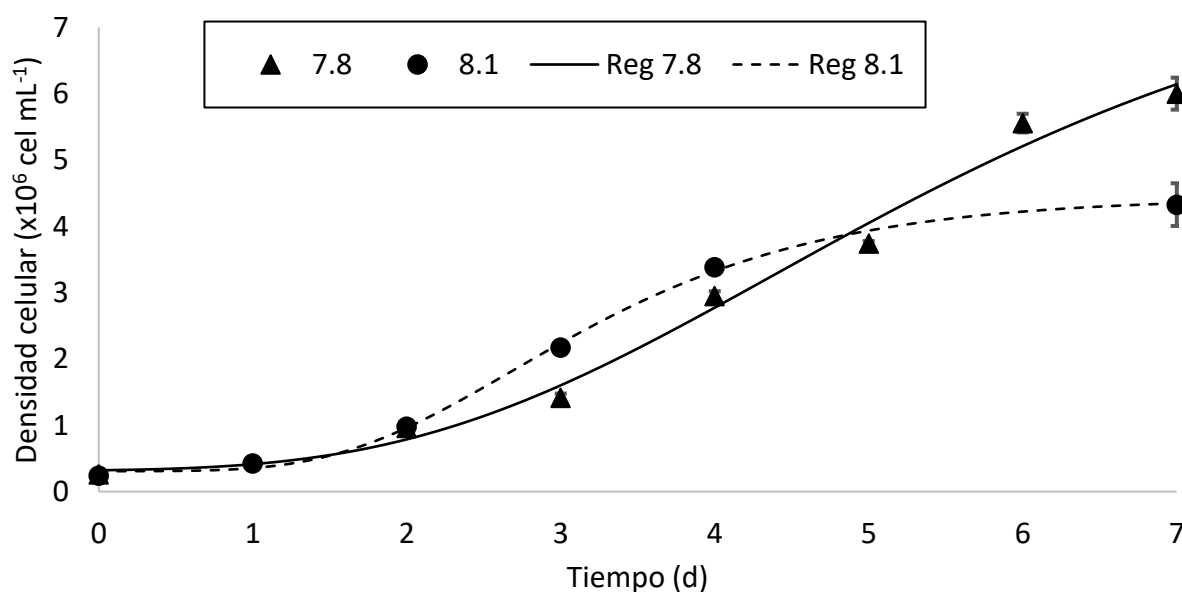


Figura 16. Curvas de crecimiento de *P. tricornutum*. Los puntos representan los promedios ($n = 15$) y las líneas verticales las desviaciones estándar. Reg 7.8: Corresponde a la línea de regresión para el punto de regulación de pH 7.8. Reg 8.1: Corresponde a la línea de regresión para el punto de regulación de pH 8.1.

7.2.2 Eficiencia fotosintética

Se observó que la tasa de respiración (consumo de O_2) fue de 0.75×10^{-6} pmol O_2 cel $^{-1}$ s $^{-1}$ en el punto de regulación de pH 8.1, mientras que en pH 7.8 aumentó 3.48×10^{-6} pmol O_2 cel $^{-1}$

s^{-1} . Del mismo modo, la tasa máxima de producción de O_2 también experimentó un cambio, pasando de $4.32 \times 10^{-6} \text{ pmol } O_2 \text{ cel}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en pH 8.1 a $15.87 \times 10^{-6} \text{ pmol } O_2 \text{ cel}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en pH 7.8, siendo mayor en esta última (Fig. 17).

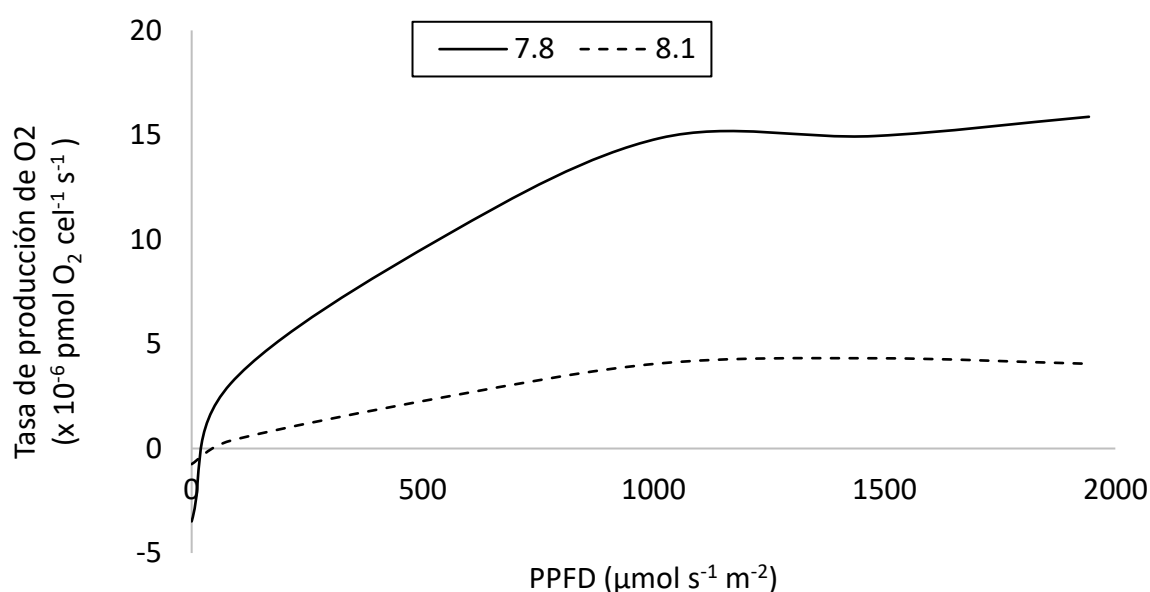


Figura 17. Tasa de producción de O_2 como correlato de la actividad fotosintética en función de la irradiancia o PPF.

7.2.3 Consumo de nitrato

El ajuste al modelo utilizado fue adecuado alcanzando valores de R^2 muy cercanos a uno. Al comparar los parámetros calculados con el modelo, se encontró que al punto de regulación de pH 8.1 tuvo el valor más bajo de λ con una diferencia significativa ($p < 0.05$), siendo 54% mayor en el caso del punto de regulación de pH 7.8. Además, el punto de regulación de pH 8.1 presentó el valor más alto de k con diferencia significativa ($p < 0.05$), siendo 45% más pequeña con 7.8 (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros de consumo de nitrato de *P. tricornutum*. Se indican valores promedio ($n = 15$) \pm desviación estándar calculados a partir del modelo.

Punto de regulación (pH)	S_i (μM)	S_f (μM)	μ (d^{-1})	λ (d)	R^2
7.8	1007.36 ± 13.87	0.00 ± 28.4	0.72 ± 0.05	0.18 ± 0.10	0.96
8.1	834.41 ± 6.33	68.18 ± 6.04	1.61 ± 0.08	1.42 ± 0.04	0.98

El nitrato se agotó en ambos puntos de regulación después de 7 días (Fig. 18). Sin embargo, se observó que con el punto de regulación de pH 8.1, el nitrato alcanzó su nivel mínimo en el día 5, mientras que con el punto de regulación de pH 7.8, esto ocurrió hasta el día 7.

Además, es importante destacar una diferencia en las concentraciones iniciales de nitrato, donde se observó una mayor concentración en el punto de regulación de pH 7.8, con una diferencia de 27.94% (Fig. 18).

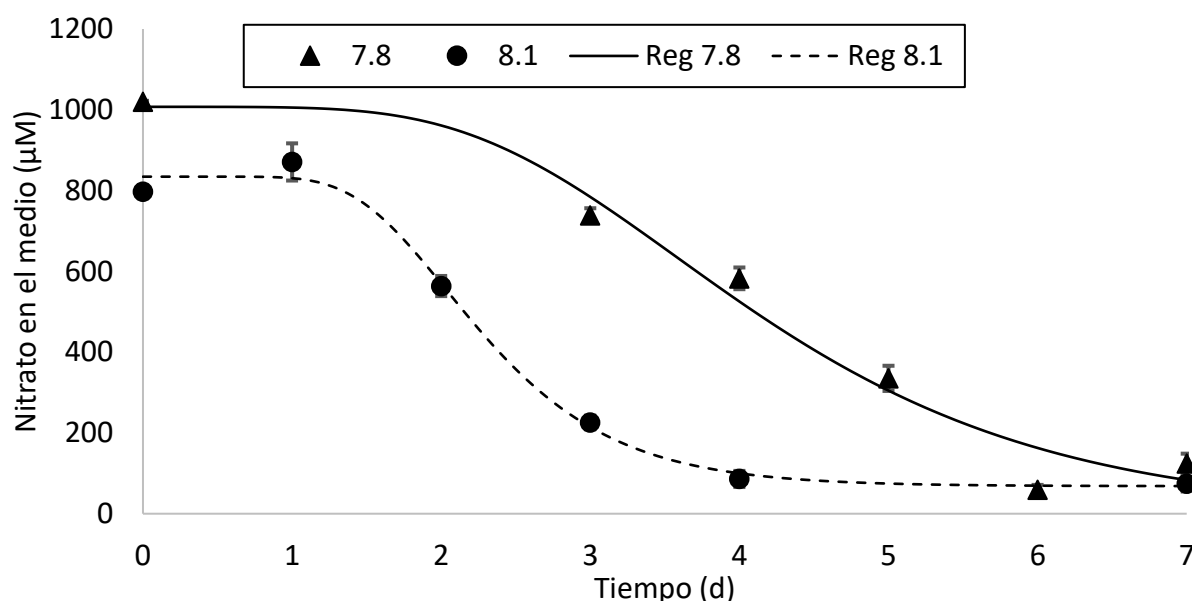


Figura 18. Curvas de consumo de nitrato de *P. tricornutum*. Los puntos representan los promedios ($n = 15$) y las líneas verticales las desviaciones estándar. Reg 7.8: Corresponde a la línea de regresión para el punto de regulación de pH 7.8. Reg 8.1: Corresponde a la línea de regresión para el punto de regulación de pH 8.1.

7.2.4 Consumo de fosfato

El modelo utilizado para el consumo de fosfatos mostró buenos ajustes, con valores de R^2 cercanos a 0.9, siendo aún más precisos para el punto de regulación de pH 7.8. Se encontró que el parámetro λ fue significativamente más alto ($p < 0.05$) en un 99.2% en el caso del punto de regulación de pH 7.8. No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en los valores de k de este nutriente entre los puntos de regulación (Tabla 7).

Tabla 7. Parámetros de consumo de fosfato de *P. tricornutum*. Se indican valores promedio ($n = 15$) \pm desviación estándar calculados a partir del modelo.

Punto de regulación (pH)	S_i (μM)	S_f (μM)	μ (d^{-1})	λ (d)	R^2
7.8	32.78 ± 0.46	0.52 ± 0.44	1.79 ± 0.14	2.59 ± 0.06	0.96
8.1	37.06 ± 0.36	23.69 ± 0.29	1.98 ± 0.35	1.30 ± 0.16	0.90

En el consumo de este compuesto se observaron diferencias en el patrón de los diferentes puntos de regulación, en el de pH 8.1 se consumió el 36% de los fosfatos disponibles, mientras que en el punto de regulación de pH 7.8 se consumieron en su totalidad (Fig. 19).

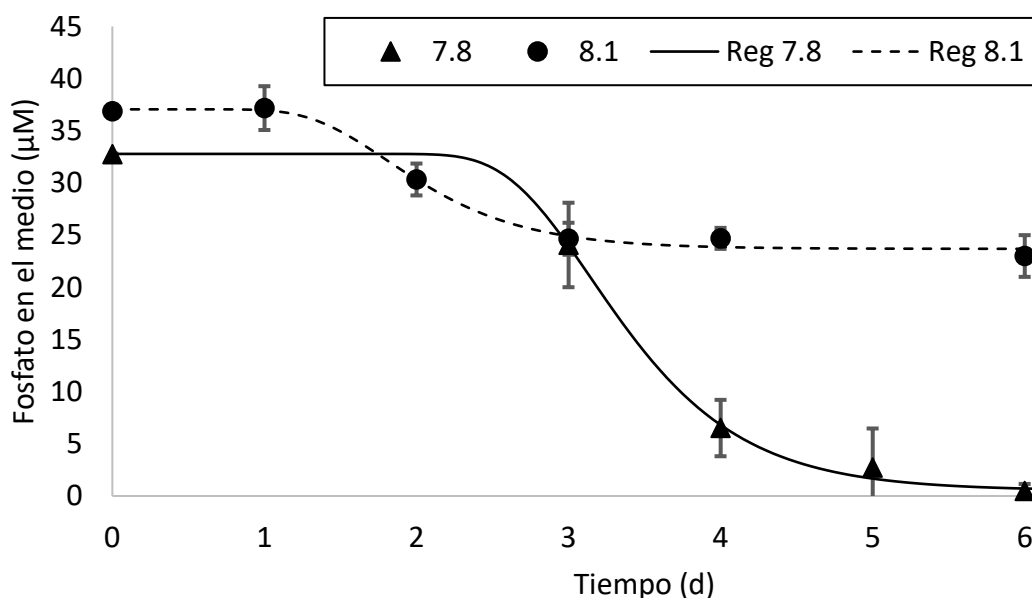


Figura 19. Curvas de consumo de fosfato de *P. tricornutum*. Los puntos representan los promedios ($n = 15$) y las líneas verticales las desviaciones estándar. Reg 7.8: Corresponde a la línea de regresión para el punto de regulación de pH 7.8. Reg 8.1: Corresponde a la línea de regresión para el punto de regulación de pH 8.1.

7.2.5 Consumo de hierro

El modelo ajustado al consumo de hierro presentó valores de R^2 superiores a 0.85, lo cual indica una aceptable adaptación del modelo. Se encontró que el parámetro λ fue menor a un día, y se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los puntos de regulación. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los valores del parámetro k (Tabla 8).

Tabla 8. Parámetros de consumo de hierro de *P. tricornutum*. Se indican valores promedio ($n = 15$) \pm desviación estándar calculados a partir del modelo.

Punto de regulación (pH)	S_i (μM)	S_f (μM)	μ (d^{-1})	λ (d)	R^2
7.8	10.29 ± 4.28	6.30 ± 0.08	1.78 ± 0.25	0.00 ± 0.60	0.85
8.1	9.13 ± 0.23	3.84 ± 0.26	0.64 ± 0.12	0.57 ± 0.31	0.78

Se observaron cambios en las tendencias de consumo, especialmente con el punto de regulación de pH 7.8, donde la λ para el consumo de hierro fue prácticamente inexistente. La cantidad de hierro consumida para el punto de regulación de pH 7.8 fue de $4.45 \mu\text{M}$, lo que representó el 44.30% del hierro disponible. Por otro lado, con el punto de regulación de pH 8.1 se consumieron $4.80 \mu\text{M}$, lo cual equivalió al 54.73% del hierro disponible (Fig. 20).

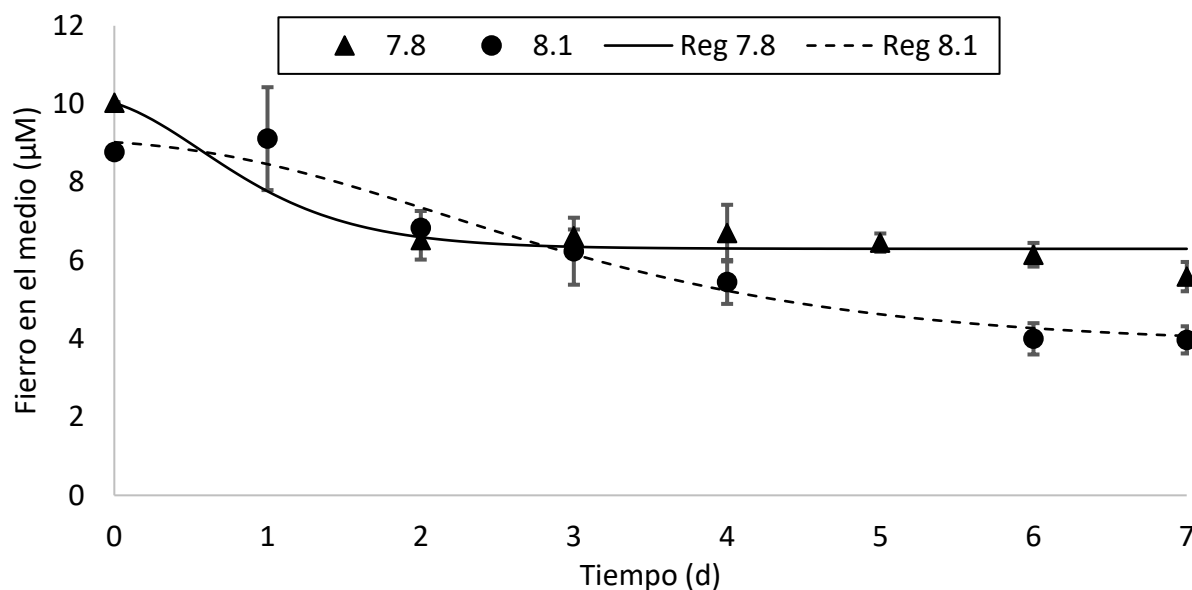


Figura 20. Curvas de consumo de fierro de *P. tricornutum*. Los puntos representan los promedios ($n = 15$) y las líneas verticales las desviaciones estándar. Reg 7.8: Corresponde a la línea de regresión para el punto de regulación de pH 7.8. Reg 8.1: Corresponde a la línea de regresión para el punto de regulación de pH 8.1.

7.2.6 Consumo de silicato

El consumo de silicatos tuvo un ajuste muy pobre al modelo en ambos casos, con valores de R^2 inferiores a 0.5. Esto se reflejó en las similitudes entre S_i y S_f , lo que indica un consumo muy bajo o incluso inexistente de este compuesto. Debido al pobre ajuste de los datos reales con el modelo, los parámetros λ y k no pudieron ser calculados de manera precisa, lo que resultó en valores que no son factibles en un sistema biológico real (Tabla 9).

Tabla 9. Parámetros de consumo de silicato de *P. tricornutum*. Se indican valores promedio ($n = 15$) \pm desviación estándar calculados a partir del modelo.

Punto de regulación (pH)	S_i (μM)	S_f (μM)	μ (d^{-1})	λ (d)	R^2
7.8	197.243 \pm 3.64	182.318 \pm 1.82	NA	NA	0.202
8.1	196.134 \pm 3.80	206.171 \pm 2.69	NA	NA	0.043

Notas: NA corresponde a valores que no pudieron ser calculados de forma precisa por el modelo.

Las curvas de consumo obtenidas no mostraron un patrón claro de consumo. Para evaluar esto, se realizó un ANOVA comparando la concentración inicial con la final de cada punto de regulación. Los resultados indicaron que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en ninguno de los casos (Fig. 21).

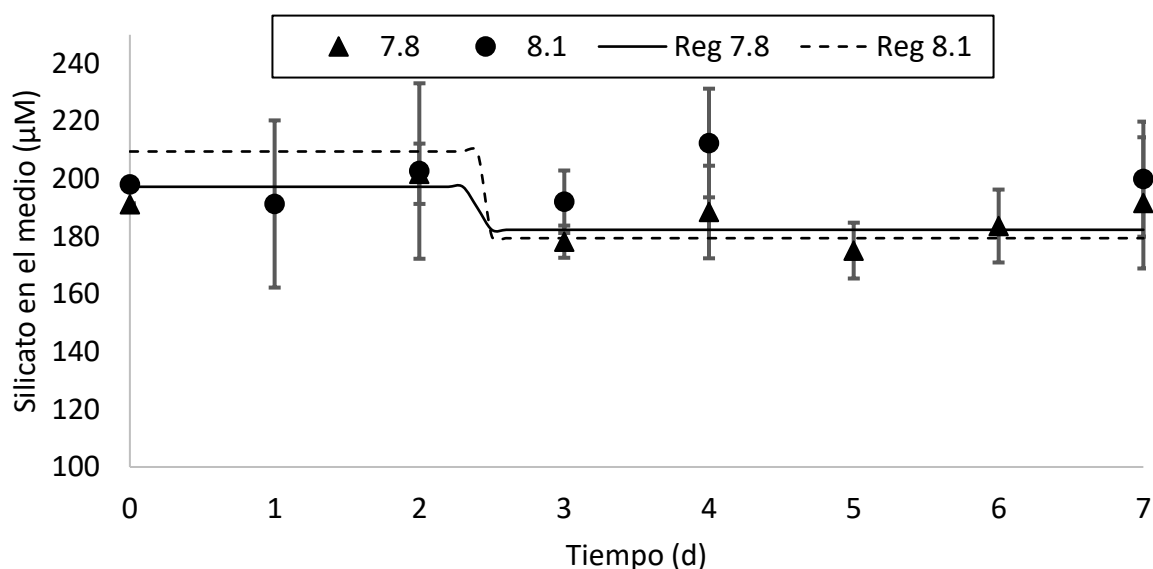


Figura 21. Curvas de consumo de silicato de *P. tricornutum*. Los puntos representan los promedios ($n = 15$) y las líneas verticales las desviaciones estándar. Reg 7.8: Corresponde a la línea de regresión para el punto de regulación de pH 7.8. Reg 8.1: Corresponde a la línea de regresión para el punto de regulación de pH 8.1.

7.3 Perfiles de ácidos grasos

En el perfil de ácidos grasos, clasificados según su nivel de insaturación, se observó que los SFA fueron significativamente más altos ($p < 0.05$) en el punto de regulación de pH 7.8. Aunque no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$), se apreció una tendencia a la disminución de los MUFA, mientras los PUFA se mantuvieron en niveles similares (Fig. 22).

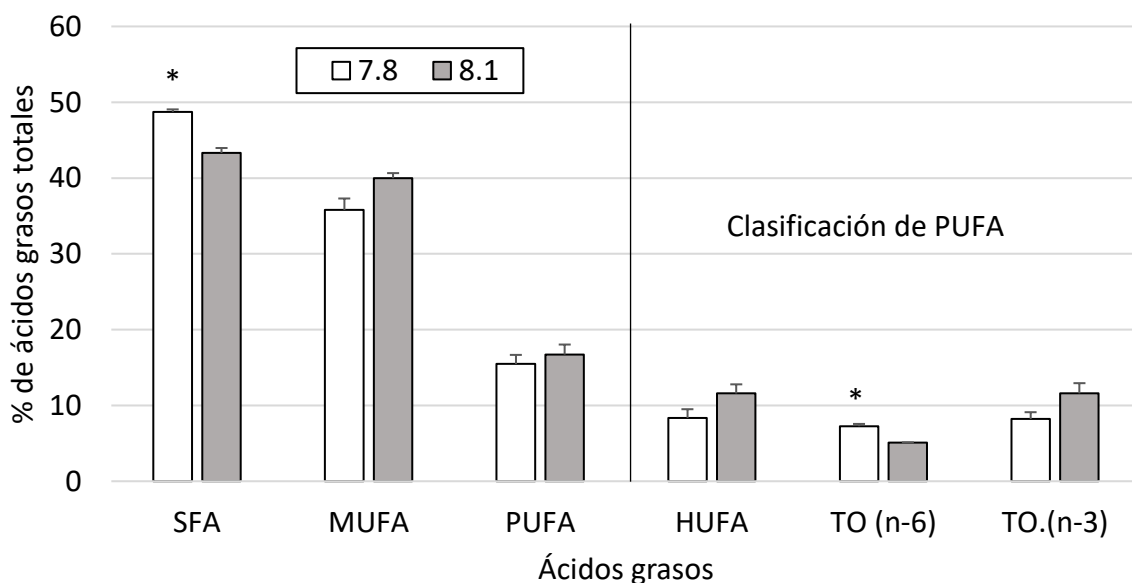


Figura 22. Perfil de ácidos grasos clasificados por sus insaturaciones de *P. tricornutum*. Las columnas representan los promedios ($n = 3$) y las líneas verticales la desviación estándar; los

* representan diferencias significativas entre los dos puntos de regulación de pH. TO(n-6): ácidos grasos omega 6 totales; TO(n-3): ácidos grasos omega 3 totales.

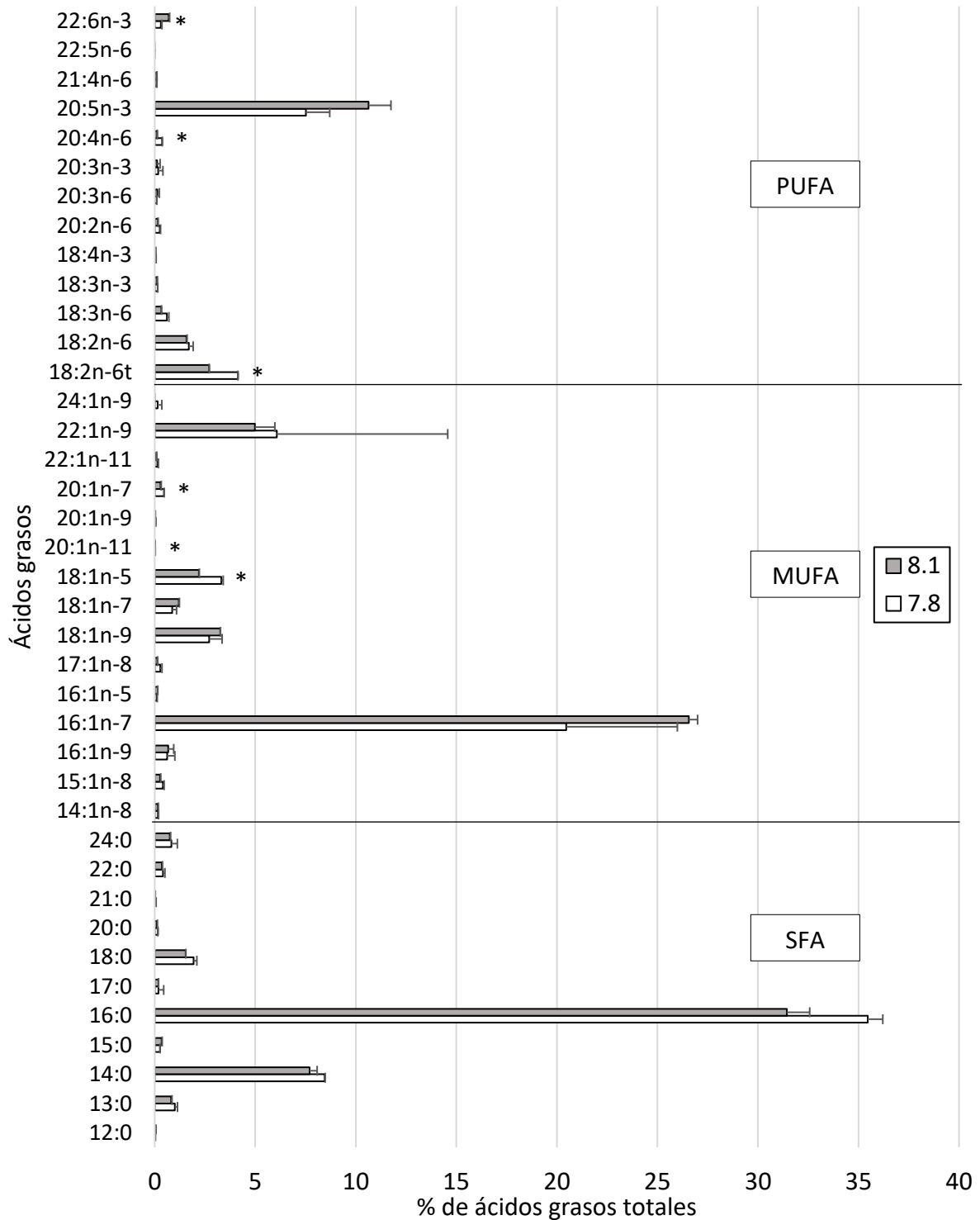


Figura 23. Perfil completo de ácidos grasos de *P. tricornutum*. Las barras representan los promedios (n = 3) y las líneas horizontales la desviación estándar; los * representan diferencias significativas entre los dos puntos de regulación de pH.

Sin embargo, al analizar los diferentes tipos de PUFA de manera específica, se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en los ácidos grasos omega-6 (n-6) a pH 7.8. Aunque no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$), se observó una tendencia a la disminución de los HUFA y los n-3 (Fig. 22). Asimismo, se observó una tendencia a la disminución en la relación n-3: n-6 con pH más bajo, siendo de 1.13 ± 0.08 a pH 7.8 y de 2.27 ± 0.27 a pH 8.1, aunque no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$).

El ácido palmítico (16:0), que pertenece al grupo de los ácidos grasos saturados, fue el más abundante en esta diatomea. Aunque no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el porcentaje de este ácido graso, se observó una tendencia a aumentar con un pH de 7.8 (Fig. 23). Se identificó un comportamiento similar en otros ácidos grasos saturados, como el ácido tridecanoico (13:0), ácido mirístico (14:0) y ácido esteárico (18:0).

En cuanto a los MUFA, el más abundante y el segundo en términos de porcentaje fue el ácido palmitoleico (16:1n-7). No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la concentración de este ácido graso, pero se identificó una tendencia a disminuir con la reducción del pH (Fig. 23). Por otro lado, los MUFA que sí mostraron un aumento significativo ($p < 0.05$) fueron el ácido cis-13-octadecenoico (18:1n-5), ácido cis-9-eicosenoico (20:1n-11) y ácido cis-13-eicosenoico (20:1n-7; Fig. 24).

Con respecto a los PUFA, el EPA fue el más abundante. No se identificaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en su porcentaje, pero se observó una tendencia a ser menor a pH 7.8 (Fig. 23). Por otro lado, el ácido linoleico conjugado (CLA; 18:2n-6t) y el ARA fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) en ese mismo pH, mientras que el DHA fue significativamente menor ($p < 0.05$; Fig. 24).

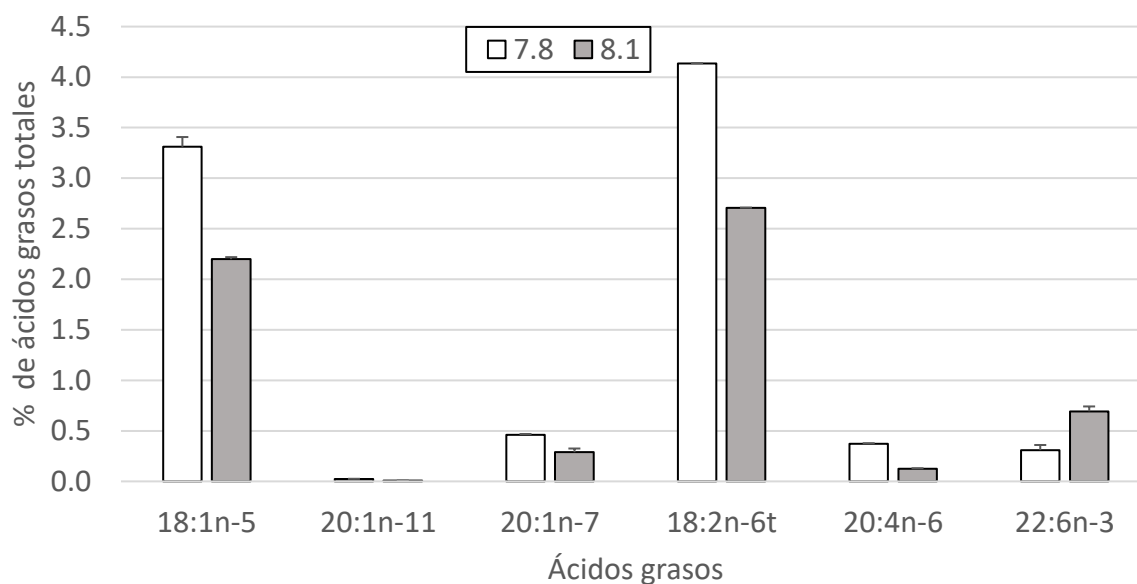


Figura 24. Ácidos grasos con diferencias significativas de *P. tricornutum*. Las columnas representan los promedios ($n = 3$) y las líneas verticales la desviación estándar. Se presentan aparte para mejorar la visibilidad respecto los demás ácidos grasos.

7.4 Expresión diferencial de genes

7.4.1 Análisis clúster y PCA para agrupación de los SRA por pH

En total se encontraron 11,351 genes en el conteo de secuencias de los SRA, de los cuales 8,485 superaron el filtrado. La configuración del filtro que generó la correlación más significativa de los conteos respecto al pH fue considerando un conteo por millón (CPM) mínimo de 3.5 en cada una de las muestras.

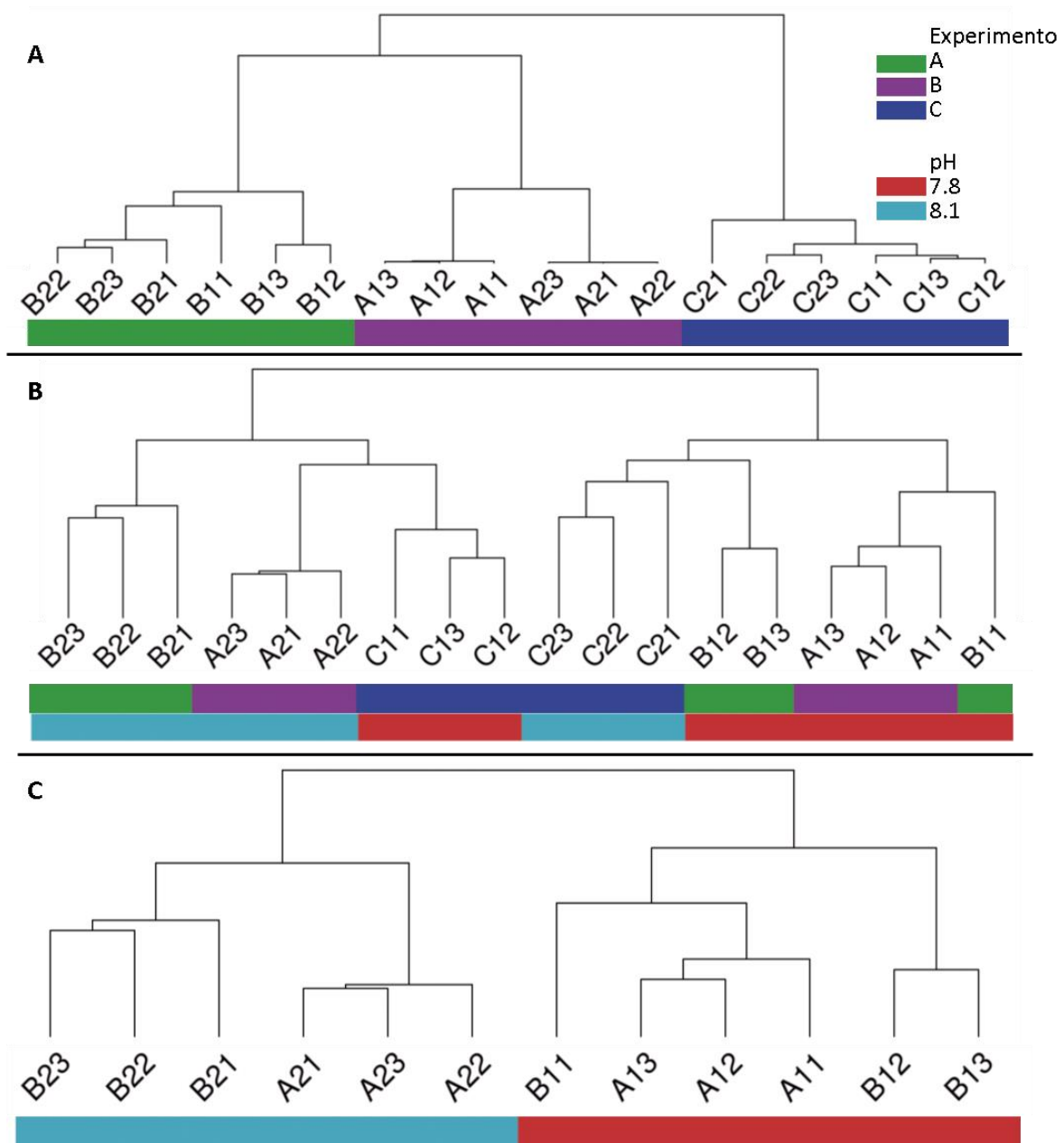


Figura 25. Análisis clúster de las muestras de los SRA. **A** Clústeres obtenidos con los datos originales sin eliminar el "efecto de lote". **B** Clústeres obtenidos con los datos transformados con *Combat_seq* eliminando el "efecto de lote". **C** Clústeres obtenidos con los datos de los experimentos A y B eliminando el "efecto de lote".

Se realizó un análisis de clúster en las muestras de los experimentos A, B y C sin eliminar el "efecto de lote". Los grupos obtenidos a partir de este análisis, aplicado a los datos originales (Fig. 25A), mostraron una separación en grupos que coincide con los experimentos de los que provienen las muestras, sin observar una influencia del pH en los grupos obtenidos.

Al reducir el "efecto de lote" en las muestras (Fig. 25B), se observó una mayor influencia del pH. Sin embargo, las muestras del experimento C no pudieron ser clasificadas en los clústeres correspondientes a su pH. Por lo tanto, se repitió el análisis únicamente con los experimentos A y B (Fig. 25C), lo cual resultó en una separación que muestra que el pH tiene influencia en las diferencias o similitudes en la expresión detectada en las muestras.

En el PCA (Fig. 26), se encontró una correlación significativa ($p < 0.05$) entre el componente principal 1 (PC1) y el pH. Esto indica que la mayor variabilidad de los datos está relacionada con el cambio de pH.

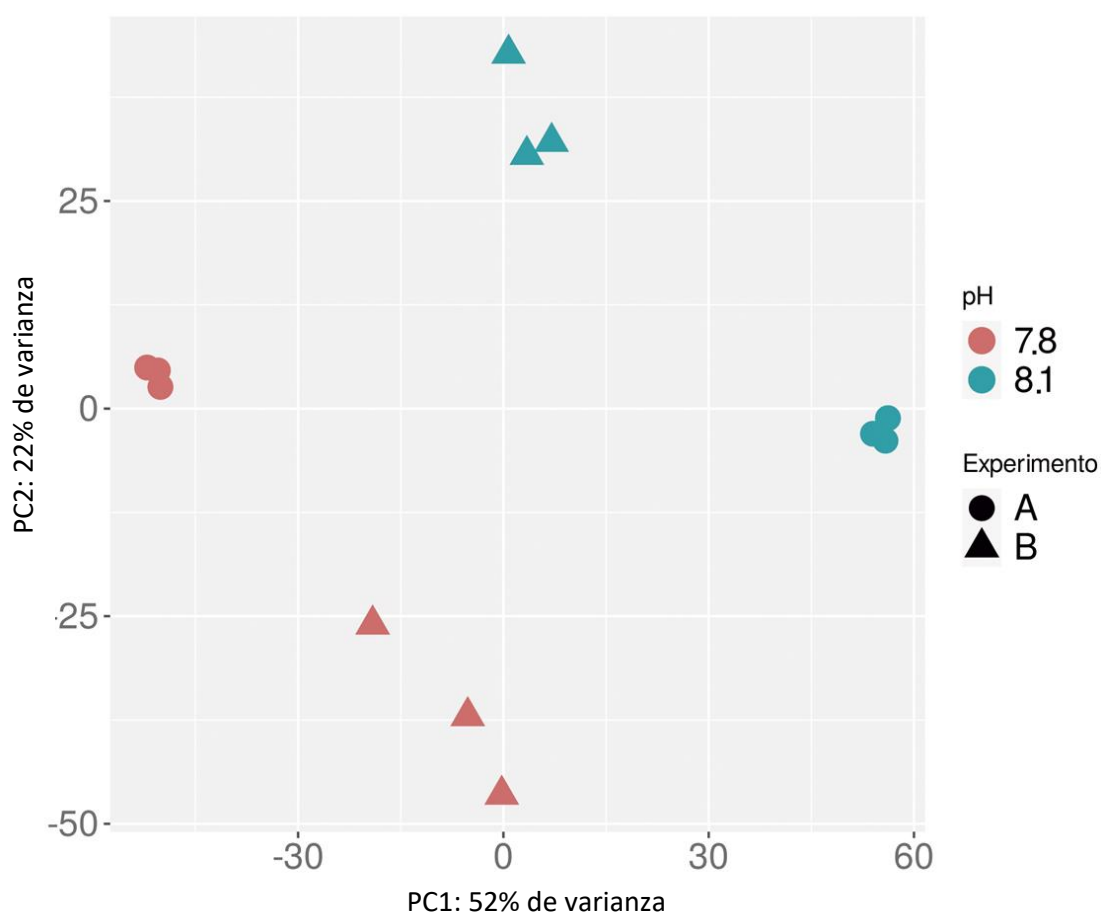


Figura 26. PCA de los experimentos A y B.

Adicionalmente, la rotación del PCA indicó que las funciones biológicas de "tRNA aminoacylation for protein translation", "photosynthesis, light reaction", "photosynthesis, light harvesting", "amino acid activation", "tRNA aminoacylation" y "RNA modification" están significativamente correlacionados ($p < 0.05$) con el PC1. Para el PC2, la rotación reveló que tiene una correlación positiva ($p < 0.05$) con las funciones biológicas de "pseudouridine

synthesis”, “DNA recombination”, “tRNA recombination”, “microtubule-based process”, “nucleoside diphosphate metabolic process” y “cell división”.

7.4.2 Identificación de DEGs y rutas metabólicas enriquecidas

Se identificaron 450 DEGs sobreexpresados, de los cuales 376 fueron reconocidos por la app *ClueGO* y solo 129 cuentan con su notación funcional. Por otra parte, se identificaron 391 DEGs reprimidos, de cuales se reconocieron 314 y solo 118 cuentan con notación funcional.

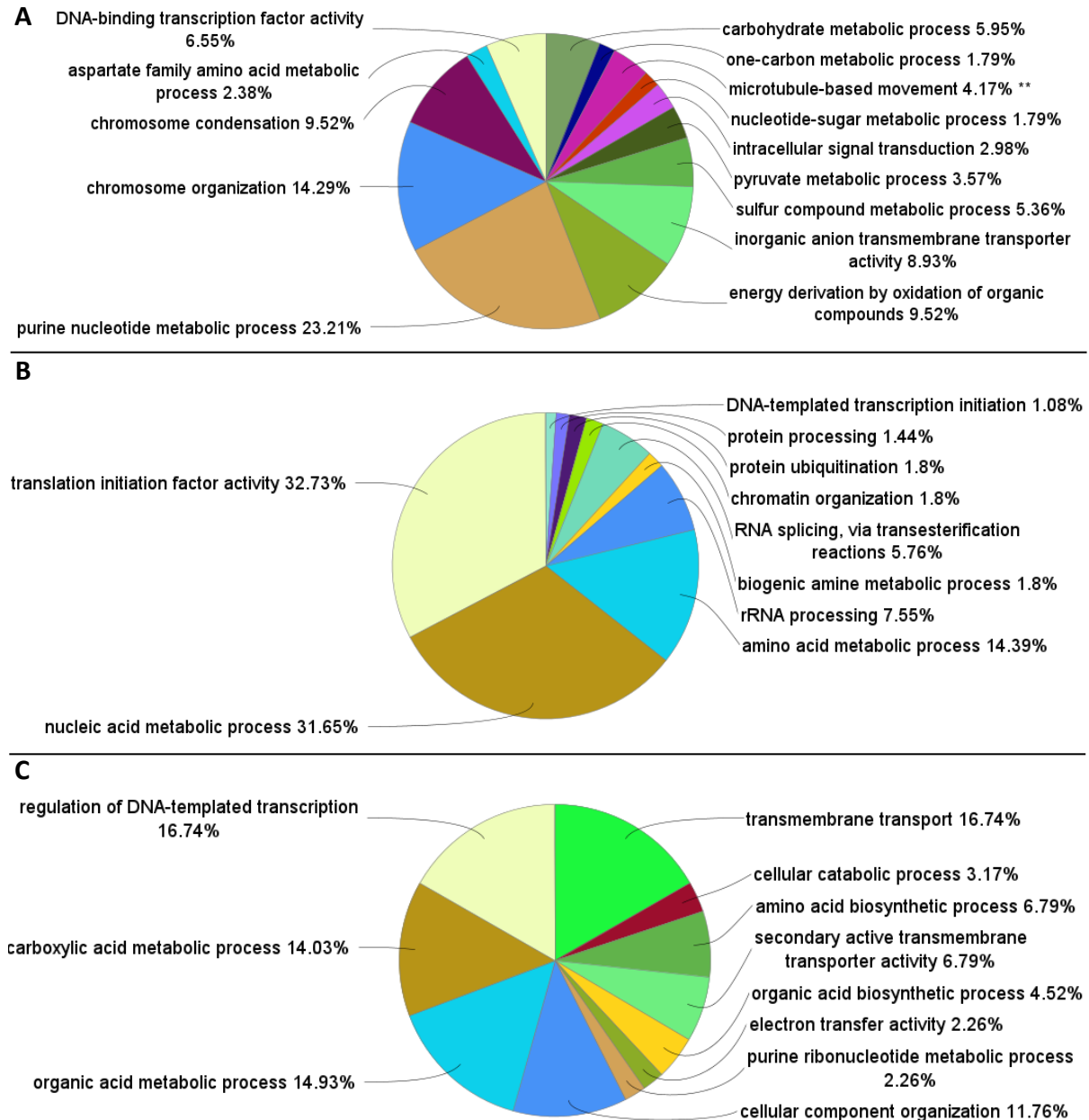


Figura 27. Grupos de procesos biológicos enriquecidos y su porcentaje de DEGs. **A** Procesos enriquecidos principalmente con DEGs sobre expresados. **B** Procesos enriquecidos con DEGs principalmente reprimidos. **C** Procesos enriquecidos con proporciones similares de DEGs sobreexpresados y reprimidos. Cada color representa un grupo distinto. Colores iguales entre las gráficas representan un mismo grupo.

En total se identificaron 154 procesos biológicos enriquecidos, de los cuales 49 fueron enriquecidos con DEGs en su mayoría sobre expresados, 75 con DEGs reprimidos y 30 presentaron una proporción similar de ambos (Fig. 27; Anexo C). Los procesos biológicos enriquecidos fueron agrupados por *ClueGo* de acuerdo con su coeficiente kappa, obteniendo finalmente 23 grupos de procesos biológicos enriquecidos (Fig. 28; Anexo C).

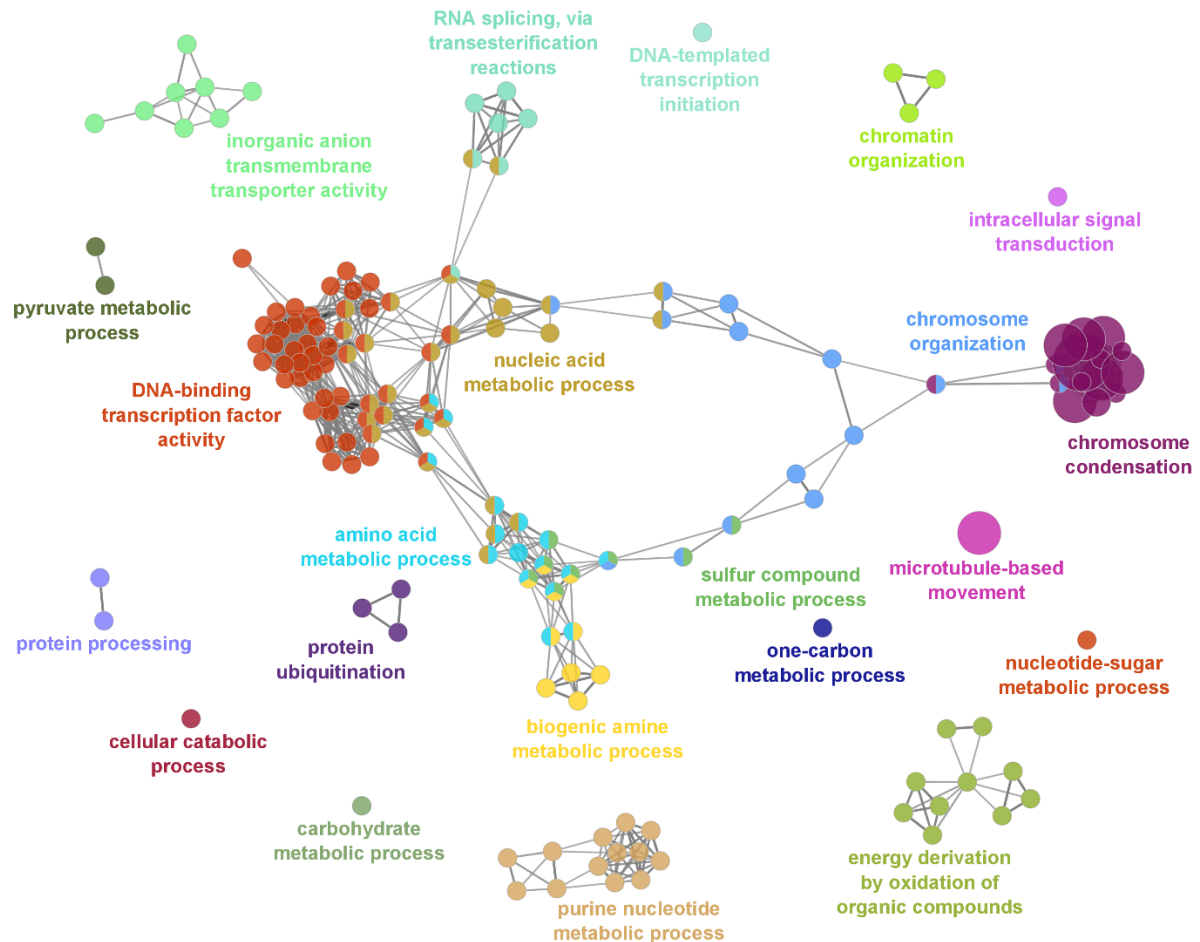


Figura 28. Mapa metabólico de procesos biológicos enriquecidos con DEGs en *P. tricornutum*. Cada nodo representa un proceso biológico y cada color representa un grupo distinto de procesos.

Adicionalmente se obtuvieron los 30 procesos biológicos con mayor significancia ($p < 0.05$; Fig. 29) y su respectiva lista de genes (Anexo D).

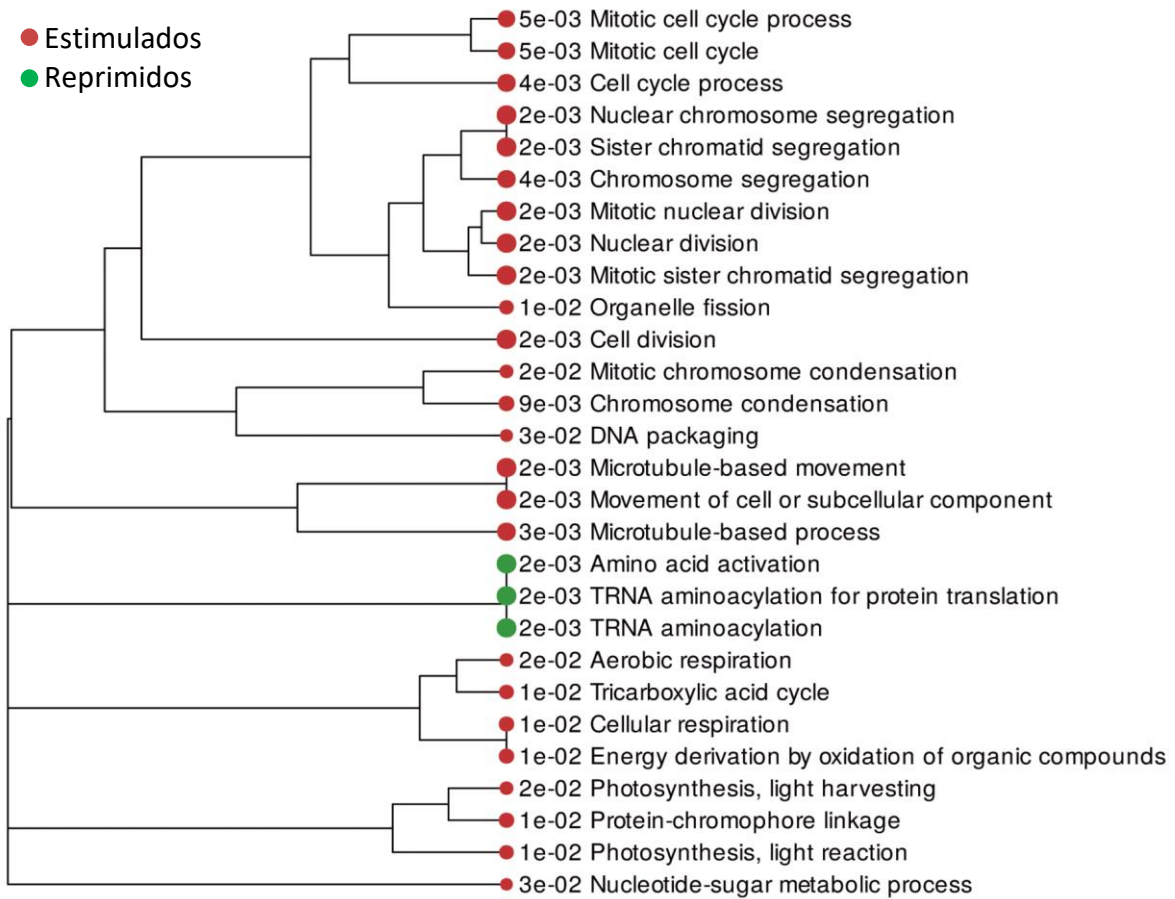


Figura 29. Funciones biológicas enriquecidas con mayor significancia de los SRA de los experimentos A y B. Los conjuntos de genes más cercanos en el dendrograma comparten más genes. Los tamaños de los puntos representan los valores p ajustados.

8. DISCUSIÓN

8.1 Evaluación del pH-stat

En este estudio, se desarrolló un equipo pH-stat para regular el pH en cultivos de microalgas mediante la adición de CO₂. Se observó que la regresión lineal en cada punto de regulación de pH resultó en una línea horizontal con una pendiente casi nula en ambos casos, lo que indica un cambio mínimo en el pH global de cada punto de regulación de pH (Fig. 15). Además, el valor de R^2 fue bajo debido a que no hay una relación de cambio en las variables (pH respecto al tiempo), lo que se espera en este caso específico (Zar, 2010). Adicionalmente, se obtuvo una exactitud del 99% y un error estándar (SE) cercano a ± 0.10 , que coincide con el valor programado como límite de variación del pH, lo que indica que la regulación fue conforme a lo planeado para estos niveles de pH.

Aunque el uso de equipos para regular el pH en cultivos de microalgas es un método común en diversos estudios, pocos proporcionan detalles sobre la construcción, modelo y eficiencia del sistema utilizado. Sin embargo, algunos estudios sí han evaluado la eficacia de sus sistemas de regulación de pH. Por ejemplo, Dogaris *et al.* (2016) evaluaron el sistema de regulación de pH utilizado en el cultivo de la microalga *Picochlorum oculatum* suministrando CO₂ de manera continua y en pulsos para regular el pH de sus cultivos a 7.5, ellos emplearon un sistema de regulación para cada biorreactor, obteniendo promedios de pH 7.47 ± 0.05 y 7.48 ± 0.02 respectivamente, con lo cual obtuvieron una exactitud del 99%.

Ying *et al.* (2014) también evaluaron su sistema de regulación de pH utilizado con la microalga *Dunaliella salina* cultivada en 6 biorreactores regulados simultáneamente. Ellos realizaron pruebas a diferentes pH obteniendo una exactitud del 99% y errores de hasta ± 0.4 .

Comparando la exactitud alcanzada con el pH-stat y los sistemas de regulación evaluados en otros estudios, se observa que la regulación de pH en este estudio está en un nivel competitivo con estos sistemas. Además, el pH-stat utilizado en este estudio tiene la capacidad de regular el pH con esta exactitud y precisión en 15 biorreactores simultáneamente, lo que lo convierte en una opción económica en comparación con algunos sistemas comerciales que regulan el pH en un solo biorreactor a la vez, con precios que

pueden alcanzar los \$600.00 USD (Galès *et al.*, 2020). En este estudio, el costo de los materiales y piezas para construir el pH-stat fue de aproximadamente \$805.00 USD en 2019.

8.2 Efectos en el crecimiento, fotosíntesis y consumo de nutrientes

El modelo de Gompertz es utilizado para describir el crecimiento celular en microalgas, así como la cinética de remoción de nutrientes en cultivos de microalgas, como fosfato y nitrato (Gonçalves *et al.*, 2016). En el presente estudio, se utilizó este modelo para describir también el consumo de silicato y hierro utilizando la diatomea *P. tricornutum*.

En general, los modelos de regresión obtenidos tuvieron un buen ajuste, con valores de R^2 cercanos o superiores a 0.8, con excepción del caso de los silicatos. Gonçalves *et al.* (2016) mencionan que solo ajustaron los parámetros μ y λ . En este caso, se permitió el ajuste de los parámetros S_f y S_i , lo cual permitió mejorar el ajuste de los modelos y aumentar el valor de R^2 . Sin embargo, se estableció una restricción para evitar que los parámetros calculados fueran inferiores a 0, ya que esto podría resultar en valores biológicamente no viables, como valores negativos para λ o valores de S_f o S_i que no serían posibles en un sistema biológico real. Aunque estos valores tienen una explicación matemática, biológicamente no podrían ser explicados.

Con la configuración utilizada para la regresión no lineal, fue posible calcular parámetros aceptables, siempre y cuando existieran diferencias significativas entre los valores iniciales y finales en los datos reales. En el caso de los silicatos, se demostró que no hubo un consumo significativo, lo que llevó al fracaso del modelo en el cálculo de los parámetros de las curvas de consumo de este nutriente, ya que no se observaron cambios significativos en función del tiempo y tampoco fue posible identificar cambios que se puedan atribuir al pH. *P. tricornutum* es conocida por ser una diatomea con una demanda muy baja de silicio ya que su pared celular es principalmente orgánica. A diferencia de otras diatomeas, esta pared celular orgánica tiene incrustadas en su superficie algunas bandas compuestas por silicatos (Borowitzka y Volcani, 1978). Sin embargo, el consumo de silicatos fue aún menor a lo esperado.

La regulación del pH en los cultivos permitió identificar diferencias en el crecimiento de *P. tricornutum*, observándose una mayor densidad celular final con el punto de regulación de pH 7.8. No obstante, esta diferencia podría estar influenciada no solo por el cambio de pH, sino también por la concentración inicial de nitrato, la cual fue más baja en los cultivos con el punto de regulación de pH 8.1. Es importante señalar que el agotamiento del nitrato coincidió con la detención del crecimiento al quinto día en ese pH (Fig. 16; Fig. 18), de manera similar a lo observado en una simulación realizada por Levering *et al.* (2017). Por esta razón, se analizaron los parámetros μ y λ como indicadores de la eficiencia de aclimatación.

En el presente estudio se observó que el parámetro μ fue mayor en los cultivos de *P. tricornutum* cuando el pH se reguló a 8.1. Estos resultados coinciden con los presentados por Song *et al.* (2014) y Xu *et al.* (2021), quienes también observaron una disminución en la μ cuando el pH se mantuvo en el rango de 7.8 a 8.0, en comparación con los cultivos regulados entre 8.0 y 8.2.

Además, en experimentos realizados por Scholz (2014) con cinco especies de diatomeas, encontró cambios significativos en μ al regular el pH en valores de 7.5, 7.75 y 8.0. con una tendencia a la disminución de la μ con la reducción del pH. Estos resultados, sumados a otras observaciones bioquímicas realizadas por Scholz (2014), sugieren que este comportamiento en la μ podría ser parte de una respuesta de aclimatación, con posibles implicaciones en las vías metabólicas del metabolismo energético.

La tasa de producción de O₂ fue mayor con pH 7.8, sin embargo, no se observó un aumento en la μ en *P. tricornutum*. Este hallazgo sugiere que la microalga tiene la capacidad de aumentar su tasa fotosintética sin un correspondiente incremento en el crecimiento, lo que podría indicar la posibilidad de acumulación de carbohidratos (Janssen, 2016) y/o lípidos, entre estos los ácidos grasos, especialmente SFA. Además, el aumento en la tasa de respiración también puede indicar un mayor gasto energético, como se ha observado en estudios previos con *Chlorella* spp. (Ihnken *et al.*, 2014).

De acuerdo con Borowitzka (2018), una λ más prolongada sugiere una respuesta de aclimatación más lenta, lo que indica que el proceso de aclimatación fue más lento a pH 7.8.

Esto se respalda mediante los cambios observados en las tasas de consumo de fosfato y nitrato, que comenzaron después de un tiempo más prolongado a pH 7.8.

Dado el papel fundamental del nitrógeno en el metabolismo de las diatomeas (Orefice *et al.*, 2019), era de esperar que su consumo estuviera estrechamente relacionado con la densidad celular, como se refleja en los parámetros λ y μ de estas dos variables, los cuales fueron muy similares (Tabla 5;Tabla 6). Estos hallazgos son consistentes con el estudio de (Scholz, 2014), quien también identificó un comportamiento similar entre la μ y el contenido de proteínas en las cinco diatomeas estudiadas. Además, se observó que el nitrato es el nutriente limitante en ambos puntos de regulación de pH.

El parámetro λ del fosfato también mostró un comportamiento similar al de la densidad celular y el nitrato, comenzando el consumo de este nutriente más tarde en los cultivos a pH 7.8. Aunque en este caso no hubo cambios significativos en μ , se observó un cambio en el consumo total de fosfato y en la duración de la fase exponencial, llegando a agotarlo en el punto de regulación de pH 7.8.

Este mayor consumo puede relacionarse con la diferencia en la biomasa final. Sin embargo, teniendo en cuenta que el fósforo participa en las reacciones del metabolismo energético (Orefice *et al.*, 2019), es posible que esta diferencia en el consumo neto esté relacionada con el aumento de la tasa fotosintética y una mayor demanda energética necesaria para lograr una aclimatación exitosa, tal como se ha observado en otras microalgas que han logrado adaptarse a condiciones que afectan su homeostasis (Vrana *et al.*, 2023).

Adicionalmente, la influencia del pH en la biodisponibilidad de los iones de fosfato es otro factor que podría haber facilitado el aumento en su consumo. Este fenómeno ya ha sido observado en plantas (Hendrix, 1967). Otro fenómeno que podría haber influido, relacionado con las especies iónicas, es la unión de los iones debido a una adsorción mononuclear en la pared celular de la diatomea, la cual es mayor a pH inferior a 8.0. Esto ha sido observado en la alga marina *Cymodocea rotundata* (Soumya *et al.*, 2015).

El consumo de hierro por parte de *P. tricornutum* no es directo, involucra una etapa de acumulación en la superficie celular. Al igual que con el fosfato, el estado de oxidación de los

iones de hierro influye en este proceso. Se ha observado que esta diatomea prefiere el Fe^{2+} (Sutak *et al.*, 2012), y la reducción de este metal se favorece en ambientes ácidos, especialmente durante el período oscuro (Garg *et al.*, 2018). El consumo más rápido de hierro observado con pH 7.8 podría ser resultado de una mayor concentración de hierro reducido en comparación con un pH más ácido, además de que el aumento en la tasa fotosintética también incrementaría la demanda de hierro.

8.3 Efectos del cambio de pH en el perfil de ácidos grasos

El aumento que se observó en los SFA de *P. tricornutum* coincide con lo reportado por Song *et al.* (2014) y sigue la tendencia discutida por Spilling *et al.* (2013), quienes encontraron un incremento de estos ácidos grasos en condiciones de pH más ácido, como en el caso del punto de regulación de pH 7.8. Este aumento puede estar relacionado con una reducción en la fluidez de la membrana, con el propósito de reducir el transporte pasivo de los iones H^+ , los cuales aumentan en el medio debido al pH ácido (Bienert *et al.*, 2006). También podría estar asociado al almacenamiento de energía proveniente de la fotosíntesis en forma de TAG con mayor contenido de SFA, como se discutió anteriormente.

No se observaron cambios significativos en los MUFA ni PUFA totales, lo cual concuerda con los resultados reportados por Spilling *et al.* (2013). Sin embargo, se observó una tendencia a la disminución de los MUFA en el punto de regulación de pH 7.8, dando mayor sustento a la idea de que *P. tricornutum* modifica su composición de ácidos grasos para reducir la fluidez biológica de la membrana como una manera de aclimatación al pH acidificado (Bienert *et al.*, 2006).

Se ha observado que ciertos ácidos grasos en su forma libre, como el mirístico (14:0), el ARA, los MUFA de 18 carbonos como el 18:1n-5 y ácidos grasos trans como el CLA activan diversos canales iónicos en células eucariotas debido a la carga negativa en su grupo carboxilo. Uno de esos canales es el canal de K^+ (Petrou *et al.*, 1995). Según lo explicado por Bisson y Walker (1981), la activación de estos canales de K^+ afecta el potencial de membrana y la permeabilidad de los iones H^+ . Por lo tanto, el incremento de estos ácidos grasos mencionados podría ser otra estrategia de aclimatación de *P. tricornutum* frente al incremento de iones H^+ .

Por otro lado, Lupette *et al.* (2018) mencionaron que los PUFA son precursores de eicosanoides por vías enzimáticas y de isoprostanoïdes a través vías no enzimáticas en *P. tricornutum*. Aunque no detectaron eicosanoides o las enzimas necesarias para su síntesis, observaron que los isoprostanoïdes se producen durante un incremento de estrés oxidativo provocado por el suministro de peróxido de hidrógeno. En su experimento detectaron la disminución del EPA, similar a lo observado en el presente trabajo; también encontraron un aumento de TAG ricos en PUFA almacenados en gotas lipídicas, con esa evidencia relacionaron la función de los isoprostanoïdes con un mecanismo de protección de los PUFA regulando la conversión de lípidos de membrana en TAG. Adicionalmente, los relacionaron con una inhibición del crecimiento.

Aunque no se ha descrito si existen diferencias en los efectos de isoprostanoïdes derivados de PUFA n-6 o n-3 en microalgas, es probable que tengan distintas funciones como se ha observado en humanos y animales (Schmitz y Ecker, 2008).

De esta manera, el aumento de PUFA n-6 y la tendencia a disminuir del EPA en *P. tricornutum* se pueden relacionar con la síntesis de isoprostanoïdes, lo cual coincidiría con la disminución de la μ que se observó en el presente estudio. Además, respalda la idea del aumento en el almacenamiento de energía mencionada anteriormente.

8.4 Enriquecimiento de rutas metabólicas

Aunque se observaron funciones biológicas estimuladas con los DEGs de los experimentos A y B sin efecto de lote relacionados con el ciclo celular, específicamente el proceso de "Cell division", los DEGs sobreexpresados para esta ruta (Anexo D) están principalmente asociados con la anafase y la metafase del ciclo celular. Según la información obtenida del sitio QuickGo (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0051301>) esta función biológica puede o no estar acompañada de la separación física de las células hijas. Por lo tanto, el estímulo de esta función biológica no indica necesariamente un crecimiento más rápido, lo cual concuerda con los datos de las μ obtenidos.

Además, estos hallazgos son consistentes con otros procesos relacionados con el ciclo celular, como "Organelle fission" y "Nuclear division", los cuales han sido asociados con un

mayor requerimiento energético en estudios previos, como se ha observado en el caso de *Pichia pastoris* (Rebnegger *et al.*, 2016). Este incremento en la demanda energética también se puede relacionar con el aumento en la tasa fotosintética. Entre los procesos biológicos estimulados se encuentran “Photosynthesis, light reaction”, “Photosynthesis, light harvesting” y “Aerobic respiration”.

Estos resultados, en conjunto con el grupo de genes relacionados con el “Carbohydrate metabolic process” que se encontraron sobreexpresados principalmente, respaldan la idea de que *P. tricornutum* está aumentando su tasa fotosintética para almacenar energía y/o dirigirla hacia otros procesos metabólicos durante la aclimatación al pH 7.8.

Muchos de los DEGs sobreexpresados asociados a estas funciones (Anexo D) corresponden a proteínas relacionadas con el complejo de fucoxantina-clorofila a/c, como el gen PSBO que codifica la proteína OEE1, crucial para la liberación de O₂, y el gen PRK que codifica una fosforribulokinasa, una enzima clave en la fijación de CO₂ (información obtenida del sitio de DiatOmicBase). Además, en las simulaciones de Levering *et al.* (2017) también encontraron una estimulación en las funciones biológicas agrupadas como "Pigmentos", "Metabolismo energético" y "Metabolismo de carbono", las cuales comparten genes en común con las funciones biológicas estimuladas en este estudio.

Adicionalmente, se encontró una función biológica enriquecida relacionada con el “Transmembrane transport”, la cual presentó genes sobreexpresados e inhibidos. Entre los genes sobreexpresados se encuentran el gen PHATRDRRAFT_11414, que codifica una proteína transportadora de fosfato, el gen PHATRDRRAFT_54405, que codifica un transportador de aniones, posiblemente de HCO₃⁻, y los genes PHATR_10581 y PHATRDRRAFT_15815, que codifican transportadores de protones. Por otro lado, se identificó el gen PHATRDRRAFT_bd1750 como un gen inhibido, el cual codifica un intercambiador de Na⁺:H⁺. Estos genes sugieren un mecanismo de absorción de fosfato que concuerda con el mayor consumo de fosfato observado a pH 7.8, así como un sistema de regulación del potencial de membrana. Es interesante destacar que Levering *et al.* (2017) también encontraron funciones de transporte enriquecidas en sus simulaciones, las cuales podrían coincidir con las observadas en este estudio.

Otra función estimulada fue la de “phosphorylation” y otra más inhibida fue la de “protein ubiquitination”, los cuales son procesos importantes en la regulación postraduccional. Se ha comentado que estas funciones pueden ser claves en el control fisiológico de la aclimatación de las diatomeas (Tan *et al.*, 2020), siendo un complemento en la regulación para las funciones enriquecidas de “DNA-binding transcription factor activity” y “RNA splicing”.

9. CONCLUSIONES

El pH-stat diseñado, demostró ser eficiente y funcional, permitiendo un uso fácil y efectivo en diversos procesos. Además, puede adaptarse a diferentes modos de cultivo y sus accesorios e interfaz pueden ser modificados según las necesidades.

El pH tiene efectos significativos en el crecimiento, eficiencia fotosintética, consumo de nutrientes y expresión génica en las diatomeas, hablando particularmente de *P. tricornutum*. Un pH de 8.1 favoreció una mayor tasa de crecimiento con una fase de latencia más corta y menores consumos de fosfato y hierro. Además, se observó un perfil lipídico más rico en ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados omega-3, lo cual es beneficioso para los organismos que se alimentan de estas microalgas debido a sus efectos saludables.

P. tricornutum utiliza diversas estrategias de adaptación a la acidificación del medio, incluyendo la activación de factores de transcripción, la inhibición del splicing alternativo y la fosforilación de proteínas. El aumento en la fosforilación de proteínas podría explicar el mayor consumo de fosfato bajo condiciones de acidificación.

Otra estrategia de aclimatación utilizada por *P. tricornutum* es la regulación del transporte activo y pasivo a través de las membranas, mediante la modificación de su composición en lípidos y la utilización de señales como el potencial de membrana y ácidos grasos libres para regular los transportadores. Estos cambios implican un mayor consumo de energía, lo cual requiere del aumento en la eficiencia fotosintética y direcciona la energía hacia estos procesos, además de almacenar parte de ella en forma de lípidos saturados y probablemente como carbohidratos también. Este aumento en la eficiencia fotosintética está contribuyendo con el incremento en el consumo de fosfato y hierro.

Los cambios observados se vieron respaldados en gran medida por la expresión diferencial de genes detectada, aunque es importante tener en cuenta que estos genes fueron obtenidos de bases de datos públicas, cuyos experimentos fueron diseñados con diferentes objetivos. Por lo tanto, es necesario seguir complementando con evidencia de experimentos diseñados para medir factores específicos considerando los diferentes estudios.

Finalmente, la acidificación oceánica podría tener impactos negativos en la cadena trófica marina debido a la reducción de ácidos grasos insaturados en las microalgas. Además, aunque se observó que *P. tricornutum* fue capaz de aclimatarse a un pH más ácido en condiciones de laboratorio gracias al aumento de su tasa fotosintética, el fitoplancton en el medio natural se encontraría con la limitante de la baja disponibilidad de hierro soluble, restringiendo su absorción que es necesaria en el proceso de la fotosíntesis. Sin embargo, dada la diversidad de especies en las comunidades de fitoplancton, es probable que existan otras especies con estrategias de aclimatación óptimas a las condiciones de acidificación.

10. LITERATURA CITADA

- Abram, N., Gattuso, J.P., Prakash, A., Cheng, L., Chidichimo, M.P., Crate, S., Enomoto, H., Garschagen, M., Gruber, N., Harper, S., Holland, E., Kudela, R.M., Rice, J., Steffen, K. y von Schuckmann, K. (2019). Framing and Context of the Report. En: Pörtner, H.O., Roberts, D.C., Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Tignor, M., Poloczanska, E., Mintenbeck, K., Alegría, A., Nicolai, M., Okem, A., Petzold, J., Rama, B. y Weyer, N.M. (eds), *IPCC special report on the ocean and cryosphere in a changing climate*. Cambridge University Press, pp 73-130
- Ait-Mohamed, O., Novák Vanclová, A.M.G., Joli, N., Liang, Y., Zhao, X., Genovesio, A., Tirichine, L., Bowler, C. y Dorrell, R.G. (2020). PhaeoNet: A holistic RNAseq-based portrait of transcriptional coordination in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Frontiers in Plant Science*, 11: 590949. doi: 10.3389/fpls.2020.590949
- Akramiene, D., Kondrotas, A., Didziapetriene, J. y Kevelaitis, E. (2007). Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)*, 43(8): 597-606
- Andersen, R.A., Berges, J.A., Harrison, P.J. y Watanabe, M.M. (2005). *Algal culturing techniques*. Elsevier, Burlington. ISBN: 0120884267
- Andrews, S. (2010). *FastQC a quality control tool for high throughput sequence data*. Disponible en: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. [consulta: 13 abril 2023]
- Arjona, O., Millan, A., Ibarra, A.M. y Palacios, E. (2008). Muscle and roe lipid composition in diploid and triploid scallops. *Journal of Food Lipids*, 15: 407-419
- Arredondo-Vega, B.O., Voltolina, D. y Cordero-Esquivel, B. (2017). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. En: Arredondo-Vega, B.O., Voltolina, D., Zenteno-Savín, T., Arce-Montoya, M. y Gómez-Anduro, G.A. (eds), *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgas*, 2.ª ed. CIBNOR, La Paz, pp 44-50
- Basu, S. y Mackey, K.R.M. (2018). Phytoplankton as key mediators of the biological carbon pump: Their responses to a changing climate. *Sustainability*, 10(3): 869-886. doi: 10.3390/su10030869
- Bautista-Chamizo, E., Sendra, M., Cid, Á., Seoane, M., De Orte, M.R. y Riba, I. (2018). Will temperature and salinity changes exacerbate the effects of seawater acidification on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*? *Science of the Total Environment*, 634: 87-94. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.314
- Bautista-Chamizo, E., Sendra, M., De Orte, M.R. y Riba, I. (2019). Comparative effects of seawater acidification on microalgae: Single and multispecies toxicity tests. *Science of the Total Environment*, 649: 224-232. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.225
- Bellou, S., Baeshen, M.N., Elazzazy, A.M., Aggeli, D., Sayegh, F. y Aggelis, G. (2014). Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, 32(8): 1476-1493. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.10.003
- Belton, D.J., Deschaume, O. y Perry, C.C. (2012). An overview of the fundamentals of the chemistry of silica with relevance to biosilicification and technological advances. *The FEBS Journal*, 279(10): 1710-1720. doi: 10.1111/J.1742-4658.2012.08531.X
- Bienert, G.P., Schjoerring, J.K. y Jahn, T.P. (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1758(8): 994-1003. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.02.015
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W.H., Pagès, F., Trajanoski, Z. y Galon, J. (2009). ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks.

- Bioinformatics*, 25(8): 1091-1093. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTP101
- Bisson, M.A. y Walker, N.A. (1981). The hyperpolarization of the chara membrane at high pH: Effects of external potassium, internal pH, and DCCD. *Journal of Experimental Botany*, 32(5): 951-971. doi: 10.1093/JXB/32.5.951
- Bolger, A.M., Lohse, M. y Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15): 2114. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTU170
- Borowitzka, M.A. (2018). The 'stress' concept in microalgal biology—homeostasis, acclimation and adaptation. *Journal of Applied Phycology*, 30(5): 2815-2825. doi: 10.1007/s10811-018-1399-0
- Borowitzka, M.A. y Volcani, B.E. (1978). The polymorphic diatom *Phaeodactylum tricornutum*: Ultrastructure of its morphotypes. *Journal of Phycology*, 14(1): 10-21. doi: 10.1111/J.1529-8817.1978.TB00625.X
- Bowler, C., Allen, A.E., Badger, J.H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., Ollilar, R.P., Rayko, E., Salamov, A., Vandepoele, K., Beszteri, B., Gruber, A., Heijde, M., Katinka, M., Mock, T., Valentin, K., Verret, F., Berges, J.A., Brownlee, C., Cadoret, J.P., Chiovitti, A., Choi, C.J., Coesel, S., De Martino, A., Detter, J.C., Durkin, C., Falciatore, A., Fournet, J., Haruta, M., Huysman, M.J.J., Jenkins, B.D., Jiroutova, K., Jorgensen, R.E., Joubert, Y., Kaplan, A., Kröger, N., Kroth, P.G., La Roche, J., Lindquist, E., Lommer, M., Martin-Jézéquel, V., Lopez, P.J., Lucas, S., Mangogna, M., McGinnis, K., Medlin, L.K., Montsant, A., Secq, M.P.O., Napoli, C., Obornik, M., Parker, M.S., Petit, J.L., Porcel, B.M., Poulsen, N., Robison, M., Rychlewski, L., Ryneerson, T.A., Schmutz, J., Shapiro, H., Siaut, M., Stanley, M., Sussman, M.R., Taylor, A.R., Vardi, A., von Dassow, P., Vyverman, W., Willis, A., Wyrwicz, L.S., Rokhsar, D.S., Weissenbach, J., Armbrust, E.V., Green, B.R., Van de Peer, Y. y Grigoriev, I.V. (2008). The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*, 456(7219): 239-244. doi: 10.1038/nature07410
- Cordoba, J., Perez, E., Van Vlierberghe, M., Bertrand, A.R., Lupo, V., Cardol, P. y Baurain, D. (2021). *De novo* transcriptome meta-assembly of the mixotrophic freshwater microalga *Euglena gracilis*. *Genes*, 12(6): 842. doi: 10.3390/genes12060842
- Cruz de Carvalho, M.H., Sun, H., Bowler, C. y Chua, N. (2016). Noncoding and coding transcriptome responses of a marine diatom to phosphate fluctuations. *New Phytologist*, 210(2): 497-510. doi: 10.1111/nph.13787
- Desingurajan, P., Dhamatharan, R. y Sankaran, B. (2018). Microalgal flora of karaneeswarar temple pond, Saidapet, Chennai. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Science*, 5(8): 507-519
- Dhillon, B.K., Smith, M., Baghela, A., Lee, A.H.Y. y Hancock, R.E.W. (2020). Systems biology approaches to understanding the human immune system. *Frontiers in Immunology*, 11: 1683. doi: 10.3389/fimmu.2020.01683
- Dogaris, I., Brown, T.R., Loya, B. y Philippidis, G. (2016). Cultivation study of the marine microalga *Picochlorum oculatum* and outdoor deployment in a novel bioreactor for high-density production of algal cell mass. *Biomass and Bioenergy*, 89: 11-23. doi: 10.1016/j.biombioe.2016.02.018
- Dorrell, R.G., Nisbet, R.E.R., Barbrook, A.C., Rowden, S.J.L. y Howe, C.J. (2019). Integrated genomic and transcriptomic analysis of the peridinin dinoflagellate *Amphidinium carterae* plastid. *Protist*, 170(4): 358-373. doi: 10.1016/j.protis.2019.06.001
- Ebenezer, T.E., Zoltner, M., Burrell, A., Nenarokova, A., Novák Vanclová, A.M.G., Prasad, B., Soukal, P., Santana-Molina, C., O'Neill, E., Nankissoor, N.N., Vadakedath, N.,

- Daiker, V., Obado, S., Silva-Pereira, S., Jackson, A.P., Devos, D.P., Lukeš, J., Lebert, M., Vaughan, S., Hampl, V., Carrington, M., Ginger, M.L., Dacks, J.B., Kelly, S. y Field, M.C. (2019). Transcriptome, proteome and draft genome of *Euglena gracilis*. *BMC Biology* 2019 17:1, 17(1): 1-23. doi: 10.1186/S12915-019-0626-8
- Eby, G.N. (2016). *Principles of environmental geochemistry*, 1.^a ed. Waveland Press, Illinois. ISBN: 9781478631644
- Espinoza-Gallardo, D., Contreras-Porcía, L. y Ehrenfeld, N. (2017). β -glucanos, su producción y propiedades en microalgas con énfasis en el género *Nannochloropsis* (Ochrophyta, Eustigmatales). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 52(1): 33-49. doi: 10.4067/S0718-19572017000100003
- Esterhuizen, T.M. y Thabane, L. (2016). Meta-analysis: some key limitations and potential solutions. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 31(6): 882-885. doi: 10.1093/NDT/GFW092
- Feijão, E., Gameiro, C., Franzitta, M., Duarte, B., Caçador, I., Cabrita, M.T. y Matos, A.R. (2017). Heat wave impacts on the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*: Searching for photochemical and fatty acid biomarkers of thermal stress. *Ecological Indicators*, 9: 1026-1037. doi: 10.1016/j.ecolind.2017.07.058
- Foo, S.C., Yusoff, F.M., Ismail, M., Basri, M., Yau, S.K., Khong, N.M.H., Chan, K.W. y Ebrahimi, M. (2017). Antioxidant capacities of fucoxanthin-producing algae as influenced by their carotenoid and phenolic contents. *Journal of Biotechnology*, 241: 175-183. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.11.026
- Fu, W., Dohai, B., El Assal, D.C., Daakour, S., Alzahmi, A., Nelson, D.R., Jaiswal, A., Mystikou, A., Sultana, M., Weston, J. y Salehi-Ashtiani, K. (2021). Protocol to generate and characterize biofouling transformants of a model marine diatom. *STAR Protocols*, 2(3): 100716. doi: 10.1016/J.XPRO.2021.100716
- Galès, A., Triplet, S., Geoffroy, T., Roques, C., Carré, C., Le Floc'h, E., Lanfranchi, M., Simier, M., Roque d'Orbcastel, E., Przybyla, C. y Fouilland, E. (2020). Control of the pH for marine microalgae polycultures: A key point for CO₂ fixation improvement in intensive cultures. *Journal of CO₂ Utilization*, 38: 187-193. doi: 10.1016/j.jcou.2020.01.019
- Garg, S., Jiang, C. y Waite, T.D. (2018). Impact of pH on iron redox transformations in simulated freshwaters containing natural organic matter. *Environmental Science and Technology*, 52(22): 13184-13194. doi: 10.1021/ACS.EST.8B03855
- Gattuso, J.P., Gao, K., Lee, K., Rost, B. y Schulz, K.G. (2011). Approaches and tools to manipulate the carbonate chemistry. En: Riebesell, U, Fabry, V.J., Hansson, L. y Gattuso, J.P. (eds) *Guide to best practices for ocean acidification research and data reporting*, 1.^a ed. Epoca, Luxembourg, pp 41-52
- Gattuso, J.P. y Lavigne, H. (2009). Technical Note: Approaches and software tools to investigate the impact of ocean acidification. *Biogeosciences*, 6(10): 2121-2133. doi: 10.5194/BG-6-2121-2009
- Ge, S.X., Son, E.W. y Yao, R. (2018). iDEP: An integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics* 2018 19:1, 19(1): 1-24. doi: 10.1186/S12859-018-2486-6
- Goldman, J.C., Dennett, M.R. y Riley, C.B. (1982). Effect of nitrogen-mediated changes in alkalinity on pH control and CO₂ supply in intensive microalgal cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 24(3): 619-631. doi: 10.1002/bit.260240308
- Gonçalves, A.L., Pires, J.C.M. y Simões, M. (2016). Biotechnological potential of *Synechocystis salina* co-cultures with selected microalgae and cyanobacteria: Nutrients removal, biomass and lipid production. *Bioresource Technology*, 200: 279-

286. doi: 10.1016/j.biortech.2015.10.023
- Guedes, A.C., Amaro, H.M. y Malcata, F.X. (2011). Microalgae as sources of carotenoids. *Marine Drugs*, 9(4): 625-644. doi: 10.3390/md9040625
- Guillard, R.R.L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: *Culture of marine invertebrate animals*. Springer, US, pp 29-60
- Hamilton, M.L., Haslam, R.P., Napier, J.A. y Sayanova, O. (2014). Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricornutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Metabolic Engineering*, 22: 3-9. doi: 10.1016/j.ymben.2013.12.003
- Hashimoto, M. y Hossain, S. (2018). Fatty acids: From membrane ingredients to signaling molecules. En: Waisundara, V.Y. y Blumenberg M. (eds), *Biochemistry and health benefits of fatty acids*. IntechOpen
- Hazen, T.C. (2019). Environmental systems biology approach to bioremediation. En: Hurst C.J. (ed), *Advances in environmental microbiology*, vol 6, 1.^a ed. Springer, Cham, pp 103-127
- Hendrix, J.E. (1967). The effect of pH on the uptake and accumulation of phosphate and sulfate ions by bean plants. *American Journal of Botany*, 54(5): 560-564. doi: 10.2307/2440659
- Hildebrand, M., Lerch, S.J.L. y Shrestha, R.P. (2018). Understanding diatom cell wall silicification-moving forward. *Frontiers in Marine Science*, 5: 125. doi: 10.3389/FMARS.2018.00125
- Hoek, C.V.D, Mann, D.G. y Jahns, H.M. (1995). *Algae : An introduction to phycology*. Cambridge University Press, Cambridge . ISBN: 9780521316873
- Huang, R., Ding, J., Gao, K., Cruz de Carvalho, M.H., Tirichine, L., Bowler, C. y Lin, X. (2019). A potential role for epigenetic processes in the acclimation response to elevated pCO₂ in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Frontiers in Microbiology*, 9: 3342. doi: 10.3389/fmicb.2018.03342
- Ihnken, S., Beardall, J., Kromkamp, J.C., Serrano, C.G., Torres, M.A., Masojídek, J., Malpartida, I., Abdala, R., Jerez, C.G., Malapascua, J.R., Navarro, E., Rico, R.M., Peralta, E., Ezequil, J.P.F. y Figueroa, F.L. (2014). Light acclimation and pH perturbations affect photosynthetic performance in chlorella mass culture. *Aquatic Biology*, 22: 95-110. doi: 10.3354/ab00586
- IPCC. (2019). Technical Summary. En: Portner, H.O., Roberts, D.C., Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Tignor, M., Poloczanska, E., Minterbeck, K., Nicolai, M., Okem, A., Petzold J., Rama, B. y Weyer, N. (eds). *IPCC special report on the ocean and cryosphere in a changing climate*. In Press
- Ismail, M.M.S., El-Ayouty, Y.M. y Piercey-Normore, M. (2016). Role of pH on antioxidants production by *Spirulina (Arthrospira) platensis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2): 298. doi: 10.1016/J.BJM.2016.01.003
- Janssen, M. (2016). Microalgal photosynthesis and growth in mass culture. *Advances in Chemical Engineering*, 48: 185-256. doi: 10.1016/BS.ACHE.2015.11.001
- Khan, M.I., Shin, J.H. y Kim, J.D. (2018). The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, 17(1): 1-21. doi: 10.1186/s12934-018-0879-x
- Kim, D., Perteza, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R. y Salzberg, S.L. (2013). TopHat2: Accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*, 14(4): 1-13. doi: 10.1186/GB-2013-14-4-R36
- Kräbs, G. y Büchel, C. (2011). Temperature and salinity tolerances of geographically

- separated *Phaeodactylum tricornutum* Böhlin strains: Maximum quantum yield of primary photochemistry, pigmentation, proline content and growth. *Botanica Marina*, 54(3): 231-241. doi: 10.1515/BOT.2011.03
- Kumari, P., Bijo, A.J., Mantri, V.A., Reddy, C.R.K. y Jha, B. (2013). Fatty acid profiling of tropical marine macroalgae: An analysis from chemotaxonomic and nutritional perspectives. *Phytochemistry*, 86: 44-56. doi: 10.1016/J.PHYTOCHEM.2012.10.015
- Levering, J., Broddrick, J., Dupont, C.L., Peers, G., Beerli, K., Mayers, J., Gallina, A.A., Allen, A.E., Palsson, B.O. y Zengler, K. (2016). Genome-scale model reveals metabolic basis of biomass partitioning in a model diatom. *PLOS ONE*, 11(5): e0155038. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0155038
- Levering, J., Dupont, C.L., Allen, A.E., Palsson, B.O. y Zengler, K. (2017). Integrated regulatory and metabolic networks of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* predict the response to rising CO₂ levels. *mSystems*, 2(1). doi: 10.1128/MSYSTEMS.00142-16
- Levine, I.A. (2018). Algae: A way of life and health. En: Levine, I.A. y Fleurence, J. (eds) *Microalgae in health and disease prevention*, 1.^a ed. Elsevier, Londres, pp 1-10
- Li, W., Gao, K. y Beardall, J. (2012). Interactive effects of ocean acidification and nitrogen-limitation on the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLOS ONE*, 7(12): e51590. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0051590
- Lora-Vilchis, M.C., Mendoza-Carrión, G. y Hernández-Herrera, R. (2017). Determinación de nitratos, nitritos, fosfatos, silicatos y hierro por micrométodos espectrofotométricos. En: Arredondo-Vega, B.O., Voltolina, D., Zenteno-Savín, T., Arce-Montoya, M. y Gómez-Anduro, G.A. (eds), *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*, 2.^a ed. CIBNOR, La Paz, pp 61-72
- Love, M.I., Huber, W. y Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12): 1-21. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
- Lukaves. (2014). Marine food chain. En: depositphotos.com. Disponible en: <https://mx.depositphotos.com/38572381/stock-illustration-marine-food-chain.html>. [consulta: 5 noviembre 2018]
- Lupette, J., Jaussaud, A., Vigor, C., Oger, C., Galano, J.M., Réversat, G., Vercauteren, J., Jouhet, J., Durand, T. y Maréchal, E. (2018). Non-enzymatic synthesis of bioactive isoprostanooids in the diatom *Phaeodactylum* following oxidative stress. *Plant Physiology*, 178(3): 1344-1357. doi: 10.1104/pp.18.00925
- Maes, A., Martínez, X., Druart, K., Laurent, B., Guégan, S., Marchand, C.H., Lemaire, S.D. y Baaden, M. (2018). MinOmics, an integrative and immersive tool for multi-omics analysis. *Journal of integrative bioinformatics*, 15(2). doi: 10.1515/jib-2018-0006
- Martins-Santana, L., Nora, L.C., Sanches-Medeiros, A., Lovate, G.L., Murilo, M.H. y Silva-Rocha, R. (2018). Systems and synthetic biology approaches to engineer fungi for fine chemical production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6. doi: 10.3389/FBIOE.2018.00117
- Masojídek, J., Ranglová, K., Lakatos, G.E., Benavides, A.M.S. y Torzillo, G. (2021). Variables governing photosynthesis and growth in microalgae mass cultures. *Processes* 2021, 9(5): 820. doi: 10.3390/PR9050820
- Masojídek, J., Torzillo, G. y Koblížek, M. (2013). Photosynthesis in microalgae. En: Richmond, A. y Qiang, H. (eds), *Handbook of microalgal culture*, 2.^a ed. John Wiley & Sons, Ltd, Oxford, UK, pp 21-36
- McCarthy, J.K., Smith, S.R., McCrow, J.P., Tan, M., Zheng, H., Beerli, K., Roth, R., Lichtle, C., Goodenough, U., Bowler, C.P., Dupont, C.L. y Allen, A.E. (2017). Nitrate reductase

- knockout uncouples nitrate transport from nitrate assimilation and drives repartitioning of carbon flux in a model pennate diatom. *The Plant Cell*, 29(8): 2047-2070. doi: 10.1105/tpc.16.00910
- McFadden, G.I. (2001). Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *Journal of Phycology*, 37(6): 951-959. doi: 10.1046/j.1529-8817.2001.01126.x
- McKinley, G.A., Fay, A.R., Eddebbar, Y.A., Gloege, L. y Lovenduski, N.S. (2020). External forcing explains recent decadal variability of the ocean carbon sink. *AGU Advances*, 1(2). doi: 10.1029/2019AV000149
- Mercado, J.M. (2002). Ecofisiología y bomba biológica en el océano. *Interciencia*, 27(10): 537-543
- Morisse, S., Michelet, L., Bedhomme, M., Marchand, C.H., Calvaresi, M., Trost, P., Fermani, S., Zaffagnini, M. y Lemaire, S.D. (2014). Thioredoxin-dependent redox regulation of chloroplastic phosphoglycerate kinase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*, 289(43): 30012-30024. doi: 10.1074/jbc.M114.597997
- Morozova, O., Hirst, M. y Marra, M.A. (2009). Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 10(1): 135-151. doi: 10.1146/annurev-genom-082908-145957
- Mus, F., Toussaint, J.P., Cooksey, K.E., Fields, M.W., Gerlach, R., Peyton, B.M. y Carlson, R.P. (2013). Physiological and molecular analysis of carbon source supplementation and pH stress-induced lipid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(8): 3625-3642. doi: 10.1007/s00253-013-4747-7
- Nakamura, M.T. y Nara, T.Y. (2004). Structure, function, and dietary regulation of $\Delta 6$, $\Delta 5$, and $\Delta 9$ desaturases. *Annual Review of Nutrition*, 24: 345-376. doi: 10.1146/annurev.nutr.24.121803.063211
- Nelson, D.M., Riedel, G.F., Millan-Nunez, R. y Lara-Lara, J.R. (1984). Silicon uptake by algae with no known Si requirement. I. True cellular uptake and pH-induced precipitation by *Phaeodactylum tricornutum* (bacillariophyceae) and *Platymonas* sp. (prasinophyceae). *Journal of Phycology*, 20(1): 141-147. doi: 10.1111/j.0022-3646.1984.00141.x
- Nguyen, B.T. y Rittmann, B.E. (2015). Predicting dissolved inorganic carbon in photoautotrophic microalgae culture via the nitrogen source. *Environmental Science and Technology*, 49(16): 9826-9831. doi: 10.1021/acs.est.5b01727
- O'Neill, E.C., Trick, M., Hill, L., Rejzek, M., Dusi, R.G., Hamilton, C.J., Zimba, P.V., Henrissat, B. y Field, R.A. (2015). The transcriptome of *Euglena gracilis* reveals unexpected metabolic capabilities for carbohydrate and natural product biochemistry. *Molecular BioSystems*, 11(10): 2808-2820. doi: 10.1039/C5MB00319A
- Orefice, I., Musella, M., Smerilli, A., Sansone, C., Chandrasekaran, R., Corato, F. y Brunet, C. (2019). Role of nutrient concentrations and water movement on diatom's productivity in culture. *Scientific Reports*, 9(1): 1-10. doi: 10.1038/s41598-018-37611-6
- Palacios, E., Racotta, I.S., Kraffe, E., Marty, Y., Moal, J. y Samain, J.F. (2005). Lipid composition of the giant lion's-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) in relation to gametogenesis. *Aquaculture*, 250(1-2): 270-282. doi: 10.1016/J.AQUACULTURE.2005.04.070
- Panahi, B., Farhadian, M. y Hejazi, M.A. (2020). Systems biology approach identifies functional modules and regulatory hubs related to secondary metabolites accumulation after transition from autotrophic to heterotrophic growth condition in

- microalgae. *PLOS ONE*, 15(2): e0225677. doi: 10.1371/journal.pone.0225677
- Pérez-Pérez, M.E., Mauriès, A., Maes, A., Tourasse, N.J., Hamon, M., Lemaire, S.D. y Marchand, CH. (2017). The deep thioredoxome in *Chlamydomonas reinhardtii*: New insights into redox regulation. *Molecular Plant*, 10(8): 1107-1125. doi: 10.1016/J.MOLP.2017.07.009
- Petrou, K., Baker, K.G., Nielsen, D.A., Hancock, A.M., Schulz, K.G. y Davidson, A.T. (2019). Acidification diminishes diatom silica production in the Southern Ocean. *Nature Climate Change*, 9(10): 781-786. doi: 10.1038/s41558-019-0557-y
- Petrou, S., Ordway, R.W., Kirber, M.T., Dopico, A.M., Hamilton, J.A., Walsh, J.V. y Singer, J.J. (1995). Direct effects of fatty acids and other charged lipids on ion channel activity in smooth muscle cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 52(2-3): 173-178. doi: 10.1016/0952-3278(95)90018-7
- Pulz, O. y Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6): 635-648. doi: 10.1007/s00253-004-1647-x
- Queiroz, M.I., Hornes, M.O., da Silva-Manetti, A.G. y Jacob-Lopes, E. (2011). Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. *Applied Energy*, 88(10): 3438-3443. doi: 10.1016/J.APENERGY.2010.12.047
- Rana, M.S. y Prajapati, S.K. (2021). Resolving the dilemma of iron bioavailability to microalgae for commercial sustenance. *Algal Research*, 59: 102458. doi: 10.1016/J.ALGAL.2021.102458
- Rastogi, A., Maheswari, U., Dorrell, R.G., Vieira, F.R.J., Maumus, F., Kustka, A., McCarthy, J., Allen, A.E., Kersey, P., Bowler, C. y Tirichine, L. (2018). Integrative analysis of large scale transcriptome data draws a comprehensive landscape of *Phaeodactylum tricornutum* genome and evolutionary origin of diatoms. *Scientific Reports*, 8(1): 4834. doi: 10.1038/s41598-018-23106-x
- Raven, J.A. y Geider, R.J. (2003). Adaptation, acclimation and regulation in algal photosynthesis. En: Larkum, A.W.D (ed), *Photosynthesis in algae*, 1.^a ed. Springer, Piscataway, NJ, USA, pp 385-412
- Rebnegger, C., Vos, T., Graf, A.B., Valli, M., Pronk, J.T., Daran-Lapujade, P. y Mattanovich, D. (2016). *Pichia pastoris* exhibits high viability and a low maintenance energy requirement at near-zero specific growth rates. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(15): 4570-4583. doi: 10.1128/AEM.00638-16
- Russek, M. y Cabanac, M. (1990). *Regulación y control en biología*, 1.^a ed. IPN, México, D.F. ISBN: 9682926734
- Sabir, J.S.M., Theriot, E.C., Manning, S.R., Al-Malki, A.L., Khiyami, M.A., Al-Ghamdi, A.K., Sabir, M.J., Romanovicz, D.K., Hajrah, N.H., El-Omri, A., Jansen, R.K. y Ashworth, M.P. (2018). Phylogenetic analysis and a review of the history of the accidental phytoplankton, *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (Bacillariophyta). *PLoS ONE*, 13(6): e0196744. doi: 10.1371/journal.pone.0196744
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A. y Bell, J.G. (1997). Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, 155(1-4): 117-127. doi: 10.1016/S0044-8486(97)00122-1
- Schmitz, G. y Ecker, J. (2008). The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 47(2): 147-155. doi: 10.1016/j.plipres.2007.12.004
- Schoffman, H., Lis, H., Shaked, Y. y Keren, N. (2016). Iron-nutrient interactions within phytoplankton. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1223. doi: 10.3389/FPLS.2016.01223
- Scholz, B. (2014). Effects of varying pH on the growth and physiology of five marine

- microphytobenthic diatoms isolated from the Solthörn tidal flat (southern North Sea, Germany). *Phycologia*, 53(3): 252-264. doi: 10.2216/13-240.1
- Smallwood, C., Chen, J.H., Kumar, N., Chrisler, W., Purvine, S., Kyle, J., Nicora, C., Boudreau, R., Ekman, A., Hixson, K., Moore, R., McDermott, G., Cannon, W. y Evans, J. (2018). Integrated systems biology and imaging of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri*. *bioRxiv*: 293704. doi: 10.1101/293704
- Smith, S.R., Gillard, J.T.F., Kustka, A.B., McCrow, J.P., Badger, J.H., Zheng, H., New, A.M., Dupont, C.L., Obata, T., Fernie, A.R. y Allen, A.E. (2016). Transcriptional orchestration of the global cellular response of a model pennate diatom to diel light cycling under iron limitation. *PLoS Genetics*, 12(12): e1006490. doi: 10.1371/journal.pgen.1006490
- Song, M., Pei, H., Hu, W., Han, F., Ji, Y., Ma, G. y Han, L. (2014). Growth and lipid accumulation properties of microalgal *Phaeodactylum tricornutum* under different gas liquid ratios. *Bioresource Technology*, 165: 31-37. doi: 10.1016/j.biortech.2014.03.070
- Sosdian, S.M., Greenop, R., Hain, M.P., Foster, G.L., Pearson, P.N. y Lear, C.H. (2018). Constraining the evolution of Neogene ocean carbonate chemistry using the boron isotope pH proxy. *Earth and Planetary Science Letters*, 498: 362-376. doi: 10.1016/j.epsl.2018.06.017
- Soumya, G.N., Manickavasagam, M., Santhanam, P., Kumar, S.D. y Prabhavathi, P. (2015). Removal of phosphate and nitrate from aqueous solution using seagrass *Cymodocea rotundata* beads. *African Journal of Biotechnology*, 14(16): 1393-1400. doi: 10.5897/AJB2015.14468
- Spilling, K., Brynjólfssdóttir, Á., Enss, D., Rischer, H. y Svavarsson, H.G. (2013). The effect of high pH on structural lipids in diatoms. *Journal of Applied Phycology*, 25(5): 1435-1439. doi: 10.1007/s10811-012-9971-5
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S. y Mesirov, J.P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43): 15545-15550. doi: 10.1073/PNAS.0506580102
- Sutak, R., Botebol, H., Blaiseau, P.L., Léger, T., Bouget, F.Y., Camadro, J.M. y Lesuisse, E. (2012). A comparative study of iron uptake mechanisms in marine microalgae: Iron binding at the cell surface is a critical step. *Plant Physiology*, 160(4): 2271-2284. doi: 10.1104/pp.112.204156
- Tan, M.H., Smith, S.R., Hixson, K.K., Tan, J., McCarthy, J.K., Kustka, A.B. y Allen, A.E. (2020). The importance of protein phosphorylation for signaling and metabolism in response to diel light cycling and nutrient availability in a marine diatom. *Biology*, 9(7): 1-25. doi: 10.3390/biology9070155
- Tavassoly, I., Goldfarb, J. y Iyengar, R. (2018). Systems biology primer: The basic methods and approaches. *Essays in Biochemistry*, 62(4): 487-500. doi: 10.1042/EBC20180003
- Tesson, B., Gaillard, C. y Martin-Jézéquel, V. (2009). Insights into the polymorphism of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Botanica Marina*, 52(2): 104-116. doi: 10.1515/BOT.2009.012
- Tréguer, P.J. y de la Rocha, C.L. (2013). The world ocean silica cycle. *Annual Review of Marine Science*, 5(1): 477-501. doi: 10.1146/annurev-marine-121211-172346
- Uddin, S., Bebehani, M., Al-Musallam, L., Kumar, VV. y Sajid, S. (2020). Po uptake in microalgae at different seawater pH: An experimental study simulating ocean acidification. *Marine Pollution Bulletin*, 151: 110844. doi:

- 10.1016/j.marpolbul.2019.110844
- Valenzuela, A., Valenzuela, R., Sanhueza, J., de la Barra, F. y Morales, G. (2014). Fosfolípidos de origen marino: una nueva alternativa para la suplementación con ácidos grasos omega-3. *Revista Chilena de Nutrición*, 41(4): 433-438. doi: 10.4067/S0717-75182014000400013
- Vega-Moreno, D., Santana, R., Rodríguez, C., Rueda-López, M.J. y Gelado-Caballero, M.D. (2012). *La química de la vida*, 1.^a ed. PLOCAN, Canarias. ISBN: 9788469538197
- Virgen-Félix, M. y Lora-Vilchis, M.C. (2017). Aislamiento, purificación y mantenimiento de cepas. En: Arredondo-Vega, B.O., Voltolina, D., Zenteno-Savín, T., Arce-Montoya, M. y Gómez-Anduro, G.A. (eds), *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*, 2.^a ed. CIBNOR, La Paz, pp 33-43
- Virta, L. y Teittinen, A. (2022). Threshold effects of climate change on benthic diatom communities: Evaluating impacts of salinity and wind disturbance on functional traits and benthic biomass. *Science of The Total Environment*, 826: 154130. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.154130
- Vrana, I., Gašparović, B., Geček, S., Godrijan, J., Novak, T., Kazazić, S.P., Mlakar, M., Kužat, N., Pfannkuchen, M. y Pfannkuchen, D.M. (2023). Successful acclimation of marine diatoms *Chaetoceros curvisetus/pseudocurvisetus* to climate change. *Limnology and Oceanography*, 9999: 1-16. doi: 10.1002/LNO.12293
- Wannicke, N., Frey, C., Law, C.S. y Voss, M. (2018). The response of the marine nitrogen cycle to ocean acidification. *Global Change Biology*, 24(11): 5031-5043. doi: 10.1111/GCB.14424
- Wilkie, A.C., Edmundson, S.J. y Duncan, J.G. (2011). Indigenous algae for local bioresource production: Phycoprospecting. *Energy for Sustainable Development*, 15(4): 365-371. doi: 10.1016/j.esd.2011.07.010
- WoRMS Editorial Board. (2023). World register of marine species - *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, 1897. Disponible en: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=175584>. [consulta: 28 abril 2023]
- Wostrikoff, K. y Mackinder, L.C.M. (2023). Rubisco and inorganic carbon assimilation. En: Grossman, A.R. y Wollman, F.A. (eds), *The Chlamydomonas sourcebook vol. 2*, 3.^a ed. Academic Press, pp 223-271
- Xu, D., Schaum, C.E., Li, B., Chen, Y., Tong, S., Fu, F.X., Hutchins, D.A., Zhang, X., Fan, X., Han, W., Wang, Y. y Ye, N. (2021). Acclimation and adaptation to elevated pCO₂ increase arsenic resilience in marine diatoms. *The ISME Journal*, 15(6): 1599-1613. doi: 10.1038/s41396-020-00873-y
- Yangüez, K., Lovazzano, C., Contreras-Porcia, L. y Ehrenfeld, N. (2015). Response to oxidative stress induced by high light and carbon dioxide (CO₂) in the biodiesel producer model *Nannochloropsis salina* (Ochrophyta, Eustigmatales). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 50: 163-175. doi: 10.4067/S0718-19572015000200003
- Yi, Z., Xu, M., Di, X., Brynjolfsson, S. y Fu, W. (2017). Exploring valuable lipids in diatoms. *Frontiers in Marine Science*, 4: 1-10. doi: 10.3389/fmars.2017.00017
- Ying, K., Gilmour, D.J. y Zimmerman, W.B. (2014). Effects of CO₂ and pH on growth of the microalga *Dunaliella salina*. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 6(3): 167-173. doi: 10.4172/1948-5948.1000138
- Yoshida, Y., Tomiyama, T., Maruta, T., Tomita, M., Ishikawa, T. y Arakawa, K. (2016). De novo assembly and comparative transcriptome analysis of *Euglena gracilis* in response to anaerobic conditions. *BMC Genomics*, 17(1): 1-10. doi: 10.1186/S12864-

016-2540-6

- Yuan, H., Zhang, X., Jiang, Z., Wang, X., Chen, X., Cao, L. y Zhang, X. (2019). Analyzing the effect of pH on microalgae adhesion by identifying the dominant interaction between cell and surface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 177: 479-486. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.02.023
- Yue, R. y Dutta, A. (2022). Computational systems biology in disease modeling and control, review and perspectives. *npj Systems Biology and Applications*, 8(1): 1-16. doi: 10.1038/s41540-022-00247-4
- Zaffagnini, M., Bedhomme, M., Groni, H., Marchand, C.H., Puppo, C., Gontero, B., Cassier-Chauvat, C., Decottignies, P. y Lemaire, S.D. (2012). Glutathionylation in the photosynthetic model organism *Chlamydomonas reinhardtii*: A proteomic survey. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(2): M111.014142. doi: 10.1074/mcp.M111.014142
- Zar, J. (2010). Simple linear regression. En: *Biostatistical analysis*, 5.^a ed. Pearson Prentice Hall, New Jersey, pp 328-362
- Zhang, M., Zhen, Y., Mi, T. y Lin, S. (2021a). Integrated transcriptome sequencing (RNA-seq) and proteomic studies reveal resource reallocation towards energy metabolism and defense in *Skeletonema marinoi* in response to CO₂ increase. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(5): 1-23. doi: 10.1128/AEM.02614-20
- Zhang, S., Yu, Z., Gong, X., Wang, Y., Chang, F., Lohmman, G., Qi, Y. y Li, T. (2021b). Precession cycles of the El Niño/Southern oscillation-like system controlled by Pacific upper-ocean stratification. *Communications Earth & Environment* 2021 2:1, 2(1): 1-10. doi: 10.1038/s43247-021-00305-5
- Zhang, W. (2019). Effect of long-term high CO₂ environment on gene expression of *Phaeodactylum tricornutum*. *Sin publicar*
- Zhang, Y., Parmigiani, G. y Johnson, W.E. (2020). ComBat-seq: batch effect adjustment for RNA-seq count data. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 2(3). doi: 10.1093/NARGAB/LQAA078
- Zhao, P., Gu, W., Wu, S., Huang, A., He, L., Xie, X., Gao, S., Zhang, B., Niu, J., Peng Lin, A. y Wang, G. (2014). Silicon enhances the growth of *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin under green light and low temperature. *Scientific Reports*, 4(1): 1-10. doi: 10.1038/srep03958

11. ANEXOS

Anexo A. Formulación del Medio f/2 de Guillard

(Guillard, 1975; Andersen *et al.*, 2005)

Las siguientes soluciones stock se añaden al agua de mar filtrada y estéril. Las soluciones stock de metales traza y vitaminas se deben preparar por separado con las formulaciones indicadas.

Compuesto	Fórmula	Solución stock (g L ⁻¹ dH ₂ O)	Cantidad utili zada
Nitrato de sodio	NaNO ₃	75.0	1 mL
Fosfato de sodio dibásico	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5.0	1 mL
Metasilicato de sodio	Na ₂ SiO ₃	30.0	1 mL
Solución Stock de metales traza ^a	-	-	1 mL
Solución Stock de Vitaminas ^b	-	-	0.5 mL
^a Solución Stock de metales traza			
EDTA	-	-	4.36 g
Cloruro férrico hexahidratado	FeCl ₃ ·6H ₂ O	-	3.15 g
Cloruro de manganeso tetrahidratado	MnCl ₂ ·4H ₂ O	180.0	1 mL
Sulfato de zinc	ZnSO ₄	22.0	1 mL
Cloruro cobaltoso hexahidratado	CoCl ₂ ·6H ₂ O	10.0	1 mL
Sulfato cúprico pentahidratado	CuSO ₄ ·5H ₂ O	9.8	1 mL
Molibdato de sodio dihidratado	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	6.3	1 mL
^b Solución Stock de Vitaminas			
Tiamina	-	-	0.2 g
Cianocobalamina	-	1.0	1 mL
Biotina	-	1.0	1 mL

Anexo B. Componentes utilizados en la construcción del pH-stat

Partes y materiales	Unidades
Atlas scientific pH kit-101p	1
Batería CR2032	1
Cable de alimentación computadora 2.5m	1
Cable dúplex para bocina, 18awg	2
Cable extensión de tarjeta TF a SD	1
Cable multiconductor 6 vías, 24awg	2
Contacto polarizado para chasis	1
Electroválvula 3/8" 120v	1
Elegoo Arduino ide mega 2560	1
Eliminador regulador 3-12 VCC 2.5 a	1
Gabinete plástico de 22.3x9.2x14cm	1
Jack invertido de 2.1mm para chasis	1
Juego 80 cables tipo DuPont de 15cm	2
LED de 5 mm, color rojo	1
LED de 5 mm, color verde	1
Módulo de entrada AC con fusible	1
Módulo RTC DS3231	1
Pantalla LCD 2x16	1
Placa fenólica perforada 4.5x4.5cm	2
Placa fenólica perforada 7.5x4.5cm	2
Porta led para montaje de 5mm	2
Registrador de datos microSD (data logger)	1
Resistencias	6
Switch miniatura de balancín 1 polo 1 tiro	1
Switch miniatura de palanca, 1 polo, 2 tiros, 2 posiciones	1
Switch miniatura push normalmente abierto	1
Tarjeta microSD 8gb	1
Teclado numérico matricial 4 x 4	1
Termofit 1/4"	5
Termofit 3/16"	5
Tira doble de 36 pines para circuitos	2
Tubo de 17gr de soldadura	1
Ventilador plástico de 2", 12vcc	1

Anexo C. Lista de términos ontológicos enriquecidos a nivel de procesos biológicos

Groups	Term	Nr. Genes	Principal regulation
1	carbohydrate metabolic process	10	Up
2	transmembrane transport	37	None
3	DNA-templated transcription initiation	3	Down
4	one-carbon metabolic process	3	Up
5	microtubule-based movement	7	Up
6	nucleotide-sugar metabolic process	3	Up
7	intracellular signal transduction	5	Up
8	cellular catabolic process	7	None
9	monocarboxylic acid metabolic process	6	Up
9	pyruvate metabolic process	3	Up
10	protein maturation	4	Down
10	protein processing	4	Down
11	protein modification by small protein conjugation or removal	5	Down
11	protein modification by small protein conjugation	5	Down
11	protein ubiquitination	5	Down
12	protein-DNA complex organization	5	Down
12	chromatin organization	5	Down
12	chromatin remodeling	5	Down
13	RNA processing	15	Down
13	mRNA metabolic process	5	Down
13	mRNA processing	4	Down
13	RNA splicing	4	Down
13	RNA splicing, via transesterification reactions	3	Down
13	RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile	3	Down
13	mRNA splicing, via spliceosome	3	Down
14	sulfur compound metabolic process	8	Up
14	sulfur compound biosynthetic process	4	Up
14	aspartate family amino acid metabolic process	4	Up
14	alpha-amino acid metabolic process	13	None
14	organic acid biosynthetic process	10	None
14	carboxylic acid biosynthetic process	10	None
14	amino acid biosynthetic process	8	None
14	alpha-amino acid biosynthetic process	8	None
15	inorganic molecular entity transmembrane transporter activity	10	Up
15	inorganic anion transport	6	Up
15	inorganic cation transmembrane transport	6	Up
15	primary active transmembrane transporter activity	4	Up
15	inorganic anion transmembrane transporter activity	3	Up
15	inorganic ion transmembrane transport	10	None
15	active transmembrane transporter activity	10	None
15	secondary active transmembrane transporter activity	6	None

16	amine metabolic process	4	Down
16	biogenic amine metabolic process	4	Down
16	amine biosynthetic process	4	Down
16	biogenic amine biosynthetic process	4	Down
16	aromatic amino acid metabolic process	3	Down
16	aromatic amino acid family biosynthetic process	3	Down
16	organic acid biosynthetic process	10	None
16	carboxylic acid biosynthetic process	10	None
16	amino acid biosynthetic process	8	None
16	alpha-amino acid biosynthetic process	8	None
17	generation of precursor metabolites and energy	16	Up
17	energy derivation by oxidation of organic compounds	7	Up
17	cellular respiration	7	Up
17	tricarboxylic acid cycle	6	Up
17	aerobic respiration	6	Up
17	photosynthesis	5	Up
17	photosynthesis, light reaction	5	Up
17	photosynthesis, light harvesting	5	Up
17	electron transport chain	5	None
17	electron transfer activity	5	None
18	phosphorus metabolic process	35	Up
18	phosphate-containing compound metabolic process	33	Up
18	phosphorylation	17	Up
18	carbohydrate derivative metabolic process	15	Up
18	nucleobase-containing small molecule metabolic process	15	Up
18	protein phosphorylation	12	Up
18	nucleoside phosphate metabolic process	10	Up
18	nucleotide metabolic process	10	Up
18	purine-containing compound metabolic process	6	Up
18	purine nucleotide metabolic process	6	Up
18	ribose phosphate metabolic process	5	None
18	ribonucleotide metabolic process	5	None
18	purine ribonucleotide metabolic process	5	None
19	organelle organization	15	Up
19	chromosome organization	10	Up
19	sulfur compound metabolic process	8	Up
19	sulfur compound biosynthetic process	4	Up
19	aspartate family amino acid metabolic process	4	Up
19	cellular component biogenesis	13	Down
19	ncRNA processing	11	Down
19	cellular component assembly	9	Down
19	ribonucleoprotein complex biogenesis	7	Down
19	ribosome biogenesis	6	Down
19	iron-sulfur cluster assembly	3	Down
19	metallo-sulfur cluster assembly	3	Down

19	rRNA processing	3	Down
19	rRNA metabolic process	3	Down
19	cellular component organization	26	None
20	organelle organization	15	Up
20	chromosome organization	10	Up
20	cell cycle process	6	Up
20	chromosome segregation	6	Up
20	organelle fission	6	Up
20	mitotic cell cycle	5	Up
20	mitotic cell cycle process	5	Up
20	nuclear chromosome segregation	5	Up
20	mitotic nuclear division	5	Up
20	sister chromatid segregation	5	Up
20	mitotic sister chromatid segregation	5	Up
20	nuclear division	5	Up
20	chromosome condensation	5	Up
20	mitotic chromosome condensation	3	Up
20	cellular component organization	26	None
21	aspartate family amino acid metabolic process	4	Up
21	organonitrogen compound biosynthetic process	34	Down
21	amino acid metabolic process	23	Down
21	amino acid activation	7	Down
21	tRNA aminoacylation	7	Down
21	tRNA aminoacylation for protein translation	7	Down
21	aromatic amino acid metabolic process	3	Down
21	aromatic amino acid family biosynthetic process	3	Down
21	organic acid metabolic process	31	None
21	oxoacid metabolic process	31	None
21	carboxylic acid metabolic process	31	None
21	alpha-amino acid metabolic process	13	None
21	small molecule biosynthetic process	12	None
21	organic acid biosynthetic process	10	None
21	carboxylic acid biosynthetic process	10	None
21	amino acid biosynthetic process	8	None
21	alpha-amino acid biosynthetic process	8	None
22	cellular biosynthetic process	57	Down
22	gene expression	48	Down
22	cellular nitrogen compound biosynthetic process	48	Down
22	nucleic acid metabolic process	46	Down
22	RNA metabolic process	42	Down
22	organonitrogen compound biosynthetic process	34	Down
22	amino acid metabolic process	23	Down
22	amide metabolic process	19	Down
22	ncRNA metabolic process	18	Down
22	amide biosynthetic process	17	Down

22	peptide metabolic process	16	Down
22	translation	15	Down
22	peptide biosynthetic process	15	Down
22	RNA processing	15	Down
22	tRNA metabolic process	15	Down
22	ncRNA processing	11	Down
22	tRNA processing	8	Down
22	amino acid activation	7	Down
22	RNA modification	7	Down
22	tRNA aminoacylation	7	Down
22	tRNA aminoacylation for protein translation	7	Down
22	tRNA modification	5	Down
22	mRNA processing	4	Down
22	RNA splicing	4	Down
22	RNA methylation	3	Down
22	rRNA processing	3	Down
22	rRNA metabolic process	3	Down
22	organic acid metabolic process	31	None
22	oxoacid metabolic process	31	None
22	carboxylic acid metabolic process	31	None
23	DNA-binding transcription factor activity	11	Up
23	transcription regulator activity	11	Up
23	cellular nitrogen compound metabolic process	78	Down
23	cellular aromatic compound metabolic process	69	Down
23	organic cyclic compound metabolic process	69	Down
23	heterocycle metabolic process	68	Down
23	nucleobase-containing compound metabolic process	62	Down
23	cellular biosynthetic process	57	Down
23	gene expression	48	Down
23	cellular nitrogen compound biosynthetic process	48	Down
23	nucleic acid metabolic process	46	Down
23	RNA metabolic process	42	Down
23	macromolecule biosynthetic process	34	Down
23	organonitrogen compound biosynthetic process	34	Down
23	regulation of metabolic process	21	Down
23	regulation of macromolecule metabolic process	21	Down
23	regulation of nitrogen compound metabolic process	20	Down
23	regulation of primary metabolic process	20	Down
23	regulation of gene expression	20	Down
23	amide metabolic process	19	Down
23	ncRNA metabolic process	18	Down
23	amide biosynthetic process	17	Down
23	RNA biosynthetic process	17	Down
23	DNA-templated transcription	17	Down
23	peptide metabolic process	16	Down

23	translation	15	Down
23	peptide biosynthetic process	15	Down
23	RNA processing	15	Down
23	tRNA metabolic process	15	Down
23	regulation of protein metabolic process	7	Down
23	amino acid activation	7	Down
23	tRNA aminoacylation	7	Down
23	tRNA aminoacylation for protein translation	7	Down
23	regulation of amide metabolic process	6	Down
23	post-transcriptional regulation of gene expression	6	Down
23	regulation of translation	6	Down
23	translational initiation	5	Down
23	translation regulator activity	5	Down
23	transcription by RNA polymerase II	5	Down
23	translation factor activity, RNA binding	5	Down
23	translation initiation factor activity	5	Down
23	translation regulator activity, nucleic acid binding	5	Down
23	organic cyclic compound biosynthetic process	31	None
23	aromatic compound biosynthetic process	30	None
23	regulation of biosynthetic process	19	None
23	regulation of cellular metabolic process	19	None
23	regulation of macromolecule biosynthetic process	19	None
23	regulation of cellular biosynthetic process	19	None
23	regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	13	None
23	regulation of RNA metabolic process	13	None
23	regulation of RNA biosynthetic process	13	None
23	regulation of DNA-templated transcription	13	None

Anexo D. Genes de los 30 procesos biológicos enriquecidos con mayor significancia

tRNA aminoacylation for protein translation

PHATR3_EG01923 GLURS_2 PHATR3_EG02219 PHATR3_EG02310 PHATR3_EG02368 PHATR3_EG02402
 PHATR3_EG02403 PHERS PHATR3_J11088 PHATR3_J11722 PHATR3_J15186 PHATR3_J15374
 PHATR3_J15481 PHATR3_J15595 PHATR3_J16944 PHATR3_J16963 PHATR3_J17198
 PHATR3_J18524 PHATR3_J18911 PHATR3_J19761 PHATR3_J21513 PHATR3_J23547
 PHATR3_J23920 PHATR3_J25331 PHATR3_J26346 PHATR3_J27385 PHATR3_J27709
 PHATR3_J29029 PHATR3_J29824 PHATR3_J30572 PHATR3_J32202 PHATR3_J33493
 PHATR3_J35813 PHATR3_J36013 PHATR3_J41016 PHATR3_J42051 PHATR3_J42247
 PHATR3_J43016 PHATR3_J43097 PHATR3_J44207 PHATR3_J44902 PHATR3_J47999
 PHATR3_J50885 PHATR3_J51120 GLURS_1 PHATR3_J7426 PHATR3_JDRAFT552
 PHATR3_JDRAFT780

Amino acid activation

PHATR3_EG01923 GLURS_2 PHATR3_EG02219 PHATR3_EG02310 PHATR3_EG02368 PHATR3_EG02402
 PHATR3_EG02403 PHERS PHATR3_J11088 PHATR3_J11722 PHATR3_J15186 PHATR3_J15374
 PHATR3_J15481 PHATR3_J15595 PHATR3_J16944 PHATR3_J16963 PHATR3_J17198
 PHATR3_J18524 PHATR3_J18911 PHATR3_J19761 PHATR3_J21513 PHATR3_J23547
 PHATR3_J23920 PHATR3_J25331 PHATR3_J26346 PHATR3_J27385 PHATR3_J27709
 PHATR3_J29029 PHATR3_J29824 PHATR3_J30572 PHATR3_J32202 PHATR3_J33493
 PHATR3_J35813 PHATR3_J36013 PHATR3_J41016 PHATR3_J42051 PHATR3_J42247
 PHATR3_J43016 PHATR3_J43097 PHATR3_J44207 PHATR3_J44902 PHATR3_J47999
 PHATR3_J50885 PHATR3_J51120 GLURS_1 PHATR3_J7426 PHATR3_JDRAFT552
 PHATR3_JDRAFT780

tRNA aminoacylation

PHATR3_EG01923 GLURS_2 PHATR3_EG02219 PHATR3_EG02310 PHATR3_EG02368 PHATR3_EG02402
 PHATR3_EG02403 PHERS PHATR3_J11088 PHATR3_J11722 PHATR3_J15186 PHATR3_J15374
 PHATR3_J15481 PHATR3_J15595 PHATR3_J16944 PHATR3_J16963 PHATR3_J17198
 PHATR3_J18524 PHATR3_J18911 PHATR3_J19761 PHATR3_J21513 PHATR3_J23547
 PHATR3_J23920 PHATR3_J25331 PHATR3_J26346 PHATR3_J27385 PHATR3_J27709
 PHATR3_J29029 PHATR3_J29824 PHATR3_J30572 PHATR3_J32202 PHATR3_J33493
 PHATR3_J35813 PHATR3_J36013 PHATR3_J41016 PHATR3_J42051 PHATR3_J42247
 PHATR3_J43016 PHATR3_J43097 PHATR3_J44207 PHATR3_J44902 PHATR3_J47999
 PHATR3_J50885 PHATR3_J51120 GLURS_1 PHATR3_J7426 PHATR3_JDRAFT552
 PHATR3_JDRAFT780

NcRNA processing

PHATR3_EG00556 PHATR3_EG01448 PHATR3_EG01456 PHATR3_EG01622 PHATR3_EG01671
 PHATR3_EG01741 PHATR3_EG02198 PHATR3_EG02304 PHATR3_EG02385 PHERS
 PHATR3_J11003 PHATR3_J11850 PHATR3_J12384 RPC11 PHATR3_J13537 PHATR3_J14149
 PHATR3_J14552 PHATR3_J15294 PHATR3_J15848 PHATR3_J16162 PHATR3_J16814
 PHATR3_J16911 PHATR3_J17059 PHATR3_J17115 PHATR3_J17628 PHATR3_J19122
 PHATR3_J19579 PHATR3_J22774 PHATR3_J23375 PHATR3_J24792 PHATR3_J26057
 PHATR3_J26780 PHATR3_J27263 PHATR3_J28331 PHATR3_J3015 PHATR3_J3052 PHATR3_J31364
 PHATR3_J31663 PHATR3_J32726 PHATR3_J33186 PHATR3_J3334 PHATR3_J33584
 PHATR3_J34229 PHATR3_J34373 PHATR3_J36014 PHATR3_J36534 PHATR3_J3687
 PHATR3_J37266 PHATR3_J37585 PHATR3_J40360 PHATR3_J4127 PHATR3_J42495
 PHATR3_J42563 PHATR3_J42959 PHATR3_J43183 PHATR3_J43387 PHATR3_J43431
 PHATR3_J43446 PHATR3_J43579 PHATR3_J43626 PHATR3_J43627 PHATR3_J43859
 PHATR3_J44373 PHATR3_J44394 PHATR3_J44702 PHATR3_J45108 PHATR3_J45238
 PHATR3_J45251 PHATR3_J45482 PHATR3_J45626 PHATR3_J46408 PHATR3_J46676
 PHATR3_J46712 PHATR3_J4674 PHATR3_J46895 PHATR3_J4708 PHATR3_J47120 PHATR3_J47122
 PHATR3_J47280 PHATR3_J47281 PHATR3_J47471 PHATR3_J47935 PHATR3_J47967
 PHATR3_J48200 PHATR3_J48376 PHATR3_J48395 PHATR3_J48587 PHATR3_J5546 PHATR3_J9197
 PHATR3_J9987 PHATR3_JDRAFT1812

tRNA processing

PHATR3_EG00556 PHATR3_EG01448 PHATR3_EG01456 PHATR3_EG02198 PHATR3_EG02304
 PHATR3_EG02385 PHERS PHATR3_J11850 PHATR3_J12384 RPC11 PHATR3_J14552
 PHATR3_J15294 PHATR3_J15848 PHATR3_J16162 PHATR3_J16911 PHATR3_J17115

PHATR3_J17628 PHATR3_J19579 PHATR3_J23375 PHATR3_J24792 PHATR3_J26057
 PHATR3_J26780 PHATR3_J28331 PHATR3_J3015 PHATR3_J3052 PHATR3_J31364 PHATR3_J32726
 PHATR3_J3334 PHATR3_J33584 PHATR3_J34229 PHATR3_J34373 PHATR3_J36534 PHATR3_J3687
 PHATR3_J37266 PHATR3_J37585 PHATR3_J40360 PHATR3_J4127 PHATR3_J42563
 PHATR3_J42959 PHATR3_J43183 PHATR3_J43387 PHATR3_J43431 PHATR3_J43446
 PHATR3_J43627 PHATR3_J43859 PHATR3_J44373 PHATR3_J45108 PHATR3_J45251
 PHATR3_J45626 PHATR3_J46408 PHATR3_J46676 PHATR3_J46712 PHATR3_J4674 PHATR3_J4708
 PHATR3_J47120 PHATR3_J47122 PHATR3_J47280 PHATR3_J47281 PHATR3_J47471
 PHATR3_J47935 PHATR3_J47967 PHATR3_J48200 PHATR3_J48395 PHATR3_J9987
 PHATR3_JDRAFT1812

RNA modification

PHATR3_EG00081 PHATR3_EG00556 PHATR3_EG01448 PHATR3_EG02137 PHATR3_EG02148
 PHATR3_EG02304 PHATR3_EG02385 PHATR3_J11003 PHATR3_J11041 PHATR3_J11965
 PHATR3_J12586 PHATR3_J12940 PHATR3_J13294 PHATR3_J13537 PHATR3_J13855
 PHATR3_J14067 PHATR3_J14552 PHATR3_J14856 PHATR3_J15666 PHATR3_J15952
 PHATR3_J15960 PHATR3_J17059 PHATR3_J17115 PHATR3_J17628 PHATR3_J19122
 PHATR3_J19579 PHATR3_J20773 PHATR3_J20893 PHATR3_J24792 PHATR3_J26057
 PHATR3_J26780 PHATR3_J28331 PHATR3_J3015 PHATR3_J3052 PHATR3_J31364 PHATR3_J3334
 PHATR3_J34229 PHATR3_J34373 PHATR3_J36014 PHATR3_J3687 PHATR3_J37266
 PHATR3_J37585 PHATR3_J40360 PHATR3_J41079 PHATR3_J4127 PHATR3_J42844
 PHATR3_J42959 PHATR3_J43071 PHATR3_J43387 PHATR3_J43431 PHATR3_J43446
 PHATR3_J43627 PHATR3_J43859 PHATR3_J44334 PHATR3_J44373 PHATR3_J44702
 PHATR3_J44844 PHATR3_J45108 PHATR3_J45251 PHATR3_J45482 PHATR3_J46408
 PHATR3_J46577 PHATR3_J46712 PHATR3_J47122 PHATR3_J47471 PHATR3_J47695
 PHATR3_J47935 PHATR3_J47967 PHATR3_J48200 PHATR3_J48756 PHATR3_J49419
 PHATR3_J49451 PHATR3_J49487 PHATR3_J49741 PHATR3_J5217 PHATR3_J8000 PHATR3_J8859
 PHATR3_J9197 PHATR3_J9987 PHATR3_JDRAFT1563 PHATR3_JDRAFT1812

Movement of cell or subcellular component

PT-KIF10 PT-KIF7 PT-KIF9 PHATR3_J13169 PT-KIF14 PHATR3_J15853 PHATR3_J17300 PT-KIF2 KRP2 PT-KIF-1
 PT-KIF4 DHC1 PT-KIF3 PHATR3_J48134 PHATR3_J49712 PT-KIF13 PT-KIF5 PT-KIF12

Microtubule-based movement

PT-KIF10 PT-KIF7 PT-KIF9 PHATR3_J13169 PT-KIF14 PHATR3_J15853 PHATR3_J17300 PT-KIF2 KRP2 PT-KIF-1
 PT-KIF4 DHC1 PT-KIF3 PHATR3_J48134 PHATR3_J49712 PT-KIF13 PT-KIF5 PT-KIF12

Microtubule-based process

PHATR3_EG01017 PT-KIF10 PT-KIF7 PT-KIF9 PHATR3_J13169 PHATR3_J14426 PHATR3_J14995 PT-KIF14
 PHATR3_J15853 PHATR3_J16008 PHATR3_J17300 PT-KIF2 PHATR3_J21122 KRP2 PT-KIF-1 PT-KIF4
 DHC1 PHATR3_J37835 PHATR3_J42361 PHATR3_J43122 GAMMA-TUB PHATR3_J44333
 PHATR3_J45285 PT-KIF3 PHATR3_J48134 PHATR3_J49712 PHATR3_J49794 PHATR3_J54534 PT-
 KIF13 PT-KIF5 PT-KIF12

Nuclear division

PHATR3_EG01464 PT-MAD1 PHATR3_EG02609 PHATR3_J10954 SMC2 PHATR3_J36284 PHATR3_J36771
 APC8 PHATR3_J43362 PHATR3_J43664 SMC RAT1 PHATR3_J45354 PHATR3_J45765
 PHATR3_J48922 PHATR3_J49507 PT-MAD2 PHATR3_J52425 SMC3 PHATR3_JDRAFT1590

Energy derivation by oxidation of organic compounds

PHATR3_EG01459 PTPEPC1 PHATR3_J10356 PHATR3_J11305 PHATR3_J26290 PHATR3_J26921 PTPEPC2
 OGD1 PHATR3_J30145 FUM PHATR3_J40430 SDH1 SCS-ALPHA PHATR3_J42245 MDH
 PHATR3_J45017 PHATR3_J46133 PHATR3_J46387 PHATR3_J48444 PHATR3_J49313
 PHATR3_J50392 SDH2 MS

Cellular respiration

PHATR3_EG01459 PTPEPC1 PHATR3_J10356 PHATR3_J11305 PHATR3_J26290 PHATR3_J26921 PTPEPC2
 OGD1 PHATR3_J30145 FUM PHATR3_J40430 SDH1 SCS-ALPHA PHATR3_J42245 MDH
 PHATR3_J45017 PHATR3_J46133 PHATR3_J46387 PHATR3_J48444 PHATR3_J49313
 PHATR3_J50392 SDH2 MS

Tricarboxylic acid cycle

PTPEPC1 PHATR3_J10356 PHATR3_J26290 PHATR3_J26921 PTPEPC2 OGD1 PHATR3_J30145 FUM
 PHATR3_J40430 SDH1 SCS-ALPHA MDH PHATR3_J45017 PHATR3_J46387 PHATR3_J48444
 PHATR3_J50392 SDH2 MS

Protein-chromophore linkage

PHATR3_EG00416 LHCF17 PHATR3_EG02552 LHCR1 PHATR3_J13877 LHCR6 LHCR14 LHCR13 LHCR5
 LHCF12 LHCR10 PHATR3_J17531 LHCR4 LHCF1 LHCR7 CPD1 LHCF10 LHCF8 LHCF13 LHCR2 LHCR11
 PHATR3_J24119 LHCF4 FCPB LHCF14 LHCX1 LHCF9 LHCF6 LHCF5 LHCR8 LHCF16 LHCX4
 PHATR3_J42519 LHCX3 LHCF15 LHCF4 LHCF11 LHCR12 DPH1 PHATR3_J54342 PHATR3_J55091
 PHATR3_J6062 LHCR3

Mitotic nuclear division

PHATR3_EG01464 PT-MAD1 PHATR3_EG02609 PHATR3_J10954 SMC2 PHATR3_J36284 APC8
 PHATR3_J43362 PHATR3_J43664 SMC RAT1 PHATR3_J45354 PHATR3_J45765 PHATR3_J48922
 PHATR3_J49507 PT-MAD2 PHATR3_J52425 SMC3 PHATR3_JDRAFT1590

Mitotic sister chromatid segregation

PHATR3_EG01464 PT-MAD1 PHATR3_EG02609 PHATR3_J10954 SMC2 PHATR3_J36284 APC8
 PHATR3_J43362 PHATR3_J43664 SMC RAT1 PHATR3_J45354 PHATR3_J45765 PHATR3_J48922
 PHATR3_J49507 PT-MAD2 SMC3 PHATR3_JDRAFT1590

Aerobic respiration

PTPEPC1 PHATR3_J10356 PHATR3_J11305 PHATR3_J26290 PHATR3_J26921 PTPEPC2 OGD1
 PHATR3_J30145 FUM PHATR3_J40430 SDH1 SCS-ALPHA MDH PHATR3_J45017 PHATR3_J46133
 PHATR3_J46387 PHATR3_J48444 PHATR3_J50392 SDH2 MS

Photosynthesis, light harvesting

PHATR3_EG00416 LHCF17 PHATR3_EG02404 PHATR3_EG02552 LHCR1 PHATR3_J13877 LHCR6 LHCR14
 LHCR13 LHCR5 LHCF12 LHCR10 PHATR3_J17531 LHCR4 LHCF1 LHCR7 LHCF10 LHCF8 LHCF13
 LHCR2 LHCR11 PHATR3_J24119 LHCF4 FCPB LHCF14 LHCX1 LHCF9 LHCF6 LHCF5 LHCR8 LHCF16
 LHCX4 PHATR3_J42519 LHCX3 LHCF15 LHCF4 LHCF11 LHCR12 PHATR3_J6062 LHCR3

Cell division

APC11 PHATR3_J11084 PHATR3_J11634 PHATR3_J17300 PHATR3_J32412 PHATR3_J35642
 PHATR3_J36284 APC8 PHATR3_J41214 PHATR3_J43019 PHATR3_J43122 PHATR3_J43664 SMC
 PHATR3_J44858 PHATR3_J45765 PHATR3_J46838 APC2 PHATR3_J48922 PHATR3_J4896
 PHATR3_J50520 PT-MAD2 SMC3 PHATR3_JDRAFT1590

Mitotic cell cycle process

RAD51-G1 PHATR3_EG01464 PT-MAD1 PHATR3_EG02609 PHATR3_J10954 PHATR3_J12339
 PHATR3_J17300 SMC2 PHATR3_J36284 PHATR3_J37655 PHATR3_J38878 APC8 PHATR3_J43362
 PHATR3_J43664 SMC PHATR3_J44199 RAT1 PHATR3_J45354 PHATR3_J45765 PHATR3_J47439
 PHATR3_J48922 PHATR3_J49507 PT-MAD2 PHATR3_J52425 SMC3 PHATR3_JDRAFT1590

Sister chromatid segregation

PHATR3_EG01464 PT-MAD1 PHATR3_EG02609 PHATR3_J10954 SMC2 PHATR3_J36284 APC8
 PHATR3_J43362 PHATR3_J43664 SMC PHATR3_J44595 RAT1 PHATR3_J45354 PHATR3_J45765
 PHATR3_J48922 PHATR3_J49507 PT-MAD2 SMC3 SMC5 PHATR3_JDRAFT1590

Nuclear chromosome segregation

PHATR3_EG01464 PT-MAD1 PHATR3_EG02609 PHATR3_J10954 SMC2 PHATR3_J36284 APC8
 PHATR3_J43362 PHATR3_J43664 SMC PHATR3_J44595 RAT1 PHATR3_J45354 PHATR3_J45765
 PHATR3_J48922 PHATR3_J49507 PT-MAD2 SMC3 SMC5 PHATR3_JDRAFT1590

Mitotic cell cycle

RAD51-G1 PHATR3_EG01464 PT-MAD1 PHATR3_EG02609 PHATR3_J10954 PHATR3_J12339
 PHATR3_J17300 SMC2 PHATR3_J36284 PHATR3_J37655 PHATR3_J38878 APC8 PHATR3_J43019
 PHATR3_J43362 PHATR3_J43664 SMC PHATR3_J44199 RAT1 PHATR3_J45354 PHATR3_J45765
 PHATR3_J47439 PHATR3_J48922 PHATR3_J49507 PHATR3_J50520 PT-MAD2 PHATR3_J52425
 SMC3 PHATR3_JDRAFT1590

Photosynthesis, light reaction

PHATR3_EG00416 LHCF17 PHATR3_EG02404 PHATR3_EG02552 LHCR1 PHATR3_J13877 LHCR6 LHCR14
 LHCR13 LHCR5 LHCF12 LHCR10 PHATR3_J17531 LHCR4 LHCF1 LHCR7 PSBO LHCF10 LHCF8 LHCF13
 LHCR2 LHCR11 PHATR3_J24119 LHCF4 FCPB LHCF14 PSBU LHCX1 LHCF9 LHCF6 LHCF5 LHCR8
 LHCF16 PHATR3_J36840 PHATR3_J37918 PHATR3_J37959 LHCX4 PHATR3_J42519
 PHATR3_J42543 LHCX3 PHATR3_J44748 LHCF15 LHCF4 LHCF11 LHCR12 PSBM PHATR3_J6062

PHATR3_J9078 LHCR3

Chromosome segregation

PHATR3_EG01464 PT-MAD1 PHATR3_EG02609 PHATR3_J10954 PHATR3_J12339 SMC2 PHATR3_J36284
 APC8 PHATR3_J43362 PHATR3_J43664 SMC PHATR3_J44595 RAT1 PHATR3_J45354
 PHATR3_J45765 PT-SEPARASE PHATR3_J48922 PHATR3_J49507 PT-MAD2 SMC3 SMC5
 PHATR3_JDRAFT1590

Cell cycle process

PHATR3_EG01017 RAD51-G1 PHATR3_EG01464 PT-MAD1 PHATR3_EG02609 PHATR3_J10954
 PHATR3_J11634 PHATR3_J12339 PHATR3_J17300 SMC2 PHATR3_J34514 PHATR3_J36284
 PHATR3_J36771 PHATR3_J37655 PHATR3_J38878 APC8 PHATR3_J42808 PHATR3_J43122
 PHATR3_J43362 PHATR3_J43614 PHATR3_J43664 SMC PHATR3_J44199 PHATR3_J44595 RAT1
 PHATR3_J45354 PHATR3_J45765 PHATR3_J47439 PHATR3_J48922 PHATR3_J4896
 PHATR3_J49507 PT-MAD2 PHATR3_J51040 PHATR3_J52425 SMC3 SMC5 PHATR3_JDRAFT1590

Glycolytic process

PFK_1 GPI_3 PFK_2 PFK1 PHATR3_J14792 PHATR3_J15495 GPI_2 PGAM_4 PHATR3_J18228 GAPC1 PK1-2
 PK5 FBAC2 GAPDH_3 GPI_1 TPI/GAPC3 FBA3 PGK1 GAPC4 PGAM_6 FBAC5 PHATR3_J41515 FBA4
 PGK PK2 PHATR3_J50738 PGAM_1 TIM_1 PK3 PDHA1 PK6 PHATR3_J55126 PGAM_5 PGAM_3
 PHATR3_J5857 PGAM_2 PHATR3_JDRAFT1572 FBAC1

ATP generation from ADP

PFK_1 GPI_3 PFK_2 PFK1 PHATR3_J14792 PHATR3_J15495 GPI_2 PGAM_4 PHATR3_J18228 GAPC1 PK1-2
 PK5 FBAC2 GAPDH_3 GPI_1 TPI/GAPC3 FBA3 PGK1 GAPC4 PGAM_6 FBAC5 PHATR3_J41515 FBA4
 PGK PK2 PHATR3_J50738 PGAM_1 TIM_1 PK3 PDHA1 PK6 PHATR3_J55126 PGAM_5 PGAM_3
 PHATR3_J5857 PGAM_2 PHATR3_JDRAFT1572 FBAC1

Photosynthesis

PHATR3_EG00416 LHCF17 PHATR3_EG02404 PHATR3_EG02552 PHATR3_J10100 PRK LHCR1
 PHATR3_J12155 CHLH PHATR3_J13877 LHCR6 LHCR14 LHCR13 LHCR5 LHCF12 LHCR10
 PHATR3_J17531 LHCR4 LHCF1 LHCR7 PSBO LHCF10 LHCF8 LHCF13 LHCR2 LHCR11 PHATR3_J24119
 LHCF4 FCPB LHCF14 PSBU LHCX1 LHCX9 LHCX6 LHCX5 PHATR3_J31683 LHCR8 PHATR3_J33017
 PHATR3_J33844 LHCF16 PHATR3_J35510 PHATR3_J36840 PHATR3_J37918 PHATR3_J37959
 LHCX4 PHATR3_J42519 PHATR3_J42543 PHATR3_J43164 PHATR3_J43698 PHATR3_J43945 LHCX3
 PHATR3_J44748 PHATR3_J48359 LHCF15 PHATR3_J49743 LHCF4 LHCF11 LHCR12 OEE3 PSBM
 PHATR3_J6062 PHATR3_J9078 LHCR3

Organelle fission

PHATR3_EG01464 PT-MAD1 PHATR3_EG02270 PHATR3_EG02609 PHATR3_J10954 SMC2 PHATR3_J36284
 PHATR3_J36771 APC8 PHATR3_J43362 PHATR3_J43664 SMC PHATR3_J44128 RAT1
 PHATR3_J45354 PHATR3_J45765 PHATR3_J48922 PHATR3_J49399 PHATR3_J49507 PT-MAD2
 PHATR3_J52425 SMC3 PHATR3_JDRAFT1590