

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

CICESE© 2025. Todos los derechos reservados

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Efecto del aumento de CO₂ en la composición
bioquímica, fotosíntesis y respuesta del transcriptoma
de un cultivo de *Chaetoceros* sp. y su posible impacto en
la calidad nutricional**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestra en Ciencias

Presenta:

Zaira Hernández Guzmán

Ensenada, Baja California, México
2025

Tesis defendida por
Zaira Hernández Guzmán

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Codirectora de tesis

Dr. Armando Mendoza Flores
Codirector de tesis

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera



Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz
Coordinadora del Posgrado en Ciencias en Acuicultura

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta Zaira Hernández Guzmán como requisito parcial para la obtención de grado de Maestra en Ciencias en Acuicultura

Efecto del aumento de CO₂ en la composición bioquímica, fotosíntesis y respuesta del transcriptoma de un cultivo de *Chaetoceros* sp. y su posible impacto en la calidad nutricional

Resumen aprobado por:

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Codirectora de tesis

Dr. Armando Mendoza Flores
Codirector de tesis

Las emisiones de CO₂ antropogénico son absorbidas en un 28% por el océano, lo que incrementa la concentración de pCO₂ en el agua y reduce el pH (acidificación del océano), debido a esto, las diatomeas son afectadas en su abundancia, composición y, en consecuencia, el flujo de nutrientes en la red trófica. Debido a que los efectos del aumento de CO₂ son específicos para cada especie de diatomea, las investigaciones que describen el efecto la acidificación sobre diatomeas locales de importancia económica y ecológica respecto a la calidad nutricional son necesarias. El presente trabajo evaluó la respuesta de *Chaetoceros* sp. en cultivos con aumento de CO₂ (pH 7.8, CA), en comparación con un cultivo control sin adición de CO₂ (CC). Cada tratamiento contó con tres repeticiones y se evaluaron las variables fisiológicas: crecimiento, composición proximal, perfil de ácidos grasos y fotosíntesis. Los datos se analizaron estadísticamente con la prueba ANCOVA y prueba *t* con un 95% de confianza. Además, se realizó el análisis del transcriptoma de cada tratamiento por secuenciación RNA-Seq de Illumina y análisis bioinformáticos para complementar las respuestas de las variables obtenidas. En condiciones de CA, *Chaetoceros* sp. aumentó su tasa de crecimiento y densidad celular, acompañadas de la reducción del peso por célula (pg cel⁻¹) y en la capacidad fotosintética. Por otro lado, la calidad nutricional de las células se conservó ya que no existió cambio en la concentración de proteínas, además de que se registró un aumento en el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). De acuerdo con el análisis transcriptómico de *Chaetoceros* sp. en CA los genes expresados diferencialmente indican una respuesta específica con ajustes puntuales en genes asociados a las rutas metabólicas de fotosíntesis, ciclo de Calvin, metabolismo energético y metabolismo de ácidos grasos, que generaron un mecanismo de adaptación por compensación estructural de las membranas celulares y en el fotosistema II frente al aumento de CO₂ durante cuatro días de cultivo. La habilidad de *Chaetoceros* sp. para reconfigurar el metabolismo sin perder valor nutricional sugiere que podría mantener su funcionalidad y persistencia en futuros escenarios de cambio climático.

Palabras clave: *Chaetoceros*, CO₂, transcriptoma, composición proximal, ácidos grasos

Abstract of the thesis presented by Zaira Hernández Guzmán as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture

Effect of increased CO₂ on the biochemical composition, photosynthesis, and transcriptomic response of a *Chaetoceros* sp. culture and its potential impact on nutritional quality

Abstract approved by:

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Thesis Director

Dr. Armando Mendoza Flores
Thesis Director

Anthropogenic CO₂ emissions are absorbed by the ocean at a rate of about 28%, which increases the pCO₂ concentration in seawater and lowers pH (ocean acidification). As a result, diatoms are affected in their abundance, composition, and consequently in the flow of nutrients through the food web. Since the effects of elevated CO₂ are species-specific, studies describing the impact of acidification on local diatoms of ecological and economic importance with respect to nutritional quality are needed. This study evaluated the response of *Chaetoceros* sp. under elevated CO₂ conditions (pH 7.8, CA), compared to a control culture without CO₂ addition (CC). Each treatment included three replicates, and physiological variables were assessed, including growth, proximate composition, fatty acid profile, and photosynthesis. Data were statistically analyzed using ANCOVA and t-tests with a 95% confidence. Additionally, transcriptome analysis was performed for each treatment via Illumina RNA-Seq and bioinformatic analysis to complement the responses observed in the physiological variables. Under CA conditions, *Chaetoceros* sp. showed increased growth rate and cell density, accompanied by reduced cell weight (pg cell⁻¹) and decreased photosynthetic capacity. However, the nutritional quality of the cells was maintained, as protein concentration did not change, and an increase in the proportion of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) was observed. Transcriptomic analysis of *Chaetoceros* sp. under CA revealed differentially expressed genes indicating a specific response, with targeted adjustments in genes associated with photosynthesis pathways, the Calvin cycle, energy metabolism, and fatty acid metabolism. These changes generated an adaptive mechanism through structural compensation of cell membranes and photosystem II in response to elevated CO₂ over four days of cultivation. The ability of *Chaetoceros* sp. to reconfigure its metabolism without losing nutritional value suggests that it could maintain functionality and persistence under future climate change scenarios.

Keywords: *Chaetoceros*, CO₂, transcriptome, proximal composition, fatty acids

Dedicatoria

Al amor de mi vida, mi esposo Saúl, por brindarme su apoyo incondicional de principio a fin, incluso a la distancia. Gracias a su compañía aprendí que el amor y la felicidad son pilares esenciales para alcanzar cualquier objetivo.

A mis amigos Ann, Jesús, Raúl, Melany, Greta y Juan Pablo quienes me acompañaron en los momentos cotidianos, en los días de alegría y también frente a las adversidades. Con ustedes esta experiencia se transformó en algo mucho más valioso de lo que alguna vez imaginé.

Agradecimientos

A la Secretaria de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada para realizar mis estudios de posgrado con CVU: 1286770. También por el financiamiento por parte del proyecto “Calentamiento global: Respuestas ecofisiológicas de diatomeas frente a la acidificación oceánica” de la convocatoria Ciencia de Fronteras 2023-2024, con numero de referencia CBF:2023-2024-763

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al Departamento de Acuicultura por aceptarme en el posgrado y permitirme hacer uso de la infraestructura durante la realización de mis estudios de maestría.

A mis codirectores, la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra por aceptarme en el laboratorio de Biotecnología de Algas, confiar en mis habilidades y brindarme todas las oportunidades para contribuir con mi formación académica. Al Dr. Armando Mendoza Flores por su disposición para orientarme, escucharme y enseñarme en cada paso del proyecto, así como por su compañerismo más allá del ámbito académico.

A mi comité, el Dr. Juan Pablo Lazo Corvera por su disposición y comentarios que enriquecieron mi conocimiento y me permitieron concluir el proyecto. A la Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez por su tiempo, conocimientos y por permitirme trabajar en el laboratorio de Genómica Funcional e integrarme a las reuniones de su grupo de trabajo.

A la Dra. Ceres Anabel Molina Cárdenas por su disposición y apoyo durante mi estancia en el laboratorio de Biotecnología de Algas. A mis compañeras de laboratorio Fátima por sus enseñanzas y su tiempo para que aprendiera las técnicas necesarias para el desarrollo del proyecto. A Noelia por brindarme la información necesaria para la cuantificación de ácidos grasos. A Sashenka por su contribución con la información de la cepa para los antecedentes.

A la Dra. Edna Sánchez Castrejón por brindarme el apoyo necesario durante el proceso de extracción de RNA en el laboratorio de Genómica Funcional. A la Dra. Paulina Mejía Ruiz por sus conocimientos para el análisis bioinformático de secuencias y por su contribución para la purificación de las muestras de RNA.

A todos los compañeros en las reuniones de Labmeeting: Roberto, Cesar, Sadot, Alexis, Roman, Mayela y Lorena por sus consejos durante mis presentaciones y por darme un lugar extra para conocer sobre otros proyectos y diferentes dinámicas de trabajo en el ambiente académico.

Al Dr. Salvador Villasuso Palomares por su asesoría sobre la dinámica de CO₂ en el océano y sus consejos para desarrollar el diseño experimental.

Al Dr. Miguel Ángel del Río Portilla por su apoyo y enseñanzas desde el inicio de mi estancia en la maestría además de su ayuda para los análisis estadísticos.

A la Dra. Beatriz Cordero Esquivel por sus conocimientos en la materia de Cultivo de microalgas, con las cuales obtuve bases más sólidas para el desarrollo de mis habilidades técnicas, las cuales hicieron una diferencia durante el desarrollo de mi proyecto. Además, por brindarme su apoyo y motivación en todo momento.

Al M. en C. Abelardo Campos Espinoza y al Dr. Lazo por permitirme utilizar el cromatógrafo de gases del laboratorio de Nutrición Acuícola.

A todos los Drs que fueron mis profesores en todos los cursos que tomé, me brindaron muchos conocimientos, experiencias y aprendizajes.

Al personal administrativo del departamento de acuicultura, especialmente las secretarias Dalila, Ceci y Bibi. Además del personal de intendencia y vigilancia dentro de CICESE.

A mis compañeros de generación que se volvieron mis mejores amigos en esta etapa: Anallely, Jesús, Raúl, Melany y Greta. Gracias por los equipos que formamos, las tareas que hicimos y el apoyo en el laboratorio durante mis experimentos.

Tabla de contenido

	Página
Resumen español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	3
1.1.1 Efecto del aumento de CO ₂ en especies de diatomeas.....	3
1.1.2 Estudios fisiológicos y transcriptómicos en especies de <i>Chaetoceros</i>	5
1.1.3 <i>Chaetoceros</i> sp.	6
1.2 Justificación.....	7
1.3 Hipótesis.....	8
1.4 Objetivos	8
1.4.1 Objetivo general	8
Capítulo 2. Metodología	9
2.1 Cultivos de <i>Chaetoceros</i> sp.	9
2.1.1 Mantenimiento rutinario de cultivos de <i>Chaetoceros</i> sp.	9
2.1.2 Cultivos experimentales	9
2.2 Análisis de las variables de respuesta.....	12
2.2.1 Parámetros de crecimiento	12
2.2.2 Composición proximal.....	14
2.2.3 Perfil de ácidos grasos	14
2.2.4 Pigmentos y fotosíntesis.....	15

2.2.5	Análisis del transcriptoma	16
2.3	Análisis estadístico	18
Capítulo 3. Resultados		19
3.1	Ensayo preliminar para mantener un pH de 7.80 en cultivos de <i>Chaetoceros</i> sp.	19
3.2	Determinación de pCO ₂ en cultivos de <i>Chaetoceros</i> sp.	20
3.3	pH, temperatura e inyección de CO ₂	20
3.4	Variables de crecimiento	22
3.4.1	Densidad celular y parámetros poblacionales	22
3.4.2	Tamaño celular	23
3.4.3	Biomasa	24
3.5	Composición proximal.....	26
3.6	Perfil de ácidos grasos.....	26
3.7	Pigmentos y fotosíntesis	29
3.8	Transcriptoma	31
3.8.1	Extracción RNA	31
3.8.2	Calidad de las lecturas y ensamblaje <i>de novo</i>	31
3.8.3	Expresión diferencial y anotación funcional	32
Capítulo 4. Discusión		37
4.1	Dinámica de pCO ₂ y variables fisicoquímicas en cultivos de <i>Chaetoceros</i> sp.	37
4.2	Efecto del pCO ₂ en el crecimiento de <i>Chaetoceros</i> sp. y su efecto sobre la fisiología	38
4.3	Calidad nutricional de <i>Chaetoceros</i> sp. por aumento de CO ₂	40
4.3.1	Proteínas, lípidos y carbohidratos	40
4.3.2	Ácidos grasos	42
4.4	Integración de la respuesta transcriptómica y fisiológica	43
4.4.1	Crecimiento y fotosíntesis	44
4.4.2	Metabolismo energético y síntesis de ácidos grasos	45

Capítulo 5.Conclusiones48

Capítulo 6.Recomendaciones49

Literatura citada50

Anexos.....58

Lista de figuras

Figura	Página
1. Diseño experimental de los cultivos de <i>Chaetoceros</i> sp. (CH-X1) para evaluar el aumento de CO ₂ (pH 7.8; CA) con un cultivo control sin aumento de CO ₂ (CC).	11
2. Valores promedio y desviación estándar de pH y temperatura de los cultivos de <i>Chaetoceros</i> sp. en el ensayo preliminar para el mantenimiento de pH a 7.80 durante cuatro días de cultivo (96 h) con diferentes flujos de inyección de CO ₂ . Las flechas azules indican los flujos de inyección de CO ₂ : flujo rápido (FR) y flujos lentos 1, 2, 3, 4 y 5 (FL1, FL2, FL4 y FL5). La Línea roja central representa un 7.80 de pH, mientras las líneas rojas externas indican un rango de ± 0.05 unidades de pH.....	19
3. Valores promedio y desviación estándar de pH y temperatura de los cultivos de <i>Chaetoceros</i> sp. en el tratamiento con aumento CO ₂ a pH 7.8 (CA) durante cuatro días de cultivo (96 h). La Línea roja central representa un valor de 7.80 de pH, mientras las líneas rojas externas indican un rango de ± 0.05 unidades de pH.....	21
4. Valores promedio y desviación estándar de pH y temperatura de los cultivos de <i>Chaetoceros</i> sp. para el tratamiento control sin inyección de CO ₂ (CC) durante cuatro días de cultivo (96 h).....	21
5. Cultivos estáticos de <i>Chaetoceros</i> sp. al cuarto día de cultivo en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO ₂ (pH 7.8; CA).....	22
6. Valores promedio y desviación estándar de densidad celular de los cultivos de <i>Chaetoceros</i> sp. en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO ₂ (CA) durante cuatro días de cultivo.....	23
7. Medidas del largo (A) y ancho (B) de 90 células de <i>Chaetoceros</i> sp. por tratamiento control (CC) y con aumento de CO ₂ (CA) al cuarto día de cultivo.....	24
8. Valores promedio y desviación estándar del peso seco total (PST), peso orgánico (PO) y peso de cenizas (PC) al cuarto día de cultivo de <i>Chaetoceros</i> sp. en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO ₂ (CA)..	25
9. Valores promedio y desviación estándar del peso celular (con base en el peso orgánico) de <i>Chaetoceros</i> sp. al cuarto día de cultivo en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO ₂ (CA). Diferencia significativa $p \leq 0.01$ (*) entre tratamientos CC y CA con la prueba <i>t</i> , $\alpha = 0.05$	25
10. Valores promedio y desviación estándar de la concentración por célula de <i>Chaetoceros</i> sp. de carbohidratos, proteínas y lípidos (pg cel ⁻¹) al cuarto día de cultivo en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO ₂ (CA). Diferencia significativa con $p \leq 0.001$ (**) y $p \leq 0.001$ (**) entre tratamientos CC y CA con la prueba <i>t</i> , $\alpha = 0.05$	26
11. Composición de ácidos grasos (expresados en porcentaje del total de ácidos grasos identificados) por grupo de ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) al cuarto día de cultivo de <i>Chaetoceros</i> sp. en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO ₂ (CA) (Ver Tabla 3).	27

12. Valores promedio y desviación estándar de la concentración de pigmentos clorofila *a* (Chla), clorofila *c* (Chlc) y carotenos al cuarto día de cultivo de *Chaetoceros* sp. en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO₂ (CA). Diferencia significativa con $p \leq 0.001$ (**) y $p \leq 0.01$ (*) entre tratamientos CC y CA con la prueba *t*, $\alpha = 0.05$29
13. Valores promedio y desviación estándar de la concentración por célula de *Chaetoceros* sp. de pigmentos clorofila *a* (Chla), clorofila *c* (Chlc) y carotenos al cuarto día de cultivo en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO₂ (CA). Diferencia significativa con $p \leq 0.001$ (**) y $p \leq 0.01$ (*) entre tratamientos CC y CA con la prueba *t*, $\alpha = 0.05$30
14. Curvas de fotosíntesis con base en el transporte de electrones del fotosistema II (ETR) y la irradiancia al cuarto día de cultivo de *Chaetoceros* sp. en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO₂ (CA).30
15. Gel de agarosa 1.5% con escalera de 1000 b (1Kb) y bandas de RNA ribosomal obtenido a partir de células de *Chaetoceros* sp. al cuarto día de cultivo de los tratamientos control (CC) y con aumento de CO₂ (CA).32
16. Heatmap de los transcritos expresados diferencialmente ($p < 0.1$) en *Chaetoceros* sp. al cuarto día de cultivo en el tratamiento control (C1, C2 y C3) y con aumento de CO₂ (T1, T2, T3). El color azul representa los transcritos subexpresados y el color rojo los transcritos sobreexpresados en la comparación CA vs CC. Los valores están representados como z-scores.33
17. Volcano plot de los transcritos expresados diferencialmente ($p < 0.05$) en *Chaetoceros* sp. al cuarto día de cultivo en la comparación CA vs CC. El color negro representa los transcritos sin expresión diferencial, el color azul representa los transcritos subexpresados (Log_2 Fold Change < -2) y el color rojo los transcritos sobreexpresados (Log_2 Fold Change > 2).34
18. Análisis de enriquecimiento de las rutas metabólicas KEGG a partir de los transcritos subexpresados diferencialmente en *Chaetoceros* sp. bajo las condiciones CA vs CC. El tamaño de los puntos representa el número de genes involucrados en cada ruta y la intensidad del color indica el valor de la probabilidad (p) del enriquecimiento.34
19. Análisis de enriquecimiento de las rutas metabólicas KEGG a partir de los transcritos sobreexpresados diferencialmente en *Chaetoceros* sp. bajo las condiciones CA vs CC. El tamaño de los puntos representa el número de genes involucrados en cada ruta y la intensidad del color indica el valor de la probabilidad (p) del enriquecimiento.35
20. Genes involucrados en cinco rutas metabólicas en *Chaetoceros* sp. bajo las condiciones CA vs CC. El largo de la línea indica el valor de Log_2 Fold Change, donde los genes sobreexpresados (> 2) se representan en color rojo y los genes subexpresados (< -2) en color azul.36

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Valores promedio y desviación estándar de los parámetros de calidad de agua y pCO ₂ del agua de mar y los cultivos de <i>Chaetoceros</i> sp. al día cuatro en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO ₂ (CA).	20
2. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento (μ), tiempo de generación (Tg) y densidad celular final de los cultivos de <i>Chaetoceros</i> sp. en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO ₂ (CA).	23
3. Composición de ácidos grasos (expresados en porcentaje del total de ácidos grasos identificados) al cuarto día de cultivo de <i>Chaetoceros</i> sp. en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO ₂ (CA).	28
4. Valores promedio y desviación estándar de los parámetros fotosintéticos: tasa máxima de transporte de electrones (ETR _{max}), eficiencia fotosintética (α), índice de saturación (Ek) y la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (Fv/Fm) al cuarto día de cultivo de <i>Chaetoceros</i> sp. en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO ₂ (CA).	31
5. Valores de concentración y calidad de RNA obtenido a partir de células de <i>Chaetoceros</i> sp. al cuarto día de cultivo de los tratamientos control (CC) y con aumento de CO ₂ (CA).	32

Capítulo 1. Introducción

El cambio climático es un fenómeno ligado a las emisiones de dióxido de carbono (CO_2), el incremento de su concentración en la atmósfera aumenta los valores de temperatura globales debido al efecto invernadero (Wigley y Jones, 1981). Naturalmente el CO_2 es liberado a la atmósfera por erupciones volcánicas o incendios naturales, sin embargo, después de la revolución industrial en 1750 las emisiones aumentaron por la actividad antropogénica de 278 ppm a 400 ppm, generando cambios en los patrones climáticos (Gattuso et al., 2015).

El cambio en la concentración de CO_2 antropogénico es evaluado por el Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC, por sus siglas en inglés) a través de informes de evaluación, los cuales indican el efecto de las emisiones de CO_2 sobre la atmósfera, el suelo y el océano (Cubash et al., 2013). En el quinto informe del IPCC en 2014 se plantearon cuatro escenarios, nombrados Rutas de Concentración Representativas (RCP, por sus siglas en inglés), mismos que indican las condiciones fisicoquímicas esperadas a largo plazo en 2100. En el caso de las concentraciones de CO_2 atmosférico, el IPCC plantea para el escenario optimista una reducción de emisiones de CO_2 (RCP 2.6) con una concentración de ~ 490 ppm de CO_2 , el escenario medio bajo (RCP 4.5) se plantea una concentración de ~ 650 ppm de CO_2 , por otro lado, el escenario medio alto (RCP 6.0) se espera una concentración de ~ 850 ppm de CO_2 y, finalmente, el escenario catastrófico (RCP 8.5) se plantea concentraciones >1000 ppm de CO_2 (Moss et al., 2010).

El océano es un integrador climático debido a que absorbe el 93% del calor de la tierra y el 28% del CO_2 antrópico (Gattuso et al., 2015), sin embargo, su capacidad reguladora ha disminuido debido a que se han registrado incrementos en la temperatura superficial del océano, disminución de la concentración de O_2 y disminución de pH superficial (Rhein et al., 2013). El aumento de la concentración de CO_2 absorbido por el océano ha provocado la disminución del pH del agua superficial del océano, en aproximadamente 0.1 unidades desde la revolución industrial, alcanzando un valor promedio actual de 8.05. De acuerdo con el escenario RCP 8.5 del IPCC, se proyecta una reducción adicional de 0.3-0.4 unidades, lo que resultaría en un pH estimado de 7.8 ± 0.05 hacia finales del siglo.

La disminución de pH es ocasionada por la alteración del balance químico en el ciclo del carbono dentro del océano. Ante el aumento de CO_2 en la atmósfera, la disolución del gas en el agua de mar incrementa, ocasionando una reacción entre el CO_2 y el ácido carbónico (H_2CO_3) lo que resulta en la liberación de iones

hidrógeno (H^+) para la formación de bicarbonato (HCO_3^-) y posteriormente la formación de carbonato (CO_3^{2-}). Se prevé que para final de la década la concentración de H^+ aumente un 150%, la concentración de CO_3^{2-} disminuya en un 50% y como consecuencia el aumento en la acidificación del medio con menor saturación superficial de carbonato de calcio ($CaCO_3$) (Dooney et al., 2009).

Ante la acidificación del océano los organismos que son afectados de manera directa son los calcificadores (moluscos, corales, cocolitóforos, pterópodos, equinodermos, algas coralinas, microalgas, entre otros) los cuales reducen el tamaño y grosor de estructuras de protección por disolución de $CaCO_3$ (Dooney et al., 2009). De forma indirecta, la acidificación del océano afecta diferentes poblaciones dentro de la red trófica, principalmente los productores primarios, debido a las alteraciones en la composición bioquímica de algas y pastos marinos disminuyendo su calidad nutricional (mayor concentración de fenoles y menor concentración de ácidos grasos poliinsaturados) (Jin et al., 2020).

Los productores primarios más abundantes en el océano son las diatomeas, las cuales contribuyen con el 40% de productividad primaria como parte del hábitat bentónico o planctónico, forman parte del ciclo del carbono y silicio en el océano y son importantes para la producción de nutrientes esenciales como los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) (Yi et al., 2017; Serôdio y Lavaud, 2020).

En las diatomeas, el efecto de la acidificación oceánica sobre su crecimiento y composición nutricional son diversos, varían dependiendo de la especie y la zona en la que se encuentren las poblaciones. Sin embargo, se ha observado que en la mayoría de las diatomeas expuestas a mayores concentraciones de CO_2 , se presenta una disminución en el tamaño celular, en la concentración de sílice de las frústulas (SiO_2) y en el contenido y tipo de PUFAs (Richa y Häder, 2016).

Por otro lado, los análisis transcriptómicos, realizados en diatomeas indican que la acidificación causada por el aumento de CO_2 en el océano representa una variable importante en la activación de mecanismos adaptativos. Las especies que logran crecer bajo estas condiciones, muestran una mayor expresión de genes relacionados con rutas metabólicas involucradas en la producción de energía celular como el ciclo de Krebs (TCA), la glucólisis, la fosforilación oxidativa y la fotosíntesis (Huang et al., 2019; Jin et al., 2022). Asimismo, se activan otras rutas metabólicas asociadas a la biosíntesis de ácidos grasos y mecanismos para equilibrio homeostático como respuesta a la disminución del pH (Liang et al., 2020).

Se proyecta que, además de los efectos fisiológicos y genéticos de las diatomeas ante el aumento de $p\text{CO}_2$ su prevalencia se verá afectada por la modificación de los ciclos biogeoquímicos de carbono y silicio. Modelos de predicción han demostrado que, ante altas concentraciones de CO_2 , la fijación de carbono disminuye (Serôdio y Lavaud, 2020), y que la alteración del ciclo del sílice podría comprometer la permanencia de las poblaciones de diatomeas lo que derivaría en cambios ecológicos importantes debido a la interrupción de energía desde la base de la red trófica (Taucher et al., 2022).

En consecuencia, los cambios en las poblaciones de diatomeas, derivado del aumento de CO_2 , afectarán la alimentación de los niveles superiores de la red trófica, modificando su composición bioquímica y capacidad reproductiva (Rossoll et al., 2012). Aunque los niveles tróficos más altos pueden adaptarse ante los efectos del aumento en la concentración de CO_2 debido a su habilidad de desplazamiento y a la sustitución del alimento por otro disponible con aporte nutricional similar (Hu et al., 2022), si el pH continúa disminuyendo, se prevé que a largo plazo se modifiquen las comunidades dentro del océano. Esto afectará actividades antropogénicas, como la pesca, la maricultura y la acuicultura comprometiendo la supervivencia de los organismos cultivados y reduciendo su valor nutricional, lo que pondrá en riesgo la salud alimentaria de la población humana (Jin et al., 2020).

1.1 Antecedentes

1.1.1 Efecto del aumento de CO_2 en especies de diatomeas

Debido a que el efecto del CO_2 sobre las diatomeas es especie específico, Bach y Taucher (2019) describieron que en la última década el aumento de CO_2 puede tener efectos positivos, negativos o nulos sobre diferentes especies de diatomeas (56 estudios analizados). Se destacó que en el 46% de los estudios, estaban relacionados con diatomeas planctónicas costeras y en 41 casos se observó un efecto fisiológico positivo o negativo a concentraciones de CO_2 mayores a $600 \mu\text{atm}$ de $p\text{CO}_2$. Una de las variables más destacadas fue la reducción del tamaño celular, así como de la concentración de sílice en las paredes de las frústulas.

Se observó que diatomeas de mayor tamaño son las que sostienen la base de la red trófica con una mejor transferencia de nutrientes y energía a través de un menor número de intermediarios, además de aportar mayor flujo de C:Si al fondo del océano. En los estudios revisados, se encontró que las diatomeas de mayor

tamaño (>20-50 μm) son el grupo más susceptible a los cambios en la concentración de CO_2 del océano ocasionando una disminución en su crecimiento y menor frecuencia en las comunidades, por lo que se espera un cambio en la composición del ambiente ante este fenómeno siendo el mar abierto el ambiente más susceptible, posteriormente el costero, después el estuarino y finalmente el bentónico (Bach y Taucher, 2019).

Estudios en mesocosmos han permitido comprender mejor el efecto del CO_2 en ecosistemas marinos, por ejemplo, el realizado por Duncan et al. en 2022 donde se concluyó que todos los grupos de diatomeas del mesocosmos de la Antártica fueron afectados en el grosor de las frústulas por una menor producción de sílice. Por otro lado, se registró un aumento en la concentración de proteínas y lípidos en organismos < 20 μm de tamaño como *Chaetoceros* spp. y en organismos grandes (> 20 μm) como *Stellarima microtias* un aumento en la concentración de proteínas y reducción de lípidos que, como consecuencia, genera la reducción en la frecuencia de las tallas grandes de diatomeas en el ambiente.

Harvey et al. (2019) estudiaron el efecto de gradientes naturales de pCO_2 en las comunidades bentónicas de una isla en Japón (zona cercana a un volcán), para simular los cuatro escenarios propuestos por el IPCC tomando en cuenta la presencia de la diatomea bentónica *Biddulphia biddulphiana* (diatomea céntrica). El aumento en la concentración de CO_2 generó un cambio en la composición de la comunidad bentónica, donde *Biddulphia biddulphiana* reemplazó a especies que no toleran condiciones de concentración alta de CO_2 . Además, demostraron que esta especie de diatomea puede mantener estable los niveles tróficos superiores.

En condiciones de aumento de CO_2 a 750 μatm , se ha reportado que para *Thalassiosira pseudonana*, otra especie de diatomea céntrica, la composición bioquímica, concentración de sílice y concentración de pigmentos (clorofila *a*) fueron afectados negativamente (Rossoll et al., 2012; Alcaraz-Rocha et al., 2023). En la especie *Thalassiosira weissflogii* se observó que la capacidad fotosintética de estas diatomeas disminuye ante el aumento gradual y abrupto en la concentración de pCO_2 en el agua. Además, se resalta la importancia de medir la respuesta generacional para evaluar las estrategias de adaptación de los organismos ante estos cambios y en conjunto con otras variables, como el aumento de temperatura en el océano, permitirán conocer el destino de las especies en el ecosistema al que pertenecen (Li et al. 2019; Zhong et al., 2021).

Los estudios moleculares con diatomeas y el aumento de pCO_2 son escasos, sin embargo, en los trabajos existentes (Huang et al., 2019; Sun y Sun, 2020) se describe que el incremento de CO_2 en el océano es una

variable que obliga a los organismos a adaptarse. Por ejemplo, en *Phaeodactylum tricornutum* existe un proceso de adaptación al medio ante la exposición de 1014 μatm de pCO_2 después de aproximadamente 10 días de cultivo. Los resultados indican que no se presentaron cambios en la respuesta fotosintética, sin embargo, se observó un incremento en la tasa de crecimiento. Por otro lado, se encontró una subexpresión en los transcritos relacionados con los mecanismos de concentración de carbón inorgánico (CCMs), el ciclo de ácido cítrico (TCA), glicólisis y la fosforilación oxidativa, que constituyen las rutas asociadas en la producción de energía de la célula (Huang et al., 2019).

Otra especie de diatomea evaluada por Sun y Sun (2020) fue *Skeletonema dohrnii* y al igual que *P. tricornutum*, se observaron cambios en la expresión basal de los genes como respuesta a 25 °C y 1000 μatm de pCO_2 . Este estudio indica que la respuesta del transcriptoma a la subexpresión de CCMs promueve la síntesis de aminoácidos y la asimilación de nitrógeno. Los cambios descritos anteriormente son integrados a rutas metabólicas que permiten la adaptabilidad de las células ante las condiciones extremas como en el caso del transporte de electrones en la membrana del tilacoide para producción de ATP y NADPH.

1.1.2 Estudios fisiológicos y transcriptómicos en especies de *Chaetoceros*

Particularmente para especies del género *Chaetoceros* se ha observado una respuesta variable ante el aumento de CO_2 de acuerdo a la especie. Por ejemplo, para *Chaetoceros gracilis*, exposiciones de 1050 y 750 μatm de pCO_2 con pH 7.74 y 7.84 respectivamente, ocasionaron daño por lisis celular. Se observó una disminución en el crecimiento celular, así como la reducción en la concentración de proteínas y carbohidratos. Además, la capacidad fotosintética de los cloroplastos fue afectada debido a alteraciones morfológicas en la membrana del cloroplasto y los tilacoides (Khairy et al., 2014).

Por el contrario, para cultivos de la diatomea *Chaetoceros muelleri* se ha observado que la acidificación del medio (800 μatm y 7.80 pH) aumenta la capacidad de las células para fijar carbono, además de aumentar la actividad fotosintética y como resultado la tasa de crecimiento aumentó en 11% en comparación con el cultivo control. También se estableció que estos organismos invierten más energía para el mantenimiento del flujo de H^+ y regular el pH intracelular para el mantenimiento homeostático (Shi et al., 2019).

Se ha observado que análisis moleculares de transcriptómica complementan las respuestas fisiológicas

obtenidas y proporcionan información sobre cómo las células responden a nivel genético ante el aumento de CO₂ (Hoffmann et al., 2008).

Con base en lo anterior, los resultados fisiológicos realizados en *C. muelleri* por Shi et al. (2019) se relacionan con los obtenidos por RNA-seq de Liang et al. (2020). Donde, además de comprobar la sobre expresión de las rutas de mantenimiento de pH celular, aporta nueva información sobre el aumento en la concentración de lípidos y cambios en el perfil de ácidos grasos. Liang et al. (2020) comparó el efecto del transcriptoma de *C. muelleri* a pH 7.8 y 1000 μ atm de CO₂ y concluyeron que la expresión de genes dedicados a la producción de lípidos aumentó, favoreciendo el flujo de carbono para la producción de acetil-CoA, en lugar de dirigirse a la síntesis de ácidos grasos, especialmente PUFAs, los cuales se encontraron en concentraciones de 15-20% menores a las obtenidas a 400 μ atm y pH 8.17.

1.1.3 *Chaetoceros* sp.

La diatomea *Chaetoceros* sp. (CH-X1) es una cepa nativa de Bahía de Todos Santos, Ensenada, Baja California, aislada por Trujillo-Valle en 1988. Esta especie es reconocida por su relevancia ecológica, ya que proporciona nutrientes esenciales para la alimentación de organismos dentro de la bahía. Además, el cultivo de *Chaetoceros* sp. tiene importancia económica, al ser utilizado como alimento para larvas de penneidos, *Crassostrea gigas* y *Mytilus galloprovincialis*, en sistemas de cultivo comerciales (Trujillo-Valle 1993).

Debido a la importancia económica de *Chaetoceros* sp. se han realizado diversos estudios para conocer las condiciones adecuadas para su cultivo. Por ejemplo, se ha establecido el uso de cultivos semicontinuos para la producción continua de biomasa (Lopez-Elias, 1990). Asimismo, se han estudiado los efectos de diferentes fuentes de luz e irradiancias sobre la producción de biomasa y la composición nutricional de las células de *Chaetoceros* sp. (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1994, Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2006), así como la implementación de estos cultivos para el crecimiento y la maduración sexual de *Artemia franciscana* (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1995).

Por otro lado, se han explorado alternativas para el almacenamiento de la biomasa seca de *Chaetoceros* sp. como alimento, y su efecto sobre la composición nutricional (Cordero-Esquivel et al. 1993). En años recientes, se utilizaron técnicas moleculares para conocer el genoma de *Chaetoceros* sp., e identificar la

especie para enriquecer el conocimiento de esta cepa y el desarrollo de mejoras continuas al cultivo (Tapia-Gallardo, 2019).

Con base en lo anterior, es importante continuar realizando estudios enfocados en conocer el futuro de esta especie ante los cambios climáticos y conocer su respuesta ante estas condiciones ambientales.

1.2 Justificación

La pesca y la maricultura son actividades importantes para incrementar la disponibilidad de alimento nutritivo para las poblaciones humanas (FAO, 2022). La pesca y maricultura se relacionan directa o indirectamente con las microalgas debido a que estos microorganismos son la base de la red trófica y participan en la nutrición de los organismos acuáticos, por lo que su prevalencia y composición nutricional es importante dentro del ecosistema marino (Serôdio y Lavaud, 2020).

El aumento de CO₂ por actividades antropogénicas es clave en el cambio climático, ya que el océano absorbe el 28 % de este gas alterando el ciclo natural del carbono, así como los niveles de pH ocasionando la acidificación de este ambiente (Gattuso et al., 2015). De acuerdo con las proyecciones del IPCC sobre un escenario para el año 2100, la concentración de CO₂ en el océano disminuirá el valor de pH de 8.05 a 7.8 lo que afectará a los organismos acuáticos dentro de este ecosistema (Cubasch et al., 2013).

Ante el aumento de CO₂ en el océano, las microalgas alteran su crecimiento (Shi et al., 2019), cambian el tamaño de las células e inducen variaciones genotípicas (Li et al., 2019) y modifican la composición bioquímica (Duncan et al., 2022), lo que podría afectar a largo plazo los niveles superiores de la red trófica en relación con el aumento de la acidificación (Jin et al., 2020).

Estudios realizados en diversas especies de diatomeas como *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira pseudonana*, *Phaeodactylum tricorutum* y *Skeletonema marino* (Shi et al., 2019; Zhang et al., 2021) concluyen que los efectos en el aumento de CO₂ del océano sobre las diatomeas son específicos incluso entre poblaciones de la misma especie (Richa y Häder, 2016). Por lo anterior, son de gran relevancia las investigaciones que describen el aumento del CO₂ sobre el tamaño de las células microalgales, la fotosíntesis, la composición bioquímica y la expresión de genes de las diatomeas de importancia ecológica y económica, como lo es *Chaetoceros* sp., respecto a la calidad nutricional para su consumo por los organismos acuáticos.

1.3 Hipótesis

El cultivo estático de *Chaetoceros* sp. expuesto a un aumento de CO₂ (pH 7.8), presentará una disminución significativa en la concentración de carbohidratos, lípidos y ácidos grasos poliinsaturados, acompañada de una subexpresión de genes involucrados en las rutas biosintéticas de estos metabolitos, en comparación con el cultivo control (sin aumento de CO₂).

Bajo las mismas condiciones (pH 7.8), se espera observar un incremento en la tasa de crecimiento, en la concentración de proteínas y en la actividad fotosintética, asociado a una sobreexpresión de genes relacionados con la fotosíntesis y biosíntesis de proteínas.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del aumento de CO₂ (pH 7.8) sobre el crecimiento, la fotosíntesis, la composición bioquímica y el transcriptoma de *Chaetoceros* sp. en cultivos estáticos.

1.4.1.1 Objetivos específicos

Evaluar el efecto del CO₂ elevado (pH 7.8) en un cultivo estático de *Chaetoceros* sp. sobre el crecimiento, el tamaño celular y la producción de biomasa.

Evaluar el efecto del CO₂ elevado (pH 7.8) en la actividad fotosintética, el contenido de pigmentos, la composición bioquímica y el perfil de ácidos grasos de un cultivo estático de *Chaetoceros* sp.

Comparar la respuesta del transcriptoma en un cultivo estático de *Chaetoceros* sp. expuesto a CO₂ elevado (pH 7.8) con un cultivo control sin enriquecimiento de CO₂.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cultivos de *Chaetoceros* sp.

Se utilizó la diatomea marina *Chaetoceros* sp. (CH-X1) aislada por Trujillo-Valle (1993) en 1988 de Bahía de Todos Santos en, Ensenada, Baja California, esta cepa pertenece a la colección de microalgas del Laboratorio de Biotecnología de Algas (BIOAL) del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE). Para todos los cultivos de *Chaetoceros* sp. utilizados, se empleó agua de mar proveniente del sistema cerrado del laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura del CICESE. El agua de mar fue tratada con filtros de 10, 5 y 1 μm , carbón activado y su desinfección con luz ultravioleta. Posteriormente, el agua de mar fue esterilizada por calor húmedo en una autoclave automática a 1.52 kg m^{-2} de presión, 121 °C de temperatura, durante 20 min. Después de la esterilización se adicionaron los nutrientes para obtener el medio de cultivo “f” (Guillard y Ryther, 1962).

2.1.1 Mantenimiento rutinario de cultivos de *Chaetoceros* sp.

Se realizó el mantenimiento rutinario de los cultivos monoespecíficos, no axénicos y estáticos. Estos cultivos iniciaron con 1×10^5 células ml^{-1} de *Chaetoceros* sp. en 100 ml de medio de cultivo “f” en un matraz Erlenmeyer de 125 ml de capacidad. Transcurrida una semana de cultivo, se realizó el trasvase del 10% de cultivo a 100 ml de medio “f” nuevo para mantener el crecimiento de *Chaetoceros* sp. en fase exponencial. Las condiciones ambientales de los cultivos fueron: irradiancia de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, salinidad de 38 UPS y temperatura de 20 ± 1 °C.

2.1.2 Cultivos experimentales

2.1.2.1 Inóculo

Para la producción de inóculo de *Chaetoceros* sp. se emplearon cultivos con densidad inicial de 1×10^5 células ml^{-1} en 400 ml de medio de cultivo “f” en matraces de 500 ml de capacidad y las condiciones

ambientales descritas anteriormente para los cultivos de mantenimiento (sección 2.1.1). Transcurridos siete días de cultivo, se tomó el volumen necesario para iniciar los cultivos experimentales con densidad celular de 1×10^5 células ml^{-1} en un volumen de 2.5 l de medio "f" en dos matraces Fernbach de 2.8 l de capacidad. El volumen de cultivo de cada matraz Ferbach fue trasvasando en tres matraces Erlenmeyer de 1 l con 800 ml de cultivo (Figura 1).

2.1.2.2 Tratamientos de los cultivos experimentales de *Chaetoceros* sp.

Se establecieron los siguientes tratamientos experimentales: 1) El tratamiento control (CC) sin inyección de CO_2 para mantener la concentración actual de pCO_2 en el agua de mar ($\approx 400 \mu\text{atm}$ de pCO_2), los cultivos se mantuvieron con un flujo constante de aire (≈ 186 burbujas min^{-1}), el cual pasó a través de un filtro de $0.20 \mu\text{m}$ de diámetro de poro y un sistema manifold para su inyección con una pipeta Pasteur en cada matraz 2) El tratamiento con aumento de CO_2 (CA) donde los cultivos se mantuvieron a un pH de 7.80 (equivalente a $1000 \mu\text{atm}$ de pCO_2) con la inyección de CO_2 desde un tanque de CO_2 con flujómetro hacia un regulador de flujo de aire para acuario y dispensado en cada matraz con una pipeta Pasteur (Figura 1).

Por cada tratamiento se realizaron tres réplicas ($n=3$), las cuales fueron monoespecíficas, no axénicas y estáticas con irradiancia continua de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los cultivos se mantuvieron durante cuatro días de cultivo, (fase exponencial de crecimiento de *Chaetoceros* sp.) para evitar el efecto por limitación de luz o nutrientes durante el experimento. Se realizaron mediciones diarias del pH y la temperatura con un potenciómetro Orion Star A211 con un electrodo Orion ROSS Ultra Triode.

Se realizó la medición de los parámetros de calidad del agua en los cultivos de los tratamientos CC y CA al cuarto día de cultivo, así como en el agua de mar utilizada para la preparación del medio de cultivo. El valor de pCO_2 se calculó mediante el software CO2Sys (Lewis y Wallace, 1998) utilizando las constantes de disociación aparente descritas por Mehrbach et al. (1973). Los parámetros de calidad de agua medidos fueron: alcalinidad, determinada por titulación con ácido sulfúrico 0.02 N e indicadores fenolftaleína y verde de bromocresol (Anexo A); salinidad utilizando un refractómetro; pH y temperatura, medidos con un potenciómetro Orion Star A211.

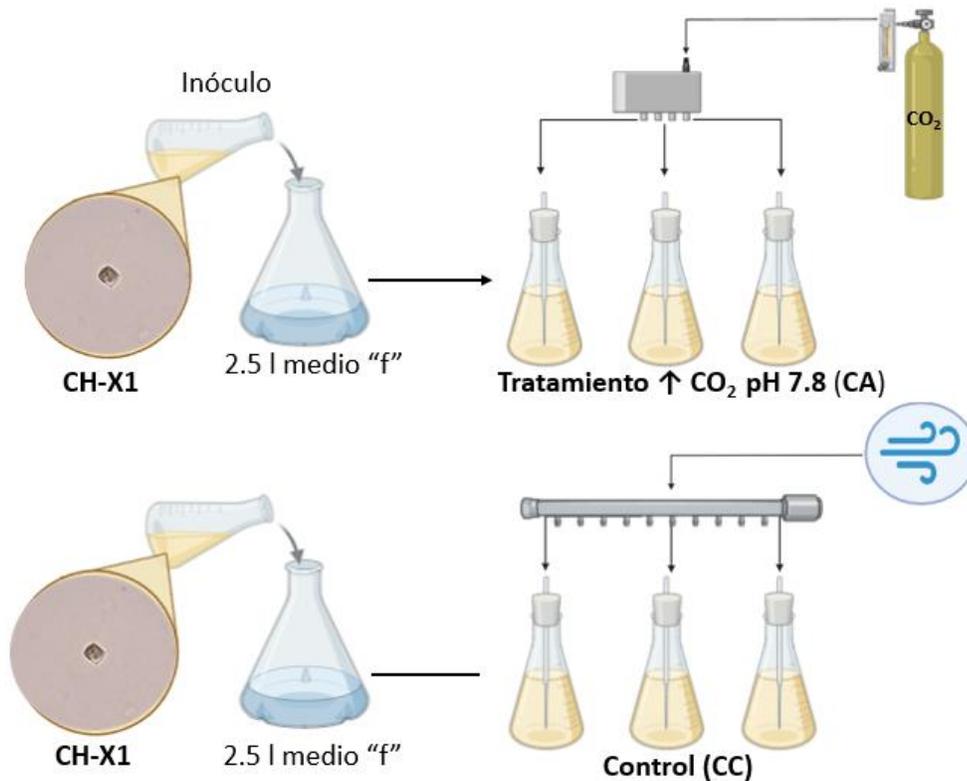


Figura 1. Diseño experimental de los cultivos de *Chaetoceros sp.* (CH-X1) para evaluar el aumento de CO₂ (pH 7.8; CA) con un cultivo control sin aumento de CO₂ (CC).

2.1.2.3 Ensayo preliminar para el mantenimiento de pH 7.80 en cultivos de *Chaetoceros sp.* con aumento de concentración de CO₂

Para determinar en el tratamiento CA la cantidad de CO₂ necesario para mantener un valor de 7.80 de pH en el cultivo de *Chaetoceros sp.* durante cuatro días de cultivo, se realizó un experimento preliminar siguiendo los puntos 2.1.2.1 y 2.1.2.2 para el tratamiento CA y registrándose solo los valores de temperatura y pH. El pH se registró cada 24 h y, dentro de cada intervalo de 24 h, se efectuaron mediciones adicionales a intervalos de una hora durante las primeras seis horas, con el propósito de ajustar el flujo de CO₂ suministrado a los matraces. Los flujos de CO₂ utilizados fueron: flujo rápido (FR) con 186 burbujas de CO₂ min⁻¹ y cinco flujos lentos 1 (FL1), 2 (FL2), 3 (FL3), 4 (FL4) y 5 (FL5) con la inyección de 7, 2, 10, 4 y 14 burbujas de CO₂ min⁻¹ respectivamente.

Los flujos de CO₂ en los cultivos se ajustaron dependiendo del cambio de pH y manteniéndose en un rango de 7.80 ± 0.05 unidades de pH (7.75-7.85 pH).

2.2 Análisis de las variables de respuesta

Las variables de respuesta, que incluyeron el crecimiento del cultivo, la fotosíntesis, la composición proximal, el perfil de ácidos grasos y la expresión del transcriptoma, fueron evaluadas en los cultivos de ambos tratamientos experimentales durante la fase exponencial de crecimiento.

2.2.1 Parámetros de crecimiento

Para registrar el crecimiento de *Chaetoceros* sp. en cada uno de los cultivos se evaluaron las variables descritas a continuación:

a) Conteo celular

Se realizaron conteos diarios de las células a partir de una alícuota de 1 ml de cultivo, tomada diariamente y fijada con lugol ácido de cada uno de los cultivos mantenidos en los tratamientos experimentales. Los conteos celulares se realizaron en una cámara de Neubauer con ayuda de un microscopio compuesto Olympus CX31. Los datos se graficaron para obtener la curva de crecimiento además se calcularon la tasa de crecimiento (μ) y tiempo de generación (Tg) de acuerdo con las ecuaciones descritas por Guillard (1973):

$$\mu = \frac{\text{Log}_2(Nt/N0)}{\Delta t} \quad (1)$$

En donde: μ = divisiones día⁻¹

Nt= Densidad celular al final del intervalo de tiempo

N0= Densidad celular al inicio del intervalo de tiempo

$$Tg = \frac{1}{\mu} \quad (2)$$

En donde: Δt = Diferencia de tiempo en el intervalo de tiempo de Nt y N0

Tg= días

b) Tamaño celular

Se realizaron mediciones del largo y el ancho de 30 células al cuarto día de cultivo de cada cultivo, las

evaluaciones se realizaron con la ayuda de un microscopio compuesto a 40X por medio de una cámara digital (ZEISS Axiocam) y el programa (ZEN lite).

c) Peso seco

Después de los cuatro días de cultivo se filtraron 15 ml de volumen de cultivo de cada tratamiento según el método gravimétrico descrito por Sorokin (1973). Para este procedimiento se usaron filtros de fibra de vidrio de 4.7 cm de diámetro y 1 μm de apertura de poro. Previamente los filtros fueron calcinados en una mufla Furnace 1400 a 490 °C por 2 h. Los filtros calcinados fueron mantenidos en una estufa VWR Brand a 60 °C hasta obtener peso constante el cual fue medido en una balanza Mettler-Toledo XS105.

Cada alícuota del cultivo fue pasada a través de los filtros previamente tratados usando un sistema de filtración, para eliminar las sales se utilizó formiato de amonio 3% en una proporción 1:1 respecto al volumen de cultivo usado. Posteriormente, los filtros con muestra fueron secados en una estufa a 60 °C durante 24 h y antes de 7 días. Después de eliminar la humedad de los filtros se volvieron a pesar en la balanza para obtener el peso seco total (*PST*) mediante la siguiente fórmula:

$$PST = \frac{Pf - Pi}{V} \quad (3)$$

En donde: $PST = \text{mg ml}^{-1}$

Pf = Peso final del filtro con volumen filtrado (g)

Pi = Peso inicial del filtro sin volumen filtrado (g)

V = Volumen filtrado (ml)

Después, el filtro se colocó en la mufla para su incineración a 490 °C durante 4 h. Los filtros fueron pesados nuevamente en la balanza para poder calcular el peso de las cenizas (*PC*) y a partir del *PST* y *PC* obtener el peso orgánico (*PSO*) del volumen filtrado. Para los cálculos del *PC* y *PSO* se usaron las siguientes fórmulas:

$$PC = \frac{PSC - Pi}{V} \quad (4)$$

$$PSO = PST - PC \quad (5)$$

En donde: $PC = \text{Peso de cenizas (mg ml}^{-1}\text{)}$

PSC = Peso del filtro después de ser incinerado (g)

Pi = Peso inicial del filtro solo (g)

V = Volumen filtrado (ml)

PSO= Peso seco orgánico (mg ml^{-1})

2.2.2 Composición proximal

Para analizar la composición proximal, la biomasa de cada cultivo se cosechó en la fase exponencial de crecimiento, que correspondió al cuarto día de cultivo. Por lo anterior, se filtraron 10 ml de medio de cultivo a través de filtros de fibra de vidrio de 2.4 cm de diámetro y $1 \mu\text{m}$ de abertura de poro. Las muestras de la biomasa de los cultivos fueron almacenadas en un congelador Sumit a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis. Se realizaron análisis espectrofotométricos con el equipo HACH DR/6000 UV y la metodología descrita a continuación:

a) Concentración de carbohidratos

Para conocer el contenido de carbohidratos se utilizó la técnica de Dubois (1956) empleando glucosa como estándar para la curva de calibración. La extracción de carbohidratos se realizó con H_2SO_4 1 M.

b) Concentración de proteínas

Para evaluar el contenido de proteínas se usó el método descrito por Lowry et al. (1951) y se utilizó seroalbúmina de suero de bovino (BSA) como estándar para la curva de calibración. La extracción de proteínas se realizó con NaOH 0.1 N a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min (Pacheco-Vega y Sánchez-Saavedra, 2009).

c) Concentración de lípidos

El método de Bligh y Dyer (1959) se usó para la cuantificación de lípidos y se empleó como estándar para la curva de calibración Tripalmitina. La extracción de lípidos se realizó con una solución de metanol:cloroformo:agua (2:1:1).

2.2.3 Perfil de ácidos grasos

Para cuantificar los ácidos grasos se cosecharon volúmenes de 400 ml para CC y 300 ml para CA en cada cultivo en fase exponencial de crecimiento. Se concentró la biomasa celular por centrifugación a $2,400 \times g$ durante 15 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ en una centrifuga Eppendorf 5810R. La biomasa celular concentrada se congeló a -

20 °C hasta su liofilización a -80 °C a 0.11 kg cm⁻² con el equipo Labconco Freezone 2.5.

Se extrajeron los lípidos a partir de 30 mg de biomasa liofilizada y se siguió el método de Folch et al. (1957) modificado al usar diclorometano:metanol (2:1) y BTH al 0.01%. Se realizó la saponificación de los lípidos con KOH 0.3N al 90% de metanol. Con el producto de la reacción anterior, se obtuvieron los lípidos insaponificables adicionando agua destilada y hexano. Los lípidos saponificables se obtuvieron por medio de la reacción de agua destilada, hexano y HCl 6N. Para obtener los ésteres metilados de los ácidos grasos se siguió el procedimiento descrito por Metcalfe et al. (1966) con trifluoruro de boro al 14% de metanol.

Los ésteres metilados de los ácidos grasos fueron disueltos con hexano para obtener una concentración final de 10 mg ml⁻¹. Posteriormente, se analizaron en un cromatógrafo de gases (GC Agilent Technologies 7890A) con una columna capilar de 30 m de largo, 0.320 mm de diámetro interno, 0.25 m de grosor (Agilent J&W, 123-3232 BD-FFAP) y un detector de ionización de flama, al usar hidrógeno como gas de acarreo. Se inyectó 1 µl de muestra con una temperatura inicial de 120 °C que se incrementó cada 4 min hasta alcanzar 230 °C. La identificación de los ácidos grasos se realizó por la comparación de los tiempos de retención obtenidos respecto a un estándar comercial (37 Component Supelco FAME Mix Sigma). Los cálculos de concentración de los ácidos grasos fueron realizados con el programa ChemStation.

2.2.4 Pigmentos y fotosíntesis

Se calculó la concentración de pigmentos de los cultivos de *Chaetoceros* sp. en fase exponencial de crecimiento. La extracción se realizó a partir de 5 ml de volumen filtrado de cultivo (filtros de fibra de vidrio de 2.4 cm de diámetro y 1 µm de abertura de poro) al cual se le adicionó acetona al 90% en relación 1:1 con el volumen filtrado y se incubó durante 24 h a 4 °C. Posteriormente al tiempo de extracción, se realizaron barridos espectrales de las muestras de 400 a 750 nm en un espectrofotómetro marca HACH modelo DR6000 empleando acetona al 90% como blanco de medición. Con la información obtenida se realizaron los cálculos de la clorofila *a*, *c* y carotenoides, como lo describe Parsons et al. (1984) y las ecuaciones de Jeffrey y Humphrey (1975).

La actividad fotosintética de los cultivos fue analizada en la fase exponencial de crecimiento en un volumen de cultivo de 15 ml y mediante un fluorímetro de pulso de amplitud modulada (PAM) (Walz, Junior PAM). Para que los centros de reacción de los fotosistemas en la membrana del tilacoide se encontraran abiertos para recibir los pulsos de luz del fluorímetro, las muestras fueron mantenidas en oscuridad previo al

análisis durante 15 min. Posteriormente, con los resultados por el fluorímetro, se realizaron las curvas rápidas de luz para evaluar la respuesta fotosintética. Se obtuvieron los parámetros fotosintéticos de tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max}), eficiencia fotosintética (α), índice de saturación (E_k) y la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (F_v/F_m) a través de las ecuaciones propuestas por Eilers y Peeters (1988).

2.2.5 Análisis del transcriptoma

2.2.5.1 Extracción de RNA

Durante la fase exponencial de crecimiento se cosechó por centrifugación volúmenes de cultivo de 25 ml para CC y 15 ml para CA a 2300 xg durante 15 min a 4 °C utilizando el equipo Eppendorf 5810R. Posteriormente, se desechó la mayor cantidad de sobrenadante de los pellets y se guardaron en un ultracongelador Labconco a -80 °C hasta el proceso de extracción de RNA.

Para la extracción de RNA, las células de la biomasa obtenida se lisaron en microtubos de 2 ml (Simport T339) que contenían 750 μ l de Trizol y 100 mg de perlas de zirconia de 1.0 mm, utilizando un Fastprep 24 (MP) a 40 m s⁻¹ durante 20 s. Posteriormente, la extracción de RNA se llevo a cabo siguiendo el protocolo del reactivo TRIzol™ Reagent (Invitrogen).

Se determinó la cantidad del RNA (ng μ l⁻¹) mediante espectrofotometría con un Nanodrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific) y mediante la relación 260/230 nm y 260/280 nm se determinó la calidad del RNA obtenido. Valores entre 1.8 y 2.2 indicaron RNA de alta calidad y para valores inferiores a 1.8 se realizó una purificación adicional del RNA con acetato de sodio 3M. Las muestras con impurezas fueron incubadas con 4 μ l de acetato de sodio 3M pH 5.20 y 132 μ l de etanol absoluto al 95% a -20 °C durante 24 h. Posteriormente se centrifugaron a 16,873 xg durante 10 min a 4 °C y el pellet obtenido fue lavado nuevamente con etanol al 75% antes de su medición final con Nanodrop.

Finalmente, se evaluó la integridad del RNA por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con buffer TAE 1X. En cada pozo se agregó 1 μ l de buffer de carga GelRed y 3 μ l de muestra de cada tratamiento con una concentración aproximada de 300 ng μ l⁻¹ de RNA. El gel con las muestras se colocó en una cámara de

electroforesis (Bio-Rad) a 80 V durante 40 min. Transcurrido el tiempo, se hizo la visualización del gel en un transiluminador Bio-Rad de luz ultravioleta (UV).

2.2.5.2 Análisis bioinformático

Después de verificar la calidad de las muestras de RNA, las muestras fueron enviadas para la construcción de librerías con fragmentos de 150 pb y la secuenciación con un sistema NovaSeq 6000 de Illumina a una profundidad de 50 millones de lecturas por librería en la empresa Novogene (California, EUA).

El análisis bioinformático inició con los archivos obtenidos de la secuenciación. Se evaluó la calidad de las lecturas pareadas mediante el programa FASTQC (Braham bioinformatics), posteriormente se realizó la limpieza de las lecturas en donde se retiraron lecturas de baja calidad (<150 pb), secuencias duplicadas y los adaptadores con el programa Fastp (Chen et al., 2018). Después de este proceso se hizo otra evaluación de la calidad de las lecturas con FASTQC.

Se realizó ensamblaje de *novo* de las secuencias con el programa Trinity (Grabherr et al., 2011) obteniendo los transcritos, los cuales se analizaron con Transrate (Smith-Unna et al., 2016) y BUSCO para verificar su calidad. Los transcritos obtenidos fueron utilizados para el análisis de expresión diferencial y anotación funcional de los genes.

Se realizó la identificación de las regiones codificantes de los transcritos ensamblados, usando el programa TransDecoder (Hass et al., 2013). Posterior a este proceso, se hizo la anotación de las secuencias de nucleótidos mediante BLASTP y BLASTX con la base de datos de proteínas de Swissprot/Uniprot, también se identificaron las familias de genes con la base de datos Pfam y el software HMMER. Se calculó la abundancia de cada uno de los transcritos mediante el software Salmon.

El análisis de expresión diferencial se realizó con la paquetería R Bioconductor Deseq2 (Love et al., 2014), donde se realizó una normalización de los transcritos y posteriormente, filtrarlos para obtener los transcritos diferencialmente expresados, tomando en cuenta un valor de $p < 0.05$ y valores de cambio (\log_2 Fold Change) de > 2 y < -2 .

Posteriormente se realizó un análisis de enriquecimiento de las vías KEGG (Kanehisa, 2000) mediante KOBAS, utilizando como datos de entrada los transcritos expresados diferencialmente y como organismo de referencia la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* para identificar las rutas metabólicas.

Finalmente, se seleccionaron los genes con mayor valor de cambio de las rutas metabólicas de fotosíntesis, la biosíntesis de ácidos grasos, la replicación de DNA, el metabolismo energético (Ciclo de Krebs, glucólisis y gluconeogénesis) y la fijación de carbono (Ciclo de Calvin) y se identificaron las proteínas correspondientes utilizando BLASTP.

2.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los tratamientos CC y CA fueron analizados con el programa RStudio versión 2024.12.1+563 y la versión 4.4.2 de R. Se evaluaron los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Barlette) para determinar la diferencia entre las variables de respuesta con una prueba t con un 95% de confianza. Las variables de respuesta que se analizaron fueron: crecimiento (tasa de crecimiento, tiempo de generación, densidad celular final, tamaño celular y biomasa), composición proximal (proteínas, carbohidratos, lípidos), perfil de ácidos grasos, pigmentos (clorofila a , clorofila c y carotenos) y fotosíntesis (F_m/F_v , ETR_{max} , α y E_k).

En el caso de las curvas de crecimiento de CC y CA se realizó el análisis de covarianza (ANCOVA) con un 95% de confianza después de comprobar los supuestos de linealidad e independencia (Modelo de regresión lineal), Normalidad de residuos (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Ensayo preliminar para mantener un pH de 7.80 en cultivos de *Chaetoceros* sp.

El valor inicial de pH en los cultivos de *Chaetoceros* sp. durante el ensayo preliminar fue de 8.69 ± 0.03 . Los valores de pH medidos fluctuaron fuera del rango establecido (7.75-7.80), se registró un valor máximo de pH de 8.56 y mínimo de 7.51 (Figura 2). Por otro lado, la temperatura dentro de los cultivos de *Chaetoceros* sp. no fue homogénea (Figura 2) registrándose un cambio de temperatura de 1.5°C entre las 0 y 96 h como consecuencia de una avería del aire acondicionado del laboratorio húmedo donde se encontraban los cultivos.

Los flujos de inyección de CO_2 variaron en cada día de cultivo (Figura 2), durante las primeras 24 h de cultivo se utilizó el FR con inyecciones de 1 min 20 s cada hora. Además, el FR se utilizó para ajustar los valores iniciales de pH a las 0, 24, 48 y 72 h mediante inyecciones de 12, 4, 6 y 2 min respectivamente. Los flujos FL1, FL2 y FL4 se aplicaron después del ajuste con FR y se mantuvieron de forma continua hasta la siguiente lectura a las 24 h.

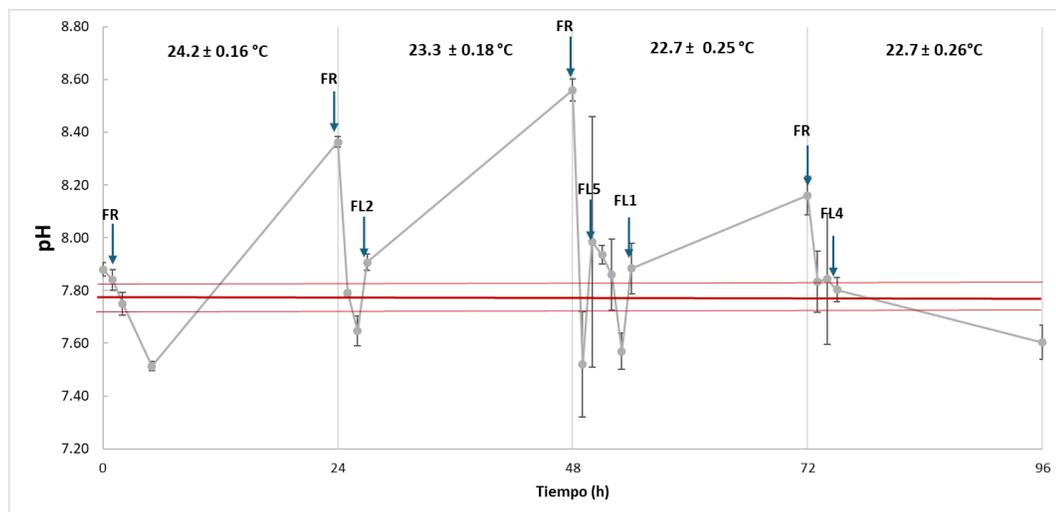


Figura 2. Valores promedio y desviación estándar de pH y temperatura de los cultivos de *Chaetoceros* sp. en el ensayo preliminar para el mantenimiento de pH a 7.80 durante cuatro días de cultivo (96 h) con diferentes flujos de inyección de CO_2 . Las flechas azules indican los flujos de inyección de CO_2 : flujo rápido (FR) y flujos lentos 1, 2, 3, 4 y 5 (FL1, FL2, FL4 y FL5). La línea roja central representa un 7.80 de pH, mientras las líneas rojas externas indican un rango de ± 0.05 unidades de pH.

3.2 Determinación de pCO₂ en cultivos de *Chaetoceros* sp.

Después del análisis de los parámetros de calidad de agua: alcalinidad, salinidad, pH y temperatura en agua de mar y en los cultivos de los tratamientos CC y CA al cuarto día con el programa CO2Sys, se observó que la concentración de pCO₂ en el agua de mar fue de 336.34 µatm, en el cultivo control fue de 0.005 ± 0.008 µatm y para el cultivo con aumento de pCO₂ fue de 811.38 ± 169.13 µatm (Tabla 1).

Tabla 1. Valores promedio y desviación estándar de los parámetros de calidad de agua y pCO₂ del agua de mar y los cultivos de *Chaetoceros* sp. al día cuatro en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO₂ (CA).

Tratamiento	pH	Temperatura (°C)	Salinidad (PSU)	Alcalinidad (µmol kg ⁻¹)	pCO ₂ (µatm)
AM	7.99	23.00	38.00	1198.92	336.34
CC*	10.08 ± 0.04	22.00 ± 0.20	38.00 ± 0.00	471.12 ± 69.15	0.005 ± 0.008
CA*	7.82 ± 0.07	22.00 ± 0.20	38.00 ± 0.00	1848.74 ± 84.04	811.380 ± 169.129

AM= agua de mar; (*) muestras centrifugadas a 2,400 ×g, 15 min, 22 °C

3.3 pH, temperatura e inyección de CO₂

Con base en los resultados obtenidos en el ensayo preliminar se realizaron los ajustes en el flujo de CO₂ para cada día de cultivo de *Chaetoceros* sp. en el tratamiento con aumento de CO₂ (CA). El pH inicial de los cultivos fue de 8.76 ± 0.01 y fueron ajustados a 7.80 ± 0.04 con la inyección de 13 min de CO₂ con el flujo FR.

El 80% de los valores de pH medidos durante los cuatro días de cultivo (96 h) de *Chaetoceros* sp. en el tratamiento CA se mantuvieron dentro del rango establecido de pH de 7.80 ± 0.05 (Figura 3), obteniendo un valor máximo de 7.94 ± 0.06 y un valor mínimo de 7.71 ± 0.10 durante los cuatro días de cultivo.

Durante las primeras 32 h de cultivo se utilizó el flujo FR para la inyección de 30 s de CO₂ cada hora, después se colocó en los matraces el flujo lento FL4 hasta las 48 h. Posteriormente, se colocó el FL1 durante una hora y finalmente se colocó el flujo FL3 hasta las 96 h.

La temperatura del cultivo de *Chaetoceros* sp. en el tratamiento CA fue homogénea y se registró un cambio desde las 0 h y hasta las 96 h de 0.38 °C.

En el caso del pH de los cultivos de *Chaetoceros* sp. en el tratamiento control (CC) el valor inicial fue de

8.66 \pm 0.02 y se registró un aumento de pH hasta 10.08 \pm 0.04 al cuarto día de cultivo (96 h). En cuanto a la temperatura, esta se mantuvo homogénea en los cuatro días de cultivo con un cambio de 0.63 °C desde las 0 h y hasta las 96 h (Figura 4).

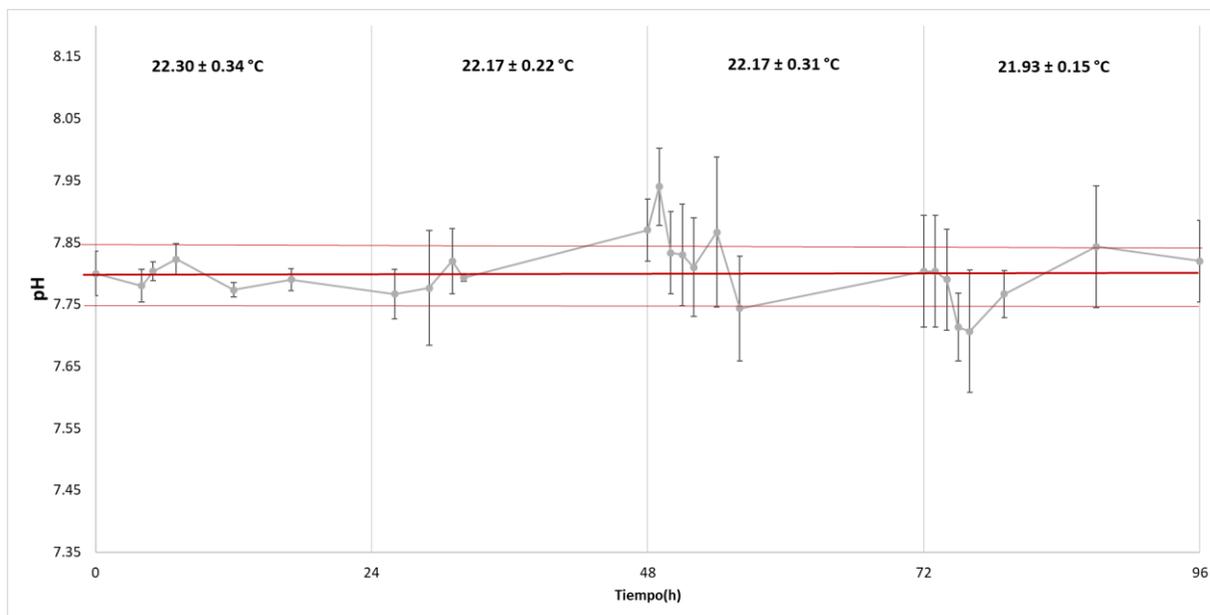


Figura 3. Valores promedio y desviación estándar de pH y temperatura de los cultivos de *Chaetoceros* sp. en el tratamiento con aumento CO_2 a pH 7.8 (CA) durante cuatro días de cultivo (96 h). La Línea roja central representa un valor de 7.80 de pH, mientras las líneas rojas externas indican un rango de \pm 0.05 unidades de pH.

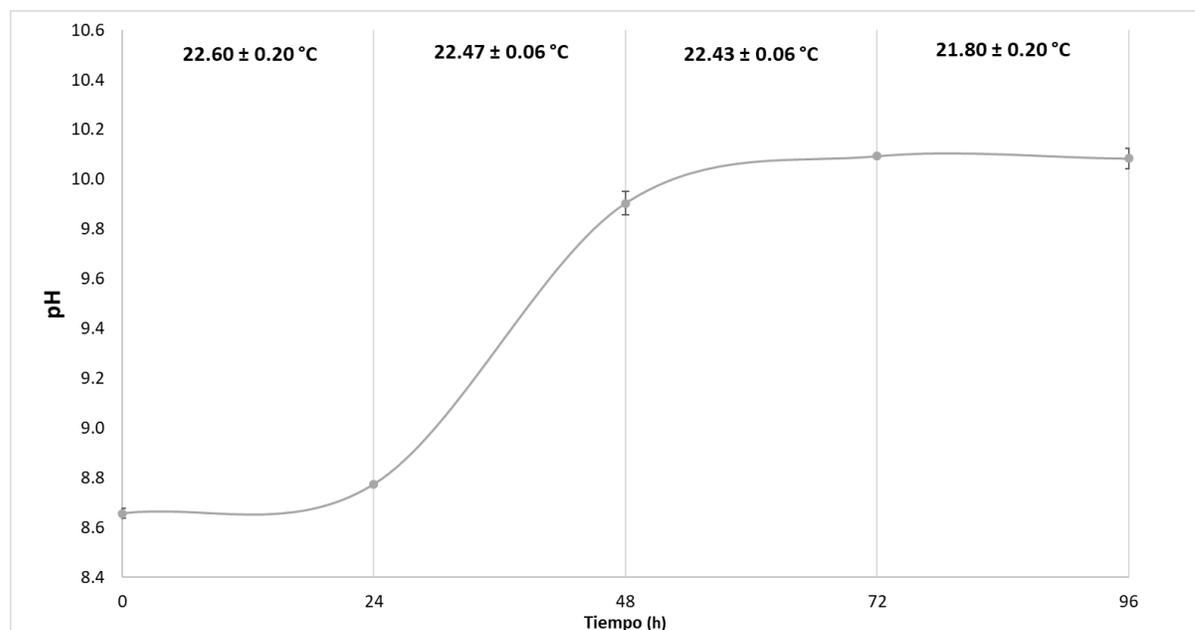


Figura 4. Valores promedio y desviación estándar de pH y temperatura de los cultivos de *Chaetoceros* sp. para el tratamiento control sin inyección de CO_2 (CC) durante cuatro días de cultivo (96 h).

3.4 Variables de crecimiento

3.4.1 Densidad celular y parámetros poblacionales

Se observó diferencia en la densidad celular por medio de la coloración de los cultivos mantenidos en los tratamientos CC y CA de *Chaetoceros* sp. desde el segundo y hasta el cuarto día de cultivo (Figura 5). Los resultados obtenidos en la curva de crecimiento indicaron que el crecimiento celular del tratamiento CA y CC fue significativamente diferente ($p < 0.05$) y se observó en la Figura 6 que la diferencia en la densidad celular es evidente a partir del segundo día de cultivo con densidades celulares de $1,132,000 \pm 68,500$ células ml^{-1} en CA y $624,000 \pm 32,572$ células ml^{-1} en CC.

En cuanto a los parámetros poblacionales (Tabla 2), se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el tratamiento CC y CA donde la densidad celular final y tasa de crecimiento (μ) fueron, respectivamente, 3.8 y 1.6 veces mayor en CA comparado con CC, además de que el tiempo generacional (T_g) fue 1.6 veces menor en CA que en CC.

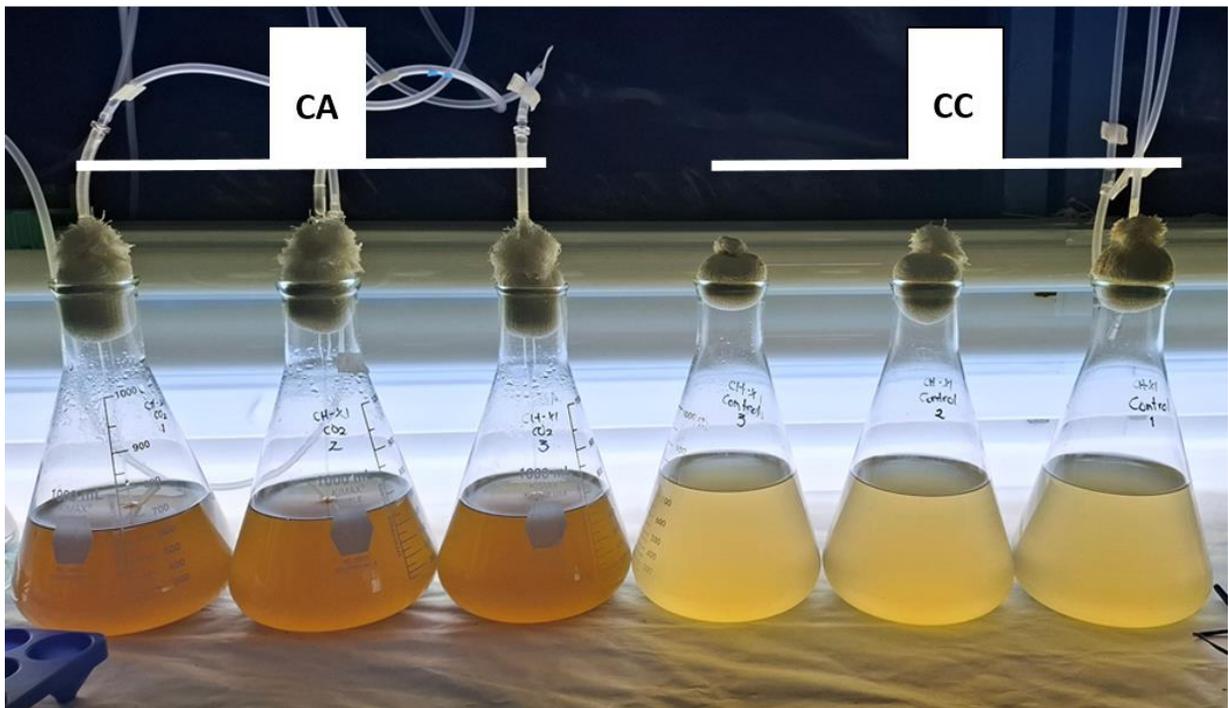


Figura 5. Cultivos estáticos de *Chaetoceros* sp. al cuarto día de cultivo en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO_2 (pH 7.8; CA).

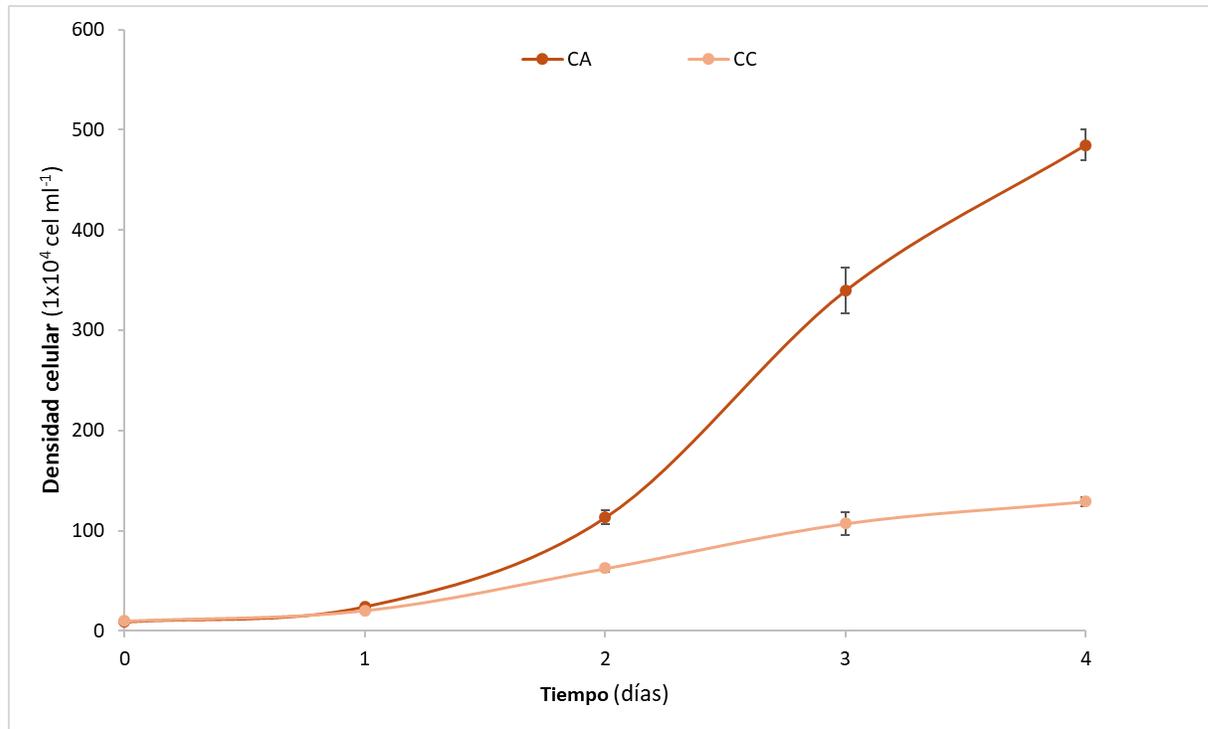


Figura 6. Valores promedio y desviación estándar de densidad celular de los cultivos de *Chaetoceros* sp. en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO_2 (CA) durante cuatro días de cultivo.

Tabla 2. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento (μ), tiempo de generación (T_g) y densidad celular final de los cultivos de *Chaetoceros* sp. en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO_2 (CA).

Parámetros poblacionales	Tratamiento CA	Tratamiento CC
μ (divisiones día ⁻¹)	1.44 ± 0.03***	0.89 ± 0.04***
T_g (días)	0.69 ± 0.01***	1.13 ± 0.05***
Densidad celular final (1×10^4 células ml^{-1})	485.00 ± 15.21***	128.92 ± 4.83***

Diferencia significativa con $p \leq 0.0001$ (***) entre tratamientos CC y CA con la prueba t , $\alpha = 0.05$.

3.4.2 Tamaño celular

Se midieron el largo y ancho de 90 células de *Chaetoceros* sp. por tratamiento CC y CA (Figura 7). Se obtuvo una medida promedio del largo de CC de $6.10 \pm 0.89 \mu\text{m}$ en comparación con $5.48 \pm 0.76 \mu\text{m}$ de CA. En cuanto al ancho de las células, en el tratamiento CC se obtuvo un valor promedio de $4.88 \pm 0.73 \mu\text{m}$ en comparación con $4.13 \pm 0.61 \mu\text{m}$ en CA. No se registró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre las medidas de CC y CA.

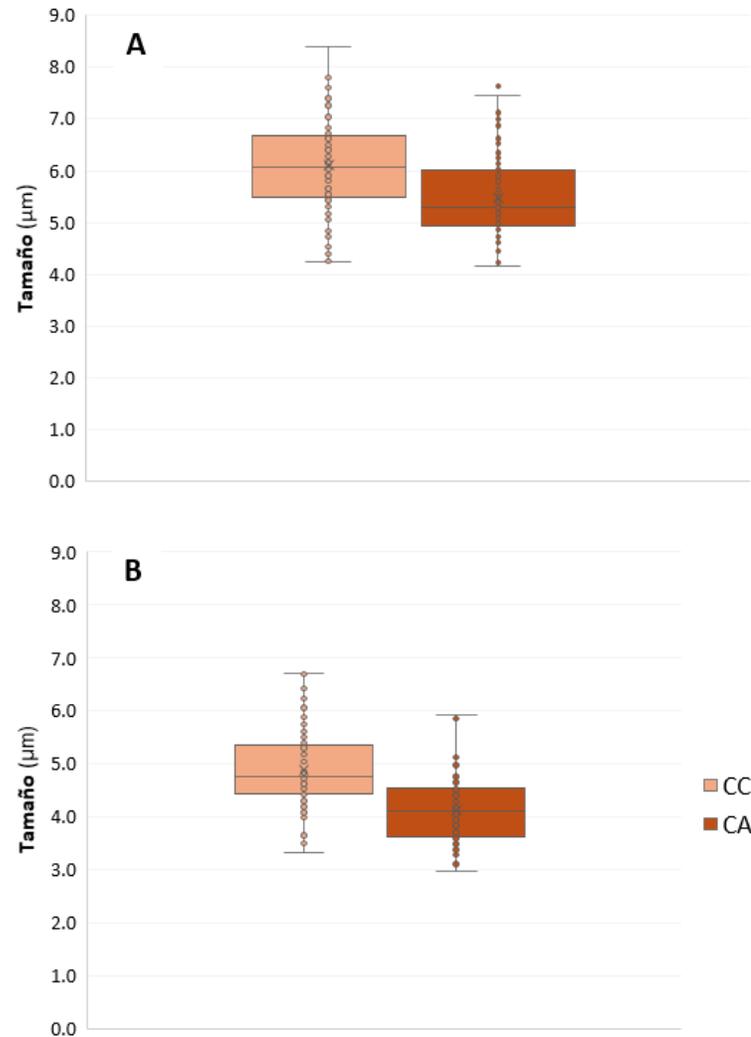


Figura 7. Medidas del largo (A) y ancho (B) de 90 células de *Chaetoceros* sp. por tratamiento control (CC) y con aumento de CO₂ (CA) al cuarto día de cultivo.

3.4.3 Biomasa

Los resultados obtenidos de los cultivos para el peso seco total (PST) fueron de $515.63 \pm 168.65 \mu\text{g ml}^{-1}$ para CC y $537.70 \pm 161.98 \mu\text{g ml}^{-1}$ para CA. En el caso del peso de la materia orgánica (PO) se calcularon valores de $345.70 \pm 86.83 \mu\text{g ml}^{-1}$ para CC y $367.11 \pm 72.23 \mu\text{g ml}^{-1}$ para CA. El contenido de cenizas (PC) fue de $169.93 \pm 81.83 \mu\text{g ml}^{-1}$ para CC y $170.60 \pm 95.23 \mu\text{g ml}^{-1}$ para CA. En las tres variables medidas (PST, PO y PC) no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre el tratamiento CC y CA (Figura 8).

En el caso del peso orgánico celular expresado en $\mu\text{g célula}^{-1}$ se obtuvo una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el tratamiento CC y el tratamiento CA, siendo las células del tratamiento CC 3.5 veces más pesadas que las del tratamiento CA (Figura 9).

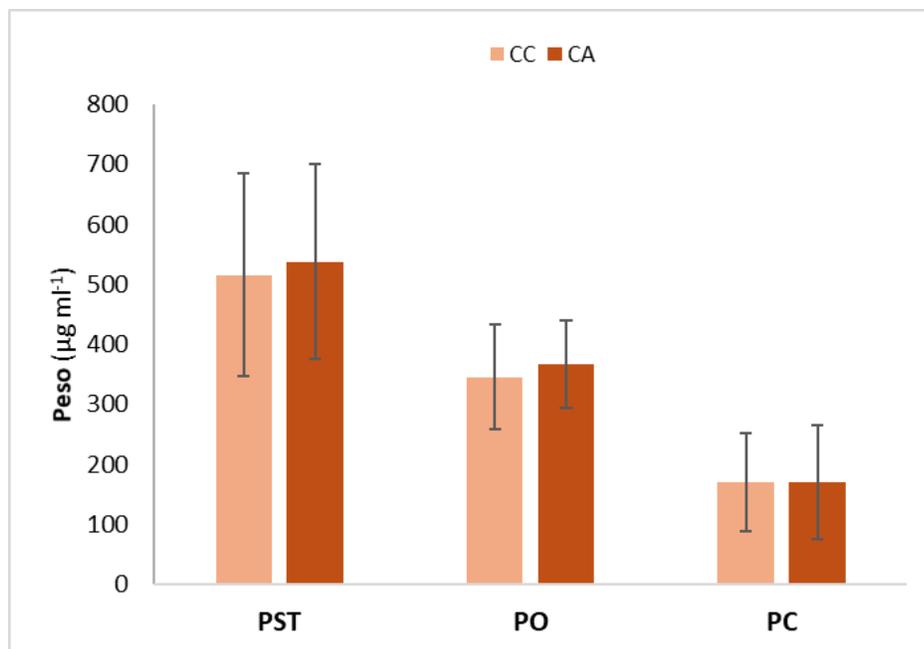


Figura 8. Valores promedio y desviación estándar del peso seco total (PST), peso orgánico (PO) y peso de cenizas (PC) al cuarto día de cultivo de *Chaetoceros* sp. en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO_2 (CA).

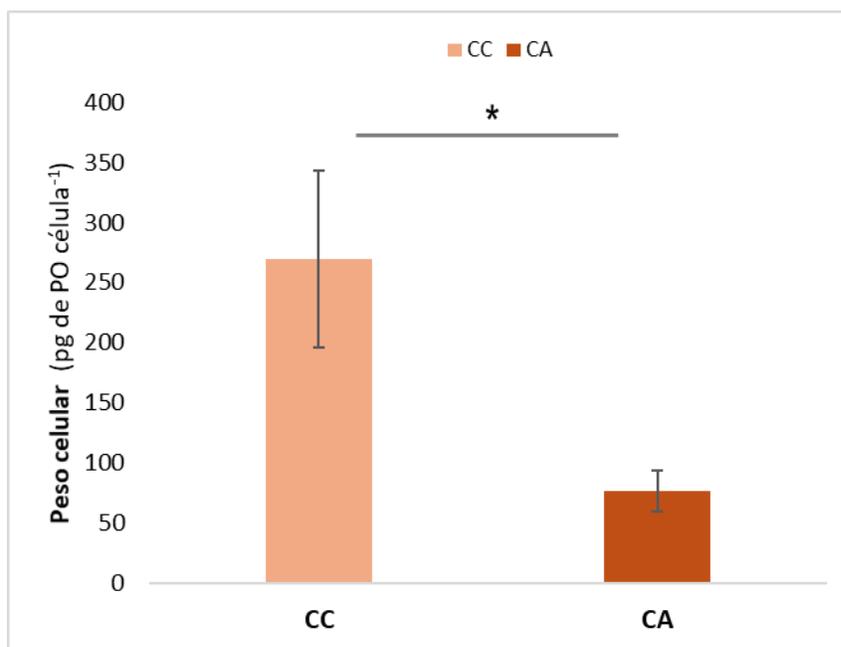


Figura 9. Valores promedio y desviación estándar del peso celular (con base en el peso orgánico) de *Chaetoceros* sp. al cuarto día de cultivo en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO_2 (CA). Diferencia significativa $p \leq 0.01$ (*) entre tratamientos CC y CA con la prueba t , $\alpha = 0.05$.

3.5 Composición proximal

Se obtuvo una concentración total de compuestos orgánicos (lípidos, proteínas y carbohidratos) de $51.97 \pm 1.27 \text{ pg cel}^{-1}$ en el tratamiento CC, en comparación con los $31 \pm 0.33 \text{ pg cel}^{-1}$ obtenidos en el tratamiento CA. En el caso de las proteínas no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) entre la concentración obtenida en CC ($18.56 \pm 1.01 \text{ pg cel}^{-1}$) comparada con el tratamiento CA ($18.46 \pm 0.72 \text{ pg cel}^{-1}$). Por otro lado, se observó que, como efecto del aumento de CO_2 , las concentraciones de carbohidratos y lípidos (expresadas en pg cel^{-1}) disminuyeron significativamente ($p < 0.05$), siendo 3.4 y 2.2 veces menores, respectivamente (Figura 10).

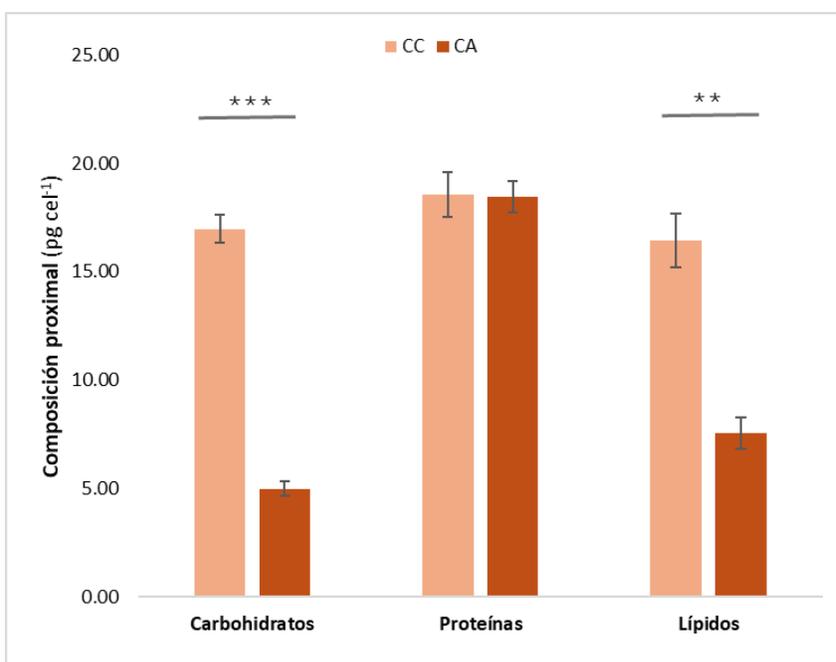


Figura 10. Valores promedio y desviación estándar de la concentración por célula de *Chaetoceros* sp. de carbohidratos, proteínas y lípidos (pg cel^{-1}) al cuarto día de cultivo en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO_2 (CA). Diferencia significativa con $p \leq 0.001$ (***) y $p \leq 0.001$ (***) entre tratamientos CC y CA con la prueba *t*, $\alpha = 0.05$.

3.6 Perfil de ácidos grasos

Se obtuvieron $6.39 \pm 1.94 \text{ mg}$ de lípidos (17.23% peso seco) en el tratamiento CA y $3.29 \pm 0.20 \text{ mg}$ (9.30% peso seco) en el tratamiento CC. A partir de estos lípidos, se extrajeron $2.51 \pm 0.75 \text{ mg}$ de ácidos grasos totales en CA, equivalentes al 6.78% del peso seco utilizado. En el caso del tratamiento CC, se obtuvieron

1.56 ± 0.04 mg, correspondientes al 4.41% del peso seco utilizado. No se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las cantidades de lípidos y ácidos grasos obtenidas en ambos tratamientos.

En cuanto al porcentaje total de los ácidos grasos identificados (Figura 11), se registraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los ácidos grasos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) entre los tratamientos CC y CA. Se observaron 8.11% menos SFAs, 11.95% menos MUFAs y 19.36% más PUFAs en las células de *Chaetoceros* sp. por efecto del aumento de CO₂.

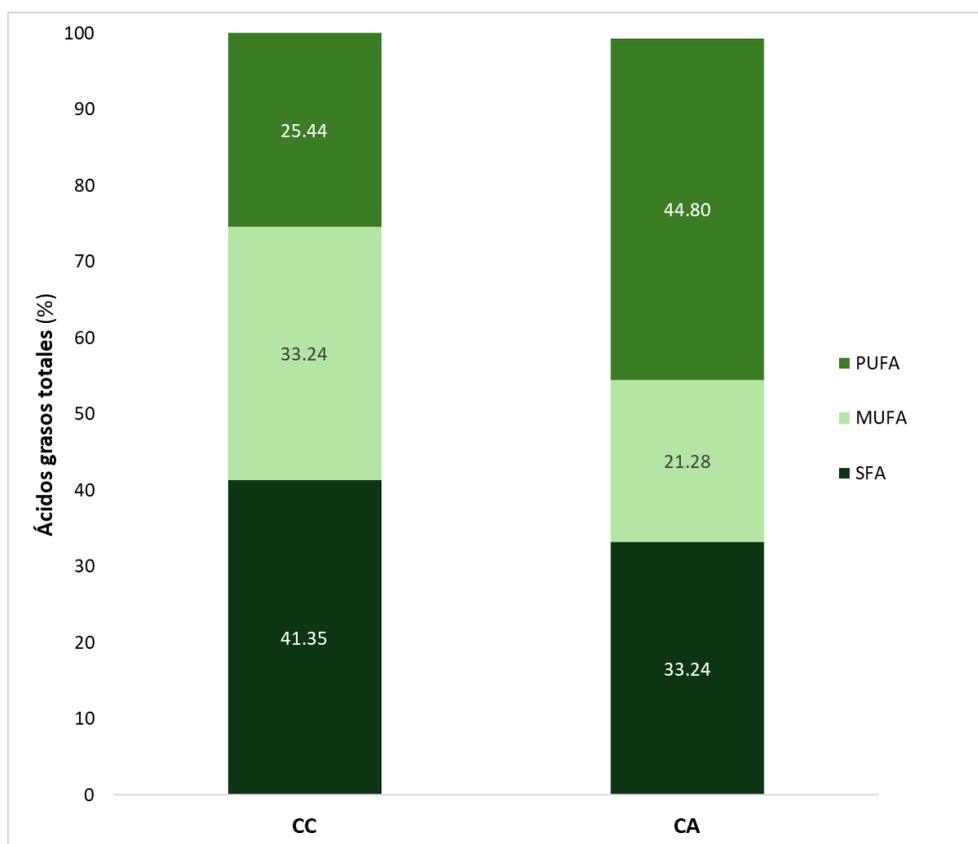


Figura 11. Composición de ácidos grasos (expresados en porcentaje del total de ácidos grasos identificados) por grupo de ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) al cuarto día de cultivo de *Chaetoceros* sp. en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO₂ (CA) (Ver Tabla 3).

Se identificaron para el tratamiento control 21 ácidos grasos diferentes, de los cuales diez corresponden con SFA, cuatro con MUFA y siete con PUFA. En el caso del tratamiento CA se identificaron 19 ácidos grasos que corresponden a diez como SFA, tres como MUFA y seis como PUFA (Tabla 3). Se obtuvo diferencia significativa ($p < 0.05$) en la abundancia de ocho ácidos grasos por efecto del aumento de CO₂ en los cultivos de *Chaetoceros* sp. (Tabla 3).

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los SFA C14:0, C15:0 y C17:0, sin embargo, el SFA C16:0 fue el más abundante en el tratamiento CC con un valor 3.1 veces mayor ($p < 0.05$) en comparación con el tratamiento CA. Por otro lado, el MUFA C16:1n-7 fue el más abundante dentro del tratamiento control y fue 1.5 veces mayor ($p < 0.05$) al valor obtenido en el tratamiento CA. En el caso del PUFA C20:5n-3 (ácido eicosapentanoico, EPA), fue 2.6 veces más abundante en el tratamiento CA ($p < 0.05$) comparada con el tratamiento control (Tabla 3). Además del EPA, se evaluó diferencia significativa ($p < 0.05$) en la abundancia de los PUFA C20:4n-6 (ácido araquidónico, ARA) y C22:6n-3 (ácido docosahexanoico, DHA), siendo 1.38 y 1.23 veces más abundantes en el tratamiento CA comparado con las células de los cultivos de *Chaetoceros* sp. en el tratamiento CC.

Tabla 3. Composición de ácidos grasos (expresados en porcentaje del total de ácidos grasos identificados) al cuarto día de cultivo de *Chaetoceros* sp. en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO₂ (CA).

Ácido graso	Abundancia (%)	
	CC	CA
SFA		
C10:0	2.17 ± 0.81	2.63 ± 1.30
C12:0	0.33 ± 0.40	0.11 ± 0.01
C13:0	4.12 ± 1.60	2.68 ± 0.54
C14:0	9.82 ± 0.98*	12.86 ± 0.07*
C15:0	0.60 ± 0.06*	0.36 ± 0.00*
C16:0	18.31 ± 3.19*	5.88 ± 0.44*
C17:0	2.81 ± 0.20***	6.25 ± 0.21***
C18:0	2.57 ± 1.41	1.81 ± 0.47
C20:0	0.35 ± 0.19	0.29 ± 0.09
C22:0	0.26 ± 0.12	0.37 ± 0.13
MUFA		
C14:1n-5	1.12 ± 1.73	0.31 ± 0.08
C16:1n-7	28.74 ± 1.75**	19.27 ± 0.41**
C18:1n-9	3.21 ± 2.72	1.70 ± 1.30
C22:1n-9	0.17 ± 0.06	nd
PUFA		
C18:2n-6c	2.44 ± 0.79	1.76 ± 0.00
C18:3n-6	2.02 ± 0.28	1.56 ± 0.27
C18:3n-3	0.52 ± 0.56	nd
C20:3n-6	0.59 ± 0.14	0.32 ± 0.14
C20:4n-6 (ARA)	6.92 ± 0.87*	9.51 ± 0.27*
C20:5n-3 (EPA)	11.24 ± 1.30**	29.55 ± 1.66**
C22:6n-3 (DHA)	1.72 ± 0.14*	2.11 ± 0.10*

Ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monosaturados (MUFA), ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentanoico (EPA) y ácido docosahexanoico (DHA), ácido graso no detectado (nd). Diferencia significativa con $p \leq 0.0001$ (***), $p \leq 0.001$ (**) y $p \leq 0.01$ (*) entre tratamientos CC y CA con la prueba *t*, $\alpha = 0.05$.

3.7 Pigmentos y fotosíntesis

La concentración de los pigmentos ($\mu\text{g ml}^{-1}$) clorofila *a*, *c* y carotenos fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) en el tratamiento CA con concentraciones 6.5 veces más de clorofila *a*, 6.3 veces más de clorofila *c* y 4.2 veces más carotenos en las células de *Chaetoceros* sp. en comparación con el tratamiento control (Figura 12).

Los valores obtenidos en la concentración de clorofila *a* y *c* en pg célula^{-1} fueron 1.7 veces mayores, para ambos pigmentos, ($p < 0.05$) en el tratamiento CA que en el tratamiento CC. Sin embargo, para la concentración de carotenos no se determinó diferencia significativa ($p > 0.05$) por efecto del aumento de CO_2 en el cultivo, debido a que el valor calculado para CC fue de $0.030 \text{ pg célula}^{-1}$ y $0.034 \text{ pg célula}^{-1}$ para CA (Figura 13).

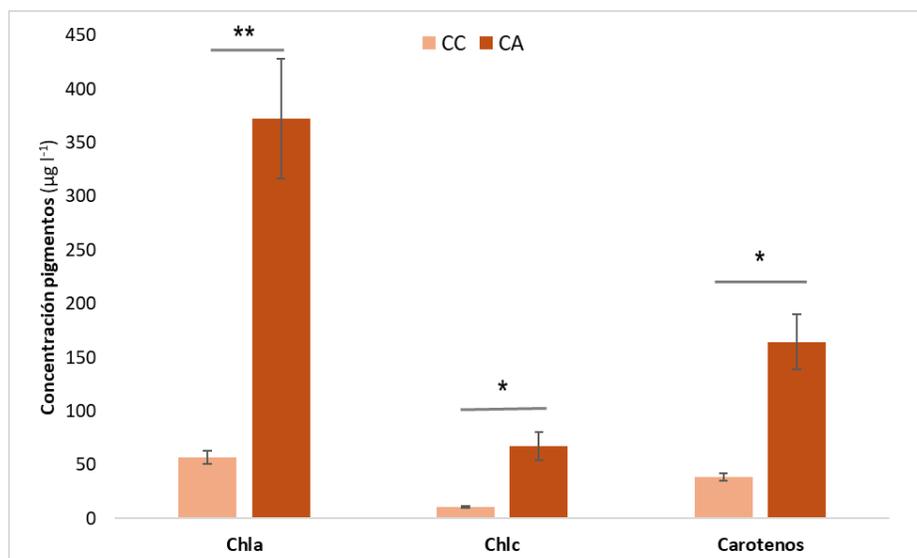


Figura 12. Valores promedio y desviación estándar de la concentración de pigmentos clorofila *a* (Chla), clorofila *c* (Chlc) y carotenos al cuarto día de cultivo de *Chaetoceros* sp. en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO_2 (CA). Diferencia significativa con $p \leq 0.001$ (**) y $p \leq 0.01$ (*) entre tratamientos CC y CA con la prueba *t*, $\alpha = 0.05$.

En las curvas de fotosíntesis (Figura 14) se observó que ante el aumento de CO_2 , el transporte de electrones (ETR) aumentó en relación al incremento del nivel de la irradiancia, sin embargo, se observó que en el tratamiento CC los valores de ETR fueron mayores respecto a los valores obtenidos con el tratamiento CA.

Dentro de los parámetros fotosintéticos, en el tratamiento CC se observó mayor eficiencia fotosintética (α) y la mayor tasa máxima de transporte de electrones (ETRmax) respecto a los valores obtenidos con el

tratamiento CA (Tabla 5; Figura 14). En el caso del índice de saturación (E_k), no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) por efecto del aumento de CO_2 en los cultivos de *Chaetoceros* sp. La eficiencia fotosintética máxima del fotosistema II (F_v/F_m) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en el tratamiento CA respecto a los valores obtenidos para el tratamiento CC.

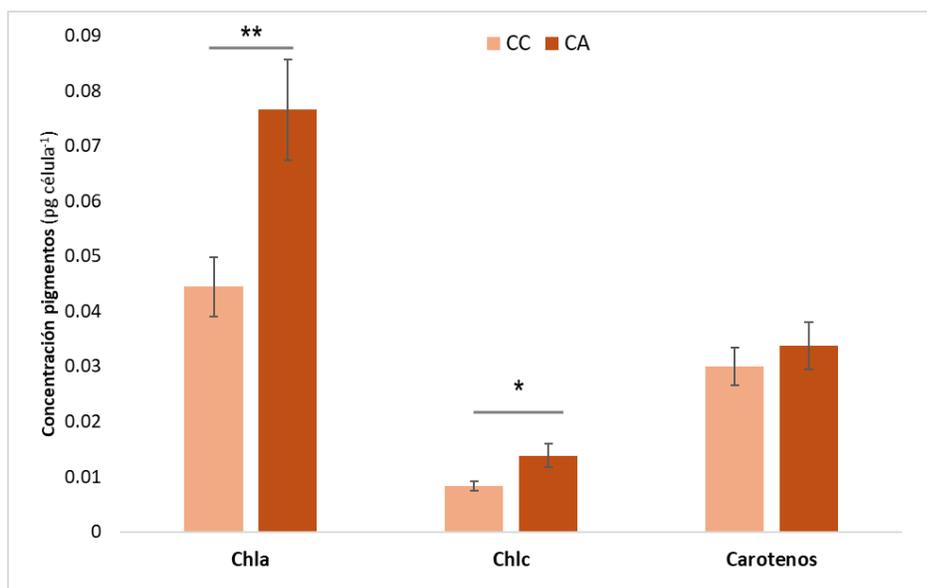


Figura 13. Valores promedio y desviación estándar de la concentración por célula de *Chaetoceros* sp. de pigmentos clorofila *a* (Chla), clorofila *c* (Chlc) y carotenos al cuarto día de cultivo en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO_2 (CA). Diferencia significativa con $p \leq 0.001$ (**) y $p \leq 0.01$ (*) entre tratamientos CC y CA con la prueba *t*, $\alpha = 0.05$.

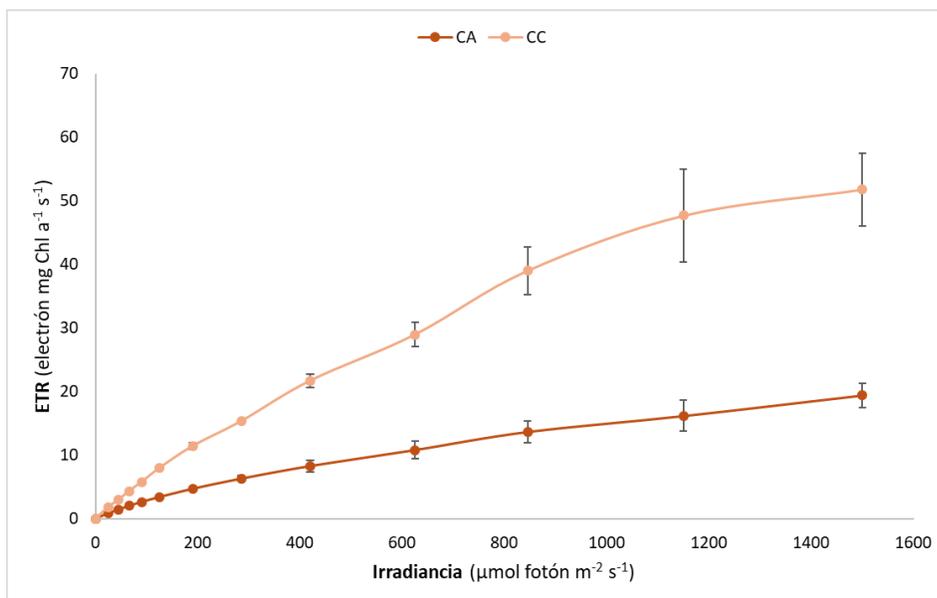


Figura 14. Curvas de fotosíntesis con base en el transporte de electrones del fotosistema II (ETR) y la irradiancia al cuarto día de cultivo de *Chaetoceros* sp. en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO_2 (CA).

Tabla 4. Valores promedio y desviación estándar de los parámetros fotosintéticos: tasa máxima de transporte de electrones (ETRmax), eficiencia fotosintética (α), índice de saturación (E_k) y la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (Fv/Fm) al cuarto día de cultivo de *Chaetoceros* sp. en los tratamientos control (CC) y con aumento de CO₂ (CA).

Tratamiento	α (electrón fotón ⁻¹)	ETRmax ($\mu\text{mol electrón m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	E_k ($\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Fv/Fm
CC	0.06 ± 0.003***	57.67 ± 10.66*	1000.01 ± 223.90	0.42 ± 0.008**
CA	0.03 ± 0.002***	36.57 ± 6.63*	1383.29 ± 179.05	0.65 ± 0.001**

Diferencia significativa con $p \leq 0.0001$ (***), $p \leq 0.001$ (**) y $p < 0.05$ (*) entre tratamientos CC y CA con la prueba t , $\alpha = 0.05$.

3.8 Transcriptoma

3.8.1 Extracción RNA

Se obtuvieron concentraciones de RNA mayores en las células de *Chaetoceros* sp. dentro del tratamiento CA con un promedio de $1,079 \pm 198.05 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ en comparación con $437.30 \pm 210.23 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ en el tratamiento CC. En el caso de la relación de calidad 260/280 para evaluar la contaminación con proteínas, todos los resultados obtenidos fueron superiores a 1.8 en ambos tratamientos.

Por otro lado, para la relación 260/230 que evalúa la contaminación por sales, fenoles y carbohidratos fueron en su mayoría superiores a 1.8, con excepción de la muestra CC 1 para el tratamiento control y aún después de realizar el proceso de purificación de RNA con acetato de amonio 3 M (Tabla 6). Se observaron bandas de RNA ribosomal íntegras en las muestras de los tratamientos CC y CA en el gel de agarosa 1.5% en un rango de más de 0.5 Kb y hasta 2 Kb, siendo las bandas más intensas las que se observaron a 1.5 Kb y 1.0 Kb (Figura 15).

3.8.2 Calidad de las lecturas y ensamblaje *de novo*

Se obtuvieron en promedio 60 580 150 y 60 929 14 de lecturas crudas para los tratamientos CC y CA, respectivamente, con una longitud de 150 pb por lectura. Después del proceso de limpieza, se conservó el 60.9% de las lecturas en CC y el 42.2% de lecturas en CA, con longitudes entre 147 a 150 pb y un contenido GC entre 43-44%.

El ensamblaje de *novo* resultó en 61 348 transcritos, con una longitud promedio de 1 651.68 pb. De acuerdo con el análisis de transrate, el 44.73% de los transcritos contiene marcos de lectura abiertos (ORFs), con un valor N50 de 4 045 pb y un contenido GC promedio de 41%. Por otro lado, el análisis con BUSCO indicó que el 80% de los transcritos están completos, de los cuales el 10.6% están presentes en una sola copia y el 69.4% se encuentran duplicados.

Tabla 5. Valores de concentración y calidad de RNA obtenido a partir de células de *Chaetoceros* sp. al cuarto día de cultivo de los tratamientos control (CC) y con aumento de CO₂ (CA).

Muestra	Concentración RNA (ng µl ⁻¹)	260/280	260/230
CC 1	343.40	2.08	1.79
CC 2	699.90	2.05	2.00
CC 3	328.60	2.07	1.85
CA 1	1181.00	2.04	2.44
CA 2	1206.80	1.97	2.50
CA 3	851.60	2.14	2.54

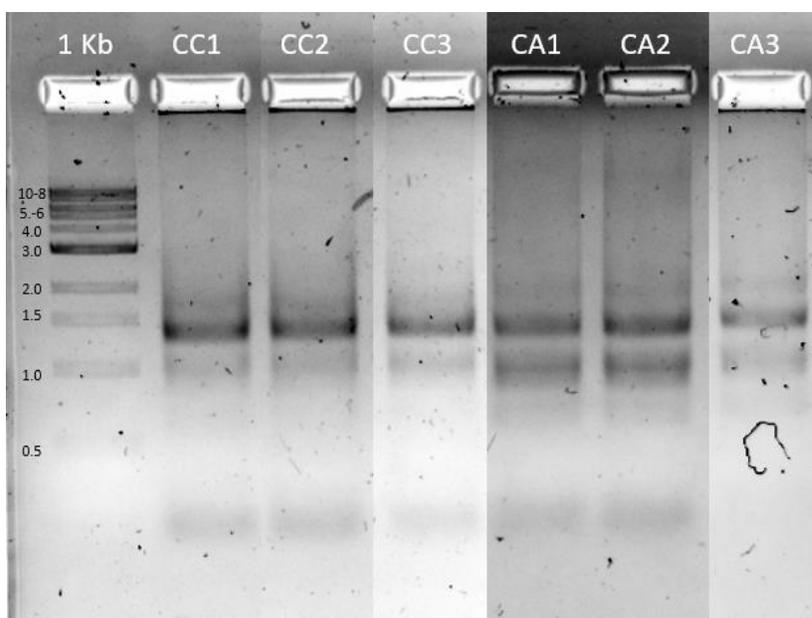


Figura 15. Gel de agarosa 1.5% con escalera de 1000 b (1Kb) y bandas de RNA ribosomal obtenido a partir de células de *Chaetoceros* sp. al cuarto día de cultivo de los tratamientos control (CC) y con aumento de CO₂ (CA).

3.8.3 Expresión diferencial y anotación funcional

Se obtuvieron 46 481 transcritos expresados diferencialmente (ajustados a $p < 0.1$), de los cuales el 3.8% (1757 transcritos) se encontraron sobreexpresados y el 7.4% (3447 transcritos) se encontraron subexpresados (Figura 16). En la Figura 17 se observan los 5 204 transcritos expresados diferencialmente

con un valor de Log₂ Fold Change (LFC) > 2 para los sobreexpresados y < -2 para los subexpresados con un valor de $p < 0.05$.

Como resultado del enriquecimiento de las vías KEGG, se encontraron 686 genes sobreexpresados en 88 rutas metabólicas y 1000 genes subexpresados en 87 rutas metabólicas. En las Figuras 18 y 19 se muestran únicamente las rutas metabólicas con los valores de enriquecimiento más altos para cada conjunto (subexpresado y sobreexpresado), debido a que, de las 97 rutas expresadas diferencialmente, únicamente 7 fueron exclusivas de las rutas subexpresadas y 8 exclusivas de las rutas sobreexpresadas, en *Chaetoceros* sp. bajo la comparación entre CA vs CC. El resto de las rutas expresadas diferencialmente fue compartido entre ambos conjuntos de datos.

Después del análisis de enriquecimiento se seleccionaron los genes con mayor valor LFC dentro de las rutas metabólicas de interés en la comparación CA vs CC. Se encontró un número variable de genes expresados diferencialmente en las rutas seleccionadas: cuatro genes en el ciclo de Calvin; cinco en rutas de replicación de DNA, nueve en rutas del metabolismo energético; siete en el metabolismo de ácidos grasos y cuatro genes en la ruta de fotosíntesis (Figura 20).

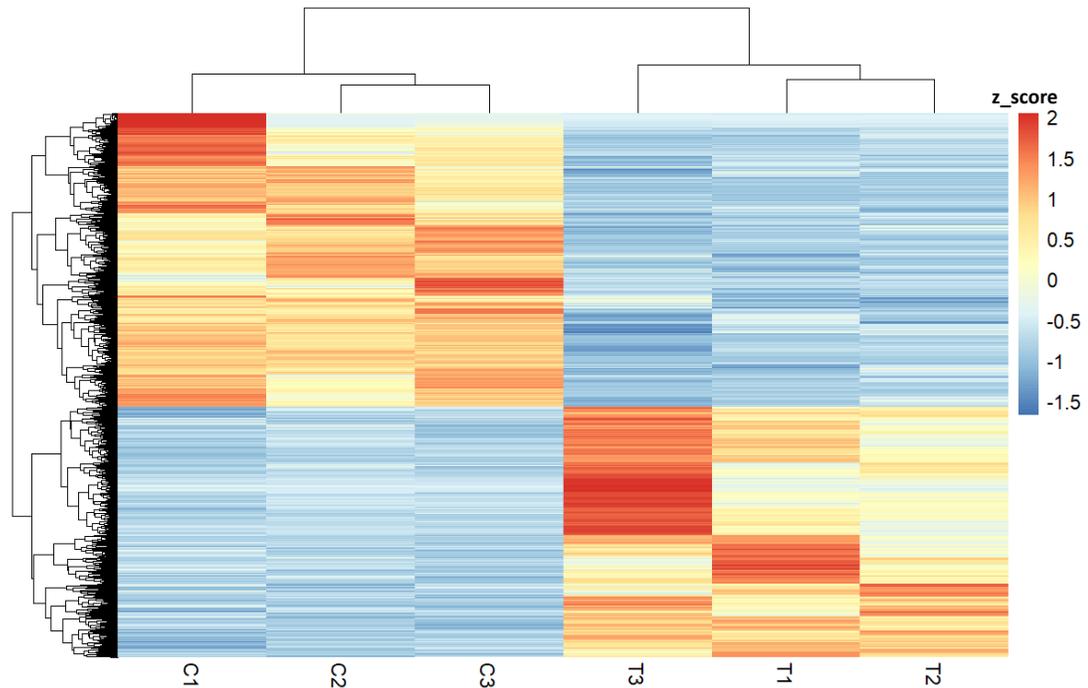


Figura 16. Heatmap de los transcritos expresados diferencialmente ($p < 0.1$) en *Chaetoceros* sp. al cuarto día de cultivo en el tratamiento control (C1, C2 y C3) y con aumento de CO₂ (T1, T2, T3). El color azul representa los transcritos subexpresados y el color rojo los transcritos sobreexpresados en la comparación CA vs CC. Los valores están representados como z-scores.

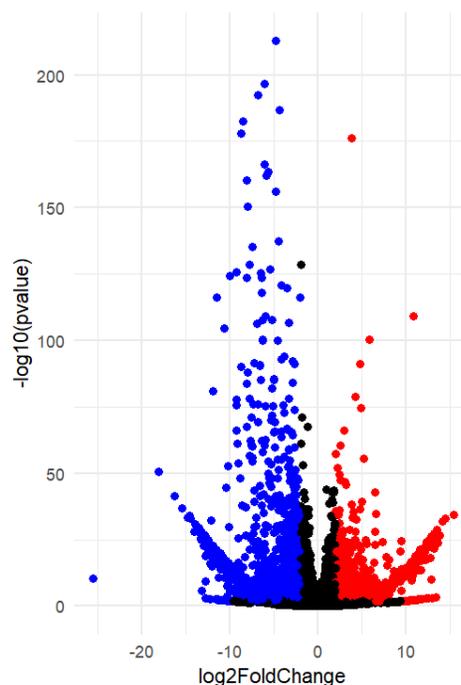


Figura 17. Volcano plot de los transcritos expresados diferencialmente ($p < 0.05$) en *Chaetoceros* sp. al cuarto día de cultivo en la comparación CA vs CC. El color negro representa los transcritos sin expresión diferencial, el color azul representa los transcritos subexpresados (Log_2 Fold Change < -2) y el color rojo los transcritos sobreexpresados (Log_2 Fold Change > 2).

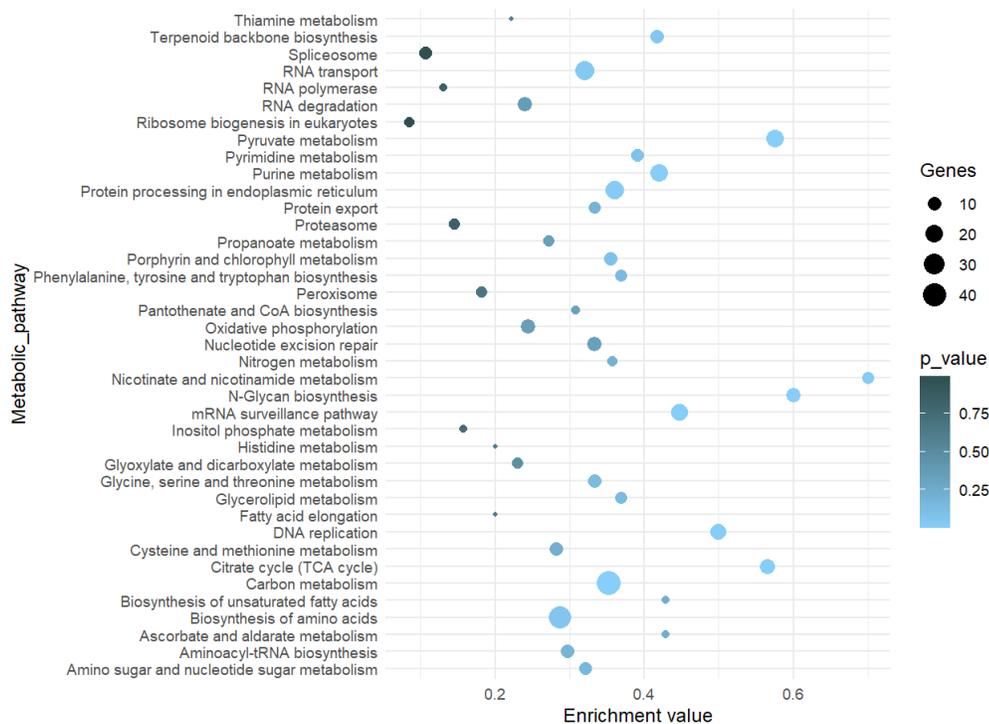


Figura 18. Análisis de enriquecimiento de las rutas metabólicas KEGG a partir de los transcritos subexpresados diferencialmente en *Chaetoceros* sp. bajo las condiciones CA vs CC. El tamaño de los puntos representa el número de genes involucrados en cada ruta y la intensidad del color indica el valor de la probabilidad (p) del enriquecimiento.

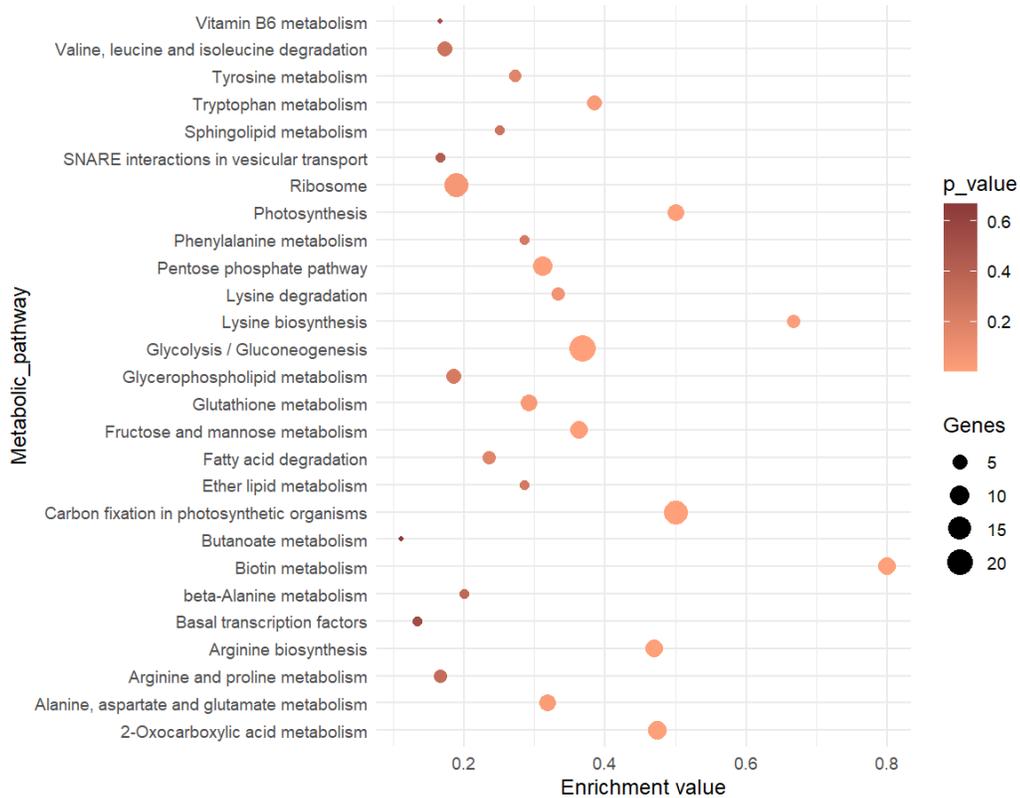


Figura 19. Análisis de enriquecimiento de las rutas metabólicas KEGG a partir de los transcritos sobreexpresados diferencialmente en *Chaetoceros* sp. bajo las condiciones CA vs CC. El tamaño de los puntos representa el número de genes involucrados en cada ruta y la intensidad del color indica el valor de la probabilidad (p) del enriquecimiento.

En las rutas metabólicas analizadas se identificaron diferentes isoformas de un mismo gen con patrones opuestos de expresión, debido a que algunas isoformas se encontraron subexpresadas y otras sobreexpresadas.

En el caso del ciclo de Calvin y el metabolismo energético, la enzima *fructose-bisphosphate aldolase* presentó una isoforma con un valor LFC menor a -12 y otra con valor superior a 10. De manera similar, en el metabolismo de ácidos grasos, se encontraron dos isoformas diferentes del gen *long-chain acyl-CoA synthetase 4*, con valores de cambio menores a -11 y mayores a 6. En la ruta de fotosíntesis, el gen *ferredoxin NADP reductase* mostró expresión diferencial entre las isoformas, con un LFC por debajo de -11 y superiores a 9.

En cuanto a los genes relacionados con la replicación del DNA, se destacó el gen *cdc21-like protein*, que presentó el mayor nivel de subexpresión observado (LFC= -11.03), Por otro lado, el gen *DNA polimerase* se encontró sobreexpresado con un valor de LFC de 7.94.

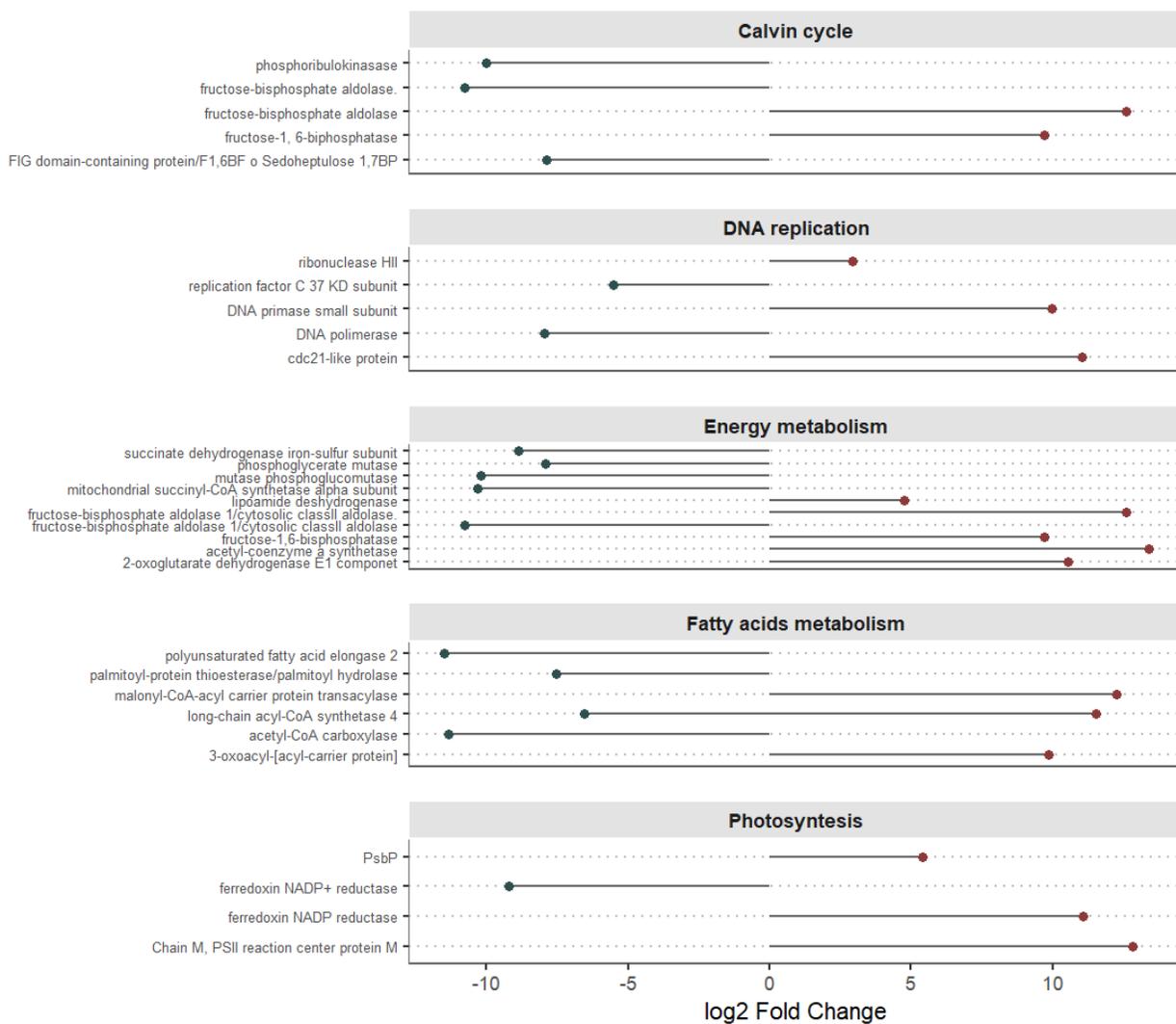


Figura 20. Genes involucrados en cinco rutas metabólicas en *Chaetoceros* sp. bajo las condiciones CA vs CC. El largo de la línea indica el valor de Log₂ Fold Change, donde los genes sobreexpresados (>2) se representan en color rojo y los genes subexpresados (<-2) en color azul.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Dinámica de pCO₂ y variables fisicoquímicas en cultivos de *Chaetoceros* sp.

El aumento en la concentración de CO₂ en el océano afecta los ciclos biogeoquímicos naturales en el agua, principalmente el ciclo del carbono inorgánico. En el océano todas las formas de carbono dentro del agua pCO₂, H₂CO₃ (ácido carbónico), HCO₃⁻ (bicarbonato), CO₃²⁻ (carbonato), OH⁻ (ion hidroxilo) e H⁺ (ion hidrógeno) se encuentran en equilibrio químico y debido a esto, es posible estimar la concentración de una especie de carbono a partir de otra con parámetros de concentración de carbono inorgánico disuelto (DIC), alcalinidad total (AT) o pH (Middelburg, 2019).

Con base en el principio anterior, en los tratamientos experimentales, se calcularon los valores de pCO₂ utilizando las mediciones de alcalinidad, pH, temperatura y salinidad. En el tratamiento CA, el valor de pCO₂ resultó menor que el reportado en estudios similares con *Phaeodactylum tricornutum* y *Chaetoceros muelleri*, bajo condiciones de pH 7.8, donde se alcanzaron concentraciones de 1000 µatm de pCO₂ (Huang et al., 2019; Liang et al., 2020).

La diferencia encontrada entre los estudios citados (Huang et al., 2019; Liang et al., 2020) y el tratamiento CA, puede atribuirse a que la alcalinidad total fue mayor (entre 2200 y 2300 µmol kg⁻¹) en comparación con el valor medido en el tratamiento CA (1848.74 µmol kg⁻¹). La alcalinidad en CA estuvo basada en la concentración de DIC presentes en el agua de mar utilizada en el cultivo y al mantener un pH constante de 7.8, el sistema se estabilizó en un nuevo equilibrio químico (Lower, 1996). Aunque la inyección de CO₂ en CA incrementó la concentración de DIC (principalmente HCO₃⁻; Middelburg, 2019) este aumento no fue suficiente para elevar la pCO₂ hasta 1000 µatm.

Debido a lo anterior, para alcanzar un valor de pCO₂ de 1000 µatm en los cultivos, probablemente era necesario aumentar la concentración de DIC, especialmente bicarbonato, para alcanzar una alcalinidad mayor a 2000 µmol kg⁻², o bien incrementar la inyección de CO₂ a un pH menor a 7.8 sin modificar el DIC del agua de mar. Sin embargo, debe considerarse que la actividad fotosintética de *Chaetoceros* sp. en el cultivo reduce la concentración de CO₂ en el medio (Lower, 1996; Doney et al., 2009). En este estudio no se estimó el consumo celular de CO₂, por lo que no es posible determinar la proporción de CO₂ consumida por las poblaciones de *Chaetoceros* sp. y su contribución al pCO₂ final.

En el tratamiento CC, el consumo de CO₂ disuelto por la actividad fotosintética de las células de *Chaetoceros* sp. fue más evidente y probablemente constituyó la principal variable que llevó el valor final de pCO₂ a un nivel cercano a 0 μatm al final del experimento. Aunque este proceso también se llevó a cabo en el tratamiento CA, la inyección continua de CO₂ mantuvo disponible el gas disuelto en el cultivo, evitando el incremento progresivo de pH, el cual es consecuencia de la disminución en la concentración de CO₂ y de protones en el agua (Middelburg, 2019).

Los parámetros fisicoquímicos como la temperatura, salinidad y presión afectan el equilibrio y las formas químicas del carbono en el agua (Lower, 1996). En particular, la temperatura influye en la capacidad del agua para disolver el CO₂ atmosférico debido a que, el aumento de la temperatura incrementa la energía cinética de las moléculas de agua, lo que dificulta la retención del gas CO₂ en el agua (Middelburg, 2019).

Con base en lo descrito anteriormente, durante el ensayo preliminar, los valores de temperatura mayores a 21 °C y su cambio entre cada día de cultivo, afectaron lograr establecer el pH a 7.8 con la inyección de CO₂, ocasionando que dentro del cultivo la capacidad para solubilizar el CO₂ disminuyera y, por lo tanto, se requirió de mayor concentración de CO₂, además, se presentó mayor dificultad para mantener el pH a 7.8 ± 0.05. Por el contrario, en el tratamiento CA, la temperatura se mantuvo constante y por lo tanto se requirió de menor inyección de CO₂ para establecer el pH 7.8 durante los cuatro días de cultivo.

4.2 Efecto del pCO₂ en el crecimiento de *Chaetoceros* sp. y su efecto sobre la fisiología

El aumento de la densidad celular en las microalgas está vinculado a los procesos fisiológicos de fotosíntesis y fijación de carbono. A través de estas rutas metabólicas, se genera la energía (ATP) y poder reductor (NADPH) que son utilizados para la síntesis de biomoléculas esenciales (Larkum, 2016). Sin embargo, ante el incremento del CO₂ en el medio, el equilibrio y flujo energético se altera, afectando el crecimiento y la composición celular (Kanazawa et al., 2020).

El aumento en la densidad celular y en la tasa de crecimiento por efecto del aumento de pCO₂, ha sido documentado en otros cultivos de microalgas como en *Chlamidomonas reinhardtii* (Zhang et al., 2021), o *Phaeodactylum tricorutum* (Huang et al., 2019). Específicamente para *C. muelleri* en condiciones similares (pH = 7.8 y pCO₂ ≥ 1000 μatm), se reportaron tasas de crecimiento de $\mu = 1.63 \pm 0.06 \text{ día}^{-1}$ (Ihnken et al.,

2011) y $\mu=1.59 \pm 0.12 \text{ día}^{-1}$ (Iwasaki et al., 2021). En *Chaetoceros* sp., el aumento de la tasa de crecimiento observado en CA podría estar asociado a diversas estrategias metabólicas que favorecen la reproducción asexual en condiciones de acidificación (pH 7.8).

Algunas de las estrategias metabólicas de *Chaetoceros* sp. en CA pueden ser la reducción en la inversión de energía en los mecanismos de concentración de carbono (CCM), debido a que la alta disponibilidad de CO₂ que facilita su difusión pasiva hacia el cloroplasto y esto permitiría redirigir la energía no invertida en CCM hacia el aumento de la densidad celular (Gao et al., 2014; Wu et al., 2014; Huang et al., 2019). Asimismo, cambios en el transporte iónico intracelular y la mayor concentración de CO₂ podría potenciar la actividad enzimática de la ribulosa-1, 5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCo) haciéndola más eficiente para producir compuestos esenciales para el crecimiento (Zhang et al., 2021). También pueden estar implicados mecanismos de asimilación de nitrógeno, favoreciendo así, la síntesis de proteínas y, en consecuencia, el incremento de la densidad celular (Hennon et al., 2017).

En cuanto a la biomasa (PSO, PST y PC), los valores fueron similares entre los cultivos de ambos tratamientos. Esto indica que, a pesar del incremento en la densidad celular en CA, cada célula presentó un menor contenido orgánico en comparación con CC. Esta reducción podría estar asociada a una menor acumulación de algunos compuestos como los lípidos o carbohidratos además de la ligera, aunque no significativa, disminución en el tamaño celular (largo y ancho), posiblemente relacionada con el aumento en la tasa de crecimiento observado en CA.

Contrario a la disminución en el peso celular en CA, la concentración de las clorofilas *a* y *c*, por efecto del incremento de CO₂, aumentaron tanto en el cultivo ($\mu\text{g l}^{-1}$) como en cada célula (pg cel^{-1}). Este incremento puede atribuirse a la baja disponibilidad de luz para las células debido al aumento en la densidad celular y el autosombreado generado por las mismas (Ng et al., 2015). En microalgas, la concentración de pigmentos puede variar en periodos de tiempo cortos para optimizar la captación de energía lumínica en respuesta a condiciones ambientales (Alcaraz-Rocha et al., 2023), por lo que es probable que el aumento en la concentración de pigmentos haya ocurrido a partir del día dos del cultivo CA.

Se ha documentado que, en cultivos de *C. muelleri*, expuestos a $\text{pCO}_2 > 800 \mu\text{atm}$, la capacidad fotosintética de los cloroplastos y la producción de pigmentos se ven favorecidas (Iwasaki et al. 2021). Sin embargo, en el tratamiento CA el incremento en la concentración de pigmentos no se tradujo en una mayor capacidad fotosintética respecto a CC.

La elevada producción de carotenos observada en *Chaetoceros* sp. en ambos tratamientos sugiere una respuesta fotoprotectora ante un posible estrés. Los carotenos actúan como antioxidantes ayudando a disipar el exceso de energía y a reducir la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ihnken et al., 2011). En el tratamiento CC, este efecto podría estar asociado a la disminución del CO₂ disponible después de cuatro días de cultivo.

En cuanto al valor de Fv/Fm en CC, este podría reflejar un desacoplamiento entre la eficiencia fotosintética y el crecimiento celular, posiblemente como consecuencia de la disminución de CO₂. Este parámetro se ha descrito como un indicador temprano de estrés ante el agotamiento progresivo de nutrientes. Debido a esto, en diatomeas, el Fv/Fm tiende a disminuir conforme aumenta el tiempo de cultivo, con un valor inicial de 0.6 que pueden descender hasta 0.3 después de ocho días de cultivo (Tan et al., 2017).

El hecho de que *Chaetoceros muelleri*, bajo las mismas condiciones de pH 7.8 y 110 μmol fotón m⁻² s⁻¹, presentara parámetros fotosintéticos de $\alpha = 0.016 \pm 0.004$, $E_k = 109 \pm 28$ μmol fotón m⁻² s⁻¹ y rETRmax = 33 μmol electrón m⁻² s⁻¹ (Ihnken et al., 2011), posiblemente indique una diferencia interespecífica con *Chaetoceros* sp. en CA, la cual podría reflejar ajustes en el fotosistema II (PSII), lo que permite una mayor captación de luz sin mejorar la eficiencia fotosintética.

4.3 Calidad nutricional de *Chaetoceros* sp. por aumento de CO₂

4.3.1 Proteínas, lípidos y carbohidratos

Se ha reportado que la acidificación en el océano, como consecuencia del cambio climático, afecta la composición bioquímica de los organismos marinos, especialmente los productores primarios, como las diatomeas. Estas pueden presentar alteraciones en la concentración de sílice, carbohidratos, proteínas y lípidos (Jin et al., 2020).

En el caso de *Chaetoceros* sp. la concentración de proteínas fue similar entre el tratamiento con aumento de CO₂ y el control. Esto puede explicarse porque el cultivo en fase exponencial favorece la síntesis de proteínas para sostener la producción de la maquinaria metabólica (DNA, RNA, enzimas) durante la reproducción (Vilém et al., 2016). Dado que la tasa de crecimiento fue mayor en CA, es probable que también se favoreció la síntesis proteica.

Por otro lado, la diferencia entre las menores concentraciones de carbohidratos y lípidos por célula observadas en condiciones de aumento de CO₂, podrían relacionarse con una baja acumulación de sustancias de reserva, ya que el cultivo no se encontraba en fase estacionaria al momento del análisis (Liu y Benning, 2012; Mudimi et al., 2015).

La disminución de carbohidratos y lípidos por célula en CA, puede relacionarse con el mantenimiento de la relación C/N en las células (Hennon et al., 2017; Liang et al., 2020), con la disminución del contenido orgánico por la reducción del tamaño celular o con la dirección del carbono fijado hacia rutas anabólicas inmediatas (síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y estructuras celulares), en lugar de acumularlo como compuestos de reserva (carbohidratos o lípidos). En el caso de CC, también se puede atribuir el aumento de carbohidratos y lípidos a un mecanismo de compensación energética por estrés ante el limitado CO₂ al final del experimento

La etapa de crecimiento de los cultivos de microalgas influye significativamente en la composición bioquímica de las células, incluso bajo condiciones de aumento de CO₂. Duncan et al. (2022), observaron que, bajo un gradiente acidificación (pH de 8.08 hasta 7.57), *Chaetoceros* spp. aumentó su contenido relativo de proteínas y lípidos bajo condiciones de alta concentración de CO₂ (1263 µatm). Sin embargo, en tratamientos intermedios de CO₂ (547-696 µatm), cuando el cultivo entró en la fase estacionaria, ambos compuestos disminuyeron.

Con base en lo descrito anteriormente, se sugiere que la fase de crecimiento también puede modular la respuesta al CO₂ mediante mecanismos de regulación metabólica por retroalimentación. En fase estacionaria, la acumulación de productos finales puede limitar la actividad de vías biosintéticas, incluso con aumento de CO₂. Esto evidencia que el efecto del CO₂ interactúa con factores internos del metabolismo celular de acuerdo al estado fisiológico y a las demandas metabólicas de la célula en cada fase de crecimiento.

En otro estudio, cultivos de *C. muelleri* expuestos a pH de 7.85 con 1000 µatm de pCO₂, la concentración de carbohidratos no presentó cambios significativos en comparación con el cultivo control, la concentración de proteínas disminuyó en más del 50% y la proporción de lípidos aumentó al doble. Estos resultados indican una estrategia de acumulación de sustancias de reserva como respuesta al estrés fisiológico inducido por el aumento de CO₂ y aunque no se mencionó la fase de crecimiento de las células, después de 10 días de cultivo es probable que el cultivo hubiera entrado en fase estacionaria al momento del análisis favoreciendo la síntesis de compuestos de reserva (Liang et al., 2020).

Pequeños cambios en la disponibilidad de nutrientes para los productores primarios pueden tener efectos significativos en los niveles superiores de la red trófica (Jin et al., 2020). Los lípidos, son las macromoléculas con mayor aporte energético (Triacil glicéridos y SFA) y nutricional (PUFAs). Modificaciones en su concentración, en las diatomeas, pueden ser críticos para la supervivencia y reproducción de otros organismos, por ejemplo, el zooplancton (Duncan et al., 2022).

4.3.2 Ácidos grasos

En *Chaetoceros* sp., el aumento de CO₂ provocó una disminución en la concentración de lípidos por célula (pg cel⁻¹). Sin embargo, al considerar la concentración total de lípidos en el cultivo (mg), no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. Esto podría explicarse por la variación en la densidad celular: aunque en CA las células presentaron menor contenido de lípidos, el incremento en la densidad celular compensó esta reducción, de modo que la concentración total de lípidos fue comparable a la de CC e incluso mostró valores superiores.

En cuanto a la concentración de ácidos grasos (mg), los resultados fueron similares entre ambos tratamientos, no obstante, el perfil de los mismos presentó variaciones significativas donde en CA se favoreció la proporción de PUFAs, mientras que en CC predominaron los SFAs.

Este resultado apoya lo descrito en la sección 4.3.1 donde *Chaetoceros* sp. muestra una estrategia metabólica que favorece las funciones celulares esenciales (crecimiento) sobre el almacenamiento, ya que a pesar del aumento de CO₂, las células aumentaron los niveles de EPA y DHA, mejorando el aporte de omega-3. Esto contrasta con lo observado en *C. muelleri*, donde el aumento de pCO₂ a 1000 µatm y pH de 7.8 causó una disminución en la proporción de EPA y DHA, acompañado de un aumento en la concentración de SFA como mecanismo de almacenamiento energético (Liang et al., 2020).

De acuerdo con Leu et al. (2013), ante la acidificación oceánica, la concentración de PUFAs (EPA y DHA) no está directamente relacionada con un aumento de pCO₂, sino con la capacidad de cada especie de diatomea para tolerar condiciones ambientales cambiantes y crecer. Por lo tanto, en escenarios futuros de acidificación, la disminución de nutrientes esenciales, no se deberá a una disminución en su producción por las diatomeas, más bien, a la pérdida de la abundancia relativa de las especies que son capaces de sintetizar estos nutrientes. Por lo que esta pérdida podría afectar la transferencia de energía y nutrientes

a niveles tróficos superiores, particularmente en zonas costeras donde las diatomeas dominan las poblaciones del fitoplacton.

El aumento de CO₂ tuvo un efecto positivo sobre *Chaetoceros* sp., con un aumento en la tasa de crecimiento y sin ninguna alteración negativa en la calidad nutricional (proteínas y ácidos grasos omega-3), sin embargo, es importante considerar si a largo plazo podrían presentarse efectos negativos que afecten la relación C/N y por lo tanto la síntesis de compuestos importantes para la nutrición oceánica.

4.4 Integración de la respuesta transcriptómica y fisiológica

Con el desarrollo de las plataformas de Secuenciación de Nueva Generación (NGS) el estudio del transcriptoma se ha centrado principalmente en la técnica de secuenciación de RNA (RNA-seq). Esta técnica permite cuantificar los transcritos, identificar genes activados o reprimidos, y comprender su función en un proceso metabólico, facilitando el análisis del impacto de factores ambientales sobre el metabolismo celular (Wang et al., 2009).

En el caso de las diatomeas, el uso de RNA-seq ha enriquecido los estudios fisiológicos sobre la acidificación oceánica, al revelar las bases genéticas de su respuesta al aumento de CO₂. Esto ha permitido una comprensión más integral del fenómeno y ha contribuido a predecir posibles efectos del CO₂ sobre las poblaciones de diatomeas (Hoffmann et al., 2008; Endo et al., 2016). No obstante, los análisis transcriptómicos también han confirmado que estas respuestas varían entre especies, reflejando una diversidad metabólica. Por lo que, comprender estas respuestas moleculares y fisiológicas son fundamentales para anticipar los efectos del cambio climático sobre la estructura y el funcionamiento del fitoplancton, así como para diseñar estrategias de manejo y conservación de los recursos marinos (Hu et al., 2022).

En *Chaetoceros* sp. el aumento de CO₂ no resultó en cambios evidentes entre las rutas metabólicas enriquecidas y fue hasta que se analizaron los genes diferencialmente expresados dentro de cada ruta metabólica en donde se observó un cambio metabólico significativo. Esto sugiere que la respuesta metabólica de *Chaetoceros* sp. fue más específica y no involucró una activación generalizada de rutas completas, sino ajustes puntuales en ciertos genes al mantener los cultivos bajo las condiciones ambientales de los tratamientos CA y CC.

4.4.1 Crecimiento y fotosíntesis

En el caso de la replicación celular se observó que, en CA las células mantienen un proceso activo de adición y eliminación de cebadores para el inicio de la replicación celular (*DNA primase small subunit*, *ribonuclease HII*) y el mantenimiento del ciclo celular en la fase S (*CDC21-like protein*) (Vilém et al., 2016). Lo descrito anteriormente, se relaciona fisiológicamente, con un aumento en la densidad celular y en la tasa de crecimiento de *Chaetoceros* sp. en CA.

En el caso de CC también se observaron genes sobreexpresados relacionados con la replicación de DNA durante la fase exponencial de *Chaetoceros* sp., como la *DNA polimerase* y *replication factor C37KD subunit*. Sin embargo, estos genes también pueden relacionarse con procesos de reparación del DNA (Vilém et al., 2016; NCBI, 2025).

En el caso de la fotosíntesis la sobreexpresión de genes encargados de la estabilidad estructural del PSII, *PsbP* y *PsbM* (*Chain M*, *PSII reaction center protein M*), observada en CA podría estar asociada a un proceso activo de reparación del PSII (Kawakami et al., 2010; Lu, 2016). Es probable que las células, al enfrentar un estrés metabólico derivado de la acumulación de protones en el citoplasma por la disminución de pH en el medio activaran medidas compensatorias (Shi et al., 2017). En este caso, pudo manifestarse con el incremento en la síntesis de carotenoides para evitar la formación de ROS que afectan las membranas o proteínas y en conjunto con los continuos mecanismos de reparación del PSII, permitió conservar valores altos de Fv/Fm, lo que aseguró un PSII funcional incluso en condiciones de acidificación.

A pesar de lo descrito anteriormente, la disminución en el ETRmax en CA indica que los procesos posteriores a la captación de luz, se ven afectados. Esto sugiere que el cuello de botella podría encontrarse en la fase de transporte de electrones debido a limitaciones en la disponibilidad de aceptores electrónicos o a una desregulación metabólica inducida por la alta densidad celular.

Aunque ambos tratamientos expresaron isoformas distintas de la enzima *ferredoxin NADP reductase*, responsable de la generación de NADPH para el ciclo de Calvin (Larkun, 2016), no se observa una tendencia clara en la modulación de fijación de carbono en CA, debido a que no se observaron otros genes sobreexpresados dentro del ciclo de Calvin. Por otro lado, la sobreexpresión de la enzima *phosphoribulokinase* en el tratamiento CC podrían indicar una mayor actividad de la RuBisCo, lo que sugeriría una mayor producción de esqueletos de carbono a través del ciclo de Calvin en CC en comparación con CA.

En otros estudios transcriptómicos bajo condiciones de aumento de CO₂ se observó una tendencia a la subexpresión de genes relacionados con los procesos fotosintéticos y el ciclo de Calvin. Esto sugiere que, ante el aumento de CO₂, algunas especies de microalgas pueden mantener estables sus procesos fotosintéticos sin necesidad de activar o suprimir muchos genes, lo que podría indicar una respuesta conservadora o de ajuste fino frente al cambio ambiental.

En *Chlamydomonas reinhardtii* expuesta a 1000 ppm de CO₂ (Zhang et al., 2021), se detectó la subexpresión de genes asociados con el transporte de electrones en proteínas del PSI, PSII y el citocromo c6 en la fotosíntesis; mientras que en el caso del ciclo de Calvin solo se encontró la subexpresión de la Ribosa 5-fosfato deshidrogenasa. A pesar de esto, se registró un aumento en el valor de Fv/Fm, lo que sugiere que el incremento de CO₂ puede mejorar la eficiencia cuántica del PSII, incluso cuando los genes relacionados con fotosíntesis presentaron menor expresión. Esto indica que estas rutas metabólicas continúan proporcionando la energía necesaria para la fijación y almacenamiento de carbono.

En el caso de las diatomeas, se observó una respuesta similar, donde *Chaetoceros affinis* expuesta a 800 ppm de CO₂ (Hennon et al., 2017) registró la subexpresión de todos los genes relacionados con la fotosíntesis (complejo de evolución de oxígeno, complejo antena, clorofilas, citocromo c6 y ferredoxina) y con el ciclo de Calvin (RuBisCo). Este mismo patrón también se observó en *Phaeodactylum tricornutum* a 1000 ppm de CO₂ (Huang et al., 2019), *Chaetoceros muelleri* a 1000 µatm de pCO₂ (Liang et al., 2020) y *Skeletonema marinoi* a 1000 ppm de CO₂ (Zhang et al., 2021).

Con base en esta evidencia, la respuesta de *Chaetoceros* sp. en CA podría representar un mecanismo de compensación metabólica específico ante la alta concentración de CO₂, ajustando la expresión génica en las rutas de fotosíntesis y el ciclo de Calvin. Este ajuste podría permitir a las células mantener la fijación de carbono y el crecimiento, a pesar de una subexpresión en los genes asociados a estas rutas.

4.4.2 Metabolismo energético y síntesis de ácidos grasos

En el tratamiento con alta concentración de CO₂, el análisis del metabolismo energético sugiere que la glucólisis está activa para la producción de piruvato, como lo indica la sobreexpresión de genes clave como *fructose-bisphosphate aldolase 1* y *fructose-1,6-bisphosphatase*. El piruvato producido se convierte en Acetyl-CoA a través de la acción de los genes *lipoamide deshidrogenase* y *acetyl-coenzyme a synthetase*, el

cual alimenta el ciclo de Krebs (a través de la *3-oxoglutarate dehydrogenase*) así como la síntesis de lípidos (mediada por *malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase*) (Raven y Beardall, 2016).

Particularmente, con los genes sobreexpresados en CA, los esqueletos de carbono se incorporaron en la ruta de síntesis de ácidos grasos (por medio de *3-oxoacyl- [acyl-carrier protein]*), destacando la participación de *long-chain acyl-CoA synthetase 4* en la elongación de PUFAs, como el EPA (Khozin-Goldberg, 2016). Esto podría indicar que el aumento en la proporción de PUFAs en CA fueron incorporados en las membranas celulares, aumentando su fluidez, facilitando el transporte de metabolitos e iones o como reemplazo continuo de las membranas. Este hecho respalda la hipótesis de un mecanismo de compensación estructural para mantener la funcionalidad celular bajo estrés por acidificación, en el cual la célula reemplaza constantemente componentes de sus membranas, posiblemente como respuesta a la disminución del pH intracelular, tal como se observó en *P. tricornutum* y *C. muelleri* a 800 μatm y pH 7.8 (Shi et al., 2019).

Considerando los estudios revisados sobre fotosíntesis, ciclo de Calvin y metabolismo energético, se observa un patrón común en varias especies ante el aumento de CO_2 . En *C. reinhardtii* (Zhang et al., 2021), se reportó una sobreexpresión de genes de la glucólisis para la producción de piruvato, lo cual también se observó en *Chaetoceros* sp. en CA. Además, en *C. reinhardtii* se sobreexpresó la enzima 2-oxoglutarato deshidrogenasa junto con otros intermediarios del ciclo de Krebs (succinil-CoA, fumarato y oxalacetato) involucrados en la síntesis de aminoácidos. La sobreproducción de acetyl-CoA favoreció la síntesis de ácidos grasos, diferentes a los obtenidos en CA, como el ácido mirístico, palmítico y oleico.

En el caso de la diatomea *S. marinoi* (Zhang et al., 2021) se identificó un flujo de energía similar desde el ciclo de Krebs y la glucólisis, con la sobreexpresión de intermediarios clave, al igual que en CA. Sin embargo, debido a la reducción del crecimiento celular de *S. marinoi*, se favoreció la síntesis de PUFAs sobre los ácidos grasos de *novo* (producidos en el cloroplasto como el C:16 y C:18). Además de que la ruta de la beta oxidación se encontró activada para mantener la viabilidad celular ante el estrés de CO_2 elevado. De forma comparable, *C. affinis*, se observó un aumento en la expresión de genes relacionados con la síntesis y degradación de ácidos grasos, lo cual sugiere un mecanismo compensatorio ante el estrés del aumento de CO_2 .

En *C. muelleri* (Liang et al., 2020) se encontró que la principal fuente de energía también provenía del ciclo de Krebs y especialmente de la glucólisis, debido a la sobreexpresión de genes como la fosfato isomerasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y fosfoglicerato quinasa. A pesar de la subexpresión de la acetyl-

CoA carboxilasa el contenido de lipídico fue mayor al control indicando una redirección del flujo metabólico.

Finalmente, a diferencia de las especies antes descritas, se ha visto que en *P. tricornutum* (Huang et al., 2019) no se observó una compensación energética ante la subexpresión del ciclo de Calvin, debido a que los genes clave de la glucólisis (fosfoglicerato quinasa) y del ciclo de Krebs (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa) se encontraron subexpresados. Sin embargo, la densidad celular aumentó, lo que sugiere una estrategia basada en la reducción del metabolismo para favorecer el crecimiento en condiciones de CO₂ elevado.

Con base en esta información se observa que *Chaetoceros* sp. en CA compartió el mismo mecanismo de compensación energético que otras diatomeas ante el aumento de CO₂, sin embargo, se destaca que la capacidad para dirigir la energía, el carbono y el tipo de PUFAs es específico de cada especie. Estos hallazgos refuerzan la idea de que, aunque las diatomeas comparten una respuesta metabólica general frente al aumento de CO₂, la forma en que esta energía se canaliza hacia productos específicos, como los ácidos grasos poliinsaturados, parece ser una característica regulada finamente a nivel de especie. Esta especificidad metabólica podría estar relacionada con diferencias genéticas y ambientales que condicionan las rutas de biosíntesis y degradación lipídica, lo que tiene implicaciones desde el punto de vista ecológico además de su uso en biotecnología y acuicultura.

Capítulo 5. Conclusiones

El aumento de CO₂ en los cultivos de *Chaetoceros* sp. modifica procesos fisiológicos que reflejan una estrategia de adaptación a la acidificación del medio. En el tratamiento con aumento de CO₂ (CA), se observó un incremento en la tasa de crecimiento y en la densidad celular, acompañado por una reducción del peso por célula. Aunque esta reducción afectó la concentración de biomasa, se registró un aumento en los pigmentos fotosintéticos, como una probable respuesta al autosombreado generado por la alta densidad de células y a un mecanismo de compensación por estrés fisiológico.

En cuanto a la composición proximal, el contenido proteico se mantuvo estable entre tratamientos, mientras que los lípidos y carbohidratos por célula disminuyeron en CA, posiblemente debido a que el cultivo aún no alcanzaba la fase estacionaria. A pesar de esto, la proporción de PUFAs, como EPA y DHA, no presentaron cambios significativos, lo que sugiere que *Chaetoceros* sp. mantuvo su contenido de omega-3 bajo condiciones de alto CO₂.

Desde un enfoque transcriptómico, *Chaetoceros* sp. mostró una reconfiguración metabólica específica bajo condiciones de acidificación. Se detectó una activación de la glucólisis y rutas asociadas a la síntesis de lípidos, con una posible incorporación de PUFAs en las membranas celulares. La expresión diferencial de genes involucrados en crecimiento, fotosíntesis y metabolismo energético corroboran un mecanismo compensatorio para sostener el crecimiento y la funcionalidad celular en escenarios de acidificación.

Frente al aumento de CO₂ *Chaetoceros* sp. demostró estrategias fisiológicas y transcriptómicas que le permitieron adaptarse manteniendo su calidad nutricional y capacidad de crecimiento durante cuatro días de cultivo. Esta resiliencia resalta su importancia ecológica como componente clave del fitoplancton costero y para aplicaciones en acuicultura. Su habilidad para reconfigurar el metabolismo sin perder valor nutricional sugiere que *Chaetoceros* sp. podría mantener su funcionalidad y persistencia en futuros escenarios de cambio climático.

Capítulo 6. Recomendaciones

Extender el periodo experimental e incluir fases más avanzadas del cultivo (como senescencia) para evaluar si las respuestas observadas se mantienen o se modifican con el tiempo según la fase de crecimiento de los cultivos.

Realizar análisis metabolómicos y proteómicos para complementar los datos transcriptómicos y confirmar si los cambios en la expresión génica se traducen en una respuesta funcional a nivel de proteínas y metabolitos.

Incluir más especies de microalgas y comparar diferentes especies de *Chaetoceros* u otras diatomeas costeras para evaluar si las respuestas son específicas.

Literatura citada

- Alcaraz-Rocha, P., Puig-Fàbregas, J., Garrido, J. L., & Sobrino, C. (2023). Ocean acidification affects pigment concentration and photoprotection of marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 68(4), 831-844. <https://doi.org/10.1002/lno.12313>
- Alexa A., & Rahnenfuhrer J. (2023). topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology. <https://bioconductor.org/packages/topGO>
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S. E., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., & Sherlock, G. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, 25(1), 25-29. <https://doi.org/10.1038/75556>
- Bach, L. T., & Taucher, J. (2019). CO₂ effects on diatoms: a synthesis of more than a decade of ocean acidification experiments with natural communities. *Ocean Science*, 15(4), 1159-1175. <https://doi.org/10.5194/os-15-1159-2019>
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). *Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology*. CRC Press. https://is.muni.cz/el/1431/jaro2013/Bi9535/um/ALGAE_ANATOMY_BIOCHEMISTRY_BIOTECHNOLOGY.pdf
- Bateman, A., Martin, M., Orchard, S., Magrane, M., Ahmad, S., Alpi, E., Bowler-Barnett, E., Britto, R., Bye-A-Jee, H., Cukura, A., Denny, P., Doğan, T., Ebenezer, T. E., Fan, J., Garmiri, P., Gonzales, L., Hatton-Ellis, E., Hussein, A., Ignatchenko, A., & Zhang, J. (2022). UniProt: the universal protein knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D523-D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Bolger, A., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884-i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
- Cordero-Esquivel, B., Voltolina, D., & Correa-Sandoval, F. (1993). The biochemical composition of two diatoms after different preservation techniques. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 105(2), 369-373. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(93\)90243-X](https://doi.org/10.1016/0305-0491(93)90243-X)
- Cubasch, U., Wuebbles, D., Chen, D., Facchini, M.C, Frame, D., Mahowald, N., & Winther, J.G. (2013). *Chapter 1: Introduction*. In T.F. Stocker, D. Qin, G.K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex & P.M. Midgley (Eds.), *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. 1-37). Cambridge University Press. https://ipcc.ch/site/assets/uploads/2017/09/WG1AR5_Chapter01_FINAL.pdf

- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Duncan, R. J., Nielsen, D. A., Sheehan, C. E., Deppeler, S., Hancock, A. M., Schulz, K. G., Davidson, A. T., & Petrou, K. (2022). Ocean acidification alters the nutritional value of Antarctic diatoms. *New Phytologist*, 233(4), 1813-1827. <https://doi.org/10.1111/nph.17868>
- Doney, S. C., Fabry, V. J., Feely, R. A., & Kleypas, J. A. (2009). Ocean acidification: the other CO₂ Problem. *Annual Review of Marine Science*, 1(1), 169-192. <https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163834>
- Eilers, P. H., & Peeters, J. C. H. (1988). A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecological Modelling*, 42(3-4), 199-215. [https://doi.org/10.1016/0304-3800\(88\)90057-9](https://doi.org/10.1016/0304-3800(88)90057-9)
- Endo, H., Sugie, K., Yoshimura, T., & Suzuki, K. (2016). Response of spring diatoms to CO₂ availability in the Western North Pacific as determined by Next-Generation Sequencing. *PLoS ONE*, 11(4), 1-22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154291>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2022). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. La sostenibilidad en acción*. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>
- Fogg, G.E., & Thake, B.J. (1987). *Cultures of limited volume*. In G.E. Fogg & B. Thake (Eds.), *Algal culture and phytoplankton ecology* (3^a ed., pp. 12-42). University of Wisconsin Press. <https://www.amazon.com/Algal-Cultures-3rd-G-Fogg/dp/0299105601>
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
- Gao, K., & Campbell, D. A. (2014). Photophysiological responses of marine diatoms to elevated CO₂ and decreased pH: a review. *Functional Plant Biology*, 41(5), 449. <https://doi.org/10.1071/fp13247>
- Gattuso, J., Magnan, A., Billé, R., Cheung, W. W. L., Howes, E. L., Joos, F., Allemand, D., Bopp, L., Cooley, S. R., Eakin, C. M., Høegh-Guldberg, O., Kelly, R. P., Pörtner, H., Rogers, A. D., Baxter, J. M., Laffoley, D., Osborn, D., Rankovic, A., Rochette, J., Sumaila, U.R., Treyer, S., & Turley, S. (2015). Contrasting futures for ocean and society from different anthropogenic CO₂ emissions scenarios. *Science*, 349(6243), 1-10. <https://doi.org/10.1126/science.aac4722>
- Guillard, R. R. L. (1973). Division rates. In J. R. Stein. (Ed), *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements* (pp. 289–312). Cambridge University Press. <https://www.amazon.com/Handbook-Phycological-Methods-Culture-Measurements/dp/0521297478>
- Guillard, R. R. L., & Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2), 229-239. <https://doi.org/10.1139/m62-029>
- Grabherr M. G., Haas B. J., Yassour M., Levin J. Z., Thompson D. A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q., Chen Z., Mauceli E., Hacohen N., Gnirke A., Rhind N., di Palma F., Birren

- B. W., Nusbaum C., Lindblad-Toh K., Friedman N., & Regev A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29(7), 644-52. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Griffith, M., Walker, J., Spies, N. C., Ainscough, B. J., & Griffith, O. L. (2015). Informatics for RNA Sequencing: A Web Resource for Analysis on the Cloud. *PLOS Computational Biology*, 11(8), 1-20. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004393>
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J. C., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M. D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N. T., Westerman, R., William, T., Dewey, C. N., Henschel, R., LeDuc, R.D., Friedman, N., & Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 8(8), 1494-1512. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>
- Harvey, B. P., Agostini, S., Kon, K., Wada, S., & Hall-Spencer, J. M. (2019). Diatoms dominate and alter marine food-webs when CO₂ rises. *Diversity*, 11(12), 1-13. <https://doi.org/10.3390/d11120242>
- Hennon, G. M. M., Limón, M. D. H., Haley, S. T., Juhl, A. R., & Dyhrman, S. T. (2017). Diverse CO₂-induced responses in physiology and gene expression among eukaryotic phytoplankton. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02547>
- Hofmann, G. E., O'Donnell, M. J., & Todgham, A. E. (2008). Using functional genomics to explore the effects of ocean acidification on calcifying marine organisms. *Marine Ecology Progress Series*, 373, 219-225. <https://doi.org/10.3354/meps07775>
- Hu, N., Bourdeau, P. E., Harlos, C., Liu, Y., & Hollander, J. (2022). Meta-analysis reveals variance in tolerance to climate change across marine trophic levels. *Science of the Total Environment*, 827, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154244>
- Huang, R., Ding, J., Gao, K., De Carvalho, M. H. C., Tirichine, L., Bowler, C., & 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, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03342>
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, K., Cook, H., Mende, D. R., Letunić, I., Rattei, T., Jensen, L. J., Von Mering, C., & Bork, P. (2018). EggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D309-D314. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1085>
- Ihnken, S., Roberts, S., & Beardall, J. (2011). Differential responses of growth and photosynthesis in the marine diatom *Chaetoceros muelleri* to CO₂ and light availability. *Phycologia*, 50(2), 182-193. <https://doi.org/10.2216/10-11.1>
- Iwasaki, K., Evenhuis, C., Tamburic, B., Kuzhiumparambil, U., O'Connor, W., Ralph, P., & Szabó, M. (2021). Improving light and CO₂ availability to enhance the growth rate of the diatom, *Chaetoceros muelleri*. *Algal Research*, 55, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102234>
- Jeffrey, S., & Humphrey, G. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochimie und Physiologie der Pflanzen*, 167(2), 191-194. [https://doi.org/10.1016/s0015-3796\(17\)30778-3](https://doi.org/10.1016/s0015-3796(17)30778-3)

- Jin, P., Hutchins, D. A., & Gao, K. (2020). The impacts of ocean acidification on marine food quality and its potential food chain consequences. *Frontiers in Marine Science*, 7, 1-6. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.543979>
- Jin, P., Wan, J., Zhou, Y., Gao, K., Beardall, J., Lin, J., Huang, J., Lu, Y., Liang, S., Wang, K., Ma, Z., & Xia, J. (2022). Increased genetic diversity loss and genetic differentiation in a model marine diatom adapted to ocean warming compared to high CO₂. *The ISME Journal*, 16(11), 2587-2598. <https://doi.org/10.1038/s41396-022-01302-y>
- Kanazawa, A., Neofotis, P., Davis, G. A., Fisher, N., & Kramer, D. M. (2020). Diversity in photoprotection and energy balancing in terrestrial and aquatic phototrophs. In A. W. Larkum, A. R. Grossmann & J. A. Raven (Eds.) *Photosynthesis in Algae: biochemical and physiological mechanisms* (pp. 299-327). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-33397-3_12
- Kanehisa, M. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kawakami, K., Umena, Y., Iwai, M., Kawabata, Y., Ikeuchi, M., Kamiya, N., & Shen, J. (2010). Roles of PsbI and PsbM in photosystem II dimer formation and stability studied by deletion mutagenesis and X-ray crystallography. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(3), 319-325. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.12.013>
- Khairy, H. M., Shaltout, N. A., El-Naggar, M. F., & El-Naggar, N. A. (2014). Impact of elevated CO₂ concentrations on the growth and ultrastructure of non-calcifying marine diatom (*Chaetoceros gracilis* F.Schütt). *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 40(3), 413-484. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2014.08.002>
- Khozin-Golldberg, I. (2016). Lipid Metabolism in microalgae. In M. Borowitzka, J. Beardall, J. Raven (Eds), *The Physiology of Microalgae. Developments in Applied Phycology* (pp. 376-409). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_18
- Larkum, A. W. (2016). Photosynthesis and light harvesting in algae. In M. Borowitzka, J. Beardall, J. Raven (Eds), *The Physiology of Microalgae. Developments in Applied Phycology* (pp. 67-87). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_3
- Leu, E., Daase, M., Schulz, K. G., Stuhr, A., & Riebesell, U. (2013). Effect of ocean acidification on the fatty acid composition of a natural plankton community. *Biogeosciences*, 10(2), 1143-1153. <https://doi.org/10.5194/bg-10-1143-2013>
- Lewis, E., & Wallace, D. (1998). *Program Development for CO₂ System Calculations*. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory. <https://doi.org/10.2172/639712>
- Li, W., Ding, J., Li, F., Wang, T., Yang, Y., Li, Y., Campbell, D. A., & Gao, K. (2019). Functional responses of smaller and larger diatoms to gradual CO₂ rise. *Science of the Total Environment*, 680, 79-90. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.035>
- Liang, C., Zhang, Y., Wang, L., Shi, L., Xu, D., Zhang, X., & Ye, N. (2020). Features of metabolic regulation revealed by transcriptomic adaptations driven by long-term elevated pCO₂ in *Chaetoceros muelleri*. *Physiological Research*, 68(3), 236-248. <https://doi.org/10.1111/pre.12423>

- Liu, B., & Benning, C. (2012). Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 300-309. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.008>
- López-Elías, J.A. (1990). *Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con medios simplificados: evaluación de técnicas analíticas y de producción*. [Tesis de Maestría en Ciencias en Ecología Marina, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio CICESE. <https://biblioteca.cicese.mx/catalogo/tesis/ficha.php?id=7109>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 1-21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lower, S. K. (1996). *Carbonate equilibria in natural waters*. Chem 1 Virtual text book. <https://www.chem1.com/acad/webtext/pdf/c3carb.pdf>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1), 265-75. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)52451-6/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)52451-6/pdf)
- Lu, Y. (2016). Identification and roles of photosystem II assembly, stability, and repair factors in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1-27. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00168>
- Mehrbach, C., Culberson, C. H., Hawley, J. E., & Pytkowicz, R. M. (1973). Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure. *Limnology and Oceanography*, 18(6), 897-907. <https://doi.org/10.4319/lo.1973.18.6.0897>
- Middelburg, J. J. (2019). Biogeochemical processes and inorganic carbon dynamics. In *Marine Carbon Biochemistry. SpringerBriefs in earth system sciences* (pp. 77-105). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10822-9_5
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G., Sonnhammer, E. L. L., Tosatto, S. C. E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L., Bateman, A., & Bateman, A. (2020). Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D412-D419. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913>
- Moss, R. H., Edmonds, J., Hibbard, K., Manning, M., Rose, S. K., Van Vuuren, D., Carter, T. R., Emori, S., Kainuma, M., Kram, T., Meehl, G. A., Mitchell, J. F. B., Nakićenović, N., Riahi, K., Smith, S. J., Stouffer, R. J., Thomson, A. M., Weyant, J. P., & Wilbanks, T. J. (2010). The next generation of scenarios for climate change research and assessment. *Nature*, 463(7282), 747-756. <https://doi.org/10.1038/nature08823>
- Mudimu, O., Rybalka, N., Bauersachs, T., Friedl, T., & Schulz, R. (2015). Influence of different CO₂ concentrations on microalgae growth, α -tocopherol content and fatty acid composition. *Geomicrobiology Journal*, 32(3-4), 291-303. <https://doi.org/10.1080/01490451.2014.889784>
- National Center for Biotechnology Information. (2025). Gene: 7443775, general gene information. NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7443775#general-gene-info>
- Ng, D. H., Ng, Y. K., Shen, H., & Lee, Y. K. (2015). Microalgal Biotechnology. In S. Kim (Ed.), *Handbook of marine microalgae. Biotechnology advances* (pp. 69-80). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800776-1.00006-6>

- Pacheco-Vega, J.M., & Sánchez-Saavedra, M.D.P. (2009). The biochemical composition of *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann Grown) with an agricultural fertilizer. *Journal of the World Aquaculture Society*, 40(4), 556-560. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2009.00276.x>
- Parsons, T.R. Matia, Y., & Lalli, C.M. (1984). *A manual of chemical and biological methods for seawater analysis*. Pergamon Press. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-07774-5>
- Raven, J. A., & Beardall, J. (2016). Dark respiration and organic carbón loss. In M. Borowitzka, J. Beardall & J. Raven (Eds.), *The Physiology of Microalgae. Developments in Applied Phycology* (pp. 88-99). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_6
- Rhein, M., Rintoul, S.R., Aoki, S., Campos, E., Chambers, D., Feely, R.A., Gulev, S., Johnson, G.C., Josey, S.A., Kostianoy, A., Mauritzen, C., Roemmich, D., Talley, L.D., & Wang F. (2013). *Observations: Ocean*. In T.F. Stocker, D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex, & P.M. Midgley (Eds.). *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. 255-315) Cambridge University Press. https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/02/WG1AR5_Chapter03_FINAL.pdf
- Richa, Sinha, R.P., & Häder, DP. (2016). Effects of global change, including UV and UV screening Compounds. In M. Borowitzka, J. Beardall, & J. Raven (Eds.), *The Physiology of Microalgae. Developments in Applied Phycology* (pp. 373-409). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_17
- Rossoll, D., Bermúdez, R., Hauss, H., Schulz, K. G., Riebesell, U., Sommer, U., & Winder, M. (2012). Ocean Acidification-Induced food quality deterioration constrains trophic transfer. *PLOS ONE*, 7(4), 1-6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034737>
- Sánchez-Saavedra, M., & Voltolina, D. (1993). Chemical composition of *Chaetoceros* sp. (Bacilariophyceae) under different light conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 107 (1), 39-44. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)90222-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)90222-4)
- Sánchez-Saavedra, M., & Voltolina, D. (1995). The effect of different light quality on the food value of the diatom *Chaetoceros* sp. for *Artemia franciscana* Kellogg. *Rivista Italiana Acquacoltura*, 30, 135-138. https://www.researchgate.net/publication/281721548_The_effect_of_different_light_quality_on_the_food_value_of_the_diatom_Chaetoceros_sp_for_Artemia_franciscana_Kellogg
- Sánchez-Saavedra, M., & Voltolina, D. (1996). Effect of blue-green light on growth rate and chemical composition of three diatoms. *Journal of Applied Phycology*, 8, 131-137. <https://doi.org/10.1007/BF02186316>
- Sánchez-Saavedra, M., & Voltolina, D. (2006). The growth rate, biomass production and composition of *Chaetoceros* sp. grown with different light sources. *Aquacultural Engineering*, 35(2), 161-165. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.12.001>
- Serôdio, J., & Lavaud, J. (2020). Diatoms and their ecological importance. In W.L. Filho, A. M. Azul, L. Brandli, A. L. Salvia & T. Wall (Eds.) *Encyclopedia of the unsustainable development goals* (pp. 1-9). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71064-8_12-1

- Shi, D., Hong, H., Shen, X., Liao, L., Chang, S., & Lin, W. (2019). The physiological response of marine diatoms to ocean acidification: Differential roles of seawater pCO₂ and pH. *Journal of Phycology*, 55(3), 521-533. <https://doi.org/10.1111/jpy.12855>
- Smith-Unna, R. D., Bournsnell, C., Patro, R., Hibberd J. M., & Kelly S. (2016). TransRate: reference free quality assessment of de-novo transcriptome assemblies. *Genome Research*, 26(8), 1134-1144. <http://doi.org/10.1101/gr.196469.115>
- Sorokin, C. (1973). Dry weight, packed cell volume and optical density, In Stein J.R. (Ed.), *Handbook of Phycological methods. Culture methods and Growth measurements* (pp. 321-343). Cambridge University Press. https://books.google.com.mx/books?id=yJw8AAAAIAAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Sun, J., & Sun, J. (2020). Transcriptomic reprogramming of the oceanic diatom *Skeletonema dohrnii* under warming ocean and acidification. *Environmental Microbiology*, 23(2), 980-995. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15248>
- Tan, L., Xu, W., He, X., & Wang, J. (2019). The feasibility of Fv/Fm on judging nutrient limitation of marine algae through indoor simulation and in situ experiment. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 229, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.106411>
- Tapia-Gallardo, Y. D. (2019). *Análisis genómico y desempeño de cultivos axénicos de tres especies de la microalga Chaetoceros*. [Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio CICESE <https://biblioteca.cicese.mx/catalogo/tesis/ficha.php?id=25475>
- Taucher, J., Bach, L. T., Prowe, A. E. F., Boxhammer, T., Kvale, K., & Riebesell, U. (2022). Enhanced silica export in a future ocean triggers global diatom decline. *Nature*, 605(7911), 696-700. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04687-0>
- Trujillo-Valle, M. L. (1993). La colección de microalgas del CICESE. Comunicaciones académicas, Serie Acuicultura [Informe Técnico No. CIACT930, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C.]
- Vilém, Z., Bišová, K., & Vítová M. (2016). *The cell cycle of microalgae*. In M. Borowitzka, J. Beardall & J. Raven (Eds.), *The Physiology of Microalgae. Developments in Applied Phycology* (pp. 3-46). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_1
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews. Genetics*, 10(1), 57-63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
- Wigley, T. M. L., & Jones, P. (1981). Detecting CO₂-induced climatic change. *Nature*, 292(5820), 205-208. <https://doi.org/10.1038/292205a0>
- Wu, Y., Campbell, D. A., Irwin, A. J., Suggett, D. J., & Finkel, Z. V. (2014). Ocean acidification enhances the growth rate of larger diatoms. *Limnology and Oceanography*, 59(3), 1027-1034. <https://doi.org/10.4319/lo.2014.59.3.1027>
- Yi, Z., Xu, M., Di, X., Brynjólfsson, S., & Fu, W. (2017). Exploring Valuable Lipids in Diatoms. *Frontiers in Marine Science*, 4, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00017>

- Zhang, Y., Gu, Z., Ren, Y., Wang, L., Zhang, J., Liang, C., Tong, S., Wang, Y., Xu, D., Zhang, X., & Ye, N. (2021). Integrating transcriptomics and metabolomics to characterize metabolic regulation to elevated CO₂ in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Marine Biotechnology*, 23(2), 255-275. <https://doi.org/10.1007/s10126-021-10021-y>
- Zhang, M., Zhen, Y., Mi, T., & Lin, S. (2020). 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 <https://doi.org/10.1128/aem.02614-20>
- Zhong, J., Guo, Y., Liang, Z., Huang, Q., Lu, H., Pan, J., Li, P., Jin, P., & Xia, J. (2021). Adaptation of a marine diatom to ocean acidification and warming reveals constraints and trade-offs. *Science of The Total Environment*, 771, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145167>

Anexos

Anexo A. Protocolo para la determinación de alcalinidad

Principio: La alcalinidad se cuantifica como la presencia de especies iones hidroxilo (OH^-) en una muestra de agua como resultado de la disociación o hidrólisis de solutos (carbonatos, fosfatos, silicatos, boratos). Estos solutos reaccionan con la adición de un ácido estandarizado a un punto de inflexión.

Objetivo: Determinar la alcalinidad total en muestras de agua de mar por medio de titulación ácida utilizando ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.02N como titulante.

Reactivos:

Na_2CO_3 0.05 N: Secar en mufla de 3 a 5 g de reactivo a 250 °C durante 4 h, transcurrido el tiempo, dejar secar en un desecador. Pesar 2.5 g y diluir en 1 l de agua destilada en un matraz volumétrico.

H_2SO_4 0.1 N: Se diluyen 2.8 ml de H_2SO_4 concentrado en 500 ml de agua destilada para obtener una concentración de 0.1 N

H_2SO_4 0.02 N: Se diluyen 100 ml de H_2SO_4 0.1 N con 400 ml de agua destilada para obtener una concentración de 0.02 N.

Verde de Bromocresol (pH 4.5): Disolver 100 mg de indicador en 100 ml de agua destilada y almacenar en un frasco ámbar.

Fenolftaleína (pH 8.3): Disolver 5 g de indicador y disolver en 500 ml de etanol, homogeneizar y agregar 500 ml de agua destilada. Filtrar si hay formación de precipitado. Almacenar en un frasco ámbar.

Procedimiento:

1. Valoración normalidad H_2SO_4 0.02N

Agregar 15 ml de solución Na_2CO_3 0.05N en 85 ml de agua destilada. Colocar la solución en un vaso de precipitado con un agitador magnético en una placa de agitación. Colocar el electrodo del potenciómetro

(previamente calibrado con soluciones buffer) en la solución (cuida que el agitador no pegue con el electrodo). Titular la solución con H_2SO_4 0.02N hasta $\text{pH} \approx 5$.

Después de la titulación tapar el vaso de precipitados con un vidrio de reloj y calentar la solución hasta ebullición por 3-5 min (eliminación de CO_2 producto de la reacción que puede interferir con el resultado). Dejar enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente, sin destapar el vaso para posteriormente enjuagar la tapa del vaso con un poco de agua destilada. Colocar nuevamente el electrodo del potenciómetro y titular hasta el punto de inflexión a $\text{pH} 4.5$

Calcular la normalidad de la solución con la siguiente ecuación:

$$N = \frac{A \times B}{53 \times C} \quad (6)$$

Donde:

A = g de Na_2CO_3 en la solución de 1 L (2.5 g)

B = ml Na_2CO_3 para titulación (15 ml)

C = ml de H_2SO_4 usado

2. Titulación

Tomar 50-100 ml de muestra para titulación en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Colocar en el agitador magnético y encenderlo para homogeneizar la muestra. Agregar 5 gotas de indicador fenolftaleína, si la solución vira a fucsia titular con H_2SO_4 0.02N hasta que la solución sea incolora. Después agregar 5 gotas de indicador verde de bromocresol y titular con H_2SO_4 0.02N hasta que la solución vire de azul a verde (aprox. $\text{pH} 4.5$).

Registrar el gasto de H_2SO_4 0.02N y realizar el cálculo de alcalinidad total con la siguiente ecuación:

$$\text{Alcalinidad total (mg CaCO}_3 \text{ l}^{-1}) = \frac{A \times N \times 50000}{\text{ml muestra}} \quad (7)$$

Donde:

A = ml de H_2SO_4 utilizado

N = Normalidad del ácido estandarizado