



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA DE *EUGLENA GRACILIS* EN CULTIVOS RICOS EN ACETATO PARA LA OBTENCIÓN DE PARAMILO Y SU TRANSFORMACIÓN EN ÁCIDOS GRASOS BAJO ANAEROBIOISIS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biólogo Jorge Adrián Serrano

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Víctor Manuel Luna Pabello, Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Jorge Donato García García, Instituto Nacional de Cardiología

Dr. Eleazar Martínez Barajas, Facultad de Química

Ciudad Universitaria, CD. MX. Enero. 2024



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta 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 titular de los Derechos de Autor.



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y  
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL  
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

“Caracterización de la biomasa de *Euglena gracilis* en cultivos ricos en acetato para la obtención de paramilo y su transformación en ácidos grasos bajo anaerobiosis”.

que presenté para obtener el grado de Maestría es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

**Atentamente**

**Jorge Adrián Serrano**

**Número de cuenta: 303108685**

## **Agradecimientos profesionales**

Al Dr. Jorge Donato García García, se le agradece por su confianza en compartir la cepa de *E. gracilis* y por su apoyo a lo largo del proyecto. A la QFB. Bertha Julieta Sandoval Guillen del Departamento de Biotecnología y Alimentos, Facultad de Química UNAM, se le agradece por su asesoría y apoyo técnico. Al M en C. Luciano Hernández Gómez y la Q.F.B. Ma. del Pilar Granada Macías del Departamento de Biología, Facultad de Química UNAM, se les agradece por su apoyo técnico. A la química Edith Espejel Valentín se le agradece por su apoyo en la resiembra de los cultivos.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la asignación de la beca 572444/599189 para la realización de estudios de maestría en el programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se agradece el apoyo otorgado por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para asistir al curso internacional “Fundamentos sobre biorreactores, diseño e implementación de bioprocesos aplicados a la biotecnología de microalgas” realizado en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) del 1 al 11 de noviembre del 2017 en La Paz, Baja California Sur.

**ADRIÁN SERRANO JORGE**  
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas  
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión extraordinaria de junio de 2023, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de Maestro en Ciencias, con la réplica de la tesis "Caracterización de la biomasa de *Euglena gracilis* en cultivos ricos en acetato para la obtención de paramilo y su transformación en ácidos grasos bajo anaerobiosis", dirigida por el/la Dr(a). LUNA PABELLO VICTOR MANUEL.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

GOSSET LAGARDA GUILLERMO	PMDCBQ	PRESIDENTE
TRUJILLO ROLDAN MAURICIO ALBERTO	PMDCBQ	SECRETARIO
RUÍZ TERÁN FRANCISCO	PMDCBQ	VOCAL
SÁNCHEZ LÓPEZ ROSANA	PMDCBQ	VOCAL
HÉCTOR MIRANDA ASTUDILLO	NO ACREDITADO	VOCAL

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 30 de junio de 2023



**Coordinadora**  
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

# Índice

<b>Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>3</b>
<b>I. Introducción .....</b>	<b>5</b>
<b>II. Hipótesis y objetivos .....</b>	<b>8</b>
II.1 Hipótesis .....	8
II.2 Objetivos.....	8
II.2.1 Objetivo general .....	8
II.2.2 Objetivos particulares.....	8
<b>III. Marco teórico de referencia.....</b>	<b>9</b>
III.1 Descripción de <i>E. gracilis</i> Klebs 1883 .....	9
III.2 Potencial biotecnológico de <i>E. gracilis</i> .....	12
III.3 Acetato como fuente de carbono orgánico en efluentes de aguas residuales ....	14
III.4 Características metabólicas de <i>E. gracilis</i> para remoción de acetato, obtención de paramilo y ácidos grasos.....	17
III.4.1 Metabolismo del acetato y ciclo del glioxilato .....	17
III.4.2 Síntesis anaeróbica de ácidos grasos .....	19
<b>IV. Estrategia experimental .....</b>	<b>25</b>
IV.1 Consideraciones experimentales preliminares .....	25
IV.2 Estrategia experimental empleada.....	26
<b>V. Materiales y métodos.....</b>	<b>28</b>
V.1 Montaje de cultivos de <i>E. gracilis</i> .....	28
V.2 Procedimiento de conteo celular.....	29
V.3 Procedimiento para determinación de peso seco y cenizas.....	30
V.4 Procedimientos de extracción y cuantificación de metabolitos.....	31
V.4.1 Procedimiento de extracción y cuantificación de clorofila total .....	31
V.4.2 Procedimiento de extracción y cuantificación de paramilo .....	32
V.4.3 Procedimiento de extracción y cuantificación de proteína total .....	32
V.4.4 Procedimiento de extracción y cuantificación de lípidos totales .....	33
V.5 Procedimiento de transesterificación para la obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) y análisis cromatográfico .....	34
V.6 Procedimientos para realizar tinciones .....	34
V.6.1 Tinción con lugol.....	34
V.6.2 Tinción con rojo Nilo .....	35
V.7 Procedimientos espectrofotométricos para remoción de nutrimentos .....	35

V.7.1 Demanda química de oxígeno (DQO) .....	35
V.7.2 Amonio (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) .....	36
V.7.3 Ortofosfatos (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ) .....	36
V.8 Análisis estadísticos .....	36
V.8.1 Ajuste de cinéticas de crecimiento al modelo de Gompertz .....	36
V.8.2 Porcentajes de remoción y rendimientos. ....	37
<b>VI. Resultados.....</b>	<b>39</b>
VI.1 Experimento de aclimatación en diferentes cultivos con acetato-citrato.....	39
VI.1.1 Cinéticas de crecimiento de la segunda resiembra .....	39
VI.1.2 Cinéticas de crecimiento de la cuarta resiembra .....	41
VI.1.3 Comparación entre los contenidos de clorofila total y paramilo entre la segunda y cuarta resiembra.....	45
VI.2 Experimento de caracterización de biomasa respecto a la remoción de nutrientes .....	47
VI.2.1 Cinéticas de crecimiento para los cultivos con acetato, acetato-propionato y acetato-citrato de la sexta resiembra .....	48
VI.2.2 Contenido diario de clorofila total en la biomasa .....	51
VI.2.3 Contenido diario de paramilo en la biomasa .....	52
VI.2.4 Remoción de nutrientes (DQO, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ) y monitoreo de pH .....	54
VI.2.5 Morfología celular en acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM. ....	57
VI.2.6 Composición de la biomasa al décimo día. ....	59
VI.2.7 Caracterización de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (EMAG).....	60
VI.3 Experimento de comparación entre fotoperíodo normal y anaerobiosis con oscuridad .....	64
VI.3.1 Efecto de la anaerobiosis en los contenidos de paramilo y lípidos totales	65
VI.3.2 Efecto de la anaerobiosis en el perfil de EMAG .....	68
VI.3.3 Morfología celular bajo anaerobiosis y fotoperíodo normal en acetato-citrato .....	72
<b>VII Discusión.....</b>	<b>74</b>
VII.1 Interpretación para los resultados del experimento de aclimatación a los cultivos con acetato-citrato .....	74
VII.2 Interpretación para los resultados del experimento de caracterización de la biomasa en relación con la remoción de nutrientes.....	76
VII.3 Interpretación para los resultados del experimento de caracterización de la biomasa en función de la anaerobiosis-oscuridad.....	81
<b>VIII. Conclusiones.....</b>	<b>85</b>

<b>IX. Referencias .....</b>	<b>86</b>
<b>Anexo 1. Análisis estadísticos para el experimento de aclimatación celular a cultivos con acetato-citrato.....</b>	<b>101</b>
1.1 Ajustes de las cinéticas de crecimiento de la segunda resiembra .....	101
1.2 Ajustes de las cinéticas de crecimiento de la cuarta resiembra .....	110
1.3 Análisis estadísticos de los contenidos de clorofila total, paramilo y porcentaje de estados palmela entre la segunda y cuarta resiembra .....	124
<b>Anexo 2. Análisis estadísticos para el experimento de caracterización de la biomasa respecto a la remoción de nutrientes de la sexta resiembra.....</b>	<b>132</b>
2.1 Ajustes de las cinéticas de crecimiento .....	132
2.2 Comparación de las concentraciones y rendimientos diarios de clorofila total y paramilo .....	139
2.3 Comparación de los porcentajes y cinéticas de remoción de DQO, amonio y fósforo, así como del cambio de pH en los cultivos.....	142
2.4 Comparación de la composición de la biomasa (paramilo, proteína, lípidos totales, clorofila total y cenizas) al décimo día de cultivo .....	145
2.5 ANOVAs factoriales para comparar los porcentajes de ácidos grasos saturados (AGS), ácidos grasos monoinsaturados (AGM) y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) entre los tratamientos de la sexta resiembra.....	153
<b>Anexo 3. Análisis estadísticos para el experimento de comparación entre anaerobiosis y fotoperíodo normal .....</b>	<b>157</b>
3.1 Comparación de la composición de la biomasa (paramilo, proteína, lípidos totales, clorofila total y cenizas) al décimo día de cultivo .....	157
3.2 ANOVAs factoriales para comparar los porcentajes de ácidos grasos saturados (AGS), ácidos grasos monoinsaturados (AGM) y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) entre los tratamientos con fotoperíodo normal y anaerobiosis-oscuridad .....	170
<b>Anexo 4. Tiempos de retención de los 23 EMAG .....</b>	<b>177</b>
<b>Anexo 5. Cromatogramas de los 23 EMAG .....</b>	<b>181</b>



## Índice de tablas

Tabla 1. Comparación de las concentraciones de acetato, amonio y ortofosfato entre los efluentes de aguas residuales domésticas, agua residual de tratamientos anaerobios y el medio de cultivo Buetow. ....	7
Tabla 2. Comparación de los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de los modelos logístico y Gompertz para los cultivos de la segunda resiembra.....	40
Tabla 3. Ajuste al modelo de Gompertz para cultivos de la segunda resiembra.....	41
Tabla 4. Comparación de los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de los modelos Logístico, Gompertz de una fase y Gompertz de dos fases para los cultivos de la cuarta resiembra. 43	
Tabla 5. Ajuste a los modelos de Gompertz de una fase y Gompertz de dos fases de la cuarta resiembra.....	44
Tabla 6. Porcentaje de estados palmela durante la aclimatación de <i>E. gracilis</i> .....	45
Tabla 7. Comparación de los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de los modelos Logístico, Gompertz de una fase y Gompertz de dos fases para los cultivos de la sexta resiembra. 49	
Tabla 8. Ajuste a los modelos de Gompertz de una fase y Gompertz de dos fases para cultivos de la sexta resiembra.....	50
Tabla 9. Remoción de nutrimentos y cambio de pH en los cultivos con acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM. ....	57
Tabla 10. Efecto de la anaerobiosis y oscuridad en la concentración celular, porcentaje de estados palmela, contenido de paramilo y contenido de lípidos totales. ....	65

## Índice de figuras

Figura 1. Principales características morfológicas de <i>E. gracilis</i> . ....	10
Figura 2. Esquema de tratamiento anaerobio de aguas residuales.....	16
Figura 3. Ciclo de Krebs y ciclo del glioxilato en <i>E. gracilis</i> .....	18
Figura 4 (página anterior). Síntesis de ácidos grasos mitocondrial en <i>E. gracilis</i> .....	24
Figura 5. Esquema de trabajo.....	27
Figura 6. Cámara diseñada para mantener a los cultivos de <i>E. gracilis</i> .....	29
Figura 7. Cuadrícula de conteo de la cámara de Neubauer.....	30
Figura 8. Cinética de crecimiento de la segunda resiembra de <i>E. gracilis</i> en cultivos con acetato-citrato.....	39
Figura 9. Cinéticas de crecimiento de la cuarta resiembra de <i>E. gracilis</i> en cultivos con acetato-citrato.....	42
Figura 10. Comparación de los contenidos de clorofila total y paramilo entre la segunda y la cuarta resiembra de <i>E. gracilis</i> en cultivos con acetato-citrato.....	46

Figura 11. Cinéticas de crecimiento en acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM de la sexta resiembra.....	48
Figura 12. Contenido diario de clorofila total en acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM.....	52
Figura 13. Contenido diario de paramilo en acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM.....	53
Figura 14. Cinéticas de remoción de acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM .....	55
Figura 15. Monitoreo diario de pH para los cultivos con acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM. ....	56
Figura 16. Morfología de <i>E. gracilis</i> en acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM. ....	58
Figura 17. Composición de la biomasa de <i>E. gracilis</i> con acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM. ....	60
Figura 18. Promedios de los porcentajes de EMAG en los tratamientos con acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM. ....	61
Figura 19. Composición relativa de EMAG en los tratamientos con acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM. ....	63
Figura 20. Efecto de la anaerobiosis en la biomasa de <i>E. gracilis</i> .....	67
Figura 21. Porcentajes de EMAG en los tratamientos en fotoperíodo normal y anaerobiosis-oscuridad. ....	70
Figura 22. Efecto de la anaerobiosis-oscuridad en la composición relativa de EMAG.....	71
Figura 23. Efecto de la anaerobiosis-oscuridad en la morfología de <i>E. gracilis</i> . ....	73

## Lista de abreviaturas

$10^6$ células mL <sup>-1</sup>	millón de células por mililitro
AGS	ácidos grasos saturados
AGM	ácidos grasos monoinsaturados
AGPI	ácidos grasos poliinsaturados
AGV	ácidos grasos volátiles
CoA	coenzima A
DQO	demanda química de oxígeno
GC-MS	cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
EMAG	Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos
FADH <sub>2</sub>	dinucleótido de flavina y adenina
$\mu\text{g } 10^{-6}$ células	microgramo por millón de células
$\mu\text{g mL}^{-1}$	microgramo por mililitro
mM	milimolar
NADH	dinucleótido de nicotinamida y adenina
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	ion amonio
PEP	fosfoenolpiruvato
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	ion ortofosfato
SDS	dodecilsulfato sódico

## Resumen

Se evaluó el crecimiento de *Euglena gracilis* var. Z en cultivos con acetato bajo diferentes condiciones fotoheterótrofas con el objetivo de estimular un aumento en el contenido de paramilo ( $\beta$ -1,3-glucano) y evaluar la composición de ácidos grasos. Los experimentos se llevaron a cabo con modificaciones al medio comúnmente empleado para cultivar *E. gracilis* con acetato (medio Buetow). Esto se realizó con el fin de buscar una estrategia de cultivo alternativa a las condiciones autótrofas y de estrés por nutrientes que predominan en varias investigaciones de la literatura científica.

Se encontró que el crecimiento en acetato (60.95 mM) requiere de citrato como cosustrato para estimular los contenidos de clorofila total y paramilo, este último alcanzado  $1107.0 \pm 111.1 \mu\text{g mL}^{-1}$  (tras 10 días de cultivo). También se encontró que la cinética de crecimiento desarrolló una forma doble sigmoidea, lo que indicó un crecimiento diaúxico (con dos fases de crecimiento exponencial) y obteniendo una concentración celular de  $3.1 \pm 0.40 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  (tras de 10 días de cultivo). Esto contrastó con otros reportes en la literatura científica en los cuales el crecimiento con acetato no supera  $0.5 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Sin citrato, el crecimiento disminuyó hasta volverse completamente nulo.

En acetato-citrato, se obtuvo un alto porcentaje de remoción de la demanda química de oxígeno o DQO ( $92.1 \pm 9.0 \%$ ), la cual es una medida de la cantidad de materia orgánica oxidable en el medio de cultivo, y el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) se agotó por completo al cuarto día de cultivo. Esto no se logró al emplear propionato como cosustrato (como sustitución de citrato), ya que los porcentajes de remoción de DQO ( $60.0 \pm 8.0 \%$ ) y  $\text{NH}_4^+$  ( $56.6 \pm 6.0 \%$ ) fueron significativamente menores ( $p < 0.05$ ). Si solamente se emplea acetato sin cosustrato, los porcentajes de remoción de DQO ( $28.5 \pm 4.0 \%$ ) y  $\text{NH}_4^+$  ( $70.3 \pm 4.0 \%$ ) también disminuyeron significativamente ( $p < 0.05$ ). Al analizar la composición de la biomasa en peso seco, se encontró que el paramilo constituyó más de la mitad de ésta, llegando a  $56.8 \pm 3.6 \%$  en acetato-citrato (tras 10 días de cultivo).

Por último, se evaluó la capacidad para aumentar el contenido de ácidos grasos, cuantificados como lípidos totales, y su relación con la disminución de paramilo en anaerobiosis-oscuridad en cultivos con acetato-citrato. El contenido de paramilo disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) al someter los cultivos, después de la fase estacionaria de crecimiento, bajo anaerobiosis-oscuridad a  $754.0 \pm 93.6 \mu\text{g mL}^{-1}$  (1 día) y  $519.3 \pm 53.7 \mu\text{g mL}^{-1}$  (4 días). Pero no hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la concentración de lípidos totales en anaerobiosis-oscuridad cuya concentración fue  $243.6 \pm 35.9 \mu\text{g mL}^{-1}$  (1 día) y  $292.9 \pm 72.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  (4 días). La anaerobiosis-oscuridad estimuló el porcentaje de ácidos grasos saturados (AGS), siendo los más abundantes 14:0, 16:0 y 12:0, los cuales constituyeron 50 a 60 % de todos los ácidos grasos caracterizados.

## Abstract

The capability of *Euglena gracilis* var. *Z* to synthesize paramylon ( $\beta$ -1,3-glucan) and fatty acids was evaluated on acetate-based medium under photoheterotrophic and anaerobic conditions in order to stimulate paramylon ( $\beta$ -1,3-glucan) content and evaluate fatty acids composition. For this purpose, the standard culture medium with acetate for *E. gracilis* (Buetow medium) growth was modified. This was done in order to find an alternative strategy to the autotrophic and nutrient stress conditions that predominate in various investigations in the scientific literature.

It was observed that cellular growth with acetate (60.95 mM) was lower than acetate plus citrate. In the medium supplemented with citrate, total chlorophyll and paramylon increased, the latter reaching  $1107.0 \pm 111.1 \mu\text{g mL}^{-1}$  (after 10 days of growth). Cell growth had a sigmoidal kinetic (diauxic growth) with two exponential phases and reached a density of  $3.1 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$  (after 10 days of growth). In absence of citrate, the cellular growth goes down to zero.

The highest chemical oxygen demand or COD removal percentage ( $92.1 \pm 9.0 \%$ ), which is a measure of the amount of oxidizable organic matter in the medium, was achieved in acetate-citrate and  $\text{NH}_4^+$  was completely removed on the fourth day of culture. Propionate also was assayed as a cosubstrate with acetate however, removal of COD ( $60.0 \pm 8.0 \%$ ) and  $\text{NH}_4^+$  ( $56.6 \pm 6.0 \%$ ) was lower than acetate-citrate ( $p < 0.05$ ). In presence of acetate as the only substrate, removal of COD ( $28.5 \pm 4.0 \%$ ) and  $\text{NH}_4^+$  ( $70.3 \pm 4.0 \%$ ) also decreased ( $p < 0.05$ ). Dry weight biomass consisted of  $56.8 \pm 3.6 \%$  paramylon un acetate-citrate (after 10 days of growth).

Finally, the ability to increase fatty acids content, quantified as total lipids, and its relationship with paramylon decrease under anaerobic-dark condition was evaluated in acetate-citrate. Paramylon content decreased ( $p < 0.05$ ) by submitting cultures, after the stationary phase of growth was reached, under anaerobic-dark condition to  $754.0 \pm 93.6 \mu\text{g mL}^{-1}$  (1 day) and  $519.3 \pm 53.7 \mu\text{g mL}^{-1}$  (4 days). However, there were no differences ( $p > 0.05$ ) in total lipid concentration, which remained in  $243.6 \pm 35.9 \mu\text{g mL}^{-1}$  (1 day) and  $292.9 \pm 72.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  (4 days) in

anaerobic-dark condition. Anaerobic-dark conditions stimulated the percentage for saturated fatty acids (SAFA), being the most abundant 14:0, 16:0 and 12:0, which constituted from 50% to 60% of all characterized fatty acids.

## I. Introducción

En el desarrollo de tecnologías encaminadas al tratamiento de aguas residuales con base en microalgas, el objetivo consiste en abatir las concentraciones de compuestos orgánicos, nitrogenados y fosfatos al generar biomasa que pueda emplearse en aplicaciones biotecnológicas. Dentro de éstas, desataca el uso de la biomasa como fertilizante o como materia prima para generar metano, la extracción de carbohidratos para convertirlos en bioetanol o ácidos grasos para biodiésel, entre otras aplicaciones (Acién Fernández *et al.*, 2018).

Para aumentar el contenido de metabolitos de interés biotecnológico se han desarrollado modelos experimentales que estimulan el crecimiento celular durante la fase exponencial al optimizar las condiciones de cultivo y, posteriormente, las células son estresadas en la fase estacionaria con altas intensidades de luz o bajas concentraciones de nutrimentos, particularmente, agotamiento de nitrógeno. Esto se ha aplicado con diferentes especies de microalgas bajo la lógica de que, al estresar las células ante condiciones adversas, entonces, acumularán sustancias de reserva como carbohidratos o ácidos grasos (Aslan & Kapdan, 2006; Huerlimann *et al.*, 2010). Los estudios metabólicos indican que, ante el agotamiento de nitrógeno, incrementa el contenido de triglicéridos, mientras que los galactolípidos y fosfolípidos disminuyen (Regnault *et al.*, 1995; Huerlimann *et al.*, 2010), esto se debe a la degradación de proteínas, cuyos esqueletos de carbono son redirigidos a la síntesis de triglicéridos, siendo las proteínas de cloroplastos las primeras en degradarse (Msanee *et al.*, 2010). Sin embargo, la desventaja de aplicar esta estrategia es que si bien, puede incrementar la acumulación intracelular de ácidos grasos, la productividad de la biomasa disminuye, en consecuencia, la concentración total de lípidos disminuye. Lo deseable sería buscar estrategias de cultivo en donde se obtengas incrementos tanto en la productividad de ácidos grasos como de la biomasa (Najafabadi *et al.*, 2015).

Otro obstáculo relacionado con la producción de biomasa microalgal, es que se han desarrollado modelos experimentales autótrofos que emplean concentraciones de nutrimentos presentes en efluentes de aguas residuales



domésticas, principalmente, de tratamientos terciarios. Estos experimentos se realizan en condiciones autótrofas, bombeando CO<sub>2</sub> a los cultivos, lo cual, si bien se puede hacer a escala de laboratorio sin problemas, resulta costoso cuando los cultivos se quieren escalar (Kong *et al.*, 2010; Mao *et al.*, 2021; Mohsenpour *et al.*, 2021). Los cultivos bajo las condiciones anteriores son efectivos para remover compuestos nitrogenados (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), ortofosfatos (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), así como materia orgánica (medida como DQO). Los porcentajes de remoción suelen alcanzar del 70 al 90 %, si se logra un bombeo de CO<sub>2</sub> homogéneo, una iluminación adecuada que no cause fotoinhibición y un caudal que permita mantener la tasa de fotosíntesis por encima de la tasa de fotorrespiración. De lo contrario, las tasas de remoción pueden caer de 30 a 40 % (Cai *et al.*, 2013; Gouveia *et al.*, 2016; Salama *et al.*, 2017). La desventaja de trabajar con este tipo de efluentes es que las concentraciones de nutrientes de fosfatos, amonio y nitrato son bajas, con un rango de 11.0 a 60.0 mg L<sup>-1</sup> (ver Tabla 1), las cuales no son suficientes para mantener productividades elevadas de biomasa (Acién Fernández *et al.*, 2018). La composición de las aguas residuales domésticas no permite generar productividades de biomasa que superen más de 1 g L<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>. Muchas de las especies estudiadas se quedan por debajo de los 200 mg L<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> (Mata *et al.*, 2009; Mahapatra *et al.*, 2013; Singh & Singh, 2015). Solamente, con algunas especies se han logrado obtener productividades elevadas como para en escalar su cultivo a nivel industrial; tal es el caso de *Arthrospira platensis*, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella vulgaris* y *Chlamydomonas reinhardtii* cuyas productividades pueden alcanzar 30 g L<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> (Brennan & Owende, 2010; Pittman *et al.*, 2011; Ting *et al.*, 2017).

Por lo anterior, con el fin de estimular el crecimiento y la productividad de la biomasa, se están buscando aplicar efluentes de aguas residuales con mayores concentraciones de nutrientes, como los provenientes de tratamientos anaerobios, los cuales además contienen fuentes de carbono orgánico de bajo costo como acetato, propionato o butirato y son ricas en amonio (Park *et al.*, 2010; Guštin & Marinšek, 2011; Perez-Garcia & Bashan, 2015; Turon *et al.*, 2015 Chalima *et al.*, 2017). Sería adecuado recurrir a modelos experimentales que permitiesen

incrementar tanto la biomasa como el contenido intracelular de metabolitos de interés biotecnológico, al tiempo que se mantienen altos porcentajes en las remociones de nutrimentos.

Partiendo del contexto anteriormente descrito, si se considera que existen diversas especies del género *Euglena* (así como géneros afines) capaces de crecer en condiciones mixótrofas y que puede asimilar  $\text{NH}_4^+$  como fuente de nitrógeno, entonces, es posible desarrollar la siguiente idea: emplear sustratos orgánicos para modelar el crecimiento celular en condiciones de altas concentraciones de nutrimentos (en  $\text{g L}^{-1}$ ) para obtener mayores concentraciones de metabolitos (en  $\text{mg L}^{-1}$  ó  $\text{g L}^{-1}$ ) respecto a los experimentos que simulan condiciones de aguas residuales sólo en condiciones autótrofas y donde la obtención de metabolitos tiene bajas concentraciones (en  $\mu\text{g L}^{-1}$  o  $\text{mg L}^{-1}$ ). Esta idea surge con la intención de proponer a *E. gracilis* como modelo para el tratamiento de aguas residuales ricas en sustratos orgánicos como acetato, propionato y butirato, entre otros.

**Tabla 1. Comparación de las concentraciones de acetato, amonio y ortofosfato entre los efluentes de aguas residuales domésticas, agua residual de tratamientos anaerobios y el medio de cultivo Buetow.** Los valores para el agua residual doméstica corresponden al efluente en etapa de tratamiento terciario. Los valores para el efluente del tratamiento anaerobio se tomaron considerando actividades agropecuarias o de la industria de alimentos. El medio Buetow es el cultivo comúnmente empleado para cultivar *E. gracilis* en presencia de acetato.

	[Acetato] ( $\text{mg L}^{-1}$ )	[DQO] ( $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ )	[ $\text{NH}_4^+$ ] ( $\text{mg L}^{-1}$ )	[ $\text{PO}_4^{3-}$ ] ( $\text{mg L}^{-1}$ )	pH	Referencias
Medio de cultivo Buetow	3600.0	3850.61	272.6	1415.1	6.8	Buetow (1968)
Agua residual doméstica						Chen <i>et al.</i> (2004) Mahaptra <i>et al.</i> (2013) Tchobanoglous <i>et al.</i> (2014)
Mínimo	39.3	42.0	14.0	3.7	5.7	Olsson <i>et al.</i> (2018)
Máximo	290.0	310.0	41.0	23.7	8.1	Mao <i>et al.</i> (2021)
Agua residual de un tratamiento anaerobio						Yang <i>et al.</i> (2003) Park <i>et al.</i> (2010) Guštin & Marinšek (2011) Franke <i>et al.</i> (2014) Carvalho <i>et al.</i> (2015) Zuliani <i>et al.</i> (2016) Kor-Bicakci <i>et al.</i> (2020)
Mínimo	300	321.0	60.0	30.0	6.0	
Máximo	2240.0	2396.8	1450.0	540.0	9.0	

## **II. Hipótesis y objetivos**

### **II.1 Hipótesis**

Si el crecimiento de *E. gracilis* puede adecuarse a la remoción de acetato, entonces, podrá estimularse el almacenamiento intracelular de paramilo, luego, éste podría transformarse en ácidos grasos bajo condiciones anaeróbicas.

### **II.2 Objetivos**

#### **II.2.1 Objetivo general**

Evaluar el crecimiento de *E. gracilis* en medios de cultivo ricos en acetato bajo condiciones mixótrofas para cuantificar la acumulación de paramilo y probar si puede incrementar el contenido de ácidos grasos en anaerobiosis-oscuridad.

#### **II.2.2 Objetivos particulares**

- 1) Caracterizar las cinéticas de crecimiento durante el proceso de aclimatación celular en medios de cultivo con acetato-citrato, así como los contenidos de paramilo y clorofila total para verificar que el crecimiento sea mixótrofo (autótrofo y heterótrofo).
- 2) Caracterizar la composición de la biomasa (paramilo, proteína, clorofila, lípidos y cenizas) en medios de cultivo con acetato-citrato, acetato-propionato y acetato para identificar qué condición estimula el mayor contenido de paramilo respecto a la remoción de demanda química de oxígeno, amonio y ortofosfatos.
- 3) Comparar el contenido de paramilo bajo condiciones de fotoperíodo normal y anaerobiosis-oscuridad para identificar si hay cambios en la cantidad de lípidos totales y el perfil de ácidos grasos en el cultivo con acetato-citrato.

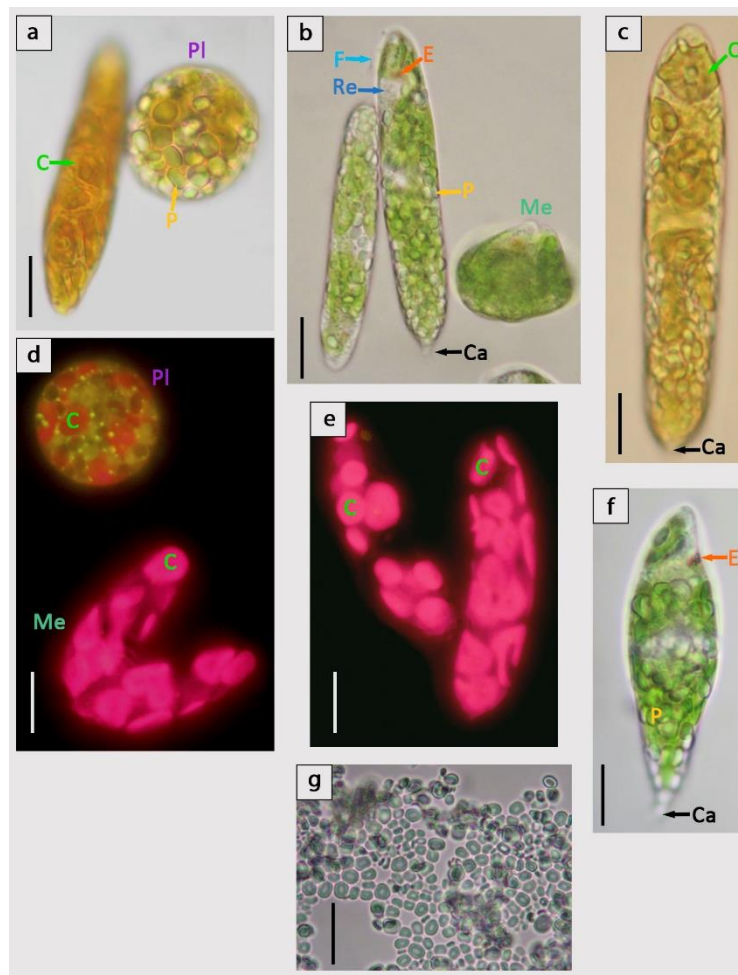
### **III. Marco teórico de referencia**

#### **III.1 Descripción de *E. gracilis* Klebs 1883**

Las células se caracterizan por presentar una morfología fusiforme a cilíndrica cuando se encuentran alargadas, pero pueden comprimirse y adquirir una forma esferoidal u ovoide. Esta capacidad de cambiar de forma se conoce como movimiento euglenoide o metabolia y es posible debido a que la cubierta celular está conformada por una estructura proteica y flexible llamada película (Figuras 1a y 1d). A su vez, la película presenta un conjunto de estrías helicoidales a todo lo largo de la célula, debido que está formada por la unión de numerosas proteínas en forma de banda llamada articulina. Cada banda presenta forma de letra “s”, con una proyección prearticular y otra proyección postarticular, tal que la proyección prearticular de una banda embona con la proyección postarticular de otra banda (Vismara *et al.*, 2000; Cnidus, 2012). Esto permite que las diferentes bandas encajen lateralmente unas con otras dando el patrón estriado que se observa en la superficie celular. Hacia el lado citosólico de la película, se presentan varios microtúbulos que le dan soporte a dicha estructura, mientras que hacia el lado extracelular se presenta la membrana celular (Cavalier-Smith, 2017).

En el polo celular anterior, se encuentra un flagelo emergente y un estigma o mancha ocular naranja, ambas estructuras están contenidas en una invaginación de coloración hialina y de forma esférica llamada reservorio al interior del cual se encuentra un segundo flagelo de menor longitud, pero que no emerge (Figuras 1b y 1f). El polo celular posterior presenta una forma redondeada con un apéndice caudal corto y romo (Figura 1c) donde se presentan varios gránulos de paramilo (Cicconofri *et al.*, 2021). Los cloroplastos son alargados, discoidales, poco numerosos (7 a 10 por célula), de bordes lobulados y ubicados en posición parietal; a veces, están dispuestos en una hilera en espiral (Figuras 1d y 1e). Hay un pirenoide por cloroplasto ubicado en posición central, el cual es visible en la fase estacionaria de crecimiento. Los gránulos de paramilo son pequeños, ovals, de escasos a abundantes y dispersos en el citoplasma (Figura 1g). El núcleo celular es grande, de forma ovoide y se ubica en posición central con los cromosomas siempre

condensados. La reproducción siempre es asexual con una mitosis de cerrada, es decir, que la membrana nuclear no se desintegra, la formación del huso mitótico es intranuclear sin centríolos con sus fibras en disposición asimétrica y sin formación de placa metafásica; por su parte, la citocinesis es binaria longitudinal (simetrogénica). Este proceso de división tiene una duración de 20 a 30 minutos. Como en todas las especies de euglenas, carece de reproducción sexual (Hubner-Pestalozzi, 1955; Brusca *et al.*, 2016)



**Figura 1. Principales características morfológicas de *E. gracilis*.** a y c) microscopía de contraste, tinción con lugol. b y f) microscopia de contraste. d y e) microscopia de epifluorescencia. g) gránulos de paramilo extraídos. Todas las microfotografías se realizaron con objetivo de 100x. Barra de 10  $\mu$ m. (Ca) cauda, (C) cloroplastos, (E) estigma, (F) flagelos, (Me) metabolia, (P) gránulos de paramilo, (PI) estado palmela, (Re) reservorio. Fotografías tomadas por el autor, Jorge Adrián Serrano.

Las células de *E. gracilis* pueden presentarse en forma flagelada, estado en el cual son libres nadadoras, con una longitud celular de 37.0 – 45.0  $\mu\text{m}$  y una anchura de 6.0 – 22.4  $\mu\text{m}$ . Dado que *E. gracilis* es una especie fotosintética, no se aplica el término trofozoito al estado flagelado. Sin embargo, sí hay euglénidos que pueden ser tanto fotosintéticos como depredadores activos, tal es el caso de *Rapaza viridis*. Por otra parte, ante condiciones adversas, se sabe que varias especies fotosintéticas, entre ellas *E. gracilis*, pierden los flagelos y adquieren una morfología esférica, a éste se le denomina estado palmela, el cual es metabólicamente activo, puede dividirse por mitosis y se rodea de una cubierta mucilaginosa (Conforti, 1983; Cnidus, 2012; Triemer & Zakryś, 2015).

Ambientalmente, *E. gracilis* ha sido reportada en cuerpos de agua someros con detritos vegetales como estanques, lagunas o zanjas cubiertas de agua. Esta característica de crecer en ambientes dulceacuícolas ricos en materia orgánica donde se acumulan ácidos orgánicos se ha descrito para varias especies fotosintéticas de euglénidos. Este patrón, observado en varias partes del mundo, ha llevado a autores como Reynolds *et al.* (2002) y Reynolds (2006) a proponer una clasificación ecológica que correlacione a taxones específicos de microalgas con determinadas condiciones abióticas de ambientes acuáticos. En este contexto, la presencia de euglénidos se correlaciona con ambientes acuáticos someros (menores que 3.0 m de profundidad), baja irradiancia en la superficie del agua (menor que  $1.5 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), con presencia de materia orgánica abundante y su crecimiento se ve afectado por disminución en las concentraciones de fósforo reactivo soluble y nitrógeno inorgánico total.

Los análisis filogenéticos con base en marcadores moleculares, como las secuencias de las subunidades grande y pequeña del ARN ribosomal, y características morfológicas ultraestructurales han aportado evidencia suficiente para comprender que las especies del género *Euglena* evolucionaron de un linaje de protozoarios osmótrofos, bacterívoros y eucarívoros. Se encuentran emparentados junto con los kinetoplástidos (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Bodo*), los diplonémidos (*Diplonema* y *Rhynchopus*) y los simbióntidos (*Postgaardia*, *Calkinsia*

y *Bihospites*) en el Phylum Euglenozoa, el cual se ha demostrado que es monofilético. La adquisición de cloroplastos se debió a un evento de endosimbiosis secundaria con una clorofita emparentada con el género *Pyramimonas*. Esto originó las especies fotosintéticas, las cuales presentan tres membranas de cloroplasto, las dos membranas internas corresponderían al cloroplasto del simbiote clorofito y la tercera, más externa, correspondería a la membrana del fagosoma del euglenido heterótrofo ancestral. Muchas de estas especies fotosintéticas conservan un citostoma vestigial y restos de la raíz microtubular asociada con éste. Todas las especies fotosintéticas se clasifican en la clase Euglenophyceae, la cual mantiene un nombre con terminación botánica (Leander, 2004; Bicudo & Menezes, 2016).

### **III.2 Potencial biotecnológico de *E. gracilis***

*E. gracilis* es conocida por su capacidad metabólica para crecer bajo condiciones autótrofas, heterótrofas o mixótrofas. Puede crecer en presencia de sustratos orgánicos como acetato, etanol, piruvato, propionato, lactato, succinato, glutamato o glucosa, tanto en presencia de luz como en oscuridad (Hosotani *et al.*, 1980; Regnault *et al.*, 1995; Barsanti *et al.*, 2000, Ogbonna *et al.*, 2002; Tossavainen *et al.*, 2019). Esto ha permitido emplear diferentes estrategias de cultivo para estimular el contenido de metabolitos de interés biotecnológico como  $\alpha$ -tocoferol, ésteres de cera,  $\beta$ -carotenos y ácidos grasos poliinsaturados, entre los que destacan el ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3n-3), eicosapentaenoico (20:5n-3) y araquidónico (22:6n-3), ya sea para su aplicación como nutraceuticos o biocombustibles (Takeyama *et al.*, 1997; Fujita *et al.*, 2008; Matsuda *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2018; Gissibl *et al.*, 2019; Kottuparambil *et al.*, 2019).

De los compuestos que pueden aprovecharse de *E. gracilis* destaca el paramilo, un polímero de  $\beta$ -1,3-glucano, que ha cobrado importancia biotecnológica por su actividad inmunoestimuladora y antimicrobiana (Nakashima *et al.*, 2018; Evans *et al.*, 2019). En ratas y ratones, el paramilo de *E. gracilis* protege contra el daño hepático inducido por tetracloruro de carbono, inhibe el desarrollo de lesiones causadas por dermatitis atópica y ofrece protección contra el virus de la influenza (Sugiyama *et al.*, 2009; Sugiyama *et al.*, 2010; Nakashima *et al.*, 2017). También se

ha descubierto que los derivados sulfatados de paramilo poseen actividad contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Koizumi *et al.*, 1993). Asimismo, el efecto inmunoestimulador se ha descrito en especies comerciales de peces, camarones y artemias, por lo cual su empleo en la acuicultura intensiva se considera una opción sustentable frente al uso de antibióticos, que tienen la desventaja de provocar resistencia en virus, bacterias y protozoarios patógenos (Meena *et al.*, 2013; Yamamoto *et al.*, 2020). En humanos, el consumo de  $\beta$ -glucanos disminuye el contenido de lipoproteínas de baja densidad (colesterol malo) y glucosa en sangre; su ingesta también se ha empleado en tratamientos contra cáncer colorrectal y gástrico por su actividad antitumoral y porque reducen los efectos secundarios de las quimioterapias (Kataoka *et al.*, 2009; Barsanti *et al.*, 2011; Okouchi *et al.*, 2019).

Actualmente, la principal fuente de  $\beta$ -1,3-glucano es *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de pan) y, en menor medida, las setas *Lentinula edodes* (hongo shiitake) y *Schizophyllum commune*, así como *Trametes versicolor*, del que se han aislado los sacaropéptidos PSK y PSP, también con actividad antitumoral. Estas especies de setas se consumen ampliamente en China y Japón (Ooi & Liu, 2000). Si bien los  $\beta$ -glucanos son componentes mayoritarios en las paredes celulares de estos hongos, el proceso de extracción es laborioso, degrada parte de los glucanos y presenta bajos rendimientos, 5 a 7 % del peso seco en levaduras (Osumi, 1998). En comparación, *E. gracilis* produce un porcentaje de paramilo entre 60 a 70 % de su peso seco, por lo que podría ser una mejor fuente de  $\beta$ -1,3-glucano (Barsanti *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2020).

No obstante, el principal obstáculo para el aprovechamiento biotecnológico de *E. gracilis* es que aún no se han desarrollado estrategias de cultivo que estimulen tanto el crecimiento celular como el contenido del metabolito de interés. Para el caso del paramilo, se sabe que su contenido intracelular es estimulado por sustratos orgánicos como acetato o etanol. Dado que estos sustratos inhiben la síntesis de clorofila, al reprimir las enzimas que sintetizan el ácido 5-aminolevulínico (el precursor del anillo de porfirina) y la síntesis del fotosistema II, la mayoría de los



modelos experimentales se han basado condiciones heterótrofas de cultivo (Ellis *et al.*, 1975; Gomez-Silva *et al.*, 1985; Schwartzbach, 2017). La desventaja es que los cultivos bajo estas condiciones presentan crecimientos celulares limitados a menos de  $0.5 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>, es decir, menores al medio millón de células por mililitro, lo que disminuye la productividad del cultivo (Wilson & Levedahl, 1964; Buetow, 1967; Vannini, 1983; Ruíz *et al.*, 2004; Tolviva 2014).

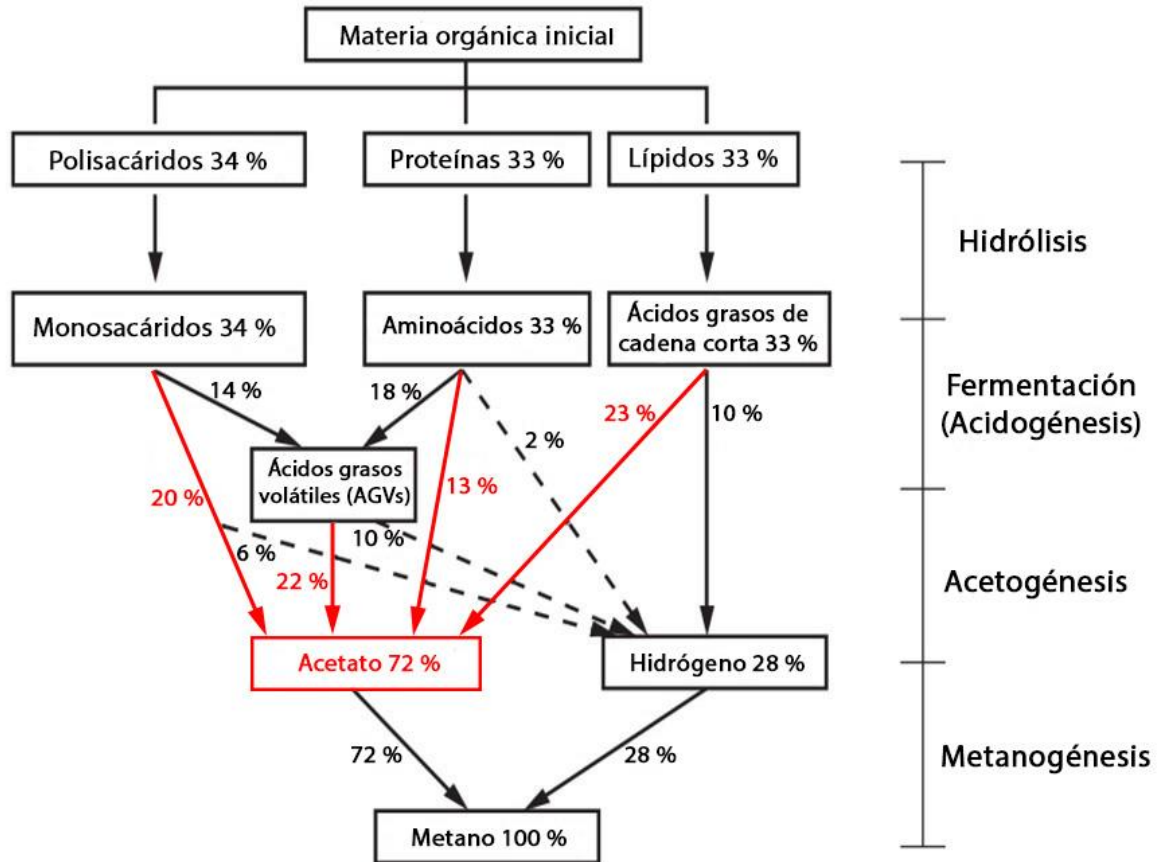
### **III.3 Acetato como fuente de carbono orgánico en efluentes de aguas residuales**

El acetato es uno de los principales compuestos orgánicos que se genera por el tratamiento de aguas residuales, principalmente, debido a tratamientos anaerobios (Figura 2). En las últimas décadas, las industrias que generan aguas residuales con alta carga orgánica, como la agrícola y de alimentos o bebidas, han buscado tecnologías de tratamiento basadas en procesos anaerobios. Éstos son menos costosos y generan menos residuos sólidos en forma de lodos que los procesos aerobios, además, producen metano que puede acoplarse a la generación de energía eléctrica. El tratamiento anaerobio consta de cuatro procesos: hidrólisis, acidogénesis o fermentación, acetogénesis y metanogénesis. De éstos, la acidogénesis y la acetogénesis producen cantidades significativas de ácido acético o acetato, dependiendo de si el pH es menor o mayor que 4.76, respectivamente (Chen *et al.*, 2003; Kotsopoulos *et al.*, 2009). En la Figura 2, se esquematizan las cuatro etapas de un tratamiento anaerobio. El proceso inicial consiste en la hidrólisis de la materia orgánica, que está compuesta por carbohidratos, lípidos o proteínas. En el caso de residuos agroindustriales, es alta la presencia de material lignocelulósico. La hidrólisis permite la descomposición de esta materia en monosacáridos, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga. Posteriormente, en la acidogénesis, se emplean como sustratos los productos de la hidrólisis y se genera una gran cantidad de ácidos grasos volátiles (AGV's) o ácidos grasos de cadena corta (dos a seis carbonos), como ácido acético, propiónico, butírico, valérico, caproico, isobutírico e isovalérico y también se libera H<sub>2</sub> gaseoso. A su vez, estos AGV's serán los sustratos de la acetogénesis, donde se produce más ácido

acético e H<sub>2</sub>. Finalmente, el ácido acético es el principal sustrato para la generación de metano, aunque algunas bacterias metanogénicas también pueden emplear CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> (Wirth *et al.*, 2012; Lou *et al.*, 2019; Wainaina *et al.*, 2019).

Para un proceso anaerobio estandarizado, 72 % de la materia orgánica inicial puede convertirse en acetato después de la acetogénesis y 60 a 70 % puede transformarse en metano después de la metanogénesis. Sin embargo, para obtener estos rendimientos, se requiere resolver tres problemas fundamentales a lo largo del tratamiento. Primero, hidrolizar la mayor parte de la materia orgánica, lo cual no siempre se logra, sobre todo cuando hay residuos lignocelulósicos. Segundo, evitar una acumulación excesiva de AGV's tras el proceso de acidogénesis, ya que esto disminuye el pH del sistema y afecta la actividad de las bacterias acetogénicas, quienes requieren un pH cercano a 7.0. Tercero, la eliminación constante del H<sub>2</sub> producido, cuya acumulación excesiva inhibe los procesos acetogénicos que degradan los AGV's de cadena larga hasta acetato, propionato y butirato (Rosas, 1998; Tchobanoglous *et al.*, 2014; Krakat *et al.*, 2017).

De lo descrito anteriormente, el principal problema en la operación de biorreactores anaerobios es la acumulación excesiva de AGV's, ya que los procesos acidogénicos son más rápidos y están termodinámicamente favorecidos respecto a los procesos acetogénicos. Si este problema no se soluciona, los efluentes contendrán cantidades significativas de ácido acético, propiónico y butírico. Para disminuir los AGVs que aún contienen los efluentes, se ha propuesto acoplar el tratamiento anaerobio de aguas residuales al crecimiento de microalgas, las cuales podrían desarrollarse heterótrofamente, consumiendo estos sustratos e incrementando su contenido celular de carbohidratos o lípidos (Chen *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018; Kusmayadi *et al.*, 2021). Así que sería deseable verificar si puede adecuarse el crecimiento de *E. gracilis* con este tipo de sustratos y obtener una producción significativa de biomasa con potencial biotecnológico.



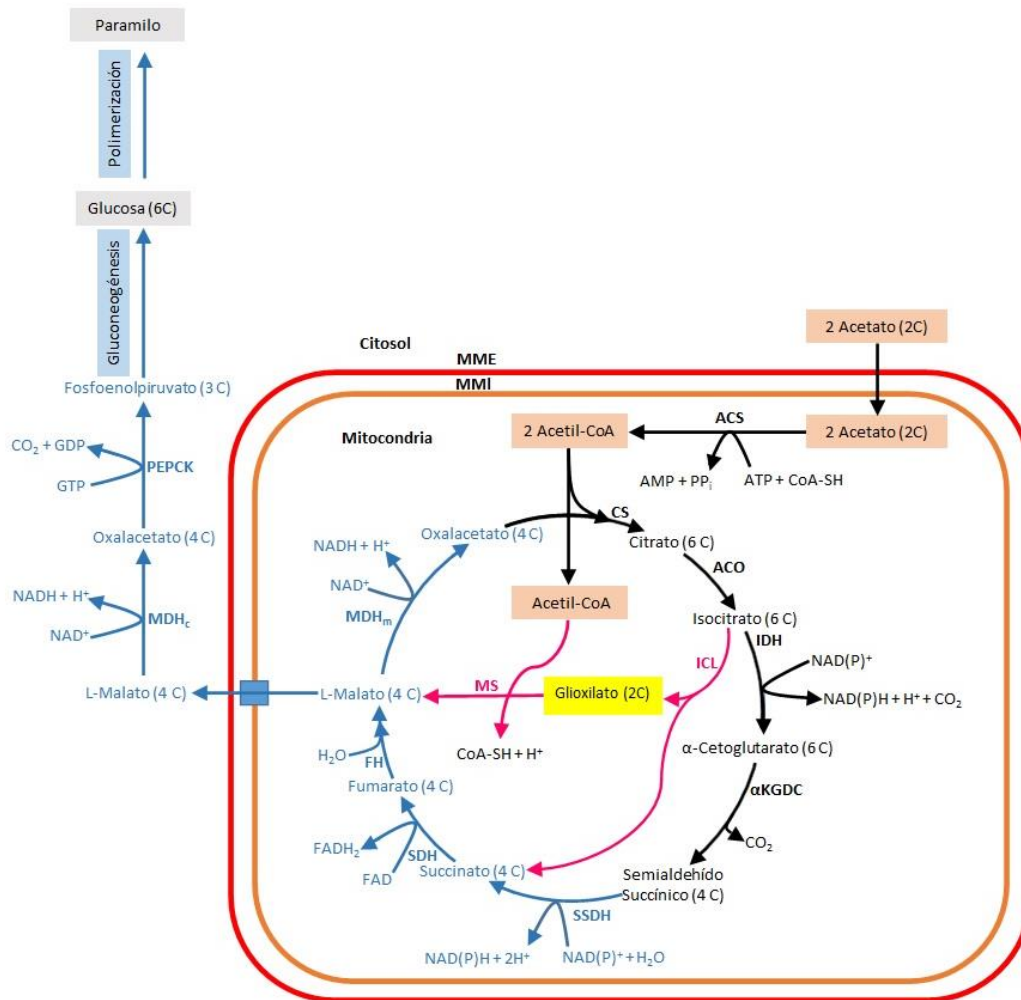
**Figura 2. Esquema de tratamiento anaerobio de aguas residuales.** Se distinguen cuatro etapas. **A) Hidrólisis.** Se realiza por bacterias anaerobias facultativas cuya excreción de enzimas extracelulares permite degradar la materia orgánica en monosacáridos, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga. **B) Fermentación o acidogénesis.** Este proceso se realiza por bacterias anaerobias facultativas o estrictas. Los sustratos de la hidrólisis se convierten en ácidos grasos volátiles, como ácido acético, propiónico, butírico, valérico, entre otros; también se liberan  $H_2$  y  $CO_2$ . Debido a la rapidez con la que ocurren las reacciones fermentativas, una acumulación excesiva de AGV's causa la disminución de pH y esto es nocivo para continuar con el proceso. **C) Acetogénesis.** Ocurre por la degradación de AGV's en ácido acético y también se produce  $H_2$ . Se realiza por bacterias anaerobias estrictas, ya sea por  $\beta$ -oxidación para AGV's de cinco o seis carbonos o por deshidrogenación acetógena para propionato y butirato. La acumulación de  $H_2$  inhibe la actividad de las bacterias acetogénicas, por lo que debe ser eliminado del sistema. Esto se realiza por bacterias hidrogenófilas, metanógenas o sulfatorreductoras que consumen  $H_2$ . **D) Metanogénesis.** Se realiza por arqueas anaerobias estrictas mediante alguno de los siguientes dos procesos. El acetato se emplea como sustrato de partida por las bacterias acetoclásticas, ésta es la principal ruta de generación de metano. En segundo lugar, las bacterias hidrogenófilas también generan metano a partir de  $H_2$  y  $CO_2$ . Modificado de Tchobanoglous *et al.* (2014).

### **III.4 Características metabólicas de *E. gracilis* para remoción de acetato, obtención de paramilo y ácidos grasos**

La ventaja de emplear *E. gracilis* es que podría aprovecharse para la remoción de acetato, ya que puede asimilarlo por el ciclo del glioxilato y sintetizar precursores para la síntesis de paramilo. En el caso de *E. gracilis*, y de todas las especies de euglénidos, el paramilo es la sustancia de reserva y se almacena como gránulos extraplastidiales, distribuyéndose por todo el citoplasma (Cook, 1968; Ono *et al.*, 2003). Otra característica de *E. gracilis* es que, en condiciones anaeróbicas, el paramilo se despolimeriza a glucosa, la cual entra a glucólisis y los productos de esta ruta se emplean para la obtención de ATP a través de una ruta conocida como fermentación de ésteres de cera (Delo *et al.*, 1971; Hendren y Bloch 1980; Inui *et al.*, 1982; Tucci *et al.*, 2010). De esta manera, podría diseñarse una estrategia de cultivo en la cual la remoción de acetato se acople a la producción de paramilo y, luego, bajo condiciones anaeróbicas, acoplar la degradación de paramilo para la obtención de cadenas de ácidos grasos por la fermentación de ésteres de cera.

#### **III.4.1 Metabolismo del acetato y ciclo del glioxilato**

En *E. gracilis*, el acetato se convierte en acetil-CoA por la acetil-CoA sintetasa con gasto de ATP y se asimila por medio de ciclo del glioxilato dentro de la mitocondria. De este ciclo, se produce succinato que entra al ciclo de Krebs, se convierte en fumarato, luego, en malato y éste se emplea en la gluconeogénesis. En *E. gracilis*, las enzimas del ciclo del glioxilato, isocitrato liasa y malato sintasa, están fusionadas en un complejo polipeptídico bifuncional cuyo dominio N-terminal tiene actividad de malato sintasa, mientras que el dominio C-terminal tiene actividad de isocitrato liasa (Ono *et al.*, 2003), ambas enzimas trabajan en conjunto para formar malato a partir de la condensación de glioxilato con acetil-CoA. Si en el medio de cultivo se empleara la cantidad suficiente de acetato, se obtendría succinato y malato, que estarían disponible para alimentar el ciclo de Krebs dentro de la mitocondria y la gluconeogénesis en el citoplasma (Nakazawa, 2017).



**Figura 3. Ciclo de Krebs y ciclo del glioxilato en *E. gracilis*.** El acetato ingresa a la mitocondria por difusión simple y es convertido en acetil-CoA por ACS. Este sustrato está disponible para ciclo de Krebs y ciclo del glioxilato, pues ambos ocurren en la mitocondria. El ciclo de Krebs presenta algunas modificaciones: la descarboxilación del  $\alpha$ -cetoglutarato no es oxidativa, pues  $\alpha$ KGDC carece de las coenzimas FAD y  $\text{NAD}^+$ , por lo que se produce semialdehído succínico en vez de succinil-CoA; luego, el semialdehído succínico se oxida a succinato por SSDH y no participa SCS, por lo que no se produce GTP. Nótese que el succinato producido por ICL del ciclo del glioxilato está disponible para seguir alimentando al ciclo de Krebs o, al convertirse en malato, sale al citosol donde se oxida a oxalacetato por MDH<sub>c</sub>, luego, se descarboxila por PEPCK a fosfoenolpiruvato y éste entra a gluconeogénesis. Cada vuelta del ciclo del glioxilato consume dos moléculas de acetil-CoA. Entre paréntesis se indica el número de átomos de carbono. Flechas negras ( $\rightarrow$ ): rama oxidativa. Flechas azules ( $\rightarrow$ ): rama reductiva. Modificado de Mathews *et al.* (2013). **Abreviaturas:** ACS. Acetil-CoA sintetasa, ACO. Aconitasa, CS. Citrato sintasa, FH. Fumarasa, ICL. Isocitrato liasa, IDH. Isocitrato deshidrogenasa,  $\alpha$ KGDC.  $\alpha$ -Cetoglutarato descarboxilasa, MDH<sub>c</sub>. Malato deshidrogenasa citosólica, MDH<sub>m</sub>. Malato deshidrogenasa mitocondrial, MMI. Membrana mitocondrial interna, MME. Membrana mitocondrial externa, MS. Malato sintasa, PEPCK. Fosfoenolpiruvato carboxicinas, SCS. Succinil-CoA sintetasa o succinato tiocinas, SDH. Succinato deshidrogenasa, SSDH. Semialdehído succinato deshidrogenasa.

El metabolismo del acetato en *E. gracilis* tiene características únicas que no se presentan en otros organismos fotosintéticos. Las enzimas que permiten asimilar etanol y acetato, alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa y acetil-CoA sintasa, se ubican dentro de la mitocondria; por lo tanto, se produce acetil-CoA que alimenta tanto el ciclo de Krebs como el ciclo del glioxilato. Esta es una diferencia importante respecto a plantas y otras microalgas, en las cuales el ciclo del glioxilato ocurre en el glioxisoma y el succinato producido debe transportarse a la mitocondria antes de incorporarse al ciclo de Krebs (Ono *et al.*, 1995). Todas estas características relacionadas con el metabolismo del acetato en *E. gracilis* se representan en la Figura 3. En este contexto, ya existen trabajos que buscan estimular el contenido de paramilo empleado aguas residuales provenientes de la industria vinícola y cervecera. En este tipo de aguas, el etanol y el acetato son sustratos orgánicos importantes. Se lograron obtener contenidos de paramilo de 30 al 60 % de la biomasa con una productividad que alcanza los 46 mg L<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> (Kim *et al.*, 2020; Matsui *et al.*, 2021).

#### **III.4.2 Síntesis anaeróbica de ácidos grasos**

En *E. gracilis*, existen tres mecanismos para la síntesis de ácidos grasos. En el cloroplasto, se encuentra la ácido graso sintasa II (FAS II) que emplea intermediarios acil-ACP, actúa en presencia de luz y presenta actividades enzimáticas en un complejo que está laxamente unido. En el citoplasma, se encuentra la ácido graso sintasa I (FAS I) que también emplea intermediarios acil-ACP y es un complejo multienzimático integrado que funciona en luz y oscuridad. Tanto FAS II como FAS I emplean acetil-CoA y malonil-CoA como metabolitos de partida. El tercer sistema de biosíntesis se ubica en la mitocondria asociado al brazo periférico del complejo respiratorio I y se alimenta de intermediarios del ciclo de Krebs en condiciones anaeróbicas, sus metabolitos de partida son acetil-CoA y propionil-CoA (Delo *et al.*, 1971; Goldberg & Bloch, 1972; Hendren & Bloch, 1980; Tucci *et al.*, 2010; Miranda-Astudillo *et al.*, 2018).

De los tres sistemas anteriores, la síntesis anaerobia de ácidos grasos está acoplada a la degradación de paramilo y se emplea como sumidero para la

oxidación de NADH generado en la glucólisis. En *E. gracilis*, el piruvato obtenido de la glucólisis se emplea para generar acetil-CoA en la mitocondria en condiciones anaeróbicas por la enzima piruvato oxidoreductasa (PNO), que tiene como coenzima NADP<sup>+</sup>. El acetil-CoA es empleado como precursor en la síntesis anaeróbica de ácidos grasos (Inui *et al.*, 1982; Inui *et al.*, 1984). Otro sustrato empleado como precursor es propionil-CoA, el cual se obtiene a partir de L-malato, vía metilmalonil-CoA. La función del L-malato en anaerobiosis es el transporte de electrones del citosol a la mitocondria. El L-malato se obtiene a partir de fosfoenolpiruvato, por la reacción inversa de la fosfoenolpiruvato carboxinasa (PEPCK).

En presencia de sustratos orgánicos, PEPCK funciona como descarboxilasa dependiente de GTP y forma fosfoenolpiruvato (PEP) a partir de oxalacetato, que alimenta la gluconeogénesis. Sin embargo, en condiciones anaeróbicas, PEPCK actúa como carboxilasa dependiente de GDP y forma oxalacetato a partir de PEP. Posteriormente, la malato deshidrogenasa citosólica (MDHc) reduce el oxalacetato a L-malato con el NADH generado por glucólisis. De esta manera, el L-malato se transporta a través de la membrana interna mitocondrial, luego, se oxida de nuevo a oxalacetato por la enzima malato deshidrogenasa mitocondrial (MDHm), formando NADH. El oxalacetato es convertido a fumarato por la fumarasa (FH) y éste es reducido a succinato por la enzima fumarato reductasa (FRD). El succinato generado puede metabolizarse a propionil-CoA a través de succinil-CoA y metilmalonil-CoA. Por su parte, el NADH generado por la MDHm se emplea como poder reductor para la síntesis anaerobia de ácidos grasos (Schneider & Betz, 1985; Tucci *et al.*, 2010).

Ya sea que dos acetil-CoA o un acetil-CoA y un propionil-CoA se usen como sustratos iniciales, la biosíntesis de ácidos grasos mitocondrial en condiciones anaeróbicas es casi un proceso inverso a la  $\beta$ -oxidación. El proceso es independiente de malonil-CoA y emplea intermediarios unidos a coenzima A en vez de la proteína transportadora de acilos (ACP). Las tres primeras reacciones son catalizadas por enzimas que participan en los últimos tres pasos de la  $\beta$ -oxidación:

$\beta$ -cetoacil-CoA tiolasa (KAT),  $\beta$ -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa/reductasa (KAR) y trans-enoil-CoA hidratasa (ECH), que actúan en sentido contrario de la  $\beta$ -oxidación y emplean como poder reductor NADPH o NADH. El último paso está catalizado por una trans-enoil-CoA reductasa (TER) en vez de una acil-CoA deshidrogenasa. Una vez sintetizadas las cadenas hidrocarbonadas en la mitocondria son transportadas al citosol donde se esterifican por uno de sus extremos y forman un éster de cera (Tucci *et al.*, 2010; Zimorski *et al.*, 2017).

Otro aspecto particular de *E. gracilis* es el transporte de piruvato del citosol a la mitocondria. A pesar de que el piruvato es el metabolito de entrada al ciclo de Krebs y genera transportadores electrónicos para la cadena respiratoria, no es un sustrato que estimule la fosforilación oxidativa en las mitocondrias de *E. gracilis* (Krnáčová *et al.*, 2015). Otros sustratos como lactato, NADH, succinato, semialdehído succínico o malato estimulan en mayor proporción la fosforilación oxidativa. Al respecto, se descubrió una lanzadera de DL-lactato que participa activamente en el transporte de piruvato en condiciones tanto anaeróbicas como aeróbicas. La lanzadera presenta dos lactato deshidrogenasas citosólicas dependientes de NAD<sup>+</sup>, una para cada isómero, L-LDH y D-LDH, así como dos lactato deshidrogenasas en la membrana mitocondrial interna dependientes de FAD, L-iLDH y D-iLDH (Uribe & Moreno-Sánchez, 1992).

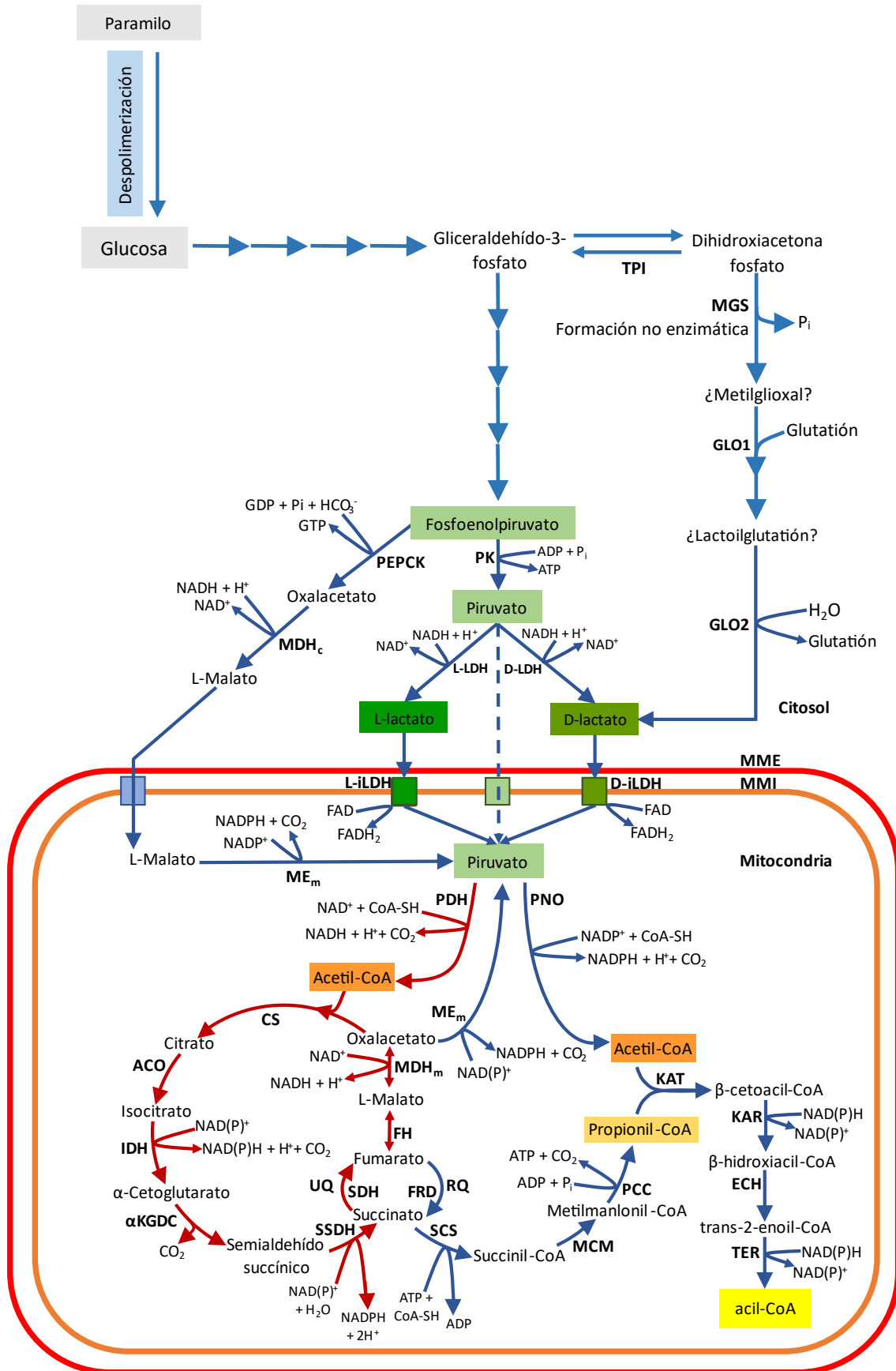
Las concentraciones intracelulares de L-lactato y D-lactato sugieren que la lanzadera está siempre activa en cultivos heterótrofos con glucosa, glutamato/malato y DL-lactato, siendo la concentración intracelular de L-lactato mayor que la de D-lactato. Pero en condiciones anaeróbicas, la actividad de D-iLDH es mayor que la de L-iLDH; esto sugiere un aumento en la concentración intracelular de D-lactato, pero que es incorporado rápidamente a la mitocondria. Aunque la actividad de la lanzadera no se ha demostrado para cultivos con etanol o acetato, la información obtenida hasta el momento sugiere que es constitutiva en *E. gracilis* (Jasso-Chávez *et al.*, 2001; Jasso-Chávez & Moreno-Sánchez, 2003).

Los estereoisómeros de lactato son oxidados por L-iLDH o D-iLDH de la membrana mitocondrial interna a piruvato, que se convierte en acetil-CoA y entra al



ciclo de Krebs en condiciones aeróbicas o a la biosíntesis de ácidos grasos en condiciones anaeróbicas. El FADH<sub>2</sub> generado por L-iLDH se emplea para reducir el reservorio de ubiquinonas que donan sus electrones al complejo III mitocondrial en condiciones aeróbicas. Mientras que el FADH<sub>2</sub> generado por D-iLDH se emplea para reducir el reservorio de rodoquinonas, que donan sus electrones a la FRD en condiciones anaeróbicas. La actividad de D-iLDH conecta la lanzadera de lactato con la síntesis de ácidos grasos, ya que FRD metaboliza el fumarato en succinato, el sustrato de partida propionil-CoA (Castro-Guerrero *et al.*, 2005; Jasso-Chávez *et al.*, 2005). La Figura 3 esquematiza todos los pasos metabólicos antes descritos, haciendo énfasis en la lanzadera de lactato y la síntesis anaeróbica de ácidos grasos.

Resulta interesante que L-iLDH y D-iLDH se mantienen siempre activas en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas. Además, se ha demostrado que el reservorio de rodoquinonas y ubiquinonas también se mantiene en ambos tipos de condiciones, así que la célula mantiene activamente la actividad de FRD, incluso en condiciones aeróbicas. De esta manera, el piruvato generado en la glucólisis está comprometido a convertirse en lactato, pues su transporte al interior de la mitocondria está acoplado a la generación de FADH<sub>2</sub>. Por su parte, el aumento en la actividad de D-iLDH en condiciones anaeróbicas se piensa que es consecuencia de la formación de metilglioxal. Este compuesto es producto de la glucólisis y se forma a partir de dihidroxiacetona fosfato. Dado que es altamente tóxico para la célula, el metilglioxal se convierte en D-lactato por las glioxilasas I y II (Castro-Guerrero *et al.*, 2005; Bringaud *et al.*, 2006). Aunque en *E. gracilis* se desconocen los detalles de cómo funcionan las enzimas GLO1 y GLO2, sí se han descrito en los kinetoplástidos *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major* y *Leishmania donovani*. En estos kinetoplástidos, la enzima GLO1 se diferencia por emplear níquel o cobalto y tripanotión como cofactores en vez de zinc y glutatión. El tripanotión está conformado por dos glutatión unidos por una molécula de espermidina. Dado que los kinetoplástidos son el grupo hermano de los euglénidos, un sistema parecido podría presentarse en *E. gracilis* (Wyllie & Fairlamb, 2011).



**Figura 4 (página anterior). Síntesis de ácidos grasos mitocondrial en *E. gracilis*.** En condiciones anaerobias, el paramilo almacenado se despolimeriza a glucosa. El piruvato producido por la glucólisis se convierte en lactato por las enzimas L-LDH y D-LDH en el citosol, luego, los estereoisómeros son transportados a la mitocondria por L-iLDH y D-iLDH de la MMI. Este transporte oxida el lactato a piruvato y genera equivalentes reductores  $FADH_2$ . Se ha propuesto que otra fuente de D-lactato es el metabolismo del metilglioxal, un subproducto altamente tóxico de la glucólisis formado *a partir* de dihidroxiacetona fosfato por MGS o de manera no enzimática. En condiciones aeróbicas, el piruvato es descarboxilado oxidativamente por PDH y el acetil-CoA producido entra a ciclo de Krebs. Pero en anaerobiosis, el piruvato es descarboxilado oxidativamente por PNO y también se produce acetil-CoA que se emplea como precursor de la síntesis de ácidos grasos. Otra forma de incorporar equivalentes reductores NADH del citosol a la mitocondria es mediante L-malato, que se sintetiza a partir de fosfoenolpiruvato por PEPCK y MDH<sub>c</sub>. Dentro de la mitocondria, el L-malato puede ser metabolizado por ME<sub>m</sub> a piruvato o puede convertirse a fumarato por FH y éste a succinato por FRD, el cual puede convertirse a propionil-CoA, otro precursor de la síntesis de ácidos grasos. Flechas rojas (→): rama aeróbica. Flechas azules (→): rama anaeróbica. Modificado de Tucci et al. (2010). **Abreviaturas:** D-LDH. Lactato deshidrogenasa dependiente de  $NAD^+$  (isómero D), L-LDH. Lactato deshidrogenasa dependiente de  $NAD^+$  (isómero L), ME<sub>m</sub>. Enzima málica mitocondrial, PDH. Piruvato deshidrogenasa, PK. Piruvato cinasa, PNO. Piruvato oxidorreductasa, D-iLDH. Lactato deshidrogenasa independiente de  $NAD^+$  (isómero D), L-iLDH. Lactato deshidrogenasa independiente de  $NAD^+$  (isómero L), ECH. Trans-enoil-CoA hidratasa, GLO1. Glioxilasa 1, GLO2. Glioxilasa 2, KAT.  $\beta$ -cetocil-CoA tiolasa, KAR.  $\beta$ -hidroxiacil-CoA reductasa, FRD. Fumarato reductasa, MCM. Metilmalonil-CoA mutasa, MGS. Metilglioxal sintasa, PCC. Propionil-CoA carboxilasa, SCS. Succinil-CoA sintetasa o succinato tiocinasa, UQ. Ubiquinona, RQ. Rodoquinona, TER. Trans-enoil-CoA reductasa, TPI. Triosa fosfato isomerasa.

## **IV. Estrategia experimental**

### **IV.1 Consideraciones experimentales preliminares**

Dadas las características metabólicas de *E. gracilis*, podría someterse a prueba su capacidad para crecer en cultivos ricos en acetato para lograr la acumulación de paramilo. Luego, podría ponerse a prueba la capacidad de las células para transformarlo en ácidos grasos bajo condiciones anaeróbicas. Con base en esto, se propone desarrollar una estrategia de cultivo en condiciones mixótrofas que estimule mayor productividad de biomasa a la que generan los cultivos en condiciones autótrofas. Esta estrategia para obtener metabolitos de interés biotecnológico, como paramilo y ácidos grasos, podría ser una alternativa al estrés por agotamiento de nitrógeno que se ha aplicado en otras especies de microorganismos fotosintéticos. En caso de resultar exitoso este planteamiento, podría proponerse a *E. gracilis* para el tratamiento de aguas residuales con elevadas concentraciones de acetato, como aquéllas provenientes de procesos anaerobios generadas en la industria de alimentos y bebidas.

Además de lo propuesto anteriormente, una motivación adicional se presentó durante la realización de pruebas preliminares, en las cuales se comenzó a cultivar *E. gracilis* en el medio de cultivo Buetow, que contiene acetato y citrato como sustratos orgánicos. Durante las primeras tres resiembras, las células perdieron su pigmentación verde, adquirieron una morfología esférica sin flagelo (estado palmela) y el crecimiento celular disminuyó a menos de  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Pero conforme se realizaron más resiembras, la coloración verde se recuperó y para la sexta resiembra el crecimiento celular aumentó a  $3 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ , valor que es superior al reportado en la literatura en cultivos con acetato. Esto significó que las células presentaron un período de aclimatación o adaptación fisiológica al acetato-citrato, entendido como el proceso en el que una población de microorganismos se adapta a metabolizar un sustrato específico (Knapp & Bromley-Challenor, 2003). La observación al microscopio óptico y de epifluorescencia reveló la presencia de células flageladas con cloroplastos bien desarrollados y varios gránulos de paramilo en el

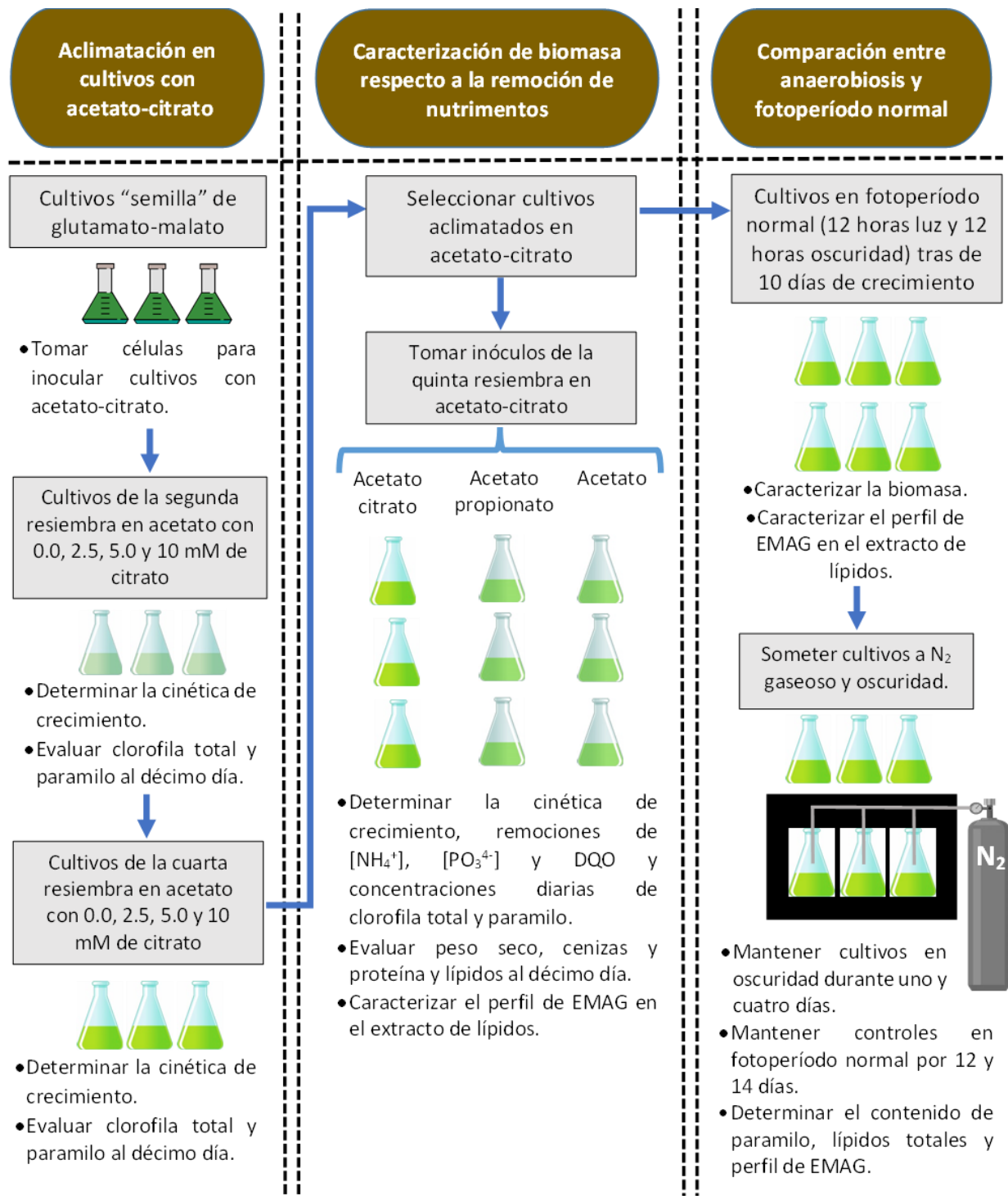
citoplasma. Debido a las observaciones descritas anteriormente, se decidió emplear el medio de Buetow con acetato-citrato como el principal cultivo para el desarrollo del proyecto. Es importante señalar que se realizaron modificaciones a este medio de cultivo, las cuales se detallan en la sección de Materiales y métodos.

## **IV.2 Estrategia experimental empleada**

Inicialmente, se caracterizó la aclimatación al cultivo Buetow con acetato-citrato al analizar las cinéticas de crecimiento de la segunda y cuarta resiembra respecto a los cultivos parentales, que provenían de cultivos con glutamato-malato. Para verificar que el crecimiento fue mixótrofo, se cuantificó el paramilo y la clorofila total al décimo día de cultivo, cuando se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento. Estas resiembras se realizaron modificando el citrato en 0.0, 2.5, 5.0 y 10.0 mM para identificar si este sustrato era necesario para la aclimatación en presencia de acetato bajo condiciones mixótrofas.

Después, en la sexta resiembra, se siguió analizando la cinética de crecimiento en acetato-citrato, pero se realizaron otros dos cultivos; en uno, se cambió el citrato por propionato y, en otro, sólo se dejó acetato. Esto se realizó para verificar si el citrato era un cosustrato necesario para la aclimatación con acetato. Se analizaron las cinéticas de crecimiento y los contenidos diarios de paramilo y clorofila total respecto a la remoción de demanda química de oxígeno, amonio y fosfatos. De esta manera, se verificó que el almacenamiento de paramilo estuviera relacionado con la remoción de sustratos orgánicos. Al décimo día, se caracterizó bromatológicamente la biomasa y los ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG).

Finalmente, se emplearon los cultivos aclimatados con acetato-citrato para transferirlos a una atmósfera con nitrógeno gaseoso e identificar el efecto en las concentraciones de paramilo y lípidos totales, así como en el perfil de EMAG. Estos cultivos estuvieron en crecimiento durante 10 días bajo fotoperíodo normal (12 horas luz y 12 horas oscuridad). Posteriormente, se cubrieron con papel aluminio y se les bombeó nitrógeno gaseoso; los análisis de biomasa se realizaron tras uno y cuatro días de haber realizado la anaerobiosis. Como controles se mantuvieron cultivos en fotoperíodo normal durante 11 y 14 días. Ver Figura 5 para el esquema de trabajo.



**Figura 5. Esquema de trabajo.** El desarrollo del proyecto se dividió en tres partes. I. Se evaluó la aclimatación a los cultivos con acetato-citrato para caracterizar el crecimiento; II. Se caracterizó la biomasa respecto a la remoción de nutrientes en cultivos con acetato-citrato, acetato-propionato y acetato; III. Se comparó el efecto de la anaerobiosis sobre el contenido de paramilo, lípidos totales y el perfil de EMAG al bombear nitrógeno gaseoso a cultivos con acetato-citrato.

## V. Materiales y métodos

### V.1 Montaje de cultivos de *E. gracilis*

La cepa de *E. gracilis* fue proporcionada amablemente por el Dr. Jorge Donato García García del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología para este trabajo. A su vez, la cepa provenía del Departamento de Parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, donde fue aislada por el Dr. Rodolfo Pérez Reyes e identificada como *E. gracilis* var. Z. El cultivo original se mantuvo en medio Hutner en condiciones axénicas de acuerdo con Santiago-Martínez *et al.* (2015), para lo cual, se diseñó una cámara de cultivo con temperatura a  $25 \pm 1$  °C y una densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activos de  $80 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con fotoperíodo de 12 h luz (LED blanca 6,500 K) y 12 h oscuridad (Figura 6). La densidad de fotones se midió con un medidor Delta Ohm HD 2302.0 y una sonda Delta Ohm Lp 471 PAR. Las resiembras se realizaron en esterilidad dentro de una campana de flujo laminar tipo II (NUAIRE) tras 10 días de crecimiento y se iniciaron con  $0.2 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Se emplearon cultivos con un volumen de 150 mL en matraces Erlenmeyer de 500 mL sin agitación.

De acuerdo con Kempner (1982), el medio Buetow contiene: acetato 60.95 mM, citrato 2.5 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  7.34 mM,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  7.57 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.81 mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.18 mM; así como de minerales traza  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $1.39 \times 10^{-3}$  mM,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$   $8.85 \times 10^{-3}$  mM,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   $8.26 \times 10^{-4}$  mM,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   $5.46 \times 10^{-3}$  mM,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$   $7.50 \times 10^{-3}$  mM,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$   $8.01 \times 10^{-5}$  mM. Adicionalmente, las modificaciones consistieron en añadir  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.02 mM, Tiamina-HCl  $5.93 \times 10^{-3}$  mM y Vitamina B<sub>12</sub>  $1.47 \times 10^{-7}$  mM. El medio se ajustó a pH 6.8 con NaOH al 10 % y se esterilizó en autoclave por 15 min a 15.0 psi. La esterilización de vitaminas y sales de hierro se realizó por filtración, manteniéndolas en una disolución madre con las siguientes concentraciones Tiamina-HCl 0.3 mM, Vitamina B<sub>12</sub>  $1.47 \times 10^{-6}$  mM,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2.0 mM y  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  0.075 mM, luego, se añadieron en una proporción de 1 mL por cada 100 mL de cultivo. Las sales de hierro se esterilizan por filtración para evitar su precipitación por autoclave (Riveros & Dutrizac, 1997).



**Figura 6. Cámara diseñada para mantener a los cultivos de *E. gracilis*.** Temperatura  $20$  a  $25 \pm 1$  °C. Lámparas de luz LED blanca 6,500 K. Fotoperíodo de 12 h luz y 12 h oscuridad. Densidad de fotones fotosintéticamente activos de  $80 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Temporizador y regulador de temperatura automático incorporados. Una malla sombra cubre el interior de los vidrios.

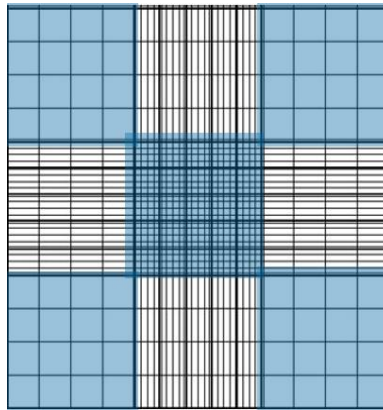
Para la anaerobiosis, se burbujeó nitrógeno gaseoso (grado cromatográfico) de acuerdo con Koneman (2006). El tapón de algodón y gasa de los matraces de 500 mL fue sustituido por un tapón de goma con varilla de vidrio y manguera de conexión, esterilizados previamente por autoclave. Todas las juntas entre el tapón de goma con el matraz y la varilla de vidrio fueron selladas con cinta teflón. El cambio de tapón se realizó en condiciones de esterilidad en la campana de flujo laminar. El aire de los matraces fue purgado seis veces con una jeringa de 60 mL, tras cada purga, la manguera de conexión fue sujeta con pinzas de Mohr. El nitrógeno se transfirió a través de un filtro de  $0.2 \mu\text{m}$  de apertura de poro (KORNBERG) conectado a la manguera para evitar contaminación. La velocidad del flujo de salida se ajustó a  $1.75 \text{ mL s}^{-1}$  y se bombeó durante 9:30 min con agitación magnética. Finalmente, la manguera de conexión se sujetó con pinzas de Hoffman y pinzas de Mohr, mientras que su extremo se selló con cinta teflón.

## **V.2 Procedimiento de conteo celular**

Se tomaron  $100 \mu\text{L}$  de cultivo y se diluyeron en 1 mL de volumen final con  $10 \mu\text{L}$  de HCl 5 % para inmovilizar a las células. Se depositaron  $10 \mu\text{L}$  de esta dilución en la cuadrícula de una cámara de Neubauer (Marienfeld) y el conteo se realizó de acuerdo con Bastidas (2012). Si las células tocan el límite superior o el límite



izquierdo del cuadro, entonces, deben contarse. Por el contrario, si tocan los límites inferior o derecho, entonces, no se cuentan (Figura 7).



**Figura 7. Cuadrícula de conteo de la cámara de Neubauer.** La cuadrícula mide 3 x 3 mm y se subdivide en 9 cuadros principales de 1 x 1 mm, en azul se muestran los cuadrantes empleados en el conteo. A su vez, cada cuadro principal se subdivide en 16 cuadros más pequeños de 0.25 x 0.25 mm de lado. El cuadrado central es el único subdividido en 25 cuadrados más pequeños, los cuales de nuevo se subdividen en 16 cuadros de 0.05 x 0.05 mm de lado, los más pequeños de la cuadrícula. Modificado de Bastidas (2012).

Para obtener el valor de concentración celular, se tomó el promedio de los 5 cuadrantes, se multiplicó por el factor de la dilución (F.d.) y por el volumen de agua formado en el cuadrante de la cámara de Neubauer, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\text{Concentración (10}^{-6}\text{células mL}^{-1}\text{)} = \bar{X} \text{ células (10,000 mL}^{-1}\text{)}(\text{F. d.})$$

Cuando se requirió diferenciar las células flageladas de los estados palmela, se empleó lugol con su respectivo factor de dilución y se aplicó la misma expresión de concentración anterior.

### **V.3 Procedimiento para determinación de peso seco y cenizas**

El peso seco y las cenizas se determinaron de acuerdo con Arredondo-Vega *et al.*, (2017). Los cultivos se centrifugaron a 3,000 g por 20 min y se descartó el sobrenadante. Para contar las células concentradas, se tomaron alícuotas de 10 ó 20  $\mu\text{L}$ , diluidas en 2 o 4 mL de volumen final de acuerdo con el procedimiento de

cuenta celular. Después, el concentrado celular se depositó en una cápsula de porcelana a 60 °C por 12 horas, previamente pesada al recibir el mismo tratamiento, luego, se colocó en un desecador por 20 min y se pesó en una balanza analítica. Después, se calculó la diferencia de pesos entre la cápsula con la biomasa seca y vacía. Este valor dividido entre el volumen del cultivo se tomó como medida de la biomasa en peso seco.

$$\text{Biomasa (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{\text{peso de la cápsula con biomasa seca} - \text{peso de la cápsula vacía}}{\text{volumen cosechado}}$$

Posteriormente, la biomasa seca se incineró en una mufla a 490 °C por 6 horas. Después, se dejó que la mufla alcanzara la temperatura ambiente y la muestra se retiró al día siguiente. La cápsula con las cenizas se colocó a 60 °C por 1 hora en el horno, luego, se trasladó a un desecador por 20 min y se determinó el peso en una balanza analítica, tomando la diferencia de pesos entre la cápsula con las cenizas y vacía.

## **V.4 Procedimientos de extracción y cuantificación de metabolitos**

### V.4.1 Procedimiento de extracción y cuantificación de clorofila total

La extracción y cuantificación de clorofila total se realizó de acuerdo con Arnon (1949). Se tomaron  $0.75 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  del cultivo y se centrifugaron a 2,200 g por 20 min. El sobrenadante se descartó y se añadieron 2 mL de acetona 80 %, se protegió de la luz con papel aluminio, se agitó en vórtex por 1 min y se depositó por 24 horas a -20 °C. Después, se centrifugó a 2,200 g por 10 min y el sobrenadante se empleó para determinar absorbancias a 663 nm y 645 nm en una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz con un espectrofotómetro Pharmacia Biotech, Ultrospec 3000. La clorofila total se determinó de acuerdo con la siguiente expresión:

$$[\text{clorofila total}] (\mu\text{g mL}^{-1}) = 8.05 (\text{Abs}_{663}) + 20.29 (\text{Abs}_{649})$$

#### V.4.2 Procedimiento de extracción y cuantificación de paramilo

La extracción y cuantificación de paramilo se realizó de acuerdo con Rodríguez-Zavala *et al.* (2010) y Dubois *et al.* (1956). Se tomaron  $0.75 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  del cultivo, se trataron como se describió en el procedimiento de extracción y cuantificación de clorofila total, luego, el botón celular se empleó para extraer el paramilo. Se añadió 1 mL de SDS 1 %, se agitó en vórtex por 1 min, se incubó por 15 min en agua hirviendo a baño maría, luego, se colocó en hielo por 10 min, se centrifugó a 2,200 g por 20 min y se eliminó el sobrenadante. El botón celular obtenido se trató así, una vez más. Luego, se eliminó el sobrenadante, se añadió de nuevo 1 mL de SDS 1 %, se agitó en vórtex por 1 min y se centrifugó a 2,200 g por 20 min. El botón de paramilo se resuspendió en 1 mL de NaOH 1.0 N y se agitó en vórtex por 1 min. Se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de esta disolución y se añadieron 600  $\mu\text{L}$  de fenol 5 % y 2.5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Se agitó en vórtex y tras 20 min a 25 °C, se determinó la absorbancia a 490 nm en una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz. La curva de calibración se realizó con glucosa anhidra a partir de una disolución con una concentración de 1 mg  $\text{mL}^{-1}$ , de la cual se tomaron alícuotas hasta una concentración máxima de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### V.4.3 Procedimiento de extracción y cuantificación de proteína total

Se empleó el método de Waddell (1956) modificado por Moreno-Sánchez & Hansford (1988). Se tomaron  $0.13 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  del cultivo y se centrifugaron a 2,200 g por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 2 mL NaOH 0.05 N. Las células se rompieron en hielo con un desmembrador ultrasónico (Thermo Fisher) a 20 Watts, empleando cinco ciclos de 10 segundos con intervalos de descanso de 30 segundos. Luego, se agitó en vórtex por 1 min y se centrifugó a 2,200 g. El sobrenadante se llevó a un volumen final de 5.0 mL con NaOH 0.05 N y se determinaron absorbancias a 215 y 225 nm en una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz. La curva de calibración se realizó con albúmina de suero bovino a partir de una disolución con una concentración de 1 mg  $\text{mL}^{-1}$ , de la cual se tomaron alícuotas hasta una concentración máxima de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , al graficar la diferencia de  $\text{Abs}_{215} - \text{Abs}_{225}$  para cada valor de concentración de proteína.

#### V.4.4 Procedimiento de extracción y cuantificación de lípidos totales

La extracción y cuantificación de lípidos totales se realizó de acuerdo con Blig & Dyer (1959) y el micrométodo de Pande *et al.* (1963). El cultivo se centrifugó a 3,000 g por 20 min. Los botones celulares concentrados se depositaron en tubos de vidrio y se cuantificó el peso húmedo. Se agregó una mezcla de cloroformo:metanol 1:2 a un volumen 25 veces el peso de la biomasa húmeda. Los tubos se protegieron de la luz con papel aluminio, se colocaron en un baño ultrasónico por 45 min con hielo y se dejaron a -20 °C por 24 horas. Después, se añadió cloroformo para completar una mezcla de extracción cloroformo:metanol 2:2 y se volvió a depositar en el baño ultrasónico con hielo por 15 min. El extracto se separó de los restos celulares mediante un filtro de fibra de vidrio (Merck) con abertura de poro de 0.45 µm y se recolectó en un tubo de vidrio nuevo. La separación de las fases se realizó en un embudo de separación al agregar KCl 0.88 % en una cantidad equivalente a la mitad del volumen total de los disolventes de extracción.

Para la cuantificación de lípidos totales, se tomaron alícuotas de 30 y 60 µL del extracto de cloroformo, se depositaron en tubos de vidrio limpios y el disolvente se evaporó con nitrógeno gaseoso, manteniendo las muestras en hielo. Se añadieron 2 mL de la disolución digestora de  $K_2Cr_2O_7$  0.15 % en  $H_2SO_4$  concentrado y se agitó en vórtex por 1 min. Luego, las muestras se colocaron en un digestor a 100 °C por 15 min, después, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 4.5 mL de agua desionizada. Se agitó en vórtex por 1 min, se volvió a dejar enfriar a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 440 nm en una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz.

Se emplearon dos blancos tratados igual que las muestras. Después de añadir agua desionizada, a un blanco se agregó 0.10 mL de  $NaHSO_3 \cdot 7H_2O$  20 %, que se empleó para calibrar el espectrofotómetro a 440 nm. Por su parte, otro blanco que no fue reducido sirve como control para determinar la cantidad inicial de dicromato en el reactivo oxidante y para obtener el primer punto de la curva de calibración, la cual se realizó con un estándar de triglicéridos a una concentración de 2.0 mg mL<sup>-1</sup>, de ésta se tomaron alícuotas hasta una cantidad máxima de 100

$\mu\text{g}$  de lípidos. Al determinar la absorbancia a 440 nm, se cuantifica la reducción del ion dicromato, que contiene la forma oxidada cromo (VI) y que se reduce a cromo (III) conforme aumenta la cantidad de lípidos en la muestra. Por lo tanto, la curva de calibración es una recta con pendiente negativa.

## **V.5 Procedimiento de transesterificación para la obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) y análisis cromatográfico**

La transesterificación y el análisis de EMAG por GC-MS se realizaron de acuerdo con Del-Ángel *et al.* (2017). Se tomaron 3 mL de los extractos de lípidos, el disolvente se evaporó con nitrógeno gaseoso, manteniendo las muestras en hielo. Posteriormente, se realizó una transesterificación ácida con 2.5 mL de una mezcla de HCl 5 % en metanol grado cromatográfico a 85 °C por 2.5 horas. Los EMAG se recuperaron con tres extracciones de 3 mL de hexano grado cromatográfico. La caracterización de EMAG se realizó con un cromatógrafo Agilent 7890B (G3440B). Se inyectó 1  $\mu\text{L}$  del extracto de hexano en modo split 10:1 a 250 °C. Se empleó helio grado cromatográfico (>99.999 % de pureza) como gas acarreador a una velocidad de flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. La columna usada fue HP-88 (60 m x 0.25 mm x 0.2  $\mu\text{m}$ , Agilent). En el horno, se mantuvo una temperatura inicial de 175 °C por 10 min, seguida por un incremento de 3 °C min<sup>-1</sup> hasta 220 °C durante 5 min y se mantuvo en 220 °C por 25 min. El detector fue un espectrómetro de masas Agilent (G7038A) a 230 °C para la fuente y 150 °C para el cuadrupolo. Los EMAG fueron identificados y caracterizados con base en los tiempos de retención del estándar “Fame Mix SUPELCO 37 component” (Sigma Aldrich) y con base en la biblioteca NIST 2.0 integrada a la paquetería Mass Hunter (Agilent).

## **V.6 Procedimientos para realizar tinciones**

Todas las microfotografías y las mediciones de tamaño celular se realizaron con un microscopio Nikon Eclipse 80i de contraste de fases y epifluorescencia.

### V.6.1 Tinción con lugol

Para resaltar los gránulos de paramilo, el citoplasma celular se tiñó con lugol (1 g de I, 2 g KI en 300 mL de agua destilada) de acuerdo con Castañeda (2004). Se

añadieron 100 µL de células en 900 µL de lugol y se dejó en reposo por 2 horas en oscuridad. Luego, se retiraron 800 µL de sobrenadante, se repuso este volumen con agua destilada y se dejó reposar por 15 min. Las células se observaron al microscopio en campo claro y en contraste de fases.

#### V.6.2 Tinción con rojo Nilo

Para resaltar los gránulos de lípidos se realizó una tinción con rojo Nilo de acuerdo con Arango (2015). Se disolvieron 2 mg de rojo Nilo en 2 mL de acetona en un frasco ámbar a 5 °C, luego, se tomaron 150 µL y se diluyeron en 1 mL de acetona, lo que da una concentración final de 150 µg mL<sup>-1</sup>. Ambas disoluciones se almacenaron en oscuridad a 5 °C. Se tomaron 1.98 mL del cultivo, se añadieron 20 µL de la disolución a 150 µg mL<sup>-1</sup> protegiendo la muestra de la luz con papel aluminio, se agitó en vórtex por 1 min y se incubó a 35 °C por 10 min. Las células se observaron a epifluorescencia con excitación láser entre 488 – 547 nm.

### **V.7 Procedimientos espectrofotométricos para remoción de nutrientes**

Se filtraron 10 mL de cultivo con una membrana de celulosa (0.45 µm de abertura de poro) y se tomaron las alícuotas necesarias para realizar las siguientes pruebas.

#### V.7.1 Demanda química de oxígeno (DQO)

La remoción de materia orgánica se cuantificó como DQO de acuerdo con el procedimiento 5220.D de APHA (2005). Se tomaron alícuotas apropiadas del cultivo filtrado para diluirlas en 2.5 mL. Se agregaron 1.5 mL de la disolución digestora (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 1.022 %, HgSO<sub>4</sub> 3.33 %, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 17.37 %). Posteriormente, se añadieron 3.5 mL del reactivo ácido (Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.012 % en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado) y se agitó en vórtex. Las muestras se colocaron en un digestor a 150 °C por dos horas, después, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 600 nm en una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz. La curva de calibración se realizó con una disolución estándar de (HOOC)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COOK (biftalato ácido de potasio) deshidratado a 110 °C por 2 horas, a una DQO de 2000 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, de la cual se tomaron alícuotas hasta una DQO máxima de 500 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>.

### V.7.2 Amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)

La determinación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se realizó de acuerdo con Richards & Kletsch (1964). Se tomaron alícuotas del cultivo filtrado para diluirlas en 3.5 mL. Se añadieron 70 µL de KBr 0.58 %, 700 µL de reactivo oxidante (NaOCl 0.079 % en NaOH 4.0 N) y se agitó en vórtex. Tras un período de oxidación de 1.5 h a temperatura ambiente, se agregaron 140 µL de una disolución de As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0.9 % (disuelto en NaOH 1 N y neutralizado con HCl 1.0 N), se agitó en vórtex y se añadieron 749 µL de reactivo de sulfanilamida (NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NH<sub>2</sub> 0.12 % en HCl 4.0 N). Después de 8 min, se añadieron 70 µL de reactivo NED (C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·2HCl 0.12 %). Luego de 10 min, se determinó la absorbancia a 540 nm con una celda de cuarzo de 1 cm de longitud. La curva de calibración se realizó con una disolución estándar de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, deshidratado a 105 °C por 2 horas, a una concentración de 100 mg L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, de la cual se tomaron alícuotas hasta una concentración máxima de 2.5 mg L<sup>-1</sup>.

### V.7.3 Ortofosfatos (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>)

La determinación de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> se realizó de acuerdo con el procedimiento 4500 Fosfatos P. C. de APHA (2005). Se tomaron alícuotas apropiadas del cultivo filtrado para diluirlas en 3.5 mL. Posteriormente, se añadió 1 mL del reactivo de molibdato de vanadato (NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub> 0.125%, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 2.5 %, HCl 12.21 %) y se agitó en vórtex. Después de 10 min, se determinó la absorbancia a 420 nm con una celda de cuarzo de 1 cm de longitud. La curva de calibración se realizó con una disolución estándar de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> deshidratado a 105 °C por 2 horas, a una concentración de 100 mg L<sup>-1</sup> de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, de la cual se tomaron alícuotas para construir la curva en un rango de 2 a 10 mg L<sup>-1</sup> de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>.

## **V.8 Análisis estadísticos**

### V.8.1 Ajuste de cinéticas de crecimiento al modelo de Gompertz

Los datos de los conteos celulares se transformaron a escala logarítmica respecto a la concentración celular inicial para obtener siempre valores positivos en las cinéticas de crecimiento de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\ln \left( \frac{N_i}{N_0} \right)$$

donde  $N_i$  es la concentración celular en el tiempo  $i$ ,  $N_0$  es la concentración celular en el tiempo inicial y  $\ln$  es logaritmo natural. Las cinéticas de crecimiento se ajustaron a los modelos logístico, Gompertz y Gompertz de dos fases de acuerdo con las siguientes ecuaciones con base en el programa STATISTICA 10, dentro del menú Estimación No lineal:

Modelo logístico	$y = a/(1+b*\exp(-c*t))$
Modelo de Gompertz	$y = a*\exp(-\exp(b-c*t))$
Modelo de Gompertz de dos fases	$y = a_1*\exp(-\exp(b_1-c_1*t)) + a_2*\exp(-\exp(b_2-c_2*t))$

La estimación de los parámetros  $a$ ,  $b$  y  $c$  se realizó con el método de mínimos cuadrados mediante el algoritmo de Levenberg-Marquardt. La tasa de crecimiento específico ( $\mu_{\max}$ ) y el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) se calcularon de acuerdo con Zwietering *et al.* (1990) y Çelekli *et al.* (2008) de la siguiente manera:

$$\mu_{\max} (\text{días}^{-1}) = \frac{a c}{e}$$

$$t_d (\text{días}) = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}}$$

Las ANOVAs de uno y dos factores también se realizaron con el programa STATISTICA 10, así como las correspondientes pruebas Post Hoc de Tukey para identificar las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

#### V.8.2 Porcentajes de remoción y rendimientos.

Lo valores de remoción para DQO,  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ , así como los respectivos porcentajes se calcularon de acuerdo con Aslan & Kapdan (2006):

$$\text{Remoción (mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}) = \frac{\text{Concentración inicial} - \text{Concentración final}}{\text{Tiempo(días)}}$$

$$\text{Porcentaje de remoción (\%)} = \frac{\text{Concentración inicial} - \text{Concentración final}}{\text{Concentración inicial}} (100 \%)$$



Por su parte, los rendimientos de clorofila total y paramilo se calcularon al multiplicar el valor de concentración en microgramos por mililitro ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) por el inverso de la concentración celular en mililitro por millón de células ( $\text{mL } 10^{-6} \text{ células}$ ) de acuerdo con Toledo-Cervantes *et al.* (2013) Por lo tanto, se tiene:

$$\text{Rendimiento de "x metabolito" } (\mu\text{g } 10^{-6} \text{ células}) = \left( \frac{\mu\text{g de x metabolito}}{\text{mL}} \right) \left( \frac{\text{mL}}{10^6 \text{ células}} \right)$$

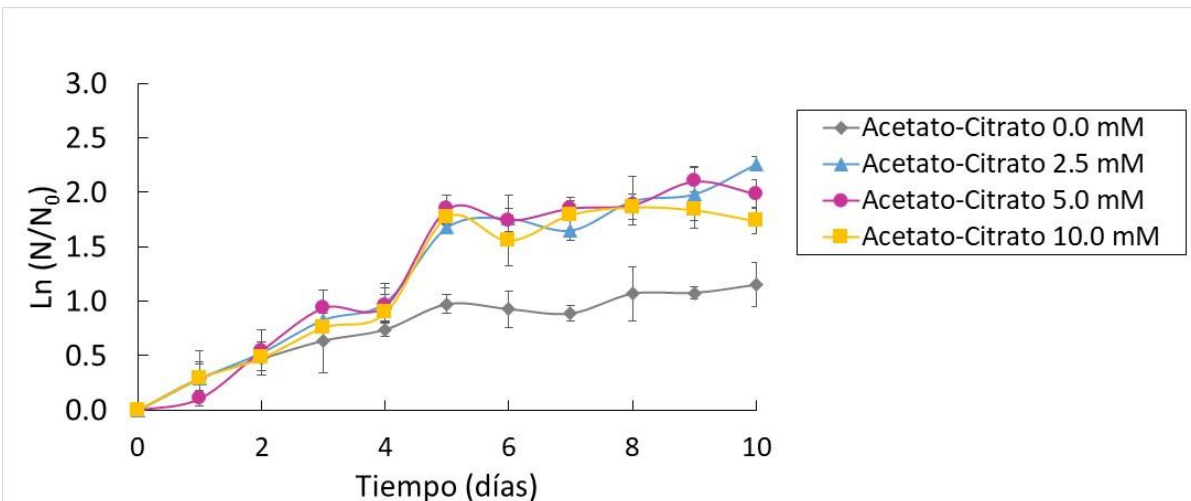
## VI. Resultados

### VI.1 Experimento de aclimatación en diferentes cultivos con acetato-citrato

Se presentan las cinéticas de crecimiento en medios de cultivo Buetow modificados para identificar el efecto del citrato en la aclimatación de *E. gracilis* a la presencia de acetato. Para analizar esto, se varió la concentración de citrato (0.0 mM, 2.5 mM, 5.0 mM, 10.0 mM), mientras que la de acetato se mantuvo constante (60.95 mM). Se realizó un seguimiento cada dos resiembras para observar los efectos del acetato-citrato en las células, a fin de abreviar el tiempo de seguimiento.

#### VI.1.1) Cinéticas de crecimiento de la segunda resiembra

La Figura 8 muestra las cinéticas de crecimiento de la segunda resiembra de células en medio Buetow modificado. Durante los primeros tres días, el crecimiento de todos los cultivos presentó un incremento lento. Después, ocurrió una fase de crecimiento exponencial del cuarto al quinto día sólo en los cultivos con citrato. Posteriormente, del sexto al décimo día, todos los cultivos se mantuvieron en fase estacionaria de crecimiento. Los cultivos con acetato-citrato 2.5, 5.0 y 10.0 mM presentaron curvas de crecimiento sigmoidales. Dadas estas características, se probó ajustar las cinéticas de crecimiento a los modelos sigmoidales logístico y de Gompertz. Los valores de los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) para cada modelo correspondiente



**Figura 8. Cinética de crecimiento de la segunda resiembra de *E. gracilis* en cultivos con acetato-citrato.** Se muestran las gráficas de Logaritmo natural ( $\ln$ ) de  $N/N_0$  vs tiempo en días.

a las cinéticas de la segunda resiembra se presentan en la Tabla 2. Para el modelo logístico, se obtuvo un valor de 0.953 para acetato-citrato 0.0 mM, pero en acetato-citrato 2.5, 5.0 y 10. mM los valores de  $R^2$  fueron iguales o menores que 0.306. Por su parte, con el modelo de Gompertz se obtuvieron los valores más altos de  $R^2$  para todos los cultivos, siempre iguales o mayores que 0.953. Esto indica un buen ajuste de las cinéticas de crecimiento con base en el modelo de Gompertz. Por lo que se procedió a caracterizar los parámetros de este modelo para cada uno de los cultivos de la segunda resiembra. Los resultados de los ajustes a dicho modelo se presentan en la Tabla 3. Para todos los tratamientos  $p < 0.05$ , lo que indicó un ajuste estadísticamente significativo en todos los casos al modelo de Gompertz. Realizado esto, se procedió a obtener las tasas crecimiento específico ( $\mu_{max}$ ) y los tiempos de duplicación ( $t_d$ ) para cada cultivo.

**Tabla 2. Comparación de los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de los modelos logístico y Gompertz para los cultivos de la segunda resiembra.** Cada modelo fue ajustado mediante el método de mínimos cuadrados con el algoritmo de Levenberg-Marquardt usando Statistica 10.0.

Modelo de crecimiento	Acetato-citrato 0.0 mM	Acetato-citrato 2.5 mM	Acetato-citrato 5.0 mM	Acetato-citrato 10.0 mM
Modelo Logístico ( $R^2$ )	0.953	0.300	0.290	0.306
Modelo Gompertz ( $R^2$ )	0.967	0.973	0.967	0.952

El ANOVA de un criterio mostró que los valores de  $\mu_{max}$  de los cultivos con acetato-citrato 2.5, 5.0 y 10.0 mM fueron significativamente mayores respecto de acetato-citrato 0.0 mM ( $p < 0.05$ ). Luego, entre los valores de  $\mu_{max}$  de los cultivos con citrato no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Respecto a  $t_d$ , los valores de acetato-citrato 2.5, 5.0 y 10.0 mM también fueron significativamente menores que acetato-citrato 0.0 mM ( $p < 0.05$ ). Por su parte, entre los valores de  $t_d$  de los cultivos con citrato no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). El cultivo con acetato-citrato 5.0 mM presentó la mayor  $\mu_{max}$  ( $0.42 \pm 0.09$  días<sup>-1</sup>) y el menor  $t_d$  ( $1.65 \pm 0.30$  días). Por el contrario, acetato-citrato 0.0 mM presentó la menor  $\mu_{max}$  ( $0.20 \pm 0.10$  días<sup>-1</sup>) y el mayor  $t_d$  ( $3.46 \pm 1.20$  días).

En cuanto a la concentración celular al décimo día, los valores de los cultivos con citrato fueron significativamente mayores respecto al cultivo sin citrato ( $p < 0.05$ ). Entre los valores de concentración celular para los cultivos con citrato no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). El cultivo con acetato-citrato 2.5 mM alcanzó la mayor concentración celular ( $1.92 \pm 0.12 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ), mientras que la menor concentración lo presentó acetato-citrato 0.0 mM ( $0.64 \pm 0.12 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ). Los detalles estadísticos de los análisis de ajuste al modelo de Gompertz y de las ANOVAs de un criterio se presentan en el Anexo 1.1.

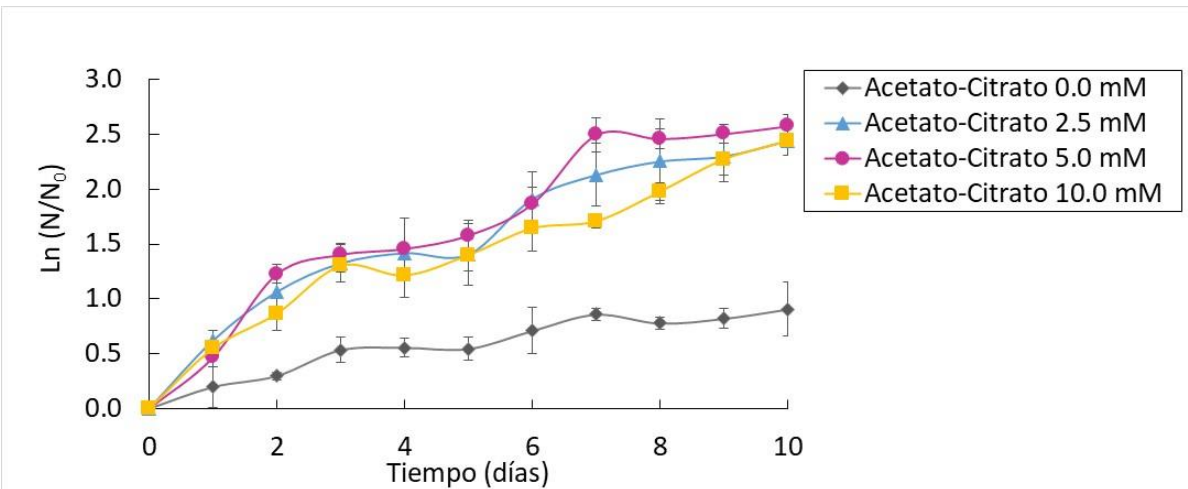
**Tabla 3. Ajuste al modelo de Gompertz para cultivos de la segunda resiembra.** Se muestran los valores de  $R^2$  y la significancia estadística de estimar los parámetros a, b y c al modelo de Gompertz. Después, se presentan los valores de  $\mu_{\max}$ ,  $t_d$  y concentración celular. Diferente letra indica diferencia estadística ( $p < 0.05$ ), mientras que la misma letra significa que no hay diferencias ( $p > 0.05$ ) de acuerdo con el ANOVA de un criterio y las respectivas pruebas de Tukey.

	Acetato-citrato 0.0 mM	Acetato-citrato 2.5 mM	Acetato-citrato 5.0 mM	Acetato-citrato 10.0 mM
$R^2$	0.967	0.973	0.967	0.952
Valor $p$	3.01 E-09	6.10 E-09	1.30 E-09	5.00E-08
Parámetro a	1.0944	2.2468	2.0704	1.9085
Parámetro b	0.8934	1.2011	1.5013	1.4376
Parámetro c	0.4978	0.4036	0.5526	0.5374
$\mu_{\max}$ (días <sup>-1</sup> )	$0.20 \pm 0.10^a$	$0.33 \pm 0.02^b$	$0.42 \pm 0.09^b$	$0.38 \pm 0.05^b$
$t_d$ (días)	$3.46 \pm 1.20^c$	$2.08 \pm 0.13^d$	$1.65 \pm 0.30^d$	$1.84 \pm 0.27^d$
Células al 10° día ( $10^6 \text{ mL}^{-1}$ )	$0.64 \pm 0.12^e$	$1.92 \pm 0.12^f$	$1.47 \pm 0.19^g$	$1.14 \pm 0.13^g$

#### VI.1.2 Cinéticas de crecimiento de la cuarta resiembra

La Figura 9 muestra las cinéticas de crecimiento de las células resembradas por cuarta ocasión en medio Buetow modificado. El crecimiento en acetato-citrato 0.0 mM fue prácticamente nulo. Por su parte, acetato-citrato 2.5 mM y acetato-citrato 5.0 mM presentaron un crecimiento continuo hasta el sexto día y desarrollaron una tendencia a una curva doble sigmoideal con dos fases de crecimiento exponencial de los días uno a dos y cinco a siete. En el caso de acetato-citrato 10.0 mM, la tendencia doble sigmoideal no fue clara, aunque el crecimiento fue continuo hasta el

décimo día. Debido a esto, se decidió probar el ajuste de las cinéticas de crecimiento a los modelos sigmoideal, de Gompertz de una fase y de Gompertz de dos fases.



**Figura 9. Cinéticas de crecimiento de la cuarta resiembra de *E. gracilis* en cultivos con acetato-citrato.** Se muestran las gráficas de Logaritmo natural ( $\ln$ ) de  $N/N_0$  vs tiempo en días.

Los valores de los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) para cada ajuste se presentan en la Tabla 4. Para el modelo logístico, se obtuvo un  $R^2$  de 0.942 en acetato-citrato 0.0 mM, pero en acetato-citrato 2.5, 5.0 y 10.0 mM los valores de  $R^2$  fueron iguales o menores que 0.438. Respecto al modelo de Gompertz de una fase, se obtuvieron valores de  $R^2$  iguales o mayores que 0.943 en todos los cultivos, lo que indicó un mejor ajuste respecto al modelo logístico. Con el modelo de Gompertz de dos fases, se obtuvieron los mayores valores de  $R^2$ , iguales o mayores que 0.980, sin embargo, al estimar los parámetros correspondientes a dicho modelo, hubo coeficientes que no fueron estadísticamente significativos ( $p > 0.05$ ) en la mayoría de los cultivos, excepto en acetato-citrato 2.5 mM. Debido a lo anterior, las cinéticas de crecimiento de acetato-citrato 0.0 mM, 5.0 mM y 10.0 mM se ajustaron al modelo de Gompertz de una fase, pero acetato-citrato 2.5 mM se ajustó al modelo de Gompertz de dos fases. Los resultados a estos ajustes fueron significativos (ver Tabla 5). En acetato-citrato 2.5 mM, dado que el ajuste de la cinética fue con el modelo de Gompertz de dos fases, se estimaron dos valores de  $\mu_{\max}$  y  $t_d$ , uno para cada fase.

**Tabla 4. Comparación de los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de los modelos Logístico, Gompertz de una fase y Gompertz de dos fases para los cultivos de la cuarta resiembra.** Cada modelo fue ajustado mediante el método de mínimos cuadrados con el algoritmo de Levenberg-Marquardt usando Statistica 10.0.

\*Aunque fueron los valores más altos de  $R^2$ , las estimaciones de los coeficientes del modelo no fueron significativos ( $p > 0.05$ ).

Modelo de crecimiento	Acetato-citrato 0.0 mM	Acetato-citrato 2.5 mM	Acetato-citrato 5.0 mM	Acetato-citrato 10.0 mM
Modelo Logístico ( $R^2$ )	0.942	0.438	0.399	0.403
Modelo Gompertz de una fase ( $R^2$ )	0.956	0.955	0.943	0.946
Modelo Gompertz de dos fases ( $R^2$ )	0.980*	0.995	0.998*	0.991*

Respecto a los valores de  $\mu_{max}$ , el ANOVA de un criterio mostró que  $\mu_{1max}$  y  $\mu_{2max}$  de acetato-citrato 2.5 mM fueron significativamente mayores respecto a los otros tratamientos ( $p < 0.05$ ). Entre los valores restantes de  $\mu_{max}$ , no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). En cuanto a  $t_d$ , los valores de acetato-citrato 2.5, 5.0 y 10.0 mM fueron significativamente menores en comparación con acetato-citrato 0.0 mM ( $p < 0.05$ ), siendo  $t_{d1}$  y  $t_{d2}$  de acetato-citrato 2.5 mM junto con  $t_d$  de acetato-citrato 5.0 mM significativamente menores que  $t_d$  de acetato-citrato 10.0 mM ( $p < 0.05$ ). El tratamiento con acetato-citrato 2.5 mM presentó la mayor tasa de crecimiento específico,  $\mu_{1max}$  ( $0.69 \pm 0.22$  días<sup>-1</sup>) y el menor tiempo de duplicación  $t_{1d}$  ( $1.00 \pm 0.28$  días), pertenecientes a la primera fase de crecimiento. Por el contrario, el tratamiento con acetato-citrato 0.0 mM presentó la menor  $\mu_{max}$  ( $0.14 \pm 0.02$  días<sup>-1</sup>) y el mayor  $t_d$  ( $5.07 \pm 0.71$ ).

En cuanto a concentración celular, los valores de acetato-citrato 2.5, 5.0 y 10.0 mM fueron significativamente mayores que acetato-citrato 0.0 mM ( $p < 0.05$ ). Por su parte, entre los valores de los cultivos con citrato no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). El cultivo con acetato-citrato 5.0 mM alcanzó la mayor concentración celular ( $2.64 \pm 0.28 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>), mientras que acetato-citrato 0.0 mM presentó el menor valor ( $0.51 \pm 0.13 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>). Los detalles de los análisis estadísticos de ajuste a los modelos de Gompertz y de las ANOVAs de un criterio con las pruebas de Tukey se presentan en el Anexo 1.2.

**Tabla 5. Ajuste a los modelos de Gompertz de una fase y Gompertz de dos fases de la cuarta resiembra.** Se muestran los valores de  $R^2$  y la significancia estadística de estimar los parámetros  $a$ ,  $b$  y  $c$  al modelo Gompertz de una fase y los parámetros  $a_1$ ,  $b_1$ ,  $c_1$ ,  $a_2$ ,  $b_2$  y  $c_2$  al modelo de Gompertz de dos fases. Después, se presentan los valores de  $\mu_{max}$ ,  $t_d$  y concentración celular. Diferente letra indica diferencia estadística ( $p < 0.05$ ), mientras que la misma letra significa que no hay diferencia ( $p > 0.05$ ) de acuerdo con el ANOVA de un criterio y las respectivas pruebas de Tukey.

Modelo Gompertz de una fase				
	Acetato-citrato 0.0 mM	Acetato-citrato 2.5 mM	Acetato-citrato 5.0 mM	Acetato-citrato 10.0 mM
$R^2$	0.956	---	0.943	0.946
Valor de $p$	1.45 E-08	---	4.05 E-08	3.23 E-08
Parámetro $a$	0.8964	---	2.7789	2.7991
Parámetro $b$	0.9033	---	0.8308	0.7669
Parámetro $c$	0.4145	---	0.3437	0.2434
Modelo de Gompertz de dos fases				
$R^2$	---	0.995	---	---
Valor de $p$	---	1.83 E-07	---	---
Parámetro $a_1$	---	1.392	---	---
Parámetro $b_1$	---	1.210	---	---
Parámetro $c_1$	---	1.354	---	---
Parámetro $a_2$	---	0.969	---	---
Parámetro $b_2$	---	6.954	---	---
Parámetro $c_2$	---	1.210	---	---
$\mu_{max}$ , $t_d$				
$\mu_{max}$ (días <sup>-1</sup> )	0.14 ± 0.02 <sup>a</sup>	$\mu_{1max} = 0.69 \pm 0.22^b$ $\mu_{2max} = 0.43 \pm 0.12^c$	0.35 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.03 <sup>a</sup>
$t_d$ (días)	5.07 ± 0.71 <sup>d</sup>	$T_{1d} = 1.00 \pm 0.28^e$ $T_{2d} = 1.61 \pm 0.43^e$	1.97 ± 0.01 <sup>e</sup>	2.77 ± 0.35 <sup>f</sup>
Células al 10 <sup>o</sup> día (10 <sup>6</sup> mL <sup>-1</sup> )	0.51 ± 0.13 <sup>g</sup>	2.31 ± 0.32 <sup>h</sup>	2.64 ± 0.28 <sup>h</sup>	2.29 ± 0.06 <sup>h</sup>

Otra característica observada durante el proceso de aclimatación fue el incremento de células en forma de estados palmela, que se caracterizan por su morfología esférica, sin flagelo y con cloroplastos reducidos en tamaño a estructuras globulares. La comparación de porcentajes de estados palmela entre la segunda y cuarta resiembra se presenta en la Tabla 6. En general, los porcentajes fueron mayores en la segunda resiembra y disminuyeron en la cuarta resiembra. De acuerdo con el ANOVA de dos factores, la disminución fue estadísticamente significativa en acetato-citrato 0.0 mM, 5.0 mM y 10.0 mM ( $p < 0.05$ ). En la segunda resiembra, los mayores porcentajes fueron  $25.3 \pm 1.1 \%$  y  $47.9 \pm 2.7 \%$  en acetato-

citrato 10.0 mM y 5.0 mM, respectivamente. En la cuarta resiembra, los porcentajes con valores mínimos fueron 2.4 % y 3.6 % en acetato-citrato 2.5 mM y 0.0 mM. Los detalles estadísticos del ANOVA de dos factores para comparar los porcentajes de estados palmela se presentan en el Anexo 1.3, así como la respectiva prueba de Tukey.

**Tabla 6. Porcentaje de estados palmela durante la aclimatación de *E. gracilis*.** Datos obtenidos tras 10 días de cultivo. Diferente letra indica diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) dentro de una misma generación y misma letra significa que no hay diferencia ( $p > 0.05$ ). Diferente número indica diferencia estadística entre generaciones ( $p < 0.05$ ) y mismo número indica que no hay diferencia ( $p > 0.05$ ). El análisis se realizó de acuerdo con un ANOVA de dos criterios y la respectiva prueba de Tukey.

	Acetato-citrato 0.0 mM	Acetato-citrato 2.5 mM	Acetato-citrato 5.0 mM	Acetato-citrato 10.0 mM
Segunda generación	18.8 ± 4.1 <sup>a1</sup>	7.0 ± 1.8 <sup>b1</sup>	47.9 ± 2.7 <sup>b1</sup>	25.3 ± 1.1 <sup>a1</sup>
Cuarta generación	3.6 ± 1.8 <sup>c2</sup>	2.4 ± 1.2 <sup>c1</sup>	4.7 ± 1.5 <sup>c2</sup>	10.0 ± 2.6 <sup>c2</sup>

### VI.1.3 Comparación entre los contenidos de clorofila total y paramilo entre la segunda y cuarta resiembra

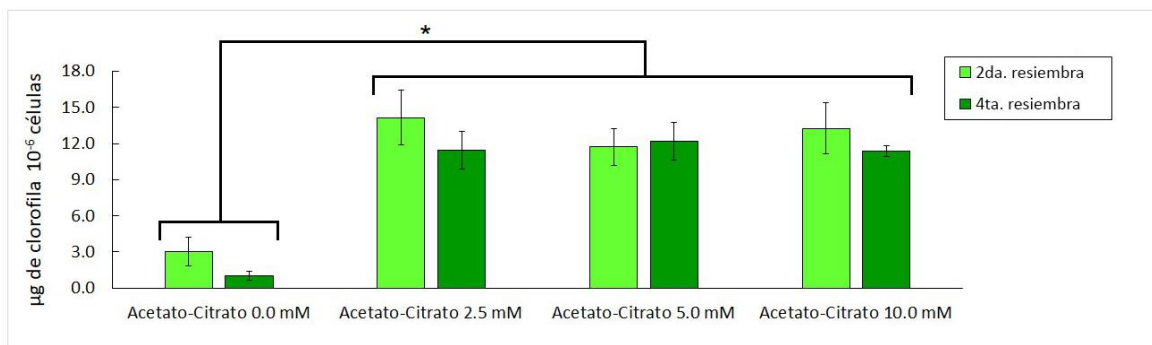
La Figura 10a presenta la comparación entre los contenidos de clorofila total al décimo día de cultivo, expresados como rendimiento en microgramos por millón de células ( $\mu\text{g } 10^{-6}$  células). En la segunda resiembra, de acuerdo con el ANOVA de dos criterios, los rendimientos de clorofila total en acetato-citrato 2.5, 5.0 y 10.0 mM fueron significativamente mayores que en acetato-citrato 0.0 mM ( $p < 0.05$ ). Los rendimientos de clorofila total en la segunda resiembra para acetato-citrato 2.5, 5.0 y 10.0 mM fueron  $14.1 \pm 2.3$ ,  $11.7 \pm 1.5$  y  $13.3 \pm 2.1 \mu\text{g } 10^{-6}$  células, respectivamente; mientras que en acetato-citrato 0.0 mM disminuyó a  $3.1 \pm 1.2 \mu\text{g } 10^{-6}$  células. Los valores de clorofila total no presentaron diferencias significativas entre los cultivos con citrato ( $p > 0.05$ ).

Por su parte, en la cuarta resiembra y de acuerdo con el ANOVA de dos criterios, los cultivos con acetato-citrato 2.5, 5.0 y 10.0 mM también presentaron rendimientos significativamente mayores que acetato-citrato 0.0 mM ( $p < 0.05$ ). Los

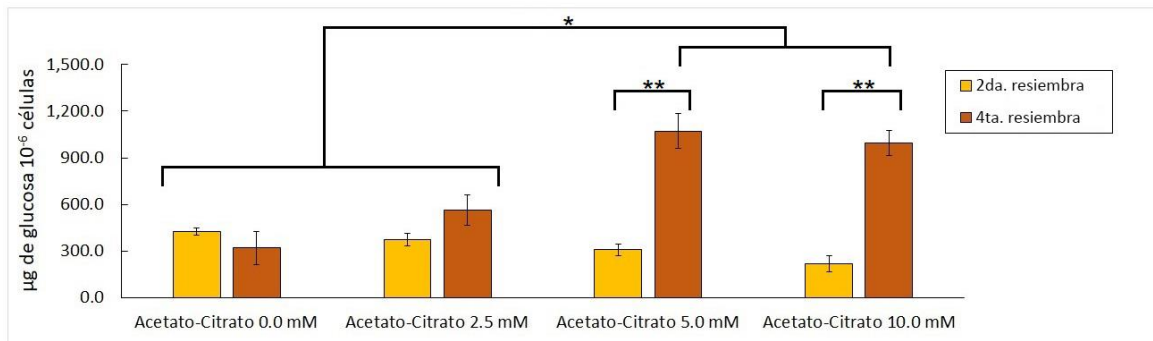


rendimientos en la cuarta resiembra para acetato-citrato 2.5, 5.0 y 10.0 mM fueron  $11.4 \pm 1.5$ ,  $12.2 \pm 1.6$  y  $11.4 \pm 0.5 \mu\text{g } 10^{-6}$  células, respectivamente; mientras que en acetato-citrato 0.0 mM el contenido disminuyó a  $1.0 \pm 0.4 \mu\text{g } 10^{-6}$  células. Entre los rendimientos de acetato-citrato 2.5, 5.0 y 10.0 mM de la cuarta resiembra no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). El ANOVA de dos factores también mostró que los rendimientos de clorofila total entre resiembras no presentaron diferencias significativas entre cada par de cultivos con la misma combinación de sustratos ( $p > 0.05$ ).

a) Contenido de clorofila total



b) Contenido de paramilo



**Figura 10. Comparación de los contenidos de clorofila total y paramilo entre la segunda y la cuarta resiembra de *E. gracilis* en cultivos con acetato-citrato.**

a) La clorofila total incluye clorofilas *a* y *b*; \* $p < 0.05$ ; b) El paramilo está cuantificado como equivalentes de glucosa. Cada valor es el promedio tres mediciones diferentes al décimo día de cultivo; \*\* $p < 0.05$ . Los datos de ambas gráficas se analizaron con una ANOVA de dos factores.

La Figura 10b presenta la comparación entre los contenidos de paramilo al décimo día de cultivo expresados como rendimiento en  $\mu\text{g } 10^{-6}$  células. En la segunda resiembra, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ( $p >$

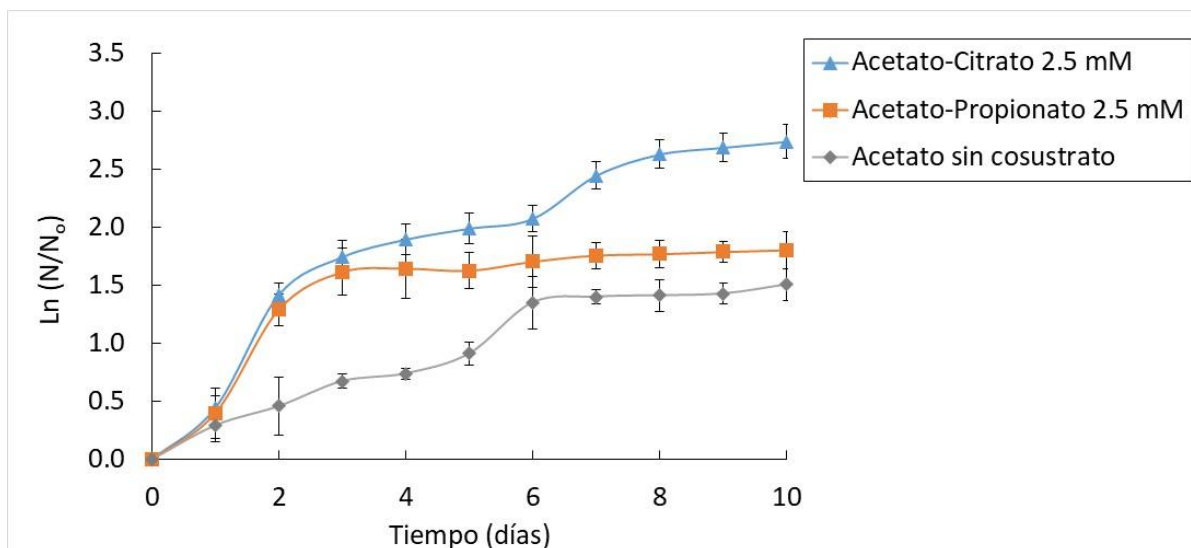
0.05). Los rendimientos de paramilo en la segunda resiembra para acetato-citrato 0.0, 2.5, 5.0 y 10.0 mM fueron  $424.7 \pm 23.9$ ,  $374.7 \pm 39.7$ ,  $308.6 \pm 36.8$  y  $218.0 \pm 52.2 \mu\text{g } 10^{-6}$  células respectivamente. Por su parte, en la cuarta resiembra, acetato-citrato 5.0 mM ( $1072.7 \pm 112.2 \mu\text{g } 10^{-6}$  células) y acetato-citrato 10.0 mM ( $996.4 \pm 81.9 \mu\text{g } 10^{-6}$  células) presentaron mayores rendimientos significativos, seguido de acetato-citrato 2.5 mM ( $562.0 \pm 98.2 \mu\text{g } 10^{-6}$  células) y, por último, acetato-citrato 0.0 mM ( $319.7 \pm 86.4 \mu\text{g } 10^{-6}$  células). De acuerdo con el ANOVA de dos factores, se identificó que, de la segunda resiembra a la cuarta resiembra, hubo un incremento significativo para los rendimientos de paramilo en acetato-citrato 5.0 y 10.0 mM ( $p < 0.05$ ), pero esto no ocurrió en acetato-citrato 0.0 y 2.5 mM ( $p > 0.05$ ). Los resultados de los análisis estadísticos para las ANOVAs de dos factores de los contenidos de clorofila total y paramilo, así como las pruebas de Tukey, se presentan en el Anexo 1.3.

## **VI.2 Experimento de caracterización de biomasa respecto a la remoción de nutrientes**

En el experimento anterior, se encontró que el citrato estimuló el incremento de las concentraciones celulares, así como los contenidos de clorofila total y paramilo. Además, se encontró un crecimiento significativo doble sigmoidal en acetato-citrato 2.5 mM, lo que indicó una diauxia con tasas de crecimiento específico mayores respecto a los otros tratamientos. En consecuencia, se decidió corroborar los efectos debidos al citrato como cosustrato y continuar trabajando con acetato-citrato 2.5 mM. Así que se emplearon células ya aclimatadas en este cultivo y se les dieron dos resiembras más para tomar los inóculos de este segundo conjunto de experimentos. Se realizaron tres condiciones experimentales, una con 2.5 mM de citrato y 2.5 mM de propionato, como cosustratos, y una tercera sin cosustrato. El acetato se mantuvo en 60.95 mM. Por lo tanto, los análisis obtenidos de estos experimentos corresponden al comportamiento de las células en la sexta resiembra respecto a la condición de acetato-citrato 2.5 mM.

### VI.2.1 Cinéticas de crecimiento para los cultivos con acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato mM de la sexta resiembra

La Figura 11 muestra las cinéticas de crecimiento en las tres condiciones de este experimento. En acetato-citrato 2.5 mM, se mantuvo la curva doble sigmoïdal con dos fases de crecimiento exponencial de los días uno a dos y seis a siete, llegando a una concentración celular de  $3.1 \pm 0.40 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> en el décimo día. Con acetato-propionato 2.5 mM, la cinética perdió la forma doble sigmoïdal, sólo se mantuvo una fase de crecimiento exponencial de los días uno a dos y la concentración celular disminuyó a  $1.2 \pm 0.12 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> al décimo día. Mientras que, con acetato sin cosustrato, también se perdió la forma doble sigmoïdal de la cinética, sólo se mantuvo una fase de crecimiento exponencial de los días cinco a seis y la concentración celular disminuyó a  $0.90 \pm 0.15 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> al décimo día. De las concentraciones celulares, el ANOVA de un factor mostró que los valores de los tres tratamientos fueron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).



**Figura 11. Cinéticas de crecimiento en acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM de la sexta resiembra. Se muestran las gráficas de Logaritmo natural (Ln) de  $N/N_0$  vs tiempo en días.**

De acuerdo con las características que presentaron las cinéticas de crecimiento, se probó el ajuste a los modelos sigmoïdales logístico, Gompertz de una fase y Gompertz de dos fases. Los valores de los coeficientes de determinación

( $R^2$ ) para cada modelo se presentan en la Tabla 7. Para el modelo logístico, se obtuvieron valores de  $R^2$  iguales o menores que 0.438, lo que indica poco ajuste de las cinéticas a este modelo. Con el modelo de Gompertz de una fase, se obtuvieron valores de  $R^2$  menores o iguales que 0.953 para las tres cinéticas, lo que representa un mejor ajuste respecto al modelo logístico. En cuanto al modelo de Gompertz de dos fases se obtuvieron valores de  $R^2$  iguales o mayores que 0.995; no obstante, al estimar los parámetros de este modelo para acetato-propionato 2.5 mM y acetato sin cosustrato se obtuvieron resultados que no fueron estadísticamente significativos. Con base en esto, se decidió ajustar las cinéticas de acetato-propionato 2.5 mM y acetato sin cosustrato con el modelo de Gompertz de una fase, mientras que para acetato-citrato 2.5 mM se empleó el modelo de Gompertz de dos fases.

**Tabla 7. Comparación de los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de los modelos Logístico, Gompertz de una fase y Gompertz de dos fases para los cultivos de la sexta resiembra.** Cada modelo fue ajustado mediante el método de mínimos cuadrados con el algoritmo de Levenberg-Marquardt usando Statistica 10.0.

\*Aunque fueron los valores más altos de  $R^2$ , las estimaciones de los coeficientes del modelo no fueron estadísticamente significativos.

Modelo de crecimiento	Acetato sin cosustrato	Acetato-Propionato 2.5 mM	Acetato-Citrato 2.5 mM
Modelo Logístico ( $R^2$ )	0.438	0.567	0.451
Modelo Gompertz de una fase ( $R^2$ )	0.943	0.993	0.953
Modelo Gompertz de dos fases ( $R^2$ )	0.995*	0.999*	0.999

Los resultados de ajustar los modelos de Gompertz de una fase y Gompertz dos fases para los cultivos de la sexta resiembra se presentan en la Tabla 8. En todos los casos, se obtuvo  $p < 0.05$ . Para acetato-citrato 2.5 mM, se siguió presentando el crecimiento diaúxico detectado desde la cuarta resiembra, por lo cual, se calcularon dos valores de  $\mu_{max}$  y dos valores de  $t_d$ , uno para cada fase de crecimiento.

Respecto a  $\mu_{max}$ , el ANOVA de un criterio mostró que  $\mu_{1max}$  de acetato-citrato 2.5 mM y  $\mu_{max}$  de acetato-propionato 2.5 mM fueron significativamente mayores que

$\mu_{2max}$  de acetato-citrato 2.5 mM y  $\mu_{max}$  de acetato sin cosustrato ( $p < 0.05$ ). El mayor valor correspondió a  $\mu_{1max}$  ( $1.03 \pm 0.28$  días<sup>-1</sup>) de acetato-citrato 2.5 mM, mientras que el menor valor fue  $\mu_{max}$  ( $0.22 \pm 0.01$  días<sup>-1</sup>) de acetato sin cosustrato. Por su parte,  $t_d$  de acetato-propionato 2.5 mM y  $t_{d1}$  de acetato-citrato 2.5 mM fueron significativamente menores que  $t_d$  de acetato sin cosustrato y, a su vez, estos tres fueron significativamente menores que  $t_{d2}$  de acetato-citrato 2.5 mM ( $p < 0.05$ ). El mayor valor correspondió a  $t_d$  ( $3.04 \pm 0.15$  días) de acetato sin cosustrato, mientras que el menor valor fue  $t_{d1}$  ( $0.67 \pm 0.12$  días) de acetato-citrato 2.5 mM.

**Tabla 8. Ajuste a los modelos de Gompertz de una fase y Gompertz de dos fases para cultivos de la sexta resiembra.** Se muestran los valores de  $R^2$  y la significancia estadística de estimar los parámetros a, b y c del modelo Gompertz de una fase, así como los parámetros  $a_1$ ,  $b_1$ ,  $c_1$ ,  $a_2$ ,  $b_2$  y  $c_2$  del modelo de Gompertz de dos fases. Después, se presentan los valores de  $\mu_{max}$ ,  $t_d$  y concentración celular. Diferente letra indica diferencia estadística ( $p < 0.05$ ), mientras que la misma letra significa que no hay diferencia ( $p > 0.05$ ) de acuerdo con el ANOVA de un criterio y las respectivas pruebas de Tukey.

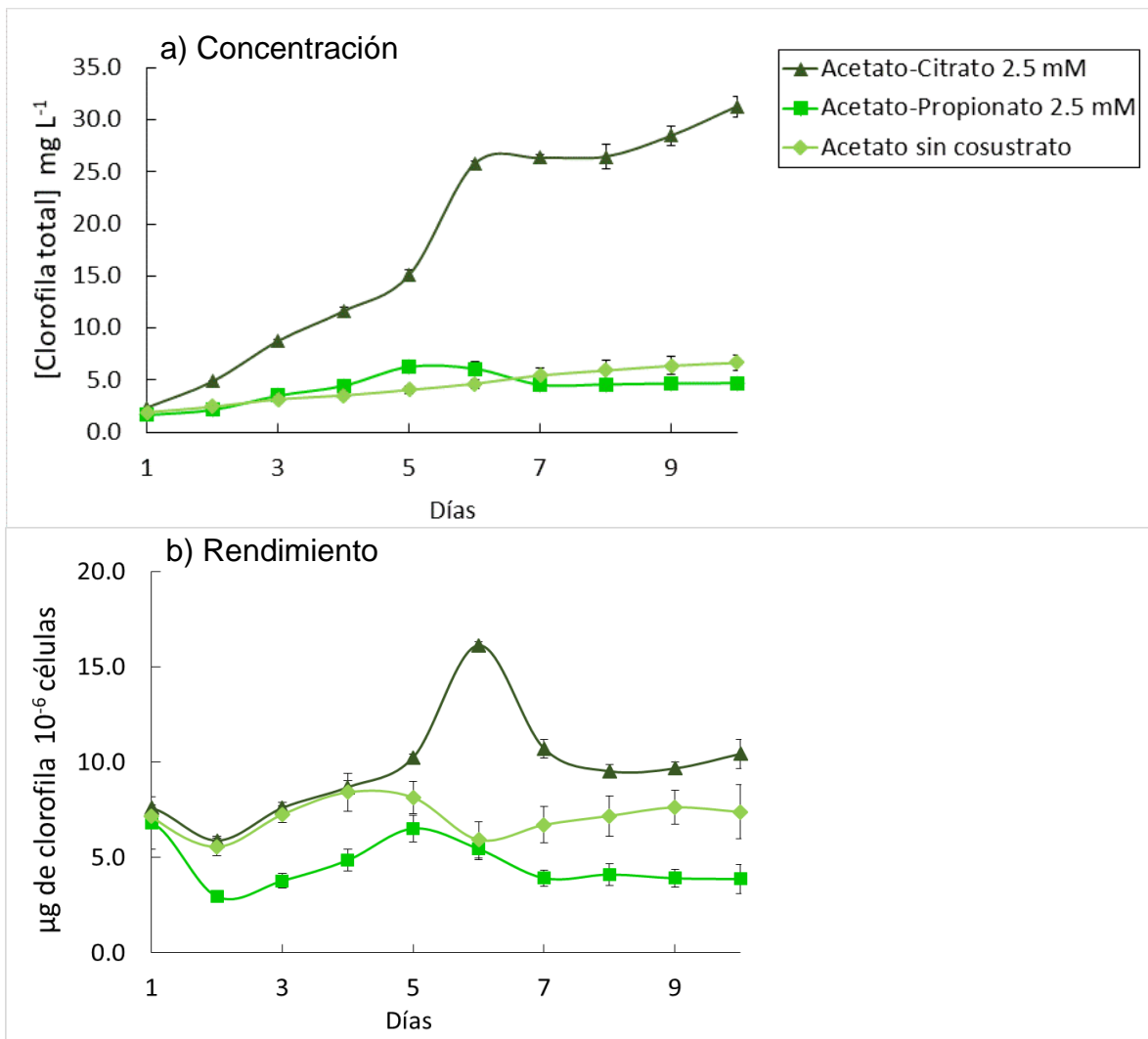
Modelo Gompertz de una fase			
	Acetato sin cosustrato	Acetato-propionato 2.5 mM	Acetato-citrato 2.5 mM
$R^2$	0.943	0.993	---
Valor de $p$	4.21 E-09	2.53 E-12	---
Parámetro a	1.6371	1.7347	---
Parámetro b	1.0578	1.9033	---
Parámetro c	0.3714	1.5366	---
Modelo de Gompertz de dos fases			
$R^2$	---	---	0.999
Valor de $p$	---	---	2.91 E-09
Parámetro $a_1$	---	---	1.9494
Parámetro $b_1$	---	---	1.8202
Parámetro $c_1$	---	---	1.4482
Parámetro $a_2$	---	---	0.7816
Parámetro $b_2$	---	---	8.4256
Parámetro $c_2$	---	---	1.3106
$\mu_{max}, t_d$			
$\mu_{max}$ (días <sup>-1</sup> )	$0.22 \pm 0.01^a$	$0.98 \pm 0.26^b$	$\mu_{1max} = 1.03 \pm 0.28^b$ $\mu_{2max} = 0.37 \pm 0.06^c$
$t_d$ (días)	$3.04 \pm 0.15^c$	$0.71 \pm 0.15^d$	$T_{d1} = 0.67 \pm 0.12^d$ $T_{d2} = 1.83 \pm 0.14^e$
Células al 10° día ( $10^6$ mL <sup>-1</sup> )	$0.90 \pm 0.06^f$	$1.22 \pm 0.12^g$	$3.10 \pm 0.13^h$

De nuevo, se hace notorio que la presencia de citrato está asociada al desarrollo de una cinética doble sigmoideal y con mayor concentración celular. El propionato como cosustrato no igualó los efectos del citrato y la concentración celular disminuyó. Por su parte, sin citrato la concentración celular y la tasa de crecimiento específico también disminuyeron considerablemente. Los detalles estadísticos de los ajustes a los modelos de Gompertz de una fase y Gompertz de dos fases, así como las ANOVAs de un criterio con las pruebas de Tukey para los cultivos de la sexta resiembra se presentan en el Anexo 2.1.

#### VI.2.2 Contenido diario de clorofila total en la biomasa

La Figura 12a muestra el comportamiento de la concentración de clorofila total durante los diez días que duraron los cultivos. Se observa que, desde el inicio, el cultivo con acetato-citrato 2.5 mM presentó mayores valores respecto a los otros dos tratamientos. En acetato-citrato 2.5 mM, se notó un marcado incremento del día cinco al seis, lo cual es previo a la segunda fase exponencial de crecimiento en dicho cultivo. De acuerdo con el ANOVA de un criterio, al décimo día de cultivo, la concentración de clorofila total en acetato-citrato 2.5 mM fue significativamente mayor que en acetato-propionato 2.5 mM y acetato sin cosustrato ( $p > 0.05$ ). Acetato-citrato 2.5 mM presentó el mayor valor significativo ( $31.3 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$ ) respecto de acetato sin cosustrato ( $6.7 \pm 1.6 \text{ mg L}^{-1}$ ) y acetato-propionato 2.5 mM ( $4.7 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$ ); entre estos dos últimos no hubo diferencias significativas.

Por su parte, la Figura 12b muestra el rendimiento diario de clorofila total donde se observa que acetato-citrato 2.5 también presentó mayores valores significativos que acetato-propionato 2.5 mM y acetato sin cosustrato ( $p < 0.05$ ). Además, se observó un máximo de contenido al día seis en acetato-citrato 2.5 mM, el cual no se presentó en los otros dos cultivos. De acuerdo con el ANOVA de un criterio, al décimo día, los tres cultivos presentaron contenidos significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ), siendo el de mayor valor acetato-citrato 2.5 mM ( $10.1 \pm 0.5 \mu\text{g } 10^{-6} \text{ células}$ ), seguido de acetato sin cosustrato ( $7.4 \pm 1.4 \mu\text{g } 10^{-6} \text{ células}$ ) y, por último, acetato-propionato 2.5 mM ( $3.9 \pm 0.5 \mu\text{g } 10^{-6} \text{ células}$ ), entre estos dos últimos no hubo diferencias significativas.



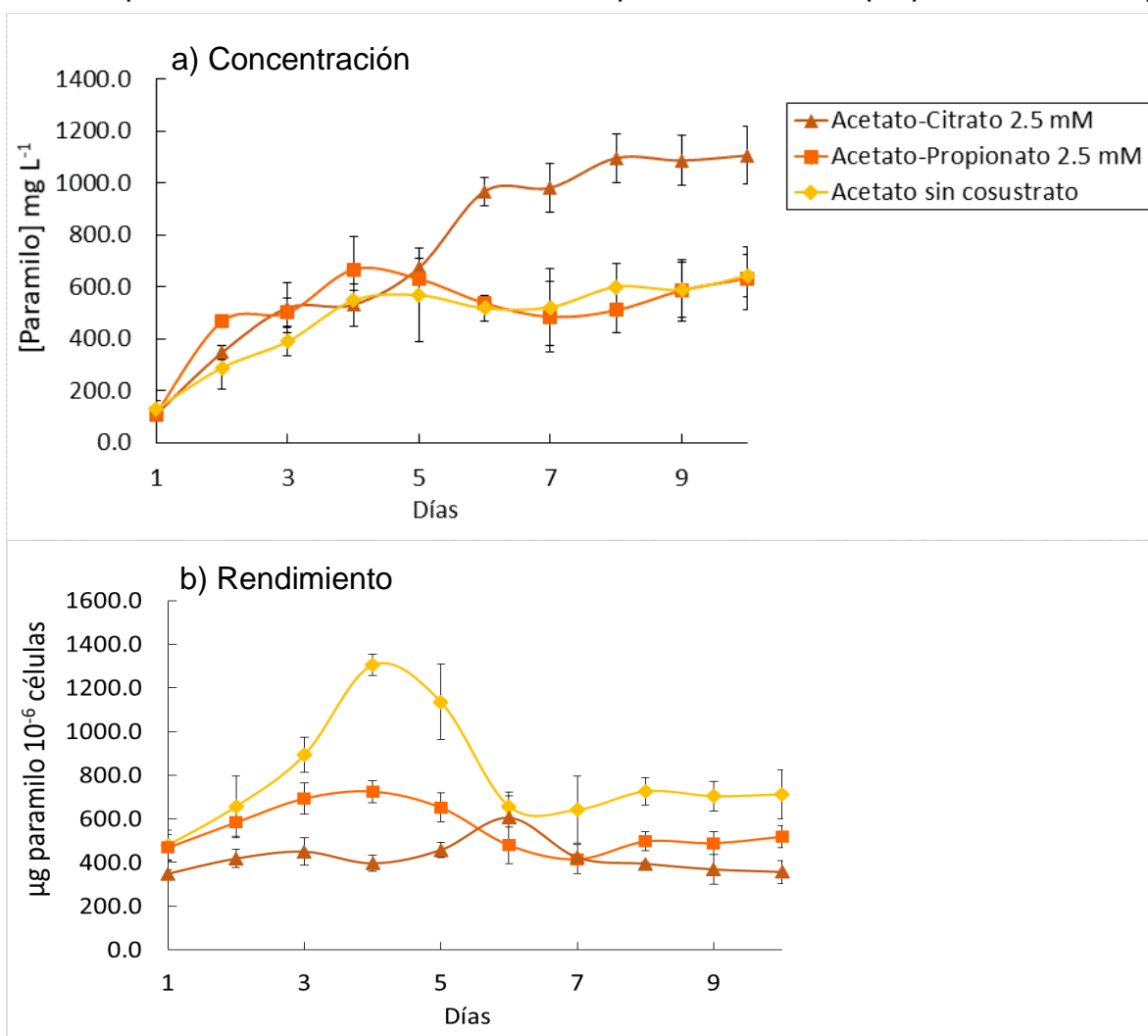
**Figura 12. Contenido diario de clorofila total en acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM. a) Concentración de clorofila total en mg L<sup>-1</sup> y b) rendimiento de clorofila total en µg 10<sup>-6</sup> células.**

### VI.2.3 Contenido diario de paramilo en la biomasa

La Figura 13a presenta las concentraciones diarias de paramilo durante los diez días de duración de los cultivos. Al inicio, los tres cultivos presentaron valores semejantes, pero al día seis, la concentración de acetato-citrato 2.5 mM incrementó respecto a los otros dos cultivos, lo cual coincidió con el máximo observado en la gráfica de rendimiento para clorofila total de este mismo tratamiento. Al décimo día y de acuerdo con el ANOVA de un criterio, la concentración de paramilo de acetato-citrato 2.5 mM fue significativamente mayor respecto de acetato-propionato 2.5 mM

y acetato sin cosustrato ( $p < 0.05$ ). Acetato-citrato 2.5 mM presentó el mayor valor significativo ( $1107.0 \pm 111.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) respecto de acetato sin cosustrato ( $643.7 \pm 79.7 \text{ mg L}^{-1}$ ) y acetato-propionato 2.5 mM ( $632.6 \pm 122.4 \text{ mg L}^{-1}$ ), mientras que entre estos dos últimos no hubo diferencias significativas.

En cuanto a los rendimientos diarios de paramilo, estos se presentan en la Figura 13b. Se observa que, durante los primeros seis días, acetato sin cosustrato presentó mayores valores, pero tras el día seis, el rendimiento de este cultivo disminuyó. De acuerdo con el ANOVA de un criterio, al décimo día, acetato-citrato 2.5 mM presentó el menor rendimiento respecto de acetato-propionato 2.5 mM y



**Figura 13. Contenido diario de paramilo en acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM. a) Concentración de paramilo en  $\text{mg L}^{-1}$  y b) rendimiento de paramilo en  $\mu\text{g } 10^{-6}$  células.**



acetato sin cosustrato. Acetato-citrato 2.5 mM presentó el menor valor significativo ( $357.1 \pm 51.6 \mu\text{g } 10^{-6}$  células); mientras que entre acetato sin cosustrato ( $712.2 \pm 111.5 \mu\text{g } 10^{-6}$  células) y acetato-propionato 2.5 mM ( $518.6 \pm 73.0 \mu\text{g } 10^{-6}$  células) no hubo diferencias significativas. Los detalles estadísticos de las ANOVAs de un criterio con las pruebas de Tukey para comparar las concentraciones y rendimiento de paramilo de la sexta resiembra se presentan en el Anexo 2.2.

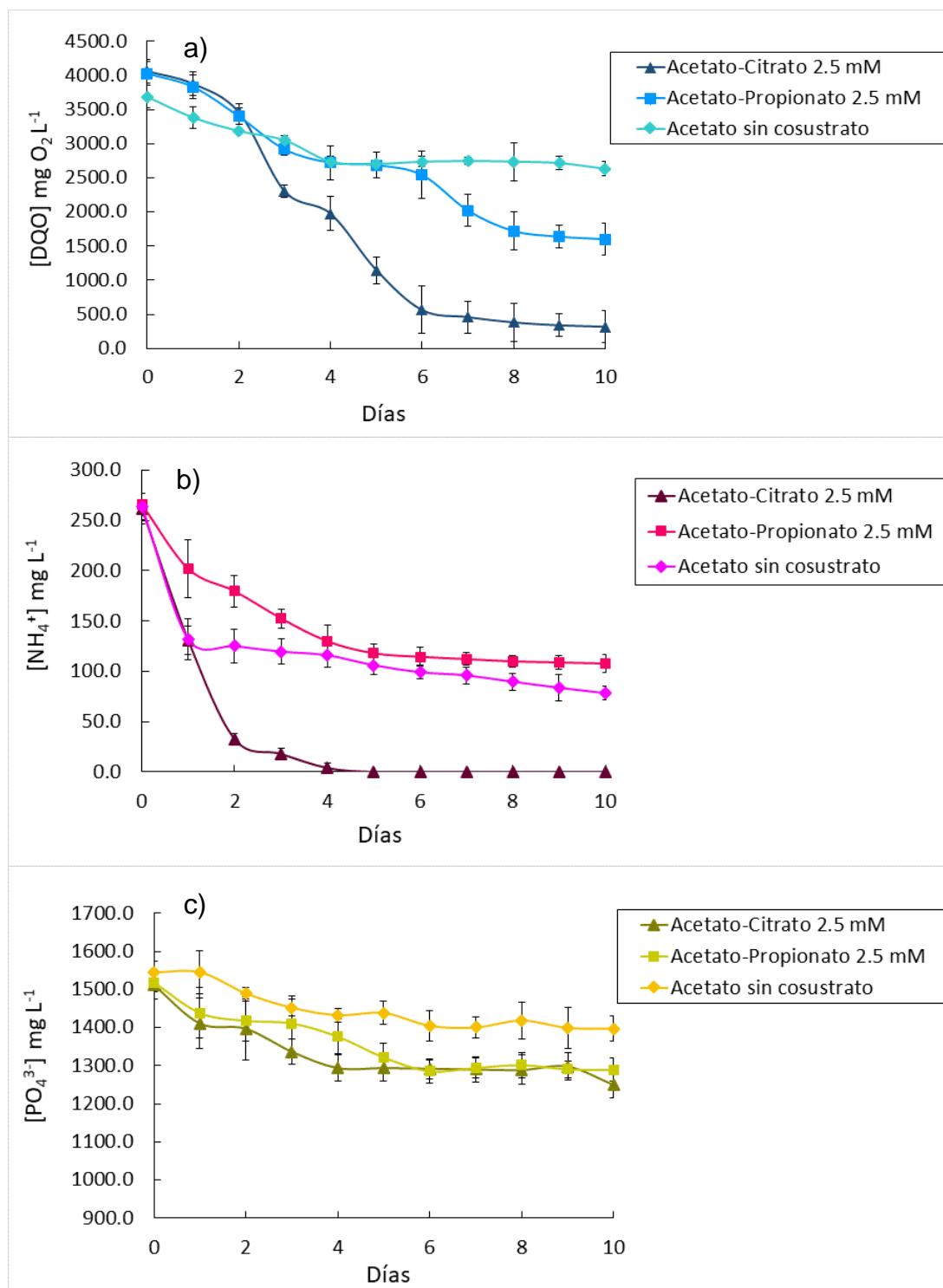
#### VI.2.4 Remoción de nutrimentos (DQO, $\text{NH}_4^+$ , $\text{PO}_4^{3-}$ ) y monitoreo de pH

La Figura 14 presenta las cinéticas de remoción de DQO,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , así como los cambios en pH durante los 10 días que duraron los cultivos. Esta información se complementa con los datos de la Tabla 9 donde se presentan los respectivos porcentajes de remoción. En la misma tabla, también se indican las cantidades iniciales y finales de estas variables.

La Figura 14a muestra que las cinéticas de remoción de DQO fueron similares en los primeros dos días para los tres tratamientos; pero al tercer día, la disminución fue muy marcada en acetato-citrato 2.5 mM respecto a los otros dos tratamientos. Al décimo día y de acuerdo con el ANOVA de un criterio, los porcentajes de remoción de los tres cultivos fueron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ), siendo acetato-citrato 2.5 mM el de mayor valor ( $92.1 \pm 9.0 \%$ ), seguido de acetato-propionato 2.5 mM ( $60.8 \pm 8.0 \%$ ) y, después, acetato sin cosustrato ( $28.5 \pm 4.0 \%$ ). Tanto el mayor porcentaje de remoción como la mayor cinética de remoción se observaron en acetato-citrato 2.5 mM.

Para amonio, la Figura 14b muestra las cinéticas de remoción para este sustrato. En acetato-citrato 2.5 mM, se observó que la mitad de la cantidad inicial de amonio se agotó en el día uno y, para el cuarto día, la remoción fue completa. En dicho cultivo, este abatimiento de amonio es previo al máximo en el contenido de clorofila total que se observó en el día seis. Este patrón no se observó en los otros dos cultivos. Al décimo día y de acuerdo con el ANOVA de un criterio, los porcentajes de remoción de amonio entre los tres cultivos fueron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ), siendo acetato-citrato 2.5 mM el de mayor valor (100 %),

seguido de acetato sin cosustrato ( $70.3 \pm 4.0 \%$ ) y, por último, acetato-propionato 2.5 mM ( $56.6 \pm 6.0 \%$ ).

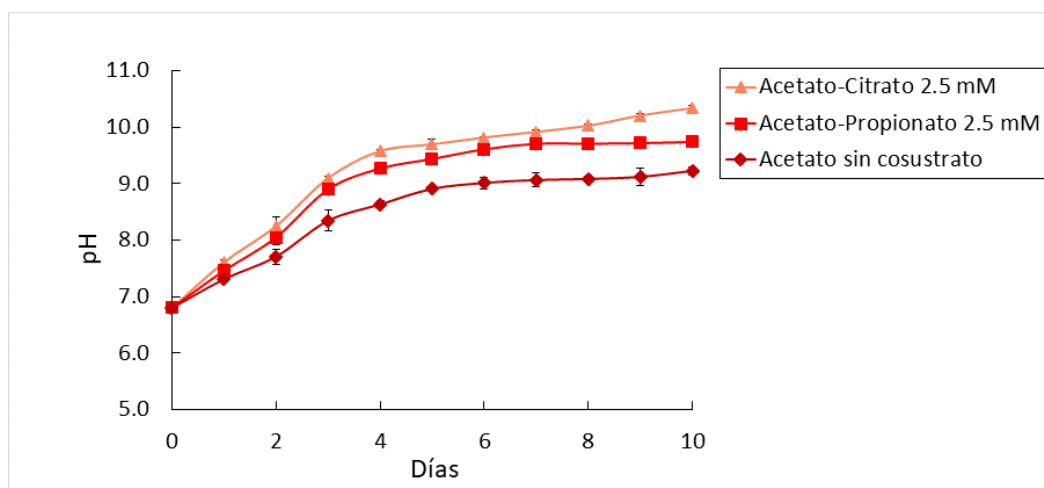


**Figura 14. Cinéticas de remoción de acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM. a) demanda química de oxígeno (DQO), b) amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y c) ortofosfatos (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>).**

En cuanto a los porcentajes de remoción de ortofosfatos, los valores fueron bajos en comparación con DQO y amonio (ver Tabla 9). Se obtuvieron valores de  $17.3 \pm 6.0 \%$ ,  $15.0 \pm 4.0 \%$  y  $10.0 \pm 4.0$  para acetato-citrato 2.5 mM, acetato-propionato 2.5 mM y acetato sin cosustrato, respectivamente. De acuerdo el ANOVA de un criterio, no hubo diferencias significativas entre los tres tratamientos ( $p > 0.05$ ).

Por su parte, la Figura 15 muestra el monitoreo diario de pH para los tres tratamientos. Todos los cultivos comenzaron a pH 6.8, de acuerdo con las especificaciones del medio Buetow. El comportamiento es similar en los tres tratamientos durante los 10 días de cultivo con un marcado aumento en los primeros cinco días. El cultivo con acetato-citrato 2.5 mM aumentó hasta un pH de  $10.3 \pm 0.04$ ; seguido del cultivo con acetato-propionato 2.5 mM hasta un pH de  $9.7 \pm 0.04$  y, en tercer lugar, acetato sin cosustrato hasta un pH de  $9.2 \pm 0.07$  (ver Tabla 9).

Los detalles de los análisis estadísticos sobre las ANOVAS de un criterio, así como las respectivas pruebas de Tukey, para los datos de DQO, amonio, ortofosfatos y pH de la sexta resiembra se presentan en el Anexo 2.3.



**Figura 15. Monitoreo diario de pH para los cultivos con acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM. Todos los cultivos comienzan con un pH de 6.8.**

**Tabla 9. Remoción de nutrimentos y cambio de pH en los cultivos con acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM.** Los valores son el promedio de tres mediciones diferentes. Todos los datos se obtuvieron tras 10 días de cultivo. Diferente letra indica diferencia estadística ( $p < 0.05$ ), mientras que la misma letra significa que no hay diferencia ( $p > 0.05$ ) de acuerdo con el ANOVA de un criterio y las respectivas pruebas de Tukey.

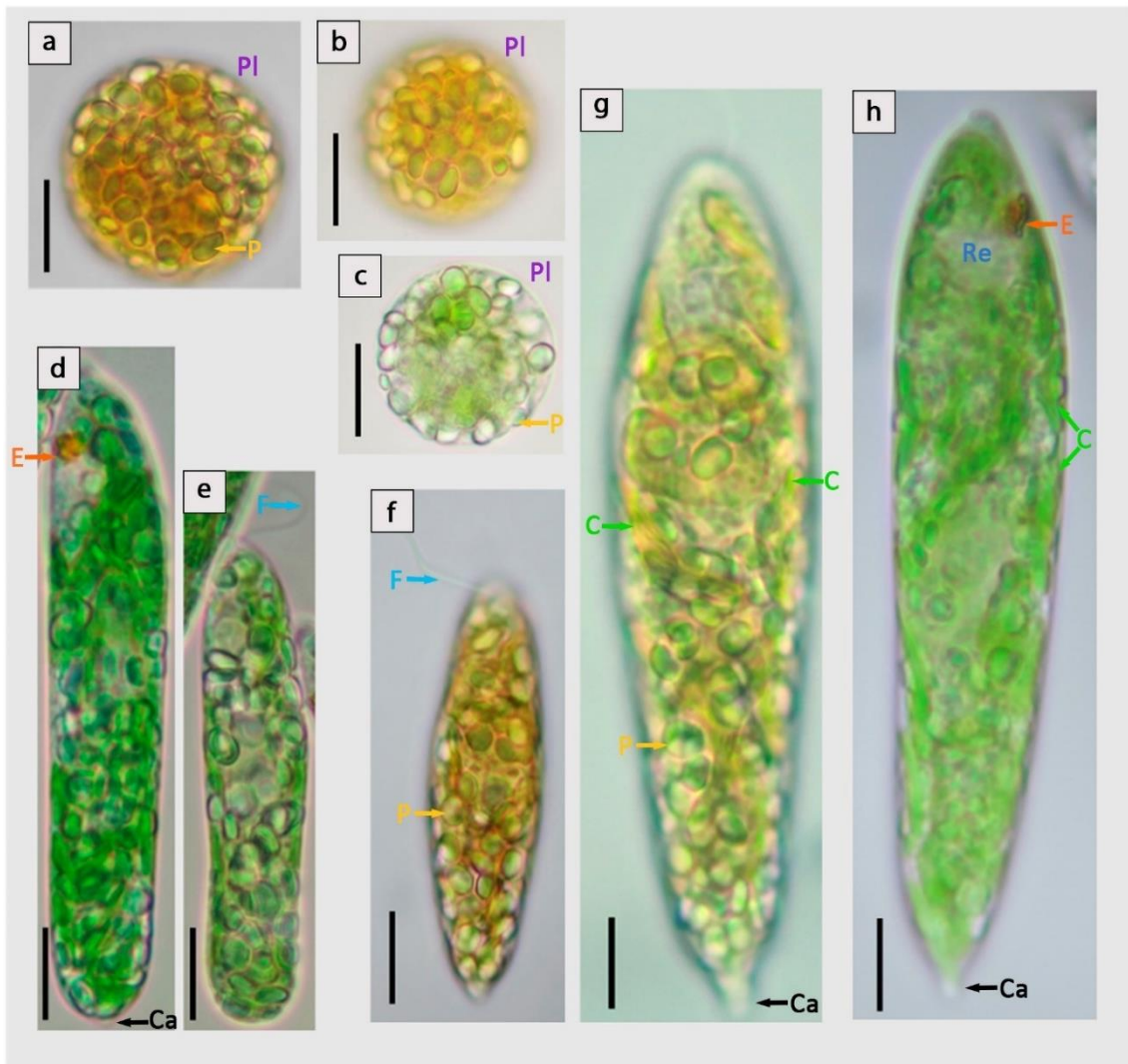
		Acetato sin cosustrato	Acetato-Propionato 2.5 mM	Acetato-Citrato 2.5 mM
DQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	Cantidad inicial	3685.4 ± 165.2	4027.2 ± 172.6	4062.2 ± 157.8
	Cantidad final	2633.3 ± 103.1	1601.3 ± 138.7	319.2 ± 16.4
	Remoción (mg L <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	103.4 ± 19.8 <sup>a</sup>	242.6 ± 44.6 <sup>b</sup>	374.3 ± 22.4 <sup>c</sup>
	Porcentaje de remoción (%)	28.5 ± 4.0 <sup>d</sup>	60.0 ± 8.0 <sup>e</sup>	92.1 ± 9.0 <sup>f</sup>
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Cantidad inicial	263.7 ± 13.0	265.7 ± 10.9	261.6 ± 15.0
	Cantidad final	78.4 ± 6.6	107.8 ± 8.6	0.00
	Remoción (mg L <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	18.5 ± 4.8 <sup>g</sup>	15.8 ± 2.5 <sup>g</sup>	26.2 ± 2.0 <sup>h</sup>
	Porcentaje de remoción (%)	70.3 ± 4.0 <sup>i</sup>	56.6 ± 6.0 <sup>j</sup>	100.0 ± 0.0 <sup>k</sup>
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Cantidad inicial	1544.6 ± 29.8	1518.3 ± 23.8	1511.4 ± 35.7
	Cantidad final	1396.8 ± 32.7	1288.9 ± 30.4	1249.5 ± 32.6
	Remoción (mg L <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	14.8 ± 6.0 <sup>l</sup>	23.0 ± 6.4 <sup>l</sup>	26.1 ± 8.6 <sup>l</sup>
	Porcentaje de remoción (%)	10.0 ± 4.0 <sup>m</sup>	15.0 ± 4.0 <sup>m</sup>	17.3 ± 6.0 <sup>m</sup>
pH	Cantidad inicial	6.8 ± 0.005	6.8 ± 0.005	6.8 ± 0.005
	Cantidad final	9.2 ± 0.07	9.7 ± 0.04	10.3 ± 0.04

#### VI.2.5 Morfología celular en acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM.

En la Figura 16, se presentan diferentes microfotografías con microscopía de contraste fases a 100x. Se distinguieron células flageladas libre nadadoras, que presentaron el característico movimiento de metabolia; así como los estados palmela sin flagelo y con morfología esférica. Ambos tipos celulares presentaron desarrollo de cloroplastos en los tres tratamientos.

Para resaltar la presencia de gránulos de paramilo se tiñó con lugol el citoplasma. De acuerdo con esta tinción, el paramilo se observó como gránulos discoidales incoloros o verde pálido y se presentaron en abundancia tanto en los estados palmela (Figuras 16a y 16c) como en las células flageladas (Figuras 16f y

16g). En el caso de las células flageladas, la acumulación de paramilo fue muy marcada hacia el extremo de la cauda (Figuras 16d y 16h).



**Figura 16. Morfología de *E. gracilis* en acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM.** Tinción con lugol de estado palmela en a) acetato-propionato y b) acetato sin cosustrato. Células sin teñir en acetato-citrato de c) estado palmela y d – e) flageladas. Tinción con lugol de células flageladas en f) acetato-citrato y g) acetato-propionato. h) Célula flagelada sin teñir en acetato sin cosustrato. Todas las microfotografías fueron obtenidas con objetivo de 100x. Barra de 10  $\mu$ m. (Ca) cauda, (C) cloroplastos, (E) estigma, (F) flagelos, (P) gránulos de paramilo, (PI) estado palmela, (Re) reservorio. Fotografías tomadas por el autor, Jorge Adrián Serrano.

La mayoría de las células flageladas presentaron una longitud de 40 a 55  $\mu$ m, pero con acetato-propionato 2.5 mM y acetato sin cosustrato se observaron células

que alcanzaron 60 a 77  $\mu\text{m}$  de longitud (Figuras 16g y 16h). Los estados palmela presentaron diámetros de 10 a 22  $\mu\text{m}$  (Figuras 16a, 16b y 16c). Otras estructuras características de las euglenas, como el estigma, el reservorio, los flagelos y la cauda también se indican en la Figura 16.

#### VI.2.6 Composición de la biomasa al décimo día.

La Figura 17 presenta la composición de la biomasa respecto al peso seco con base en las células cosechadas al décimo día de cultivo. Los promedios de los datos que se calcularon para peso seco, concentración y rendimiento, así como las respectivas ANOVAs de un factor y pruebas de Tukey se presentan en el Anexo 2.4.

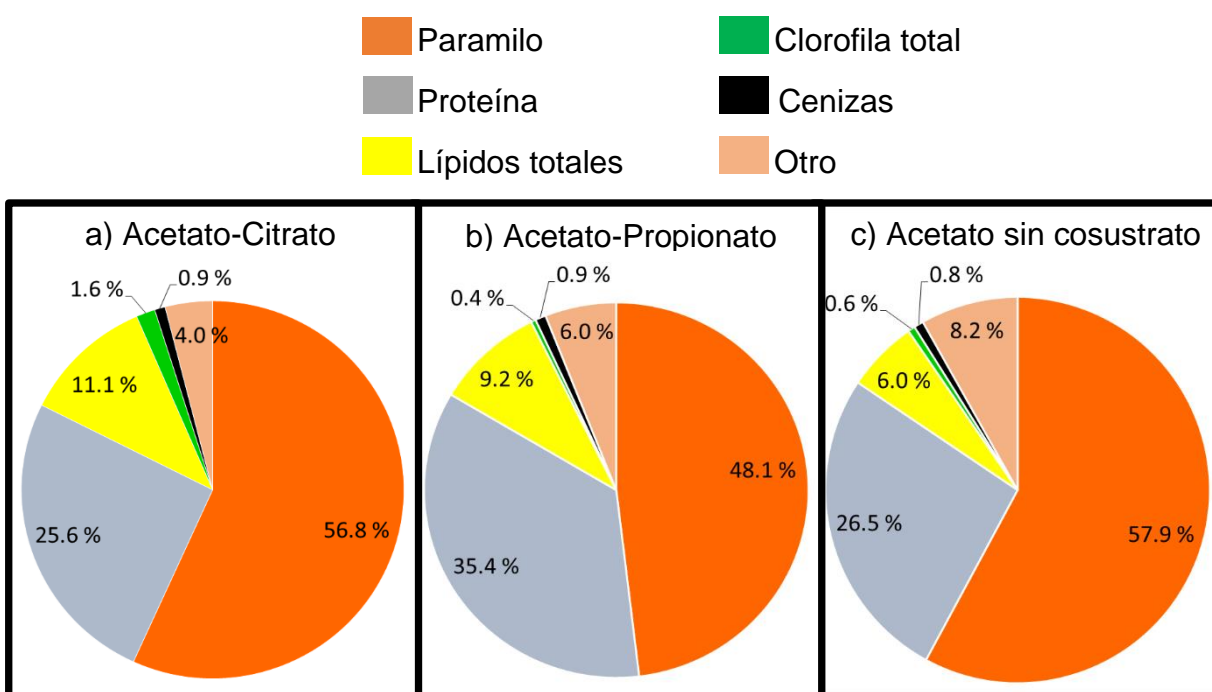
El paramilo fue el principal componente, llegando a representar casi la mitad o más de la biomasa seca. De acuerdo con el ANOVA de un criterio, no hubo diferencias significativas entre los porcentajes de paramilo de los tres cultivos ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, en términos de concentración, destacó acetato-citrato 2.5 mM ( $1107.0 \pm 111.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) cuyo valor fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) respecto de acetato sin cosustrato ( $643.7 \pm 79.7 \text{ mg L}^{-1}$ ) y acetato-propionato 2.5 mM ( $632.6 \pm 122.4 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Luego, la proteína fue el segundo componente principal, representando entre 25.6 a 35.4 % de la biomasa seca. De acuerdo con el ANOVA de un criterio, no hubo diferencias significativas entre los porcentajes de proteína de los tres cultivos ( $p > 0.05$ ). Juntos, paramilo y proteína, conforman más del 80 % de la biomasa en los tres tratamientos.

Por su parte, los lípidos totales representaron el tercer componente con valores entre 6.0 a 11.1 % del peso de la biomasa seca. De acuerdo con el ANOVA de un criterio, no hubo diferencias significativas entre los porcentajes de lípidos totales de los tres cultivos ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, al considerar la concentración, se encontró que acetato-citrato 2.5 mM ( $250.2 \pm 32.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) presentó un valor significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) respecto de acetato-propionato 2.5 mM ( $125.1 \pm 21.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) y acetato sin cosustrato ( $70.1 \pm 17.1 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Como cuarto componente de la biomasa en peso seco se presentó la clorofila total en los tres cultivos. En este caso, el ANOVA de un criterio mostró que acetato-citrato 2.5 mM presentó el mayor porcentaje significativo ( $p < 0.05$ ) con un valor de  $1.6 \pm 0.2$  %, seguido de acetato sin cosustrato con un valor de  $0.6 \pm 0.1$  % y de acetato-propionato 2.5 mM con  $0.4 \pm 0.1$  %. Entre estos últimos dos valores no hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

Finalmente, en el caso de las cenizas, se obtuvieron los menores porcentajes en peso seco, representado entre 0.8 y 0.9 %. De acuerdo con el ANOVA de un criterio, no hubo diferencias significativas entre los valores de estos porcentajes en los tres tratamientos ( $p < 0.05$ ).



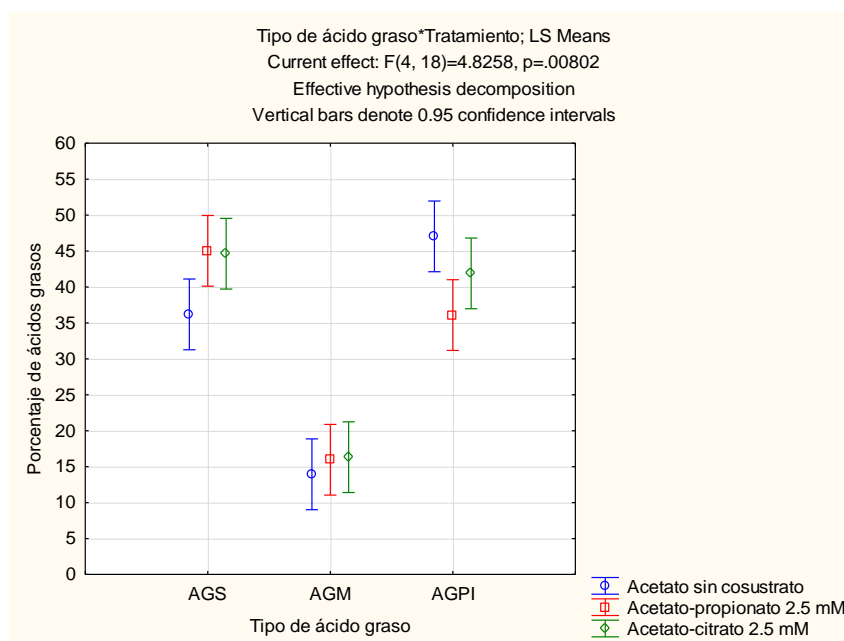
**Figura 17. Composición de la biomasa de *E. gracilis* con acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM.** Los porcentajes de paramilo, proteína, lípidos totales, clorofila total y cenizas son respecto al peso seco al décimo día de cultivo.

#### VI.2.7 Caracterización de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (EMAG)

En total, se identificaron 23 EMAG entre los tres tratamientos, de los cuales se brinda un listado con su respectiva nomenclatura y tiempos de retención en el Anexo 4, mientras que los respectivos cromatogramas se presentan en el Anexo 5. La

mayoría de los EMEAG insaturados corresponden a los isómeros cis, excepto el 18:1n-9 del cual se identificaron los isómeros cis y trans. Los 23 EMAG se agruparon en tres categorías dependiendo de su grado de insaturación: ácidos grasos saturados (AGS), ácidos grasos monoinsaturados (AGM) y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI).

De los AGS, se obtuvieron porcentajes totales de  $36.77 \pm 5.42$  % para acetato sin cosustrato,  $47.94 \pm 3.63$  % para acetato-propionato 2.5 mM y  $44.05 \pm 6.70$  % para acetato-citrato 2.5 mM. En cuanto a los AGM, los porcentajes obtenidos fueron  $16.19 \pm 1.51$  % para acetato sin cosustrato,  $15.96 \pm 2.23$  % para acetato-propionato 2.5 mM y  $14.06 \pm 3.01$  % para acetato-citrato 2.5 mM. Por su parte, de los AGPI se obtuvieron  $47.04 \pm 2.70$  % para acetato sin cosustrato,  $36.09 \pm 2.03$  % para acetato-propionato 2.5 mM y  $41.89 \pm 5.74$  para acetato-citrato 2.5 mM. De acuerdo en el ANOVA factorial, el porcentaje de AGM fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ) en los tres tratamientos respecto a los AGS y AGPI. Por su parte, entre estos dos tipos de ácidos grasos no hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Los promedios obtenidos por AGS, AGM y AGPI para cada cultivo se muestran en la Figura 18.



**Figura 18. Promedios de los porcentajes de EMAG en los tratamientos con acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM.** Los valores de AGM fueron significativamente menores que los de AGS y AGPI, mientras que entre estos dos últimos no hubo diferencias significativas.

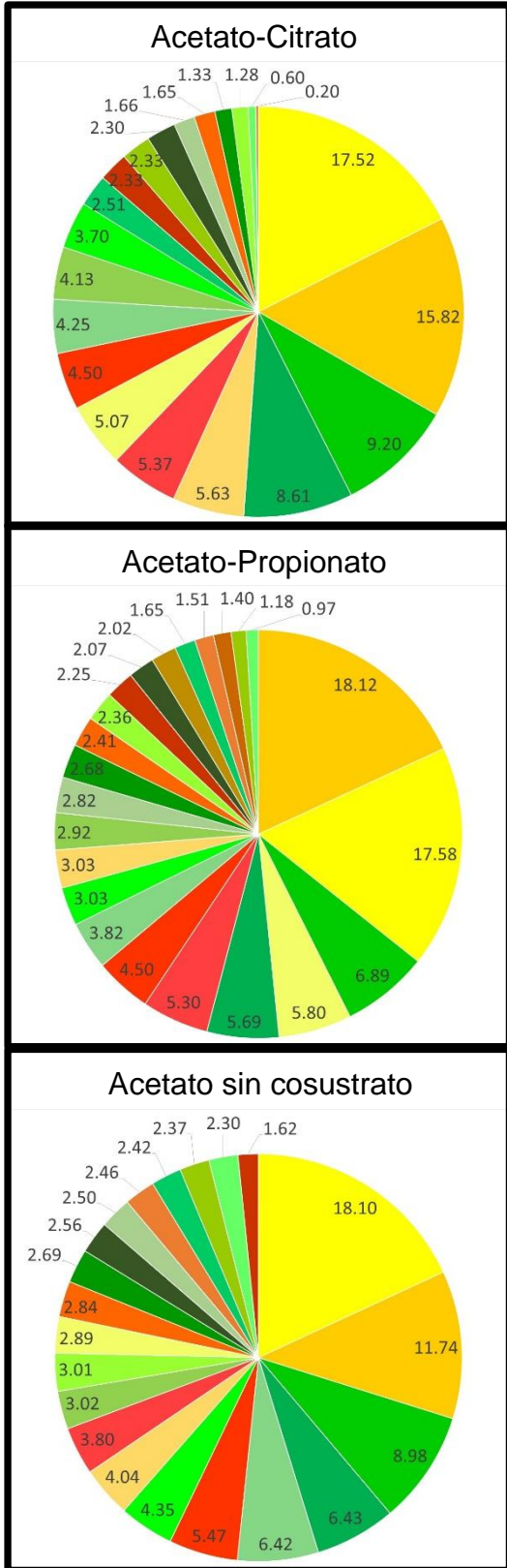


Otro patrón mostrado por el ANOVA factorial fue que, en los tres tratamientos, los EMAG con mayor porcentaje significativo ( $p < 0.05$ ) fueron, en orden descendente, 16:0, 14:0, 18:3n-3 y 18:2n-6. Por el contrario, los EMAG con menor porcentaje significativo ( $p > 0.05$ ) fueron, en orden descendente, 16:1n-7, 20:3n-6, 15:0 y 13:0.

Los porcentajes de abundancia de cada EMAG para los tres tratamientos se muestran en la Figura 19. Se encontraron cuatro AGS en acetato-citrato 2.5 mM y acetato sin cosustrato, 12:0, 14:0, 16:0 y 18:0; mientras que con acetato-propionato 2.5 mM también se encontraron estos mismos AGS y dos más de cadena impar, 13:0 y 15:0. Destacaron 14:0 y 16:0 por ser significativamente ( $p < 0.05$ ) los dos EMAG con mayor porcentaje de abundancia en cada uno de los tres tratamientos. El AGS 14:0 presentó  $11.74 \pm 2.99$  % en acetato sin cosustrato,  $18.12 \pm 1.23$  % en acetato-propionato 2.5 mM y  $15.82 \pm 4.56$  en acetato-citrato 2.5 mM, siendo acetato-propionato 2.5 mM significativamente mayor ( $p < 0.05$ ). Por su parte, el AGS 16:0 presentó valores de  $18.10 \pm 0.91$  % en acetato sin cosustrato,  $17.58 \pm 0.16$  % en acetato-propionato 2.5 mM y  $17.52 \pm 2.09$  % en acetato-citrato 2.5 mM, entre estos tres valores no hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

En cuanto a los AGM, los tres cultivos compartieron los siguientes cinco ácidos grasos, 16:1n-9, 16:1n-7, cis 18:1n-9, trans 18:1n-9 y 24:1n-9. De éstos, no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre los cultivos.

De los AGPI, se identificaron doce en cada uno de los tres tratamientos, 16:2n-6, 16:4n-3, 18:2n-6, 18:3n-3, 20:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-3, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:5n-6 y 22:6n-3. Destacaron 18:3n-3 y 18:2n-6 por ser los que se presentaron en tercer y cuarto lugar de abundancia significativa ( $p < 0.05$ ). El AGPI 18:3n-3 presentó valores de  $8.98 \pm 0.23$  % en acetato sin cosustrato,  $6.89 \pm 1.11$  % en acetato-propionato 2.5 mM y  $9.20 \pm 1.31$  % en acetato-citrato 2.5 mM; entre estos valores no hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). El AGPI 18:2n-6 presentó  $6.43 \pm 0.91$  % en acetato sin cosustrato,  $5.69 \pm 1.20$  % en acetato-propionato 2.5 mM y  $8.61 \pm 1.56$  % en acetato-citrato 2.5 mM; de los cuales no hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre cultivos.



- AGS**
- 12:0 (ácido láurico)
  - 13:0 (ácido tridecílico)
  - 14:0 (ácido mirístico)
  - 15:0 (ácido pentadecílico)
  - 16:0 (ácido palmítico)
  - 18:0 (ácido esteárico)
- AGM**
- 16:1n-9 (ácido palmitoleico)
  - 16:1n-7 (ácido cis-9-hexadecanoico)
  - cis 18:1n-9 (ácido oleico)
  - trans 18:1n-9 (ácido elaídico)
  - 24:1n-9 (ácido nervónico)
- AGPI**
- 16:2n-6 (ácido graso 16:2 $\omega$ -6)
  - 16:4n-3 (ácido graso 16:4 $\omega$ -3)
  - 18:2n-6 (ácido linoleico)
  - 18:3n-3 (ácido  $\alpha$ -linolénico)
  - 20:2n-6 (ácido graso 20:2 $\omega$ -6)
  - 20:3n-6 (ácido graso 20:3 $\omega$ -6)
  - 20:4n-6 (ácido araquidónico)
  - 20:4n-3 (ácido graso 20:4 $\omega$ -3)
  - 20:5n-3 (Ácido eicosapentaenoico)
  - 22:5n-6 (Ácido de Osbond)
  - 22:5n-3 (ácido graso 22:5 $\omega$ -3)
  - 22:6n-3 (Ácido docosahexaenoico)

**Figura 19. Composición relativa de EMAG en los tratamientos con acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM. El porcentaje de ácidos saturados (AGS), ácidos grasos monoinsaturados (AGM) y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) se presenta respecto al total de EMAG.**

De acuerdo con la Figura 19, en acetato sin cosustrato predominaron 16:0, 14:0, 18:3n-3, 18:2n-6 y 20:4n-6, que representaron 51.66 % del total. En acetato-propionato 2.5 mM predominaron 14:0, 16:0, 18:3n-3, 18:0 y 18:2n-6, correspondientes a 54.08 % del total. Por su parte, en acetato-citrato 2.5 mM predominaron 16:0, 14:0, 18:3n-3, 18:2n-6 y 12:0, correspondientes a 56.78 % del total.

El Anexo 2.5 presenta los resultados estadísticos de los ANOVAs factorial realizados, así como las respectivas pruebas de Tukey obtenidas de comparar los porcentajes de EMAG. También se brinda una tabla comparativa con los porcentajes de cada EMAG por tratamiento, así como una gráfica de barras donde se indican cuáles fueron los EMAG con mayor porcentaje significativo.

### **VI.3 Experimento de comparación entre fotoperíodo normal y anaerobiosis con oscuridad**

Se emplearon células ya aclimatadas en acetato-citrato 2.5 mM, ya que con este tratamiento se presentó mayor crecimiento, remoción de DQO y productividad de paramilo en el experimento anterior. Los cultivos se mantuvieron sin agitación por diez días en fotoperíodo normal de 12 horas iluminación y 12 horas oscuridad. Las condiciones de iluminación fueron  $80 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activos.

Para este tercer experimento, se emplearon 12 cultivos en total, los cuales se mantuvieron por 10 días bajo fotoperíodo normal, por ser el tiempo que los cultivos alcanzan la fase estacionaria de crecimiento. Posteriormente, a seis de estos cultivos, se les bombeó nitrógeno gaseoso (grado cromatográfico) como se describe en Materiales y métodos en la sección de Montaje de cultivos de *E. gracilis*. Tras el bombeo de nitrógeno, estos seis cultivos se envolvieron en papel aluminio y se mantuvieron en oscuridad de uno a cuatro días (adicionales a los diez días de fotoperíodo normal). Por lo tanto, el tiempo total que duraron estos cultivos fue de 11 días (10 en fotoperíodo normal y 1 en anaerobiosis-oscuridad) o de 14 días (10 en fotoperíodo normal y 4 en anaerobiosis-oscuridad).

Para analizar si la combinación de anaerobiosis-oscuridad tuvo efecto sobre la composición de la biomasa, se tomaron células de seis cultivos que tuvieron una duración de 11 días, tres de ellos con 10 días de fotoperíodo normal y 1 día en anaerobiosis-oscuridad; y como control se tomaron otros tres cultivos en 11 días bajo fotoperíodo normal. Posteriormente, se analizaron otros seis cultivos con una duración de 14 días, tres de ellos con 10 días de fotoperíodo normal y 4 días de anaerobiosis-oscuridad, y como control se tomaron otros tres cultivos en 14 días bajo fotoperíodo normal.

### VI.3.1 Efecto de la anaerobiosis en los contenidos de paramilo y lípidos totales

La Figura 20 muestra el efecto de la anaerobiosis en la composición de la biomasa seca respecto a los cultivos que duraron 11 y 14 días. Los promedios de los datos que se calcularon para peso seco, concentración y rendimiento, así como las correspondientes ANOVAs de dos factores y pruebas de Tukey se presentan en el Anexo 3.1. De manera complementaria, en la Tabla 10 se presenta el crecimiento celular, porcentaje de estados palmela, así como los contenidos de paramilo y lípidos totales.

**Tabla 10. Efecto de la anaerobiosis y oscuridad en la concentración celular, porcentaje de estados palmela, contenido de paramilo y contenido de lípidos totales.** Los resultados se presentan de acuerdo con un ANOVA de dos factores y las respectivas pruebas de Tukey. Diferente letra indica diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) respecto al efecto de la anaerobiosis, misma letra significa que no hay diferencia ( $p > 0.05$ ). Diferente número indica diferencia estadística respecto al tiempo de cultivo ( $p < 0.05$ ) y mismo número indica que no hay diferencia ( $p < 0.05$ ).

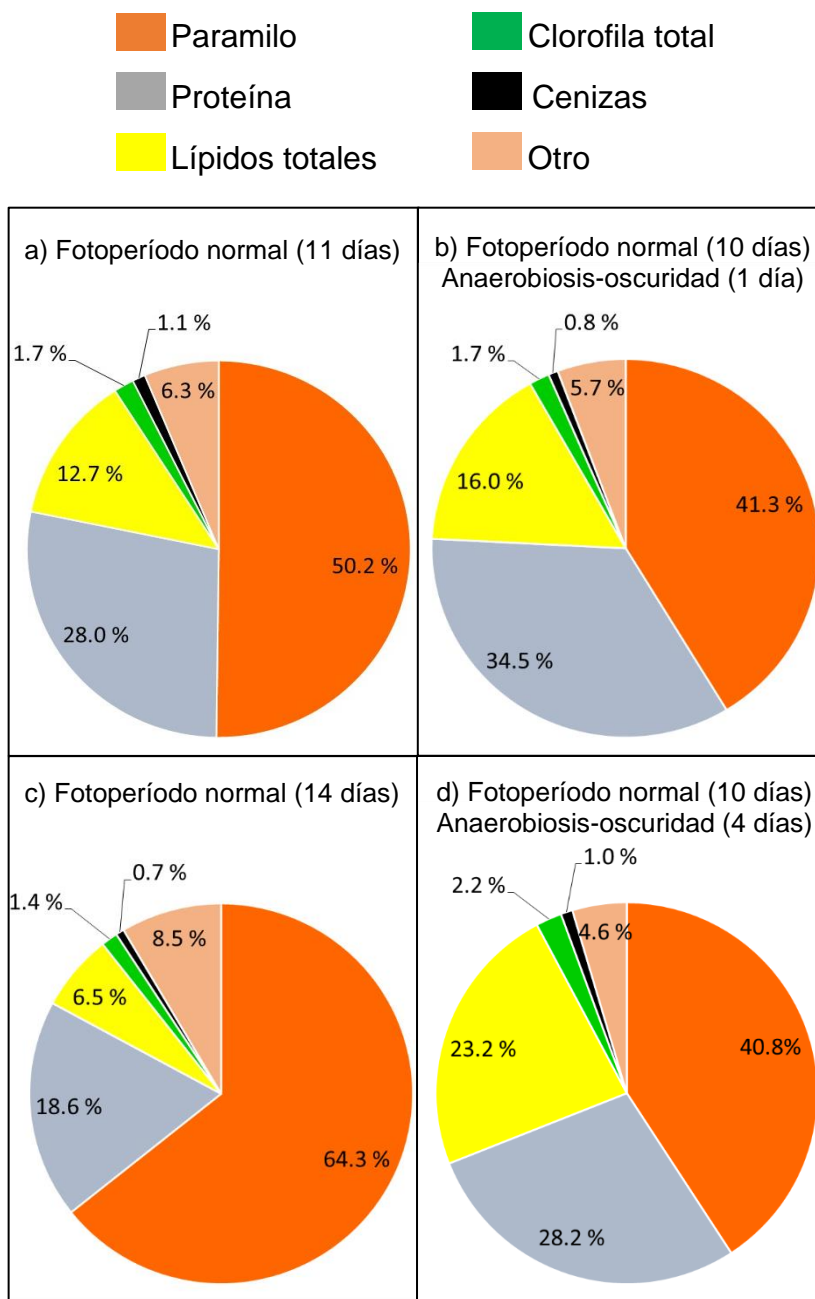
		Sin anaerobiosis	Con anaerobiosis
Concentración celular	$10^6$ células $\text{mL}^{-1}$ (11 días)	$2.9 \pm 0.2^{\text{a1}}$	$2.8 \pm 0.4^{\text{a1}}$
	$10^6$ células $\text{mL}^{-1}$ (14 días)	$3.4 \pm 0.2^{\text{b1}}$	$2.9 \pm 0.3^{\text{b1}}$
Estados palmela	porcentaje (11 días)	$2.3 \pm 0.7^{\text{c2}}$	$3.3 \pm 0.9^{\text{c2}}$
	porcentaje (14 días)	$8.8 \pm 2.1^{\text{d3}}$	$18.1 \pm 3.7^{\text{e3}}$
Concentración de paramilo	$\mu\text{g mL}^{-1}$ (11 días)	$956.0 \pm 102.6^{\text{e4}}$	$754.0 \pm 93.6^{\text{e4}}$
	$\mu\text{g mL}^{-1}$ (14 días)	$1646.8 \pm 219.0^{\text{f5}}$	$519.3 \pm 53.7^{\text{g4}}$
Rendimiento de paramilo	$\mu\text{g } 10^{-6}$ células (11 días)	$328.1 \pm 54.4^{\text{h6}}$	$271.9 \pm 33.4^{\text{h6}}$
	$\mu\text{g } 10^{-6}$ células (14 días)	$481.5 \pm 39.9^{\text{i7}}$	$188.1 \pm 16.0^{\text{j6}}$
Concentración de lípidos totales	$\mu\text{g mL}^{-1}$ (11 días)	$243.6 \pm 35.9^{\text{j8}}$	$292.9 \pm 72.2^{\text{k8}}$
	$\mu\text{g mL}^{-1}$ (14 días)	$165.1 \pm 23.65^{\text{k8}}$	$296.3 \pm 24.0^{\text{k8}}$
Rendimiento de lípidos totales	$\mu\text{g } 10^{-6}$ células (11 días)	$83.4 \pm 14.8^{\text{l9}}$	$106.2 \pm 15.5^{\text{l9}}$
	$\mu\text{g } 10^{-6}$ células (14 días)	$48.5 \pm 10.1^{\text{m1}}$	$101.7 \pm 9.4^{\text{m9}}$

En cuanto al crecimiento celular, el ANOVA de dos factores mostró que no hubo diferencias significativas entre los cuatro cultivos ( $p > 0.05$ ), es decir, ni el tiempo ni la anaerobiosis-oscuridad causaron un efecto significativo. En general, todos los cultivos presentaron un crecimiento cercano a  $3.0 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ , siendo el cultivo con 14 días de fotoperíodo normal el de mayor valor ( $3.4 \pm 0.2 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ), aunque no fue estadísticamente diferente de los otros valores (ver Tabla 10).

En cuanto al porcentaje de estados palmela, no se presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los cultivos con duración de 11 días en fotoperíodo normal ( $2.3 \pm 0.7\%$ ) y en anaerobiosis-oscuridad ( $2.8 \pm 0.4\%$ ). Sin embargo, sí hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los cultivos en fotoperíodo normal de 11 días ( $2.3 \pm 0.7\%$ ) y 14 días ( $8.8 \pm 2.1\%$ ), así como entre los cultivos en anaerobiosis-oscuridad de 11 días ( $3.3 \pm 0.9\%$ ) y 14 días ( $18.1 \pm 3.7\%$ ), siendo este último el cultivo con mayor porcentaje significativo ( $p < 0.05$ ). Es decir, la anaerobiosis-oscuridad provocó un incremento significativo en el porcentaje de estados palmela al aumentar los días de cultivo.

En cuanto a la composición de la biomasa en peso seco, el paramilo fue el componente mayoritario en todos los tratamientos, con valores de  $40.8 \pm 5.0$  a  $64.3 \pm 6.2\%$ . Si bien el porcentaje de paramilo disminuyó entre los cultivos con 11 días en fotoperíodo normal ( $50.2 \pm 7.5\%$ ) y anaerobiosis-oscuridad ( $41.3 \pm 3.1\%$ ), esta diferencia no fue significativa ( $p > 0.05$ ) de acuerdo con el ANOVA de dos criterios. En el caso de los cultivos con 14 días de duración, sí se presentó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) entre los cultivos con fotoperíodo normal ( $64.3 \pm 6.2\%$ ) y anaerobiosis-oscuridad ( $40.8 \pm 5.0\%$ ). Además, también se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los cultivos con fotoperíodo normal de 11 días ( $50.2 \pm 7.5\%$ ) y 14 días ( $64.3 \pm 6.2\%$ ), este último cultivo presentó el mayor porcentaje significativo y alcanzó una concentración de  $1646.8 \pm 219.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de paramilo y un rendimiento de  $481.5 \pm 39.9 \mu\text{g } 10^{-6}$  células. Esto significa que la anaerobiosis-oscuridad provocó una disminución significativa respecto al tiempo en el contenido de paramilo. Además, el mayor porcentaje de paramilo en peso seco con 14 días

de fotoperíodo normal ( $64.3 \pm 6.2 \%$ ) concuerda con los mayores valores obtenidos de concentración ( $1646.8 \pm 219.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y rendimiento ( $481.5 \pm 39.9 \mu\text{g } 10^{-6}$  células).



**Figura 20. Efecto de la anaerobiosis en la biomasa de *E. gracilis*.** Todos los cultivos se realizaron con acetato-citrato 2.5 mM. Los porcentajes de paramilo, proteína, lípidos totales, clorofila total y cenizas son respecto al peso seco a los 11 o 14 días de cultivo.

Respecto a lípidos totales, en general, se obtuvieron porcentajes de peso seco entre  $6.5 \pm 0.2 \%$  y  $23.2 \pm 5.73 \%$ . En los cultivos con 11 días de fotoperíodo normal ( $12.7 \pm 3.3 \%$ ) y anaerobiosis-oscuridad ( $16.0 \pm 3.5 \%$ ) hubo un incremento en el porcentaje de peso seco, pero de acuerdo con el ANOVA de dos criterios, no fue significativo ( $p > 0.05$ ). Por su parte, entre los cultivos con 14 días de fotoperíodo normal ( $6.5 \pm 0.2 \%$ ) y anaerobiosis-oscuridad ( $23.2 \pm 5.7 \%$ ) sí hubo un incremento significativo ( $p < 0.05$ ). Si bien el cultivo con duración de 14 días al que se aplicó anaerobiosis-oscuridad presentó mayor porcentaje significativo en peso seco ( $23.2 \pm 5.7 \%$ ) de lípidos totales, esto no se vio reflejado en las concentraciones, pues presentó  $296.3 \pm 24.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , valor que no fue significativamente diferente del cultivo con 11 días de fotoperíodo normal ( $243.6 \pm 35.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y anaerobiosis-oscuridad ( $292.9 \pm 72.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). En términos de rendimiento, tampoco hubo diferencias significativas, pues el valor del cultivo con 14 días al que se aplicó anaerobiosis-oscuridad ( $101.7 \pm 9.4 \mu\text{g } 10^{-6} \text{ células}$ ) no fue significativamente diferente del cultivo con 11 días de fotoperíodo normal ( $83.4 \pm 14.8 \mu\text{g } 10^{-6} \text{ células}$ ) no del cultivo con anaerobiosis-oscuridad ( $106.2 \pm 15.5 \mu\text{g } 10^{-6} \text{ células}$ ). Esto significa que, si bien la anaerobiosis-oscuridad provocó un incremento significativo del porcentaje en peso seco de lípidos totales, esto no se vio reflejado ni en la concentración ni en el rendimiento.

### VI.3.2 Efecto de la anaerobiosis en el perfil de EMAG

En los cuatro cultivos empleados en este experimento, se encontraron los 23 EMAG caracterizados previamente. Los análisis estadísticos obtenidos del ANOVA factorial se presentan en el Anexo 3.2 y los cromatogramas, en el Anexo 5.

En general, los AGS predominaron en los cultivos donde se aplicó anaerobiosis-oscuridad con valores de  $63.09 \pm 11.05 \%$  en el cultivo con 11 días y  $61.76 \pm 7.71 \%$  en el cultivo con 14 días, siendo ambos porcentajes los de mayor valor significativo ( $p < 0.05$ ). Por el contrario, el porcentaje de AGS fue menor en los cultivos con fotoperíodo normal, pues se presentaron valores de  $54.49 \pm 11.61 \%$  en el cultivo de 11 días y  $32.81 \pm 5.96 \%$  en el cultivo de 14 días, siendo este último el porcentaje de menor valor significativo ( $p < 0.05$ ). De los seis AGS encontrados,

destacaron dos por tener los mayores porcentajes significativos, 14:0 y 16:0. De todos los EMAG, solamente estos dos AGS conforman  $43.19 \pm 9.22$  % en el cultivo de 11 días de fotoperíodo normal,  $50.49 \pm 8.99$  % en el cultivo de 11 días con anaerobiosis-oscuridad,  $25.67 \pm 4.68$  % en el cultivo de 14 días de fotoperíodo normal y  $45.43 \pm 4.63$  % en el cultivo de 14 días con anaerobiosis-oscuridad.

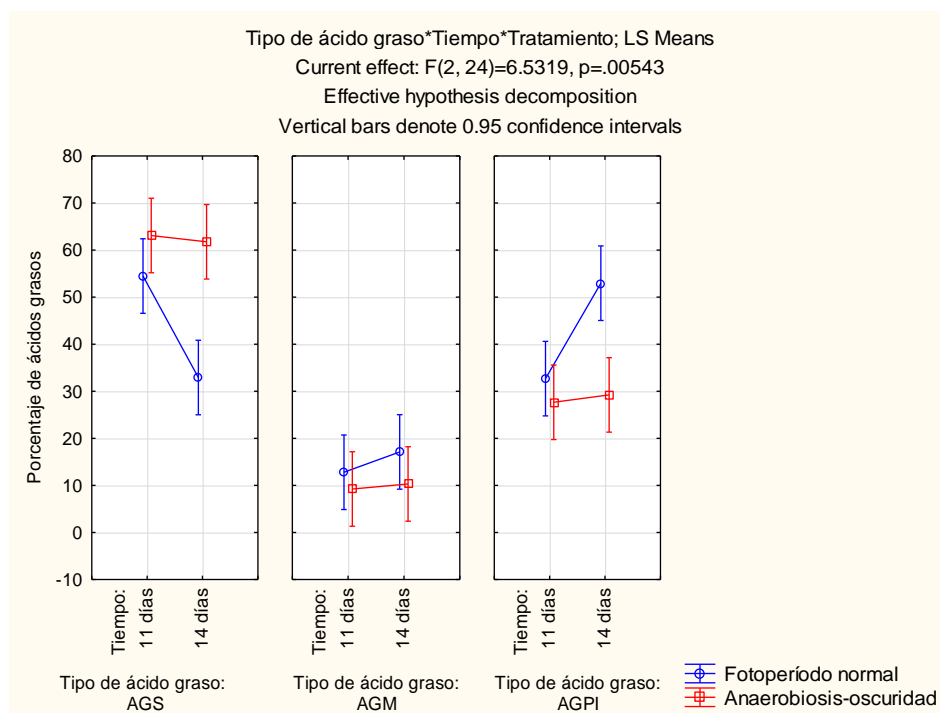
Por su parte, los AGPI presentaron porcentajes significativamente menores ( $p < 0.05$ ) en el cultivo de 11 días con anaerobiosis-oscuridad,  $27.67 \pm 8.51$  %, así como en el cultivo de 14 días con anaerobiosis-oscuridad,  $27.93 \pm 6.09$  %. Por el contrario, los porcentajes de AGPI incrementaron en los cultivos con fotoperíodo normal, con valores de  $32.70 \pm 8.25$  % en el cultivo de 11 días y  $50.09 \pm 2.78$  % en el cultivo de 14 días, siendo este último el mayor porcentaje significativo ( $p < 0.05$ ). De los 12 AGPI identificados, destacaron 18:2n-6 y 18:3n-6 por presentar los mayores porcentajes significativos. Del total de EMAG, estos dos por sí solos representaron  $13.23 \pm 2.65$  % en el cultivo de 11 días de fotoperíodo normal,  $10.68 \pm 3.18$  % en el cultivo de 11 días con anaerobiosis-oscuridad,  $21.12 \pm 4.5$  % en el cultivo de 14 días de fotoperíodo normal y  $10.76 \pm 2.01$  % en el cultivo de 14 días con anaerobiosis-oscuridad.

Los AGM representaron el menor componente de EMAG. En los cultivos con anaerobiosis-oscuridad presentaron  $9.24 \pm 2.54$  % a los 11 días y  $10.31 \pm 2.62$  % a los 14 días. En cuanto a los cultivos con fotoperíodo normal, se presentaron valores de  $12.81 \pm 3.36$  % a los 11 días y  $17.11 \pm 1.20$  % a los 14 días, siendo este último el mayor porcentaje de AGM que se obtuvo. Sin embargo, el ANOVA factorial mostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los porcentajes de AGM ( $p > 0.05$ ).

La Figura 21 muestra los cambios en los porcentajes de AGS, AGM y AGPI de acuerdo con el tiempo (11 y 14 días) respecto al fotoperíodo normal y anaerobiosis-oscuridad. Para los cultivos en fotoperíodo normal se muestra que, de 11 a 14 días, el porcentaje de AGS disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ); por el contrario, el porcentaje de AGPI incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ); mientras que el valor de AGM no tuvo cambios significativos ( $p > 0.05$ ). En cuanto a los

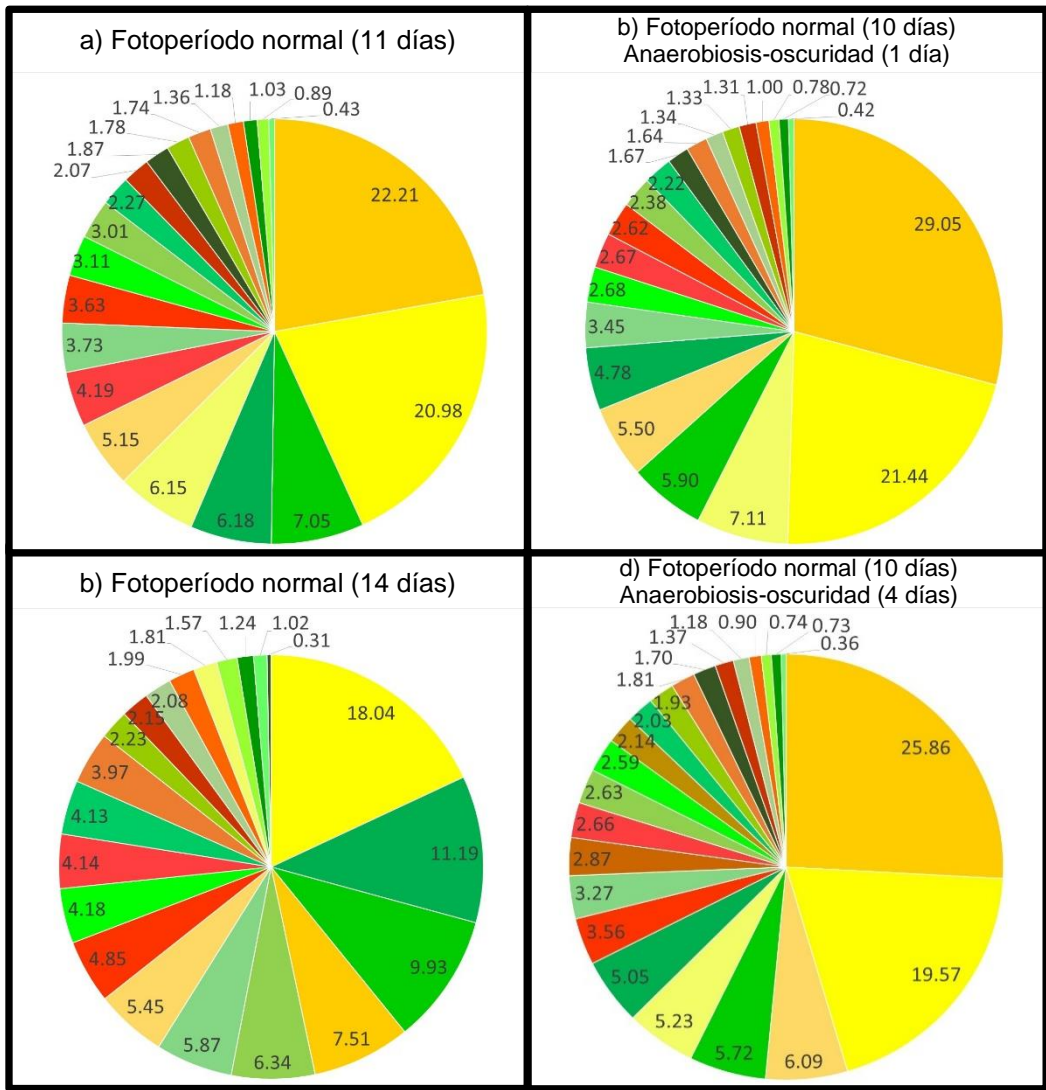
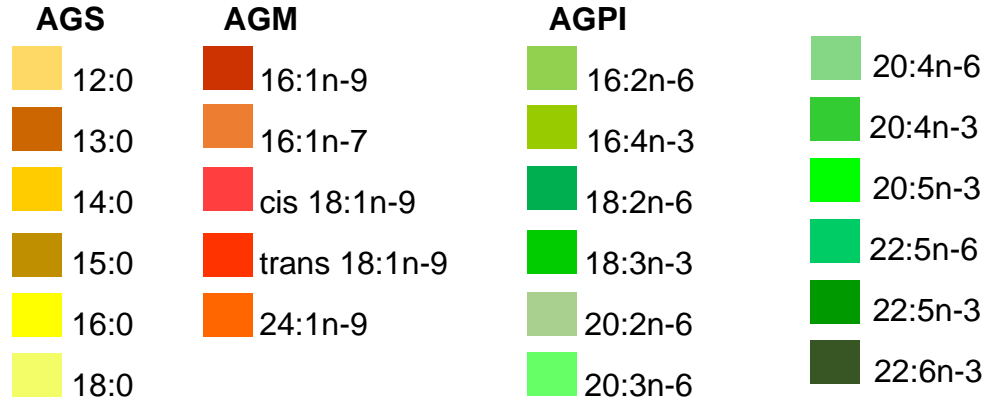


cultivos en anaerobiosis-oscuridad, se observa que ni AGS ni AGPI ni AGM presentaron cambios significativos respecto al tiempo ( $p > 0.05$ ), esto también concuerda con los valores observados de concentración y rendimiento de lípidos totales, en los cuales tampoco se identificaron cambios significativos bajo esta condición experimental.



**Figura 21. Porcentajes de EMAG en los tratamientos en fotoperíodo normal y anaerobiosis-oscuridad.** Se comparan los porcentajes de AGS, AGM y AGPI por tiempo (11 y 14 días).

La Figura 22 presenta el orden relativo EMAG en cada tratamiento. En el cultivo de 11 días con anaerobiosis-oscuridad, los EMAG más abundantes fueron 14:0, 16:0 y 18:0, conformando 57.59 % del total; mientras que, en el cultivo de 11 días de fotoperíodo normal, los EMAG más abundantes fueron 14:0, 16:0, 18:3n-3 y 18:2n-6, conformando 56.42 % del total. Por su parte, en el cultivo de 14 días con anaerobiosis-oscuridad, los EMAG con mayores porcentajes fueron, 14:0, 16:0 y 12:0, conformando 51.52 %; en tanto que en el cultivo de 14 días de fotoperíodo normal los EMAG más abundantes fueron 16:0, 18:2n-6, 18:3n-3, 14:0 y 16:2n-2, conformando 53.02 % del total.



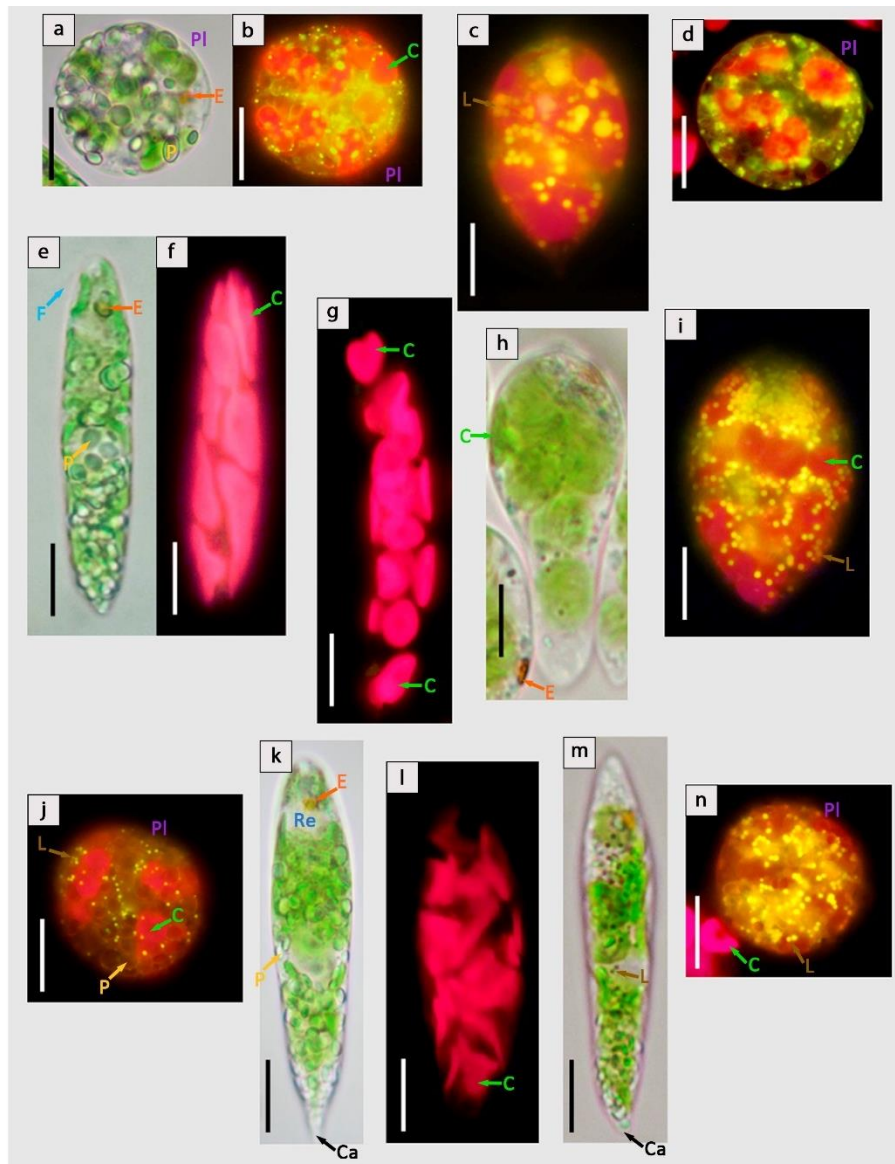
**Figura 22. Efecto de la anaerobiosis-oscuridad en la composición relativa de EMAG.** El porcentaje de ácidos saturados (AGS), ácidos grasos monoinsaturados (AGM) y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) se presenta respecto al total de EMAG.

### VI.3.3 Morfología celular bajo anaerobiosis y fotoperíodo normal en acetato-citrato

En la Figura 23, se presentan diferentes microfotografías de las células cultivadas en fotoperíodo normal y anaerobiosis-oscuridad con microscopia de contraste de fases y epifluorescencia teñidas con rojo Nilo. La presencia de lípidos se muestra como pequeños gránulos amarillos teñidos por el rojo Nilo bajo microscopia de epifluorescencia. También se observa con detalle la morfología de los cloroplastos debido a la fluorescencia de clorofila, que se presentan de color rosa.

Los cultivos en 11 días de fotoperíodo normal se caracterizaron por presentar células flageladas con pocos gránulos de lípidos o carecer de ellos (Figuras 23e-f); así como estados palmela también con varios gránulos de lípidos (Figuras 23a-b y 23e-f); los cloroplastos de las células flageladas presentaron una morfología distendida (Figura 23f); pero los estados palmela presentaron cloroplastos con morfología globular (Figura 23a). Por su parte, en los cultivos en los cuales se aplicó la anaerobiosis-oscuridad al décimo día (y se dejaron un día bajo esta condición), se observaron tanto células flageladas como estados palmela con varios gránulos de lípidos (Figuras 23c-d); no obstante, también se presentaron células flageladas donde no se observaron (Figura 23g); bajo esta condición, los cloroplastos se caracterizaron por presentar forma globular (Figura 23b).

Los cultivos en 14 días de fotoperíodo normal presentaron células flageladas sin gránulos de lípidos, cloroplastos distendidos (Figura 23l), así como varios gránulos de paramilo en la cauda (Figura 23k); sin embargo, también se presentaron algunos estados palmela con escasos gránulos de lípidos y abundante presencia de paramilo (Figura 23j). En cuanto a los cultivos en los que se aplicó anaerobiosis-oscuridad (y se dejaron cuatro días bajo esta condición), se observaron células flageladas (Figuras 23h-i) y estados palmela (Figura 23n-m) con varios gránulos de lípidos y cloroplastos con morfología globular (Figura 23h); la disminución de paramilo fue notoria en la cauda (Figura 23h y 23m).



**Figura 23. Efecto de la anaerobiosis-oscuridad en la morfología de *E. gracilis*.** 11 días (fotoperíodo normal): estado palmela con a) cloroplastos globulares, abundante paramilo y b) algunos gránulos de lípidos; célula flagelada e) con abundante paramilo y cloroplastos distendidos f). 11 días (anaerobiosis-oscuridad) células flageladas con c) y sin g) gránulos de lípidos, pero ambas con cloroplastos globulares; estado palmela con d) gránulos de lípidos y cloroplastos globulares. 14 días (fotoperíodo normal) estado palmela j) con varios gránulos de paramilo y algunos de lípidos; células flageladas k) con varios gránulos de paramilo y 23i) sin gránulos de lípidos y cloroplastos distendidos. 14 días (anaerobiosis-oscuridad): células flageladas h) y m) con escaso paramilo y i) varios gránulos de lípidos; estado palmela n) con varios gránulos de lípidos. Todas las microfotografías se tomaron con objetivo de 100x. Barra de 10  $\mu\text{m}$ . (Ca) cauda, (C) cloroplastos, (E) estigma, (F) flagelos, (P) gránulos de paramilo, (PI) estados palmela, (L) gránulos de lípidos y (Re) reservorio. Fotografías tomadas por el autor, Jorge Adrián Serrano.

## VII. Discusión

### VII.1 Interpretación para los resultados del experimento de aclimatación a los cultivos con acetato-citrato

Este experimento mostró que la combinación de sustratos acetato-citrato estimuló significativamente el crecimiento celular, así como los rendimientos de clorofila total y paramilo respecto al cultivo que sólo tuvo acetato.

En comparación con otros trabajos que emplean el medio Buetow, es notable la diferencia en concentración celular. Por ejemplo, Ruiz *et al.* (2004), Rocchetta *et al.* (2012) y Tolivia (2014) reportaron concentraciones celulares de *E. gracilis* por debajo de  $0.5 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> para cultivos autótrofos y heterótrofos. Sin embargo, con las condiciones de cultivo establecidas en esta investigación, se mostró que las concentraciones celulares superaron el millón de células por mililitro en la segunda resiembra y, para la cuarta resiembra, superaron los dos millones de células por mililitro. Sin citrato, el crecimiento se mantuvo en medio millón de células por mililitro (ver Figuras 8 y 9).

Otro aspecto que mostraron los cultivos con acetato-citrato fue que las células se repusieron de la clorosis observada al comenzar a sembrar en medio Buetow modificado, superando 10 µg de clorofila total por millón de células tanto en la segunda y como en la cuarta resiembra, mientras que sólo con acetato se obtuvieron valores menores de 3 µg y 1 µg de clorofila total por millón de células, respectivamente (ver Figura 10a).

Para *E. gracilis* está reportado que la síntesis de clorofila y el desarrollo de cloroplastos son inhibidos al emplear sustratos orgánicos como acetato, glucosa o lactato (Schwelitz *et al.*, 1978; Vannini, 1983; Regnault *et al.*, 1990). Así que, bajo las condiciones de cultivo del medio Buetow modificado, la capacidad de sintetizar clorofila pudo deberse a la sinergia entre el hierro, proveniente del FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, y el citrato. El hierro es el micronutriente más importante para microorganismos fotosintéticos dulceacuícolas y marinos, su carencia provoca membranas tilacoidales poco desarrolladas, así como disminución del contenido de clorofila y

de la actividad fotosintética (Reynolds, 2006). En el cloroplasto, el hierro se requiere para la actividad ferredoxina de las enzimas protoclorofílida reductasa y 8-vinil-reductasa que participan en la síntesis de clorofila (Tripathy & Dalal, 2013); también se requiere para el funcionamiento de la ferredoxina que participa en la formación de NADPH en el fotosistema I (Ishikawa *et al.*, 2017); así como para la actividad de la superóxido dismutasa (isoenzima Fe-SOD) que convierte el radical superóxido, formado en el fotosistema I, en agua y peróxido de hidrógeno (Ishikawa *et al.*, 2017) y para el correcto funcionamiento del citocromo b<sub>6</sub>f (Santillán *et al.*, 2023).

Por su parte, se sabe que el citrato funciona como agente quelante de Fe<sup>3+</sup>, en bacterias, hongos y plantas, lo que permite su transporte a través de la membrana celular. Este mecanismo se ha descrito en los microorganismos *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (Schröder *et al.*, 2003), así como en las microalgas *Chlorella vulgaris*, *Emiliana huxleyi*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira pseudonana* (Allnut & Bonner, 1987; Sutak *et al.*, 2012). En el caso de *E. gracilis*, si bien la adsorción por medio de la película, así como la quelación por polifosfatos y ascorbato son mecanismos que han sido asociados al transporte de Fe<sup>3+</sup> (Collinsworth, 1966; Ishikawa *et al.*, 1993; García-García *et al.*, 2016; Moreno-Sánchez *et al.*, 2017), el citrato como agente quelante de hierro no se ha descrito con detalle.

También fue destacable el desarrollo de estados palmela, principalmente, durante la segunda resiembra de aclimatación donde alcanzaron porcentajes considerables del total de células,  $25.3 \pm 1.1$  % o  $47.9 \pm 2.7$  % en algunos casos. Se sabe que los estados palmela se presentan en cultivos senescentes o cuando existen cambios marcados de pH y salinidad. Aunque son estados de latencia, no se consideran quistes, ya que son metabólicamente activos (Gomez *et al.*, 1974; Richter *et al.*, 2003). Su presencia pudo ser una respuesta al período de aclimatación debido al cambio de condiciones del medio Hutner con glutamato-malato (pH 3.5) al medio Buetow modificado con acetato-citrato (pH 6.8). Por esto, se presentaron con mayor porcentaje de abundancia en los cultivos de la segunda resiembra que de la cuarta resiembra.

Asimismo, la intensidad de luz empleada en esta investigación pudo ser otro factor que influyó en la aclimatación. En esta investigación se emplearon  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mientras que los autores citados previamente (Ruiz *et al.*, 2004; Rocchetta *et al.*, 2012; Tolivia, 2014) emplearon 150 o  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Estos valores de intensidad luminosa ya podrían ser elevados para *E. gracilis*, pues se sabe que causan fotoinhibición del crecimiento y las células son más susceptibles a sufrir este fenómeno en condiciones fotoheterótrofas (Ogbonna *et al.*, 2002).

## **VII.2 Interpretación para los resultados del experimento de caracterización de la biomasa en relación con la remoción de nutrientes.**

Este experimento puso de manifiesto que, con acetato-citrato 2.5 mM, la cinética de crecimiento presentó una forma de doble sigmoideal, lo cual indicó un crecimiento diaúxico que no se observó con acetato-propionato 2.5 mM ni en acetato sin cosustrato. Sin bien este crecimiento diaúxico comenzó a manifestarse en los cultivos de la cuarta resiembra con acetato-citrato 2.5 y 5.0 mM, es en la sexta resiembra donde se observó ya bien establecido, alcanzando una concentración celular de  $3.1 \pm 0.40 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  (ver Figura 11).

El crecimiento diaúxico ha sido reportado en *E. gracilis* en cultivos bajo condiciones fotoheterótrofas al usar sustratos orgánicos como glucosa, etanol y acetato (Schifif & Schwartzbach, 1982; Rezić *et al.*, 2013). Al respecto, se ha observado que esto ocurre cuando las células tienen a su disposición diferentes fuentes de carbono y energía. En estas condiciones, se prioriza el consumo de un sustrato sobre otro en función de las necesidades energéticas de las células. Esto se debe a que el consumo de un sustrato particular requiere la síntesis de enzimas específicas para su asimilación. Cuando el primer sustrato se ha agotado, entonces, la célula se prepara para utilizar un segundo sustrato, esto implica sintetizar otro nuevo conjunto de enzimas. A este fenómeno se le denomina diauxia y se ve reflejado en la cinética de crecimiento con diferentes fases de latencia intercaladas con diferentes fases exponenciales de crecimiento. Cada fase de latencia corresponde al tiempo en el cual se realiza el recambio de enzimas y cada fase exponencial corresponde el crecimiento por el consumo de un sustrato particular

(Schiff & Schwartzbach, 1982). Dado que el consumo de un nuevo sustrato requiere de sintetizar enzimas específicas para su asimilación, la diauxia asegura que la célula consumirá un sustrato hasta agotarlo y no gastará energía en la síntesis de nuevas enzimas para asimilar otro sustrato hasta que el primero se haya agotado.

En el caso de *E. gracilis*, se ha documentado que prioriza el consumo de glutamato, malato y succinato debido a que, al ser sustratos del ciclo de Krebs, las enzimas requeridas para su asimilación se expresan de manera constitutiva (siempre están presentes). Además, estos sustratos no causan inhibición de la síntesis de clorofila. Por su parte, sustratos como etanol y acetato, que se metabolizan por el ciclo del glioxilato, requieren de más tiempo para ser asimilados, pues la expresión de las enzimas para esta ruta metabólica necesita ser inducida por dichos sustratos en el medio de cultivo (Schiff & Schwartzbach, 1982). En el caso de que la fuente de energía sea luz y la fuente de carbono sea CO<sub>2</sub>, entonces, el compromiso energético para la célula es mayor, pues debe desarrollar un organelo completo, el cloroplasto, así que esto es la tercera opción a elegir por parte de *E. gracilis*, además, se sabe que sustratos como etanol o acetato inhiben el desarrollo de las membranas tilacoidales del cloroplasto (Schwartzbach, 2017).

De acuerdo con lo anterior y los resultados obtenidos de las cinéticas de crecimiento, se puede plantear lo siguiente. La clorosis y la formación de estados palmela observada durante las primeras dos resiembras en medio Buetow modificado (a pH 6.8) respecto a los cultivos parentales provenientes del medio Hutner (a pH 3.5) se debió a un proceso de aclimatación, durante el cual fue necesario inducir las enzimas necesarias para el ciclo del glioxilato. Al realizar el cambio al medio Buetow modificado, el acetato provocó la inhibición de clorofila y el crecimiento celular disminuyó a menos de dos millones de células por mililitro en la segunda resiembra. Para reponerse de este cambio, las células requirieron de una combinación acetato-citrato, pues para la cuarta resiembra, sólo los cultivos que presentaron esta combinación de sustratos superaron los dos millones de células por mililitro. Es hasta la sexta resiembra que se observó una cinética doble sigmoideal bien definida en acetato-citrato 2.5 mM, con dos fases exponenciales de los días



uno a dos y seis a siete, lo que indicó una diauxia. Este fenómeno pudo deberse a que, en un primer momento, el crecimiento celular se basó en el consumo de acetato y, posteriormente, en un metabolismo fotosintético. Al observar la cinética de remoción para DQO con acetato-citrato 2.5 mM se presentó una marcada disminución hasta el día seis de cultivo, después, la gráfica se volvió asintótica (ver Figura 14a). Esto también coincidió con el hecho de que, al día seis de cultivo, la gráfica de concentración de paramilo se volvió asintótica (ver Figura 13a). Ambas observaciones indican un marcado consumo de acetato durante los primeros seis días y su correspondiente almacenamiento en paramilo, el cual llegó a ser  $56.8 \pm 3.6$  % del peso seco de la biomasa al décimo día en acetato-citrato 2.5 mM (ver Figura 17a). Por otra parte, de los días cinco a seis, se observó un marcado incremento en el contenido de clorofila total, tanto en concentración como en rendimiento (ver Figuras 12a y 12b). Es decir, mientras la cinética de remoción para DQO y contenido de paramilo se volvieron asintóticos, el contenido de clorofila alcanzó un máximo al sexto día. Luego, de los días seis a siete se presentó la segunda fase exponencial de crecimiento.

Por otra parte, el crecimiento diaúxico se perdió al quitar el citrato o cambiarlo por propionato (ver Figura 11) y la concentración celular disminuyó significativamente respecto al cultivo con acetato-citrato 2.5 mM ( $3.1 \pm 0.40 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>) a menos de la mitad tanto en acetato-propionato 2.5 mM ( $1.22 \pm 0.12 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>) como en acetato sin cosustrato ( $0.90 \pm 0.06 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>). Esto pone de manifiesto que la combinación acetato-citrato es necesaria para estimular el crecimiento celular, el acetato para mantener la primera fase de crecimiento exponencial y el citrato, posiblemente, como agente quelante de hierro (como se discutió en la sección previa) para permitir un metabolismo fotosintético en la segunda fase exponencial de crecimiento.

Otro aspecto a destacar de este experimento fue la remoción del 100 % de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> al cuarto día en acetato-citrato 2.5 mM, siendo la mitad de la concentración inicial abatida al segundo día (ver Figura 14b). Esto no se logró con acetato-propionato 2.5 mM ni con acetato sin cosustrato, cuyos porcentajes de remoción

fueron significativamente menores,  $56.6 \pm 6.0 \%$  y  $70.3 \pm 4.0 \%$ , respectivamente. El consumo de  $\text{NH}_4^+$  podría estar relacionado con el contenido de clorofila total en acetato-citrato 2.5 mM, ya que después de su agotamiento al cuarto día, se presentó el marcado incremento de clorofila total de los días cinco a seis. Esto muestra que la remoción de  $\text{NH}_4^+$  y los aumentos en concentración y rendimiento de clorofila total también están relacionados con la presencia de citrato.

Price & Carell (1964), Harris & Kirk (1969), Regnault *et al.* (1990) lograron estimular el crecimiento celular de *E. gracilis* en condiciones fotoheterótrofas (empleando lactato, etanol o acetato) con valores que alcanzaron  $3.2 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Esto está relacionado con el consumo de  $\text{NH}_4^+$  y la presencia de  $\text{FeCl}_3$  como fuente de hierro, lo que estimuló el contenido de clorofila total. Se sabe que el  $\text{NH}_4^+$  es requerido para la síntesis del anillo de porfirina y de las proteínas del cloroplasto (Regnault *et al.*, 1990). En cuanto a la intensidad de luz, los autores citados emplearon valores de 36.3 a 40.5  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bajo condiciones de temperatura de 27 o 29 °C. No obstante, si bien los autores mencionados no emplearon el medio Buetow, se pone de relieve la sinergia entre  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{FeCl}_3$  y una intensidad de luz adecuada para estimular el contenido de clorofila.

Respecto al cultivo de *E. gracilis* con propionato, Yokota *et al.* (1982) reportaron un crecimiento de  $10 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  en condiciones fotoheterótrofas con este sustrato bajo una intensidad de luminosa de 40.5  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a 27 °C. Yokota *et al.* (1982) emplearon el medio de cultivo Cramer y Myers modificado, al cual añaden citrato,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  como fuente de hierro y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . Así que, de nuevo, la sinergia entre estos componentes puede ser la causa del buen crecimiento celular en estas condiciones. Otros trabajos, como Hosotani *et al.* (1980), Watanabe *et al.* (1996) y Miyamoto *et al.* (2010), también emplearon la estrategia de cultivar *E. gracilis* con propionato en el medio Cramer y Myers modificado. Si bien estas investigaciones se han centrado en comprender la asimilación de propionato en condiciones fotoheterótrofas, vía metilmalonil-CoA, no reportan contenido de clorofila total ni remoción de  $\text{NH}_4^+$ .

Por lo anterior, se puede afirmar que  $\text{NH}_4^+$ , citrato y hierro son tres factores que permiten adecuar el crecimiento de *E. gracilis* a condiciones fotoheterótrofas con acetato, etanol, lactato o propionato, empleando intensidades luminosas entre 40 a 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y temperaturas de 25 a 27 °C. Estas condiciones permiten a las células incrementar el contenido de clorofila total y obtener crecimientos iguales o mayores a tres millones de células por mililitro.

En cuanto al perfil de EMAG destacó que, de los 23 ácidos grasos identificados, solamente 16:0, 14:0 y 18:3n-3 fueron los más abundantes en los tres tratamientos, conformando cerca de 40% del total (ver Figura 19). Al respecto, Zimorski *et al.* (2017) resumen la versatilidad de *E. gracilis* para sintetizar ácidos grasos. El sistema FAS II del cloroplasto se expresa en condiciones autótrofas, produce los AGS 16:0 y 18:0, además, este organelo presenta elongasas y desaturasas que producen AGPI de 20 carbonos. Por su parte, el sistema FAS I del citosol se expresa en condiciones heterótrofas, principalmente produce los AGS 14:0 y 16:0, así como 18:0 en menor medida, y está asociado con elongasas y desaturasas del sistema microsomal cuyos productos son AGPI de 22 y 24 carbonos. El tercer sistema de síntesis de ácidos grasos se ubica en la mitocondria y predomina en condiciones anaeróbicas, produce cadenas de 8 a 18 carbonos, de cadena par e impar, siendo 14:0 el más abundante.

De acuerdo con lo anterior, el predominio de los AGS con mayores porcentajes de abundancia, 16:0 y 14:0, reflejó la condición heterótrofa de crecimiento; mientras que la condición autótrofa se vio reflejada en los AGPI 18:3n-3 y 18:2n-6, ubicados en tercer y cuarta (o quinta) posición de abundancia. El hecho de que 16:0 sea el ácido graso más abundante pudo deberse a que es parte tanto de la membrana citoplasmática como de los tilacoides del cloroplasto, por lo cual, su síntesis sería realizada tanto por FAS I como por FAS II (Jasso-Chávez *et al.*, 2002). Por su parte, los únicos AGS de cadena impar, 13:0 y 15:0, se presentaron en acetato-propionato, ya que este sustrato estimula cadenas impares; no obstante, su abundancia es de 3.42 %. Galli *et al.* (1985) reportaron que *E. gracilis* puede acumular hasta 14.0 % de ácidos grasos de cadena impar, siendo los principales

AGS 13:0, 15:0 y 17:0, mientras que Nakazawa *et al.* (2018) mencionan que su porcentaje puede incrementarse de a 40 a 50 %, dependiendo de la cepa y de las condiciones de cultivo.

### **VII.3 Interpretación para los resultados del experimento de caracterización de la biomasa en función de la anaerobiosis-oscuridad.**

El principal efecto de la anaerobiosis-oscuridad fue la disminución de paramilo respecto al porcentaje de biomasa seca, concentración y rendimiento en comparación con la condición de fotoperíodo normal (ver Tabla 11). Por su parte, en cuanto a las concentraciones de lípidos totales no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con 11 y 14 días de duración ni en concentración ni en rendimiento (ver Tabla 11). Por lo tanto, si bien la anaerobiosis-oscuridad provocó disminución en la concentración de paramilo, esto no provocó cambios significativos en la concentración de lípidos totales.

Otro efecto de la anaerobiosis fue que estimuló el predominio de AGS, principalmente, 14:0 y 16:0 que representaron casi la mitad del total de ácidos grasos y, en menor medida, 12:0 y 18:0. Mientras que, en fotoperíodo normal, 14:0 y 16:0 siguieron siendo abundantes, pero hubo un incremento de los AGPI 16:2n-6, 18:3n-3 y 18:2n-6. Esto pone de manifiesto que para estimular AGPI con 16,18 y 20 carbonos se requiere de la presencia de luz (ver Figura 22).

En el caso de *E. gracilis*, en condiciones de anaerobiosis-oscuridad, se sabe que el paramilo almacenado se degrada y las moléculas de glucosa obtenidas entran a glucólisis. Para reoxidar los transportadores electrónicos (NADH), *E. gracilis* emplea la fermentación de ésteres de cera, cuya síntesis de cadenas hidrocarbonadas se realiza en la mitocondria. Bajo estas condiciones, el porcentaje de ésteres de cera alcanza 50 % de la biomasa y el de lípidos totales hasta 60 % (Tucci *et al.*, 2010, Matsuda *et al.*, 2011). De acuerdo con lo anterior, se esperaría detectar un incremento de lípidos totales bajo estas condiciones, pero esto no ocurrió. Una posible explicación de por qué el incremento de lípidos totales se vio limitado pudo ser la formación de metilglioxal, un compuesto tóxico derivado de la

dihidroxiacetona fosfato, que se presenta cuando existen altas tasas de glucólisis. La toxicidad del metilglioxal se debe a que acila proteínas y ADN, lo que forma aductos llamados productos finales de glucosilación avanzada (AGEs), que interfieren con el metabolismo celular (Chakraborty, 2014; Allaman, 2015; Schalkwijk *et al.*, 2020). El principal mecanismo para mitigar el metilglioxal son las glioxilasas, GLO1 y GLO2, que lo convierten a D-lactato.

En *E. gracilis*, se sabe que existe un metabolismo activo de lactato bajo condiciones microaerófilas, producto de una lanzadera de lactato deshidrogenasas (n-LDH y i-LDH) que metabolizan los estereoisómeros D y L de lactato. En condiciones microaerófilas, D-iLDH es tres veces más activa que L-iLDH y esta diferencia sería consecuencia del incremento intracelular de D-lactato. Si bien las glioxilasas no se conocen en *E. gracilis*, sí se han descrito en los kinetoplastidos *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major* y *Leishmania donovani*. Dado que éstos son el grupo taxonómicamente más cercano de los euglénidos, un sistema parecido podría presentarse en *E. gracilis* (Castro-Guerrero *et al.*, 2005; Jasso-Chávez *et al.*, 2005; Bringaud *et al.*, 2006; Wyllie & Fairlamb 2011).

Una segunda consideración es que el lactato formado sea expulsado extracelularmente en condiciones microaerófilas o anaeróbicas. Castro-Guerrero *et al.* (2005) y Tomita *et al.* (2016) han reportado este fenómeno para *E. gracilis* cultivada tanto heterótrofa como autótrofamente. De esta manera, la concentración extracelular de lactato alcanza 1.4 g L<sup>-1</sup> y la de succinato a 869.6 mg L<sup>-1</sup>. Estos resultados han llamado la atención porque el lactato y el succinato se emplean para la elaboración de bioplásticos y existe una intensa investigación para obtenerlos a partir de microalgas (Azeem *et al.*, 2017; Tomita *et al.*, 2019; Cinar *et al.*, 2020).

De acuerdo con lo anterior, la formación de metilglioxal junto con la secreción de succinato y lactato podrían comprometer la síntesis de ácidos grasos, ya que los productos de la glucólisis no se dirigirían a la formación de piruvato y acetil-CoA, precursores de las cadenas hidrocarbonadas, sino a lactato y succinato.

Como tercera consideración, el incremento de lípidos totales pudo también afectarse al emplear N<sub>2</sub> gaseoso. Furuhashi *et al.* (2015) y Padermshoke *et al.*

(2016) reportaron que la síntesis de ácidos grasos comienza tras cuatro horas de iniciada la anaerobiosis con  $N_2$ , pero luego de 24 horas se detiene, reestableciéndose con la adición de  $CO_2$  o  $HCO_3^-$ . Por esto, se ha propuesto que se requiere aportar carbono inorgánico, cuya fijación heterótrofa estaría mediada por PEPCCK para estimular la síntesis de ácidos grasos.

Yoshida *et al.* (2016) realizaron el primer análisis transcriptómico de *E. gracilis* en anaerobiosis, empleando  $N_2$  gaseoso, y no encontraron incremento en la expresión de genes relacionados con las enzimas PNO y TER1, requeridas en la síntesis de ácidos grasos. Tamaki *et al.* (2019) realizaron el primer análisis proteómico de *E. gracilis* en condiciones hipóxicas, también empleado  $N_2$  gaseoso, y sí encontraron incrementos significativos en las expresiones de PNO, KAT1, KAT2, TER1 y PCC, entonces, propusieron que las discrepancias con los datos transcriptómicos se deben a que el control de la expresión génica ocurre a nivel post-transcripcional; pero, señalan que ninguna de las enzimas alcanzó a duplicar su expresión respecto a la condición aeróbica.

La síntesis anaerobia de ácidos grasos y la formación de ésteres de cera podrían aprovecharse biotecnológicamente para estimular el contenido de AGS al tiempo que se fija  $CO_2$ . Suzuki (2017) señala que la producción de aceites con alto contenido de AGS en *E. gracilis* sería una alternativa para obtener biodiésel o aceites comerciales cuya producción provoca la expansión de la frontera agrícola, como el aceite de palma. Mientras que la biomasa restante podría emplearse como sustituto de soya por su alto contenido en proteína.

Los cultivos a escala industrial de *E. gracilis* se desarrollaron en Japón en 2005, luego, en 2007 comenzaron a introducirse productos en Asia para consumo humano y elaboración de cosméticos (Harada *et al.*, 2020). Recientemente, se aprobó en la Comunidad Europea la producción de *E. gracilis* para consumo humano cuyo contenido de paramilo sea mayor al 50 % (EFSA 2020). El aprovechamiento biotecnológico de paramilo ya se perfila como una realidad y se han hecho avances significativos para monitorear su contenido en cultivos a escala

industrial, así como para mejorar el cosechado de la biomasa (Hiramatsu *et al.*, 2020; Khatiwada *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020).

## VIII. Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos y respecto a los objetivos particulares que se plantearon al inicio de la tesis, se pueden enunciar las siguientes conclusiones:

1) Se requiere de citrato como cosustrato para incrementar el crecimiento celular de *E. gracilis* en presencia de acetato, tal que la concentración celular supere dos millones de células por mililitro. Esta combinación de acetato-citrato también es requerida para estimular incrementos en los contenidos de paramilo y clorofila total. En el caso del paramilo, su concentración puede superar  $1 \text{ g L}^{-1}$ .

2) Se comprobó que puede estimularse el incremento en el contenido de paramilo, así como las remociones de DQO y  $\text{NH}_4^+$  si se usa acetato-citrato, combinación de sustratos que causó un crecimiento diaúxico. Se propone que la primera fase de crecimiento exponencial se mantiene por consumo de acetato, mientras que la segunda fase se mantiene por un metabolismo fotosintético. Respecto a dicho crecimiento diaúxico, se identificó que el incremento en el contenido de paramilo es previo a una marcada remoción de DQO, mientras que el incremento de clorofila total es previo a las remociones de amonio y DQO. Esto permitió obtener un porcentaje de paramilo de casi la mitad de la biomasa seca ( $56.8 \pm 3.6 \%$ ) con una concentración de  $1107.0 \pm 111.1 \text{ mg L}^{-1}$ .

3) El experimento de anaerobiosis-oscuridad puso de manifiesto que, a pesar de la disminución en el contenido de paramilo, el contenido de lípidos totales se mantuvo sin cambios significativos. No obstante, sí se logró observar un mayor porcentaje de ácidos grasos saturados respecto a los poliinsaturados en anaerobiosis-oscuridad donde predominaron los AGS 14:0 y 16:00, conformando la mitad de EMAG bajo esta condición.



## **IX. Referencias**

- Acién Fernández, F. G., Gómez-Serrano, C., & Fernández-Sevilla, J. M. (2018). Recovery of nutrients from wastewaters using microalgae. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. **2**: 59.
- Allaman, I., Bélanger, M., & Magistretti, P. J. (2015). Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. *Frontiers in neuroscience*. **9 (23)**: 1 - 12.
- Allnut, F. T., & Bonner, W. D. (1987). Characterization of iron uptake from ferrioxamine B by *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiology*. **85 (3)**: 746 - 750.
- American Public Health Association. (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Federation, W. E., & American Public Health Association. Washington, DC. USA.
- Arango, L. (2015). *Remoción de materia orgánica y nutrientes de aguas residuales, purines de cerdo y digestato anaerobio utilizando un consorcio de microalgas-bacterias*. Tesis de maestría. Programa de maestría y doctorado en Ingeniería, Ingeniería Ambiental – Agua. Instituto de Ingeniería, Unidad Juriquilla. Universidad Nacional Autónoma de México. 122 p.
- Arnon, D. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology*. **24 (1)**: 1 - 15.
- Arredondo., B., Cordero, B. y Voltolina, D. (2017). Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico. En: Arredondo, B., Voltolina, D., Zenteno, T., Arce, M. y Gómez, G. (Eds). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de biomasa microalgal*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. Segunda edición. La Paz, Baja California Sur, México. pp. 64 - 70.
- Azeem, M., Batool, F. & Iqbal, N. (2017). Algal-Based Biopolymers. In: Zia, K. M., Zuber, M. & Ali, M (eds). *Algae Based Polymers, Blends, and Composites*. Elsevier. pp. 1 - 20.
- Barsanti, L., Bastianini, A., Passarelli, V., Tredici, M., & Gualtieri, P. (2000). Fatty acid content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. *Journal of applied phycology*. **12 (3-5)**: 515 - 520.
- Barsanti, L., Vismara, R., Passarelli, V., & Gualtieri, P. (2001). Paramylon ( $\beta$ -1,3-glucan) content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions. *Journal of applied phycology*. **13 (1)**: 59 - 65.
- Barsanti, L., Passarelli, V., Evangelista, V., Frassanito, A. M., & Gualtieri, P. (2011). Chemistry, physico-chemistry and applications linked to biological activities of  $\beta$ -glucans. *Natural product reports*. **28 (3)**: 457 - 466.

- Bastidas, O. (2012). *Conteo Celular con Hematocitómetro Uso Elemental del Hematocitómetro*. Nota técnica. Celoromics. 6 p.
- Bligh, E. & Dyer, W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. **37 (8)**: 911 - 917.
- Bringaud, F., Rivière, L., & Coustou, V. (2006). Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Molecular and biochemical parasitology*. **149 (1)**: 1 - 9.
- Brusca, R. C., Moore, W. & Shuster, S. M. (2016). *Invertebrates* (3<sup>rd</sup> edition, pp. 118 - 120). Sinauer Associates, Inc.
- Buetow, D. (1989). The mitochondrion. In: Buetow, D. (ed). *The Biology of Euglena*, Vol. IV. Academic Press. New York pp. 247 - 305.
- Buetow, D. (1967). Acetate repression of chlorophyll synthesis in *Euglena gracilis*. *Nature*. **213 (5081)**: 1127 - 1128.
- Cai, T., Park, S. Y., & Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*: 19: 360 - 369.
- Calvayrac, R., & Douce, R. (1970). Les polyglycerophospholipides d'*Euglena gracilis*. *FEBS letters*. **7 (3)**: 259 - 262.
- Castañeda, M. (2004). *Microbiología aplicada: manual de laboratorio*. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco. División de Ciencias Básicas e Ingeniería. Departamento de Ciencias Básicas. 228 p.
- Carvalho, F., Prazeres, A., & Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *Science of the total environment*. **445**: 385 - 396.
- Castro-Guerrero, N., Jasso-Chávez, R., & Moreno-Sánchez, R. (2005). Physiological role of rhodoquinone in *Euglena gracilis* mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. **1710 (2-3)**: 113 - 121.
- Cavalier-Smith, T. (2017). Euglenoid pellicle morphogenesis and evolution in light of comparative ultrastructure and trypanosomatid biology: Semi-conservative microtubule/strip duplication, strip shaping and transformation. *European Journal of Protistology*. **61**: 137-179.
- Çelekli, A., Balcı, M., & Bozkurt, H. (2008). Modelling of *Scenedesmus obliquus*; function of nutrients with modified Gompertz model. *Bioresource technology*. **99 (18)**: 8742 - 8747.
- Chakraborty, S., Karmakar, K., & Chakravorty, D. (2014). Cells producing their own nemesis: understanding methylglyoxal metabolism. *IUBMB life*. **66 (10)**: 667 - 678.

Chalima, A., Oliver, L., Fernández de Castro, L., Karnaouri, A., Dietrich, T., & Topakas, E. (2017). Utilization of volatile fatty acids from microalgae for the production of high added value compounds. *Fermentation*. **3 (4)**: 54.

Chen, Y., Randall, A., & McCue, T. (2004). The efficiency of enhanced biological phosphorus removal from real wastewater affected by different ratios of acetic to propionic acid. *Water Research*. **38 (1)**: 27 - 36.

Chen, Y, Ho, S., Nagarajan, D., Ren, N., & Chang, J. (2018). Waste biorefineries—integrating anaerobic digestion and microalgae cultivation for bioenergy production. *Current opinion in biotechnology*. **50**: 101 - 110.

Cinar, S., Chong, Z., Kucuker, M., Wieczorek, N., Cengiz, U., & Kuchta, K. (2020). Bioplastic production from microalgae: a review. *International journal of environmental research and public health*. **17 (11)**: 3842.

Cicconofri, G., Noselli, G., & DeSimone, A. (2021). The biomechanical role of extra-axonemal structures in shaping the flagellar beat of *Euglena gracilis*. *Elife*. 10: e58610.

Cnidus. (2 de agosto de 2012). *Evolución en Euglena & company: de la depredación a la fotosíntesis*. La Ciencia y sus demonios. <https://cnho.wordpress.com/2012/08/02/origen-evolucion-en-euglena-company-de-la-depredacion-a-la-fotosintesis/>

Cook, J. (1968). The cultivation and growth of *Euglena*. In: Buetow, D. The Biology of *Euglena*. Vol. I. Academic Press. New York. pp. 243 - 314.

Conforti, V. T. D. (1983). *Morfología, taxonomía y estereoultraestructura de las Euglenophytas del área bonaerense*. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 275 p.

Del-Ángel, R., Carreón-Palau, L. y Arjona-López, M. (2017). Determinación de ácidos grasos y esteroides por cromatografía de gases-espectrometría de masas. En: Arredondo, B., Voltolina, D., Zenteno, T., Arce, M. y Gómez, G. (Eds). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de biomasa microalgal*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. Segunda edición. La Paz, Baja California Sur, México. pp. 80 - 89.

Delo, J., Ernst-Fonberg, M. L., & Bloch, K. (1971). Fatty acid synthetases from *Euglena gracilis*. *Archives of biochemistry and biophysics*. **143 (2)**: 384 - 391.

DuBois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*. **28 (3)**: 350 - 356.

Ellis, R., Spooner, T., & Yakulis, R. (1975). Regulation of chlorophyll synthesis in the green alga *Golenkinia*. *Plant physiology*. **55 (4)**: 791 - 795.

Evans, M., Falcone, P., Crowley, D., Sulley, A., Campbell, M., Zakaria, N., Lasrado, J., Fritz, E. & Herrlinger, K. (2019). Effect of a *Euglena gracilis* Fermentate on Immune Function in Healthy, Active Adults: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Nutrients*. **11 (12)**: 2926.

Franke-Whittle, I. H., Walter, A., Ebner, C., & Insam, H. (2014). Investigation into the effect of high concentrations of volatile fatty acids in anaerobic digestion on methanogenic communities. *Waste management*. **34 (11)**: 2080 - 2089.

Fujita, T., Aoyagi, H., Ogbonna, J., & Tanaka, H. (2008). Effect of mixed organic substrate on  $\alpha$ -tocopherol production by *Euglena gracilis* in photoheterotrophic culture. *Applied microbiology and biotechnology*. **79 (3)**: 371 - 378.

Furuhashi, T., Ogawa, T., Nakai, R., Nakazawa, M., Okazawa, A., Padermschoke, A., Nishio, K., Hirai, M., Arita, M. & Ohta, D. (2015). Wax ester and lipophilic compound profiling of *Euglena gracilis* by gas chromatography-mass spectrometry: toward understanding of wax ester fermentation under hypoxia. *Metabolomics*. **11 (1)**: 175 - 183.

Galli, R., Lucchini, G., & Bianchetti, R. (1985). Vitamin B<sub>12</sub> requirement and propionate utilization in *Euglena gracilis*. *Plant Science*. **38 (3)**: 193 - 198.

Gissibl, A., Sun, A., Care, A., Nevalainen, H., & Sunna, A. (2019). Bioproducts from *Euglena gracilis*: Synthesis and applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. **7**: 108.

Gomez, M., Harris, J., & Walne, P. (1974). Studies of *Euglena gracilis* in aging cultures. I. Light microscopy and cytochemistry. *British Phycological Journal*. **9 (2)**: 163 - 174.

Gomez-Silva, B., Timko, M. P., & Schiff, J. A. (1985). Chlorophyll biosynthesis from glutamate or 5-aminolevulinate in intact *Euglena* chloroplasts. *Planta*. **165**: 12-22.

Gouveia, L., Graça, S., Sousa, C., Ambrosano, L., Ribeiro, B., Botrel, E., Castro, P., Ferreira, A. & Silva, C. (2016). Microalgae biomass production using wastewater: treatment and costs: scale-up considerations. *Algal Research*. **16**: 167 - 176.

Goldberg, I., & Bloch, K. (1972). Fatty acid synthetases in *Euglena gracilis*. *Journal of biological chemistry*. **247 (22)**: 7349 - 7357.

Guštin, S., & Marinšek, R. (2011). Effect of pH, temperature and air flow rate on the continuous ammonia stripping of the anaerobic digestion effluent. *Process safety and environmental protection*. **89 (1)**: 61 - 66.

Harada, R., Nomura, T., Yamada, K., Mochida, K., & Suzuki, K. (2020). Genetic engineering strategies for *Euglena gracilis* and its industrial contribution to sustainable development goals: A review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. **8**: 1- 10.

- Harris, R., & Kirk, J. T. (1969). Control of chloroplast formation in *Euglena gracilis*. Antagonism between carbon and nitrogen sources. *Biochemical Journal*. **113 (1)**: 195 - 205.
- Hendren, R., & Bloch, K. (1980). Fatty acid synthetases from *Euglena gracilis*. Separation of component activities of the ACP-dependent fatty acid synthetase and partial purification of the beta-ketoacyl-ACP synthetase. *Journal of Biological Chemistry*. **255 (4)**: 1504 - 1508.
- Hiramatsu, K., Yamada, K., Lindley, M., Suzuki, K., & Goda, K. (2020). Large-scale label-free single-cell analysis of paramylon in *Euglena gracilis* by high-throughput broadband Raman flow cytometry. *Biomedical Optics Express*. **11 (4)**: 1752 - 1759.
- Huber-Pestalozzi, G. (1955). Euglenophyceen. In: Huber-Pestalozzi, G. (Ed.), *Das Phytoplankton des Süßwassers, Systematik und Biologie* (Teil 4). Stuttgart, E. Schweizerbartsche Verlangsbuchhandlung.
- Huerlimann, R., De Nys, R., & Heimann, K. (2010). Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnology and bioengineering*. **107 (2)**: 245 - 257.
- Hulanicka, D., Erwin, J., & Bloch, K. (1964). Lipid metabolism of *Euglena gracilis*. *Journal of Biological Chemistry*. **239 (9)**: 2778 - 2787.
- Inui, H., Miyatake, K., Nakano, Y., & Kitaoka, S. (1982). Wax ester fermentation in *Euglena gracilis*. *FEBS Letters*. **150 (1)**: 89 - 93.
- Inui, H., Miyatake, K., Nakano, Y., & Kitaoka, S. (1984). Fatty acid synthesis in mitochondria of *Euglena gracilis*. *European journal of biochemistry*. **142 (1)**: 121 - 126.
- Jasso-Chávez, R., Vega-Segura, A., El-Hafidi, M., Moreno-Sánchez, R., & Torres-Márquez, M. (2002). Kinetic and thermodynamic characterization of adenyl cyclase from *Euglena gracilis*. *Archives of biochemistry and biophysics*. **404 (1)**: 48 - 54.
- Jasso-Chávez, R., García-Cano, I., Marín-Hernández, Á., Mendoza-Cózatl, D., Rendón, J., & Moreno-Sánchez, R. (2005). The bacterial-like lactate shuttle components from heterotrophic *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. **1709 (2)**: 181 - 190.
- Jasso-Chávez, R. & Moreno-Sánchez, R. (2003). Cytosol-mitochondria transfer of reducing equivalents by a lactate shuttle in heterotrophic *Euglena*. *European journal of biochemistry*. **270 (24)**: 4942 - 4951.
- Jasso-Chávez, R., Torres-Márquez, M., & Moreno-Sánchez, R. (2001). The membrane-bound L- and D-lactate dehydrogenase activities in mitochondria from *Euglena gracilis*. *Archives of biochemistry and biophysics*. **390 (2)**: 295 - 303.

Jahn, T. (1946). The euglenoid flagellates. *The Quarterly review of biology*. **21 (3)**: 246 - 274.

Kataoka, H., Shimura, T., Mizoshita, T., Kubota, E., Mori, Y., Mizushima, T., Wada, T., Ogasawara, N., Tanida, S., Sasaki, M., Togawa, S., Sano, H., Hirata, Y., Ikai, M., Mochizuki, H., Seno, K., Itoh, S., Kawai, T. & Joh, T. (2009). Lentinan with S-1 and paclitaxel for gastric cancer chemotherapy improve patient quality of life. *Hepato-gastroenterology*. **56 (90)**: 547 - 550.

Krakat, N., Demirel, B., Anjum, R., & Dietz, D. (2017). Methods of ammonia removal in anaerobic digestion: a review. *Water Science and Technology*. **76 (8)**: 1925 - 1938.

Kempner. (1982). Stimulation and Inhibition of the metabolism and growth of *Euglena gracilis*. In: Buetow, D.E. (ed). *The Biology of Euglena*, Vol. III. Academic Press. New York pp. 197 - 252.

Khatiwada, B., Sunna, A., Nevalainen, H. (2020). Molecular tools and applications of *Euglena gracilis*: From biorefineries to bioremediation. *Biotechnology and Bioengineering*. 1 - 16.

Kim, S., Lee, D., Lim, D., Lim, S., Park, S., Kang, C., Yu, J. & Lee, T. (2020). Paramylon production from heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* in two different industrial byproducts: Corn steep liquor and brewer's spent grain. *Algal Research*. **47**: 101826.

Knapp, J. S. & Bromley-Challenor, K.C.A. (2003). Recalcitrant organic compounds. In: Mara, D., & Horan, N. J. (Eds.). *Handbook of water and wastewater microbiology*. Elsevier. pp. 579 - 580.

Koizumi, N., Sakagami, H., Utsumi, A., Fujinaga, S., Takeda, M., Asano, K., Sugawara, I., Ichikawa, S., Kondo, H., Mori, S., Miyatake, K., Nakano, Y., Nakashima, H., Murakami, T., Miyano, N. & Yamamoto, N. (1993). Anti-HIV (human immunodeficiency virus) activity of sulfated paramylon. *Antiviral research*. **21 (1)**: 1 - 14.

Kong, Q., Li, L., Martinez, B., Chen, P., & Ruan, R. (2010). Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production. *Applied biochemistry and Biotechnology*. **160 (1)**: 9 - 18.

Koneman, E. & Allen, D. 2006. Diagnóstico microbiológico: Texto y Atlas en Color. Sexta edición. Editorial médica panamericana. Madrid, España. pp. 853 - 857.

Kor-Bicakci, G., Ubay-Cokgor, E., & Eskicioglu, C. (2020). Comparative analysis of bacterial and archaeal community structure in microwave pretreated thermophilic and mesophilic anaerobic digesters utilizing mixed sludge under organic overloading. *Water*. **12 (3)**: 887

- Kottuparambil, S., Thankamony, R., & Agusti, S. (2019). *Euglena* as a potential natural source of value-added metabolites. A review. *Algal Research*. **37**: 154 - 159.
- Kusmayadi, A., Lu, P. H., Huang, C. Y., Leong, Y. K., Yen, H. W., & Chang, J. S. (2021). Integrating anaerobic digestion and microalgae cultivation for dairy wastewater treatment and potential biochemicals production from the harvested microalgal biomass. *Chemosphere*. **291**: 133057.
- Krnáčová, K., Rýdlová, I., Vinarčíková, M., Krajčovič, J., Vesteg, M., & Horváth, A. (2015). Characterization of oxidative phosphorylation enzymes in *Euglena gracilis* and its white mutant strain WgmZOflL. *FEBS letters*. **589 (6)**: 687 - 694.
- Leander, B. (2004). Did trypanosomatid parasites have photosynthetic ancestors? *Trends in microbiology*. **12 (6)**: 251 - 258.
- Lesuisse, E., & Labbe, P. (1989). Reductive and non-reductive mechanisms of iron assimilation by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. **135 (2)**: 257-263.
- Li, S., Ho, S., Wang, C., Lin, Y., Nagarajan, D., Chang, J., & Ren, N. (2018). Integration of sludge digestion and microalgae cultivation for enhancing bioenergy and biorefinery. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **96**: 76 - 90.
- Luo, K., Pang, Y., Yang, Q., Wang, D., Li, X., Lei, M., & Huang, Q. (2019). A critical review of volatile fatty acids produced from waste activated sludge: enhanced strategies and its applications. *Environmental Science and Pollution Research*. **26 (14)**: 13984 - 13998.
- Mahapatra, D., Chanakya, H., & Ramachandra, T. (2013). *Euglena* sp. as a suitable source of lipids for potential use as biofuel and sustainable wastewater treatment. *Journal of applied phycology*. **25 (3)**: 855 - 865.
- Mao, Y., Xiong, R., Gao, X., Jiang, L., Peng, Y., & Xue, Y. (2021). Analysis of the Status and Improvement of Microalgal Phosphorus Removal from Municipal Wastewater. *Processes*. **9 (9)**: 1486.
- Mata, T., Martins, A., & Caetano, N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*. **14 (1)**: 217 - 232.
- Mathews, C., Van Holde, K., Appling, D., Anthony-Cahill, S. (2013). *Bioquímica*. Cuarta edición. Pearson Educacion. Madrid, España. pp. 620 - 622.
- Matsuda, F., Hayashi, M., & Kondo, A. (2011). Comparative profiling analysis of central metabolites in *Euglena gracilis* under various cultivation conditions. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. **75 (11)**: 2253 - 2256.
- Matsui, T., Mori, K., & Toyama, T. (2021). Paramylon production by *Euglena gracilis* via mixotrophic cultivation using sewage effluent and waste organic compounds. *Bioresource Technology Reports*. **15**: 100735.

Meena, D., Das, P., Kumar, S., Mandal, S., Prusty, A., Singh, S., Akhtar, M., Behera, B., Kumar, K., Pal, A., & Mukherjee, S. (2013). Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish physiology and biochemistry*. **39** (3): 431 - 457.

Mishra, S., Suh, W., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M., & Yang, J. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource technology*. **155**: 330 - 333.

Miranda-Astudillo, H. V., Yadav, K. N. S., Colina-Tenorio, L., Bouillenne, F., Degand, H., Morsomme, P., Boekema, E. J. & Cardol, P. (2018). The atypical subunit composition of respiratory complexes I and IV is associated with original extra structural domains in *Euglena gracilis*. *Scientific reports*. **8** (1): 1 - 13.

Miyamoto, E., Tanioka, Y., Nishizawa-Yokoi, A., Yabuta, Y., Ohnishi, K., Misono, H., Shigeoka, S., Nakano, Y. & Watanabe, F. (2010). Characterization of methylmalonyl-CoA mutase involved in the propionate photoassimilation of *Euglena gracilis* Z. *Archives of microbiology*. **192** (6): 437 - 446.

Moreno-Sánchez, R., & Hansford, R. (1988). Relation between cytosolic free calcium and respiratory rates in cardiac myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. **255** (2): H347 - H357.

Mohsenpour, S. F., Hennige, S., Willoughby, N., Adeloye, A., & Gutierrez, T. (2021). Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review. *Science of The Total Environment*. **752**: 142168

Msanne, J., Xu, D., Konda, A., Casas-Mollano, J., Awada, T., Cahoon, E., & Cerutti, H. (2012). Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169. *Phytochemistry*. **75**: 50 - 59.

Nakashima, A., Suzuki, K., Asayama, Y., Konno, M., Saito, K., Yamazaki, N., & Takimoto, H. (2017). Oral administration of *Euglena gracilis* Z and its carbohydrate storage substance provides survival protection against influenza virus infection in mice. *Biochemical and biophysical research communications*. **494** (1 - 2): 379 - 383.

Nakashima, A., Yamada, K., Iwata, O., Sugimoto, R., Atsuji, K., Ogawa, T., Ishibashi-Ohgo, N. & Suzuki, K. (2018).  $\beta$ -Glucan in foods and its physiological functions. *Journal of nutritional science and vitaminology*. **64** (1): 8 - 17.

Nakazawa, M. (2017). C2 metabolism in *Euglena*. In: Schwartzbach, S. D & Shigeoka, S. (eds). *Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 979. Springer International Publishing. pp. 39 - 45.

Nakazawa, M., Ando, H., Nishimoto, A., Ohta, T., Sakamoto, K., Ishikawa, T., Ueda, M., Sakamoto, T., Nakano, Y., Miyatake, K. & Inui, H. (2018). Anaerobic respiration



coupled with mitochondrial fatty acid synthesis in wax ester fermentation by *Euglena gracilis*. *FEBS letters*. **592 (24)**: 4020 - 4027.

Najafabadi, H. A., Malekzadeh, M., Jalilian, F., Vossoughi, M., & Pazuki, G. (2015). Effect of various carbon sources on biomass and lipid production of *Chlorella vulgaris* during nutrient sufficient and nitrogen starvation conditions. *Bioresource Technology*. **180**: 311 - 317.

Ogbonna, J., Ichige, E., & Tanaka, H. (2002). Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena gracilis*. *Applied microbiology and biotechnology*. **58 (4)**: 532 - 538.

Okouchi, R., Yamamoto, K., Ota, T., Seki, K., Imai, M., Ota, R., Asayama, Y., Nakashima, A., Suzuki, K. & Tsuduki, T. (2019). Simultaneous intake of *Euglena gracilis* and vegetables exerts synergistic anti-obesity and anti-inflammatory effects by modulating the gut microbiota in diet-induced obese mice. *Nutrients*. **11 (1)**: 204.

Olsson, J., Forkman, T., Gentili, F. G., Zambrano, J., Schwede, S., Thorin, E., & Nehrenheim, E. (2018). Anaerobic co-digestion of sludge and microalgae grown in municipal wastewater—a feasibility study. *Water Science and Technology*. **77 (3)**: 682 - 694.

Ono, K., Kawanaka, Y., Izumi, Y., Inui, H., Miyatake, K., Kitaoka, S., & Nakano, Y. (1995). Mitochondrial alcohol dehydrogenase from ethanol-grown *Euglena gracilis*. *The Journal of Biochemistry*. **117 (6)**: 1178 - 1182.

Ono, K., Kondo, M., Osafune, T., Miyatake, K., Inui, H., Kitaoka, S., Nishimura, M. & Nakano, Y. (2003). Presence of glyoxylate cycle enzymes in the mitochondria of *Euglena gracilis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **50 (2)**: 92 - 96.

Ooi, V., & Liu, F. (2000). Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Current medicinal chemistry*. **7 (7)**: 715 - 729.

Osumi, M. (1998). The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron*. **29 (2 - 3)**: 207 - 233.

Padermshoke, A., Ogawa, T., Nishio, K., Nakazawa, M., Nakamoto, M., Okazawa, A., Kanaya, S., Arita, M. & Ohta, D. (2016). Critical involvement of environmental carbon dioxide fixation to drive wax ester fermentation in *Euglena*. *Plos one*. **11 (9)**: 1 - 16.

Pande, S., Khan R. & Venkitasubramanian, T. (1963). Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Analytical Biochemistry*. **6**: 415 - 423.

Park, J., Jin, H. F., Lim, B. R., Park, K. Y., & Lee, K. (2010). Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. *Bioresource technology*. **101 (22)**: 8649 - 8657.

- Perez-Garcia, O. & Bashan. (2015). Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic Culturing for Bio-refining: From Metabolic Routes to Techno-economics. In: A. Prokop, R. K. Bajpai & M. E. Zappi (Eds). *Algal Biorefineries* (Vol. 2). Springer.
- Pittman, J. K., Dean, A. P., & Osundeko, O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource technology*. **102 (1)**: 17 - 25.
- Price, C., & Carell, E. (1964). Control by iron of chlorophyll formation and growth in *Euglena gracilis*. *Plant physiology*. **39 (5)**: 862 - 868.
- Regnault, A., Piton, F., & Calvayrac, R. (1990). Growth, proteins and chlorophyll in *Euglena* adapted to various C/N balances. *Phytochemistry*. **29 (12)**: 3711 - 3715.
- Regnault, A., Chervin, D., Chammai, A., Piton, F., Calvayrac, R., & Mazliak, P. (1995). Lipid composition of *Euglena gracilis* in relation to carbon-nitrogen balance. *Phytochemistry*. **40 (3)**: 725 - 733.
- Reynolds, C. S., Huszar, V., Kruk, C., Naselli-Flores, L., & Melo, S. (2002). Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of plankton research*. **24 (5)**: 417 - 428.
- Reynolds, C. (2006). *The ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press. pp. 168 - 171.
- Rezić, T., Filipović, J., & Šantek, B. (2013). Photo-mixotrophic cultivation of algae *Euglena gracilis* for lipid production. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. **78 (1)**: 65 - 69.
- Richards, F. & Kletsch, R. (1964). *The spectrophotometric determination of ammonia and labile amino compounds in fresh and seawater by oxidation to nitrite*. Washington University of Seattle. Technical report No. 97. 17 p.
- Richter, P., Börnig, A., Streb, C., Ntefidou, M., Lebert, M., & Häder, D. (2003). Effects of increased salinity on gravitaxis in *Euglena gracilis*. *Journal of plant physiology*. **160 (6)**: 651 - 656.
- Riveros, P. A., & Dutrizac, J. E. (1997). The precipitation of hematite from ferric chloride media. *Hydrometallurgy*. **46 (1-2)**: 85 - 104.
- Rocchetta, I., Mazzuca, M., Conforti, V., Balzaretto, V., & de Molina, M. (2012). Chromium induced stress conditions in heterotrophic and auxotrophic strains of *Euglena gracilis*. *Ecotoxicology and environmental safety*. **84**: 147 - 154.
- Rodríguez-Zavala, J., Ortiz-Cruz, M., Mendoza-Hernández, G., & Moreno-Sánchez, R. (2010). Increased synthesis of  $\alpha$ -tocopherol, paramylon and tyrosine by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production. *Journal of applied microbiology*. **109 (6)**: 2160 - 2172.

- Rosas, L. (1998). *Efecto de micronutrientes en la transformación de ácidos grasos volátiles metano en un proceso anaerobio para tratar vinazas*. Tesis de maestría. Proyecto Académico Especialización, Maestría y Doctorado en Biotecnología, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 145 p.
- Ruíz, L., Rocchetta, I., Ferreira, V., & Conforti, V. (2004). Isolation, culture and characterization of a new strain of *Euglena gracilis*. *Phycological Research*. **52 (2)**: 168 - 173.
- Salama, E. S., Kurade, M. B., Abou-Shanab, R. A., El-Dalatony, M. M., Yang, I. S., Min, B., & Jeon, B. H. (2017). Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **79**: 1189 - 1211.
- Santiago-Martínez, M., Lira-Silva, E., Encalada, R., Pineda, E., Gallardo-Pérez, J., Zepeda-Rodríguez, A., Moreno-Sánchez, R., Saavedra, E., & Jasso-Chávez, R. (2015). Cadmium removal by *Euglena gracilis* is enhanced under anaerobic growth conditions. *Journal of hazardous materials*. **288**: 104 - 112.
- Torres, J. L. S., Atteia, A., Claros, M. G., & González-Halphen, D. (2003). Cytochrome f and subunit IV, two essential components of the photosynthetic bf complex typically encoded in the chloroplast genome, are nucleus-encoded in *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. **1604 (3)**: 180-189.
- Schiff, J. A., & Schwartzbach, S. D. (1982). Photocontrol of chloroplast development in *Euglena*. In: Buetow, D.E. (ed). *The Biology of Euglena*, Vol. III. Academic Press. New York pp. 313 - 348.
- Schneider, T., & Betz, A. (1985). Waxmonoester fermentation in *Euglena gracilis* T. Factors favouring the synthesis of odd-numbered fatty acids and alcohols. *Planta*. **166 (1)**: 67 - 73.
- Schalkwijk, C., & Stehouwer, C. (2020). Methylglyoxal, a highly reactive dicarbonyl compound, in diabetes, its vascular complications, and other age-related diseases. *Physiological Reviews*. **100 (1)**: 407 - 461.
- Schröder, I., Johnson, E., & De Vries, S. (2003). Microbial ferric iron reductases. *FEMS microbiology reviews*. **27 (2-3)**: 427 - 447.
- Schwartzbach, S. D. (2017). Photo and nutritional regulation of *Euglena* organelle development. In: Schwartzbach, S., & Shigeoka, S. (eds). *Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 979. Springer International Publishing. pp. 159 - 182.
- Schwelitz, F., Cisneros, P., & Jagiello, J. (1978). The effect of glucose on the biochemical and ultrastructural characteristics of developing *Euglena* chloroplasts. *The Journal of protozoology*. **25 (3)**: 398 - 403.

Singh, S. P., & Singh, P. (2015). Effect of temperature and light on the growth of algae species: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*. **50**: 431 - 444.

Sugiyama, A., Suzuki, K., Mitra, S., Arashida, R., Yoshida, E., Nakano, R., Yabuta, Y. & Takeuchi, T. (2009). Hepatoprotective effects of paramylon, a  $\beta$ -1,3-D-glucan isolated from *Euglena gracilis* Z, on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Journal of Veterinary Medical Science*. **71 (7)**: 885 - 890.

Sugiyama, A., Hata, S., Suzuki, K., Yoshida, E., Nakano, R., Mitra, S., Arashida, R., Asayama, Y., Yabuta, Y. & Takeuchi, T. (2010). Oral administration of paramylon, a  $\beta$ -1,3-D-glucan isolated from *Euglena gracilis* Z inhibits development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Journal of Veterinary Medical Science*. **72 (6)**: 756 - 663.

Sutak, R., Botbol, H., Blaiseau, P. L., Léger, T., Bouget, F. Y., Camadro, J. M., & Lesuisse, E. (2012). A comparative study of iron uptake mechanisms in marine microalgae: iron binding at the cell surface is a critical step. *Plant physiology*. **160 (4)**: 2271 - 2284.

Suzuki, K. (2017). Large-scale cultivation of *Euglena*. In: Schwartzbach, S. D & Shigeoka, S. (eds). *Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 979. Springer International Publishing. pp. 285 - 293.

Takeyama, H., Kanamaru, A., Yoshino, Y., Kakuta, H., Kawamura, Y., & Matsunaga, T. (1997). Production of antioxidant vitamins,  $\beta$ -carotene, vitamin C, and vitamin E, by two-step culture of *Euglena gracilis* Z. *Biotechnology and bioengineering*. **53 (2)**: 185 - 190.

Tamaki, S., Nishino, K., Ogawa, T., Maruta, T., Sawa, Y., Arakawa, K., & Ishikawa, T. (2019). Comparative proteomic analysis of mitochondria isolated from *Euglena gracilis* under aerobic and hypoxic conditions. *PloS one*. **14 (12)**: e0227226.

Tchobanoglous, G., Stensel, H., Tsuchihashi, R., & Burton, F. (2014). *Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery*. 5th International edn.

Ting, H., Haifeng, L., Shanshan, M., Zhang, Y., Zhidan, L., & Na, D. (2017). Progress in microalgae cultivation photobioreactors and applications in wastewater treatment: A review. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*. **10 (1)**: 1-29.

Triemer, R. E. & Zakryś, B. (2015). Photosynthetic Euglenoids. In: Wehr, J. D., Sheath, R. G., & Kocielek, J. P. (Eds.). *Freshwater algae of North America: ecology and classification*. Elsevier. Second Edition. pp 383 - 409.

Tripathy, B., & Dalal, V. (2013). Modulation of chlorophyll biosynthesis by environmental cues. In: Bisbal, B., Krupinska, K. & Biswal, U. (Eds). *Plastid*

*Development in Leaves during Growth and Senescence*. Springer, Dordrecht. Volume 36. pp. 601 - 639.

Tschiersch, H., & Ohmann, E. (1993). Photoinhibition in *Euglena gracilis*: involvement of reactive oxygen species. *Planta*. **191 (3)**: 316 - 323.

Toledo-Cervantes, A., Morales, M., Novelo, E., & Revah, S. (2013). Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. *Bioresource Technology*. **130**: 652 - 658.

Tolivia, A. (2014). *Prospección biotecnológica de cultivos de Euglena gracilis (Euglenozoa)*. Tesis de Doctorado. Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina. 299 p.

Tomita, Y., Yoshioka, K., Iijima, H., Nakashima, A., Iwata, O., Suzuki, K., Hasunuma, T., Kondo, A., Hirai, M. & Osanai, T. (2016). Succinate and lactate production from *Euglena gracilis* during dark, anaerobic conditions. *Frontiers in microbiology*. **7**: 1 - 8.

Tomita, Y., Takeya, M., Suzuki, K., Nitta, N., Higuchi, C., Marukawa, Y., & Osanai, T. (2019). Amino acid excretion from *Euglena gracilis* cells in dark and anaerobic conditions. *Algal Research*. **37**: 169 - 177.

Tossavainen, M., Ilyass, U., Ollilainen, V., Valkonen, K., Ojala, A., & Romantschuk, M. (2019). Influence of long term nitrogen limitation on lipid, protein and pigment production of *Euglena gracilis* in photoheterotrophic cultures. *PeerJ*. **7**: e6624

Tucci, S., Vacula, R., Krajcovic, J., Proksch, P., & Martin, W. (2010). Variability of wax ester fermentation in natural and bleached *Euglena gracilis* strains in response to oxygen and the elongase inhibitor flufenacet. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **57 (1)**: 63 - 69.

Turon, V., Baroukh, C., Trably, E., Latriille, E., Fouilland, E., & Steyer, J. P. (2015). Use of fermentative metabolites for heterotrophic microalgae growth: Yields and kinetics. *Bioresource technology*. **175**: 342 - 349.

Uribe, A., & Moreno-Sánchez, R. (1992). Energy-dependent reactions supported by several substrates in coupled *Euglena gracilis* mitochondria. *Plant Science*. **86 (1)**: 21 - 32.

Vannini, G. (1983). Degeneration and regeneration of chloroplasts in *Euglena gracilis* grown in the presence of acetate: ultrastructural evidence. *Journal of cell science*. **61 (1)**: 413 - 422.

Vismara, R., Barsanti, L., Lupetti, P., Passarelli, V., Mercati, D., Dallai, R., & Gualtieri, P. (2000). Ultrastructure of the pellicle of *Euglena gracilis*. *Tissue and Cell*. **32 (6)**: 451 - 456.

- Waddell, W. (1956). A simple ultraviolet spectrophotometric method for the determination of protein. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. **48 (2)**: 311 - 314.
- Wainaina, S., Lukitawesa, K. A. M., & Taherzadeh, M. J. (2019). Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: a critical review. *Bioengineered*. 10 (1): 437 - 458.
- Wang, Y., Seppänen, T., Rischer, H., & Wiebe, M. (2018). *Euglena gracilis* growth and cell composition under different temperature, light and trophic conditions. *PLoS One*. **13 (4)**: e0195329.
- Watanabe, F., Abe, K., Tamura, Y., & Nakano, Y. (1996). Adenosylcobalamin-dependent methylmalonyl-CoA mutase isozymes in the photosynthetic protozoon *Euglena gracilis* Z. *Microbiology*. 142 (9): 2631 - 2634.
- Wilson, B., & Levedahl, B. (1964). Synthetic and division rates of *Euglena gracilis* grown in batch cultures. *Experimental cell research*. **35 (1)**: 69 - 76.
- Wirth, R., Kovács, E., Maróti, G., Bagi, Z., Rákhely, G., & Kovács, K. (2012). Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnology for biofuels*. **5 (1)**: 41.
- Wu, M., Li, J., Qin, H., Lei, A., Zhu, H., Hu, Z., & Wang, J. (2020). Pre-concentration of microalga *Euglena gracilis* by alkalescent pH treatment and flocculation mechanism of Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, and derivatives. *Biotechnology for Biofuels*. **13**: 1 - 13.
- Wyllie, S., & Fairlamb, A. (2011). Methylglyoxal metabolism in trypanosomes and leishmania. In: David, J. (Ed). *Cell Biology of Glyoxalase in Microbial Systems and Human Disease*. Seminars in Cell & Developmental Biology. Academic Press. Vol. 22, No. 3. pp. 271 - 277.
- Yang, K., Yu, Y., & Hwang, S. (2003). Selective optimization in thermophilic acidogenesis of cheese-whey wastewater to acetic and butyric acids: partial acidification and methanation. *Water Research*. **37 (10)**: 2467 - 2477.
- Yamamoto, F., Castillo, S., & Gatlin III, D. M. (2020). Immunomodulatory effects of β-glucans derived from *Euglena gracilis* or *Saccharomyces cerevisiae* for hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*). *Aquaculture Research*. **51 (3)**: 1211 - 1221.
- Yokota, A., Hosotani, K., & Kitaoka, S. (1982). Mechanism of metabolic regulation in photoassimilation of propionate in *Euglena gracilis* z. *Archives of biochemistry and biophysics*. **213 (2)**: 530 - 537.
- Zimorski, V., Rauch, C., van Hellemond, J., Tielens, A., & Martin, W. (2017). The mitochondrion of *Euglena gracilis*. In: Schwartzbach, S., & Shigeoka, S. (eds).

*Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 979. Springer International Publishing. pp. 19 - 37.

Zuliani, L., Frison, N., Jelic, A., Fatone, F., Bolzonella, D., & Ballottari, M. (2016). Microalgae cultivation on anaerobic digestate of municipal wastewater, sewage sludge and agro-waste. *International journal of molecular sciences*. **17 (10)**: 1692.

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & Van't Riet, K. J. A. E. M. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and environmental microbiology*. **56 (6)**: 1875 – 1881.

# Anexo 1. Análisis estadísticos para el experimento de aclimatación celular a cultivos con acetato-citrato

## 1.1 Ajustes de las cinéticas de crecimiento de la segunda resiembra

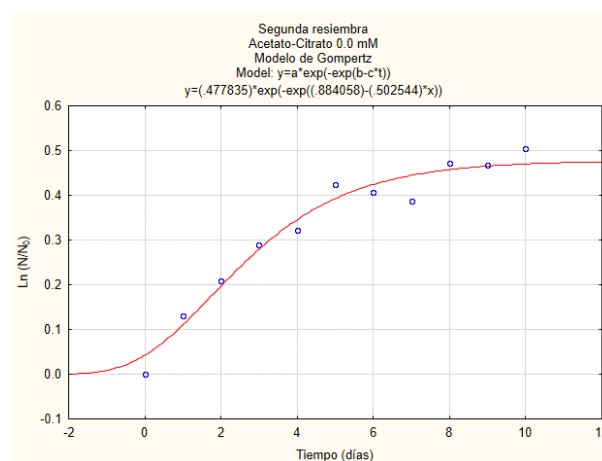
Se muestran los resultados obtenidos para los ajustes de las cinéticas de crecimiento al modelo de Gompertz con el programa STATISTICA 10 para las cinéticas de crecimiento **de la segunda resiembra**.

### 1) Cultivo acetato-citrato 0.0 mM (segunda resiembra).

a) Estimación de los parámetros a, b y c para acetato-citrato 0.0 mM. Para los tres parámetros  $p < 0.05$ , por lo cual, las estimaciones son estadísticamente significativas.

Model is: $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$ (Ajustes de cinéticas segunda resiembra Acetato-Citrato 0.0 mM) Dep. Var. : y Level of confidence: 95.0% (alpha=0.050)						
	Estimate	Standard - error	t-value - df = 8	p-value	Lo. Conf - Limit	Up. Conf - Limit
<b>a</b>	1.094453	0.054482	20.08838	0.000000	0.968818	1.220089
<b>b</b>	0.893424	0.186737	4.78440	0.001383	0.462808	1.324040
<b>c</b>	0.497804	0.092769	5.36605	0.000673	0.283878	0.711730

b) Gráfica de la curva ajustada del modelo de Gompertz a los datos de la cinética de crecimiento del cultivo acetato-citrato 0.0 mM.



c) Análisis de varianza para el ajuste al modelo de Gompertz del cultivo con acetato-citrato 0.0 mM. Dado que  $p < 0.05$ , el ajuste es estadísticamente significativo.



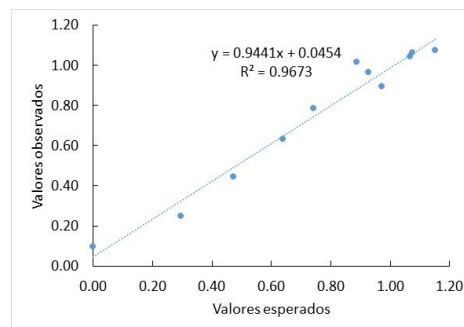
Model is:  $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$  (Ajustes de cinéticas segunda resiembra Acetato-Citrato 0.0 mM)  
Dep. Var. : y

	1 - Sum of Squares	2 - DF	3 - Mean Squares	4 - F-value	5 - p-value
<b>Regression</b>	7.432355	3.00000	2.477452	447.9589	3.01 E-09
<b>Residual</b>	0.044244	8.00000	0.005531		
<b>Total</b>	7.476599	11.00000			
<b>Corrected Total</b>	1.325156	10.00000			
<b>Regression vs. Corrected Total</b>	7.432355	3.00000	2.477452	18.6956	0.000201

d) Datos de valores observados y valores estimados con base en el modelo de Gompertz. Se muestra también el ajuste lineal y el valor de  $R^2$ .

Model is:  $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$  (Ajustes de cinéticas segunda resiembra Acetato-Citrato 0.0 mM)  
Dep. Var. : y

	Observed	Predicted	Residuals
1	0.000000	0.095062	-0.095062
2	0.294847	0.247821	0.047027
3	0.473112	0.443699	0.029413
4	0.637863	0.632192	0.005672
5	0.740639	0.783996	-0.043357
6	0.972103	0.893568	0.078535
7	0.927069	0.967527	-0.040458
8	0.887510	1.015443	-0.127933
9	1.067602	1.045722	0.021880
10	1.075118	1.064567	0.010551
11	1.150062	1.076188	0.073874



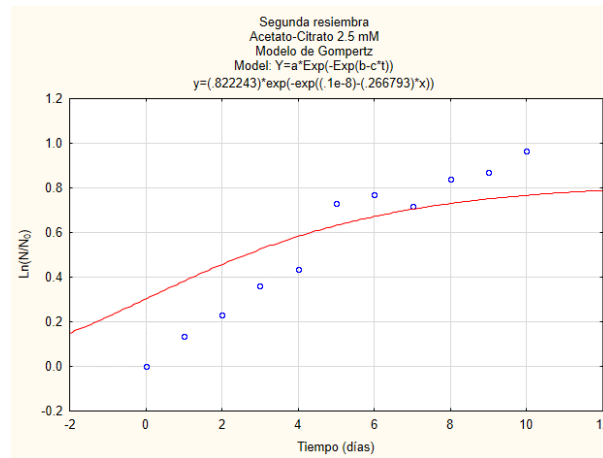
## 2) Cultivo acetato-citrato 2.5 mM (segunda resiembra).

a) Estimación de los parámetros a, b y c para acetato-citrato 2.5 mM. Para los tres parámetros  $p < 0.05$ , por lo cual, las estimaciones son estadísticamente significativas.

Model is:  $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$  (Ajustes de cinéticas segunda resiembra Acetato-Citrato 2.5 mM)  
Dep. Var. : y Level of confidence: 95.0% (alpha=0.050)

	Estimate	Standard - error	t-value - df = 8	p-value	Lo. Conf - Limit	Up. Conf - Limit
<b>a</b>	2.246829	0.171902	13.07041	0.000001	1.850423	2.643236
<b>b</b>	1.201131	0.207311	5.79387	0.000408	0.723072	1.679190
<b>c</b>	0.403654	0.081490	4.95344	0.001116	0.215739	0.591569

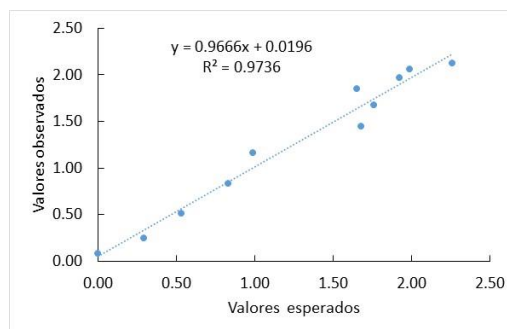
b) Gráfica de la curva ajustada del modelo de Gompertz a los datos de la cinética de crecimiento del cultivo acetato-citrato 2.5 mM.



c) Análisis de varianza para el ajuste al modelo de Gompertz del cultivo con acetato-citrato 2.5 mM. Dado que  $p < 0.05$ , el ajuste es estadísticamente significativo.

Model is: $y = a \cdot \text{exp}(-\text{exp}(b \cdot c^t))$ (Ajustes de cinéticas segunda resiembra Acetato-Citrato 2.5 mM)					
Dep. Var. : y					
	1 - Sum of Squares	2 - DF	3 - Mean Squares	4 - F-value	5 - p-value
<b>Regression</b>	23.26115	3.00000	7.753716	374.1600	6.10 E-09
<b>Residual</b>	0.16578	8.00000	0.020723		
<b>Total</b>	23.42693	11.00000			
<b>Corrected Total</b>	5.86167	10.00000			
<b>Regression vs. Corrected Total</b>	23.26115	3.00000	7.753716	13.2278	0.000816

d) Datos de valores observados y valores estimados con base en el modelo de Gompertz. Se muestra también el ajuste lineal y el valor de  $R^2$ .



Model is:  $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$  (Ajustes de cinéticas segunda resiembra Acetato-Citrato 2.5 mM)  
Dep. Var. : y

	Observed	Predicted	Residuals
1	0.000000	0.080915	-0.080915
2	0.290257	0.244043	0.046214
3	0.530340	0.510116	0.020224
4	0.830958	0.834688	-0.003730
5	0.989721	1.159720	-0.169998
6	1.679935	1.444591	0.235344
7	1.759793	1.672841	0.086952
8	1.652177	1.845037	-0.192860
9	1.921017	1.969805	-0.048788
10	1.985707	2.057800	-0.072093
11	2.260376	2.118748	0.141628

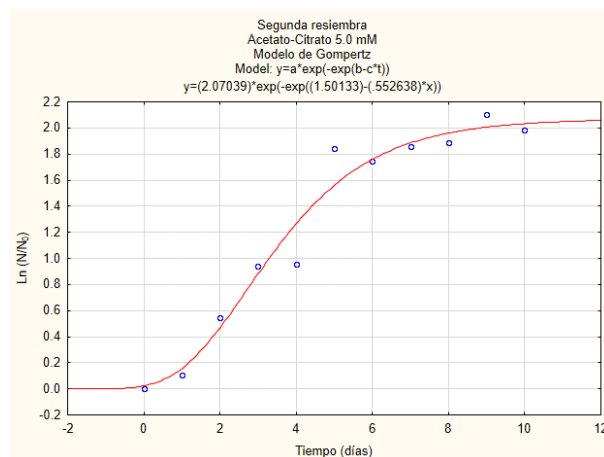
### 3) Cultivo acetato-citrato 5.0 mM (segunda resiembra).

a) Estimación de los parámetros a, b y c para acetato-citrato 5.0 mM correspondientes al modelo Gompertz. Para los tres parámetros se obtuvieron valores de  $p < 0.05$ , por lo cual, las estimaciones son estadísticamente significativas para cada uno de los coeficientes del modelo Gompertz.

Model is:  $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$  (Ajustes de cinéticas segunda resiembra Acetato-Citrato 5.0 mM)  
Dep. Var. : y Level of confidence: 95.0% (alpha=0.050)

	Estimate	Standard - error	t-value - df = 8	p-value	Lo. Conf - Limit	Up. Conf - Limit
a	2.070395	0.123954	16.70299	0.000000	1.784557	2.356232
b	1.501327	0.329174	4.56090	0.001848	0.742251	2.260404
c	0.552638	0.120410	4.58964	0.001779	0.274973	0.830304

b) Gráfica de la curva ajustada del modelo de Gompertz a los datos de la cinética de crecimiento del cultivo acetato-citrato 5.0 mM.

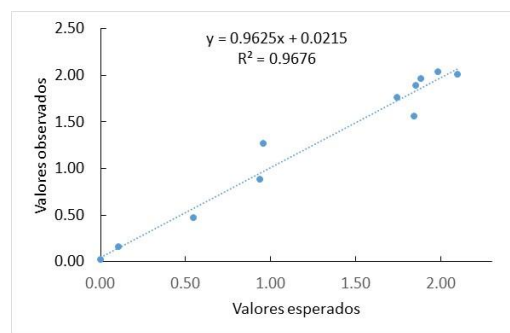


c) Análisis de varianza para el ajuste al modelo de Gompertz del cultivo con acetato-citrato 5.0 mM. Dado que  $p < 0.05$ , el ajuste es estadísticamente significativo.

Model is: $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$ (Ajustes de cinéticas segunda resiembra Acetato-Citrato 5.0 mM) Dep. Var. : y					
	1 - Sum of Squares	2 - DF	3 - Mean Squares	4 - F-value	5 - p-value
<b>Regression</b>	23.71622	3.00000	7.905408	306.2319	1.30E-09
<b>Residual</b>	0.20652	8.00000	0.025815		
<b>Total</b>	23.92274	11.00000			
<b>Corrected Total</b>	6.17025	10.00000			
<b>Regression vs. Corrected Total</b>	23.71622	3.00000	7.905408	12.8121	0.000924

d) Datos de valores observados y valores estimados con base en el modelo de Gompertz. Se muestra también el ajuste lineal y el valor de  $R^2$ .

Model is: $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$ (Ajustes de cinéticas segunda resiembra Acetato-Citrato 5.0 mM) Dep. Var. : Y			
	Observed	Predicted	Residuals
1	0.000000	0.023286	-0.023286
2	0.108807	0.156518	-0.047711
3	0.548043	0.468507	0.079536
4	0.939963	0.880455	0.059509
5	0.959386	1.265813	-0.306427
6	1.845909	1.559888	0.286022
7	1.742574	1.759132	-0.016557
8	1.854610	1.885119	-0.030509
9	1.886059	1.961665	-0.075606
10	2.102010	2.007113	0.094897
11	1.986809	2.033741	-0.046931



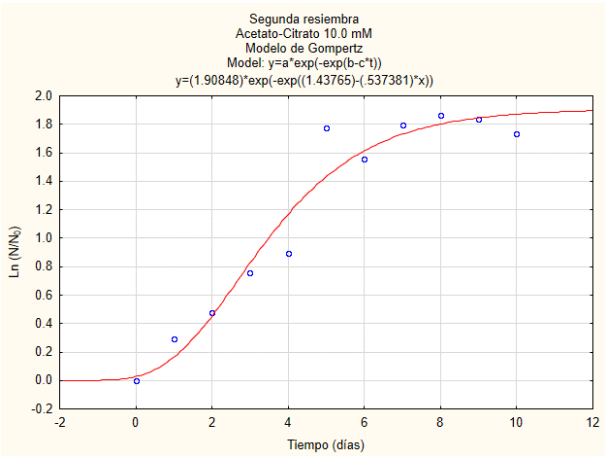
#### 4) Cultivo acetato-citrato 10.0 mM (segunda resiembra).

a) Estimación de los parámetros a, b y c para acetato-citrato 10.0 mM. Para los tres parámetros  $p < 0.05$ , por lo cual, las estimaciones son estadísticamente significativas.

Model is:  $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$  (Ajustes de cinéticas segunda resiembra Acetato-Citrato 10.0 mM)  
 Dep. Var. : y Level of confidence: 95.0% (alpha=0.050)

	Estimate	Standard - error	t-value - df = 8	p-value	Lo. Conf - Limit	Up. Conf - Limit
<b>a</b>	1.908483	0.137466	13.88335	0.000001	1.591487	2.225480
<b>b</b>	1.437650	0.369333	3.89256	0.004593	0.585967	2.289332
<b>c</b>	0.537381	0.137807	3.89950	0.004548	0.219596	0.855165

b) Gráfica de la curva ajustada del modelo de Gompertz a los datos de la cinética de crecimiento del cultivo acetato-citrato 10.0 mM.



c) Análisis de varianza para el ajuste al modelo de Gompertz del cultivo con acetato-citrato 10.0 mM. Dado que  $p < 0.05$ , el ajuste es estadísticamente significativo.

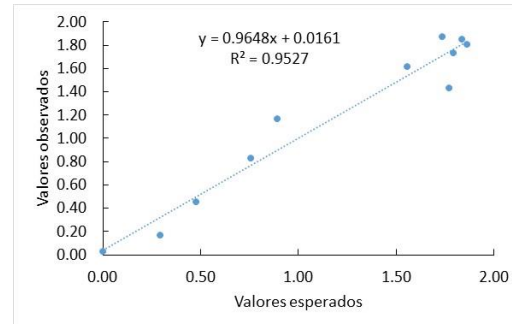
Model is:  $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$  (Ajustes de cinéticas segunda resiembra Acetato-Citrato 10.0 mM)  
 Dep. Var. : y

	1 - Sum of Squares	2 - DF	3 - Mean Squares	4 - F-value	5 - p-value
<b>Regression</b>	20.08807	3.00000	6.696024	220.3855	5.00E-08
<b>Residual</b>	0.24307	8.00000	0.030383		
<b>Total</b>	20.33114	11.00000			
<b>Corrected Total</b>	5.00370	10.00000			
<b>Regression vs. Corrected Total</b>	20.08807	3.00000	6.696024	13.3821	0.000779

d) Datos de valores observados y valores estimados con base en el modelo de Gompertz. Se muestra también el ajuste lineal y el valor de  $R^2$ .

Model is:  $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$  (Ajustes de cinéticas segunda resiembra Acetato-Citrato 10.0 mM)  
 Dep. Var. : y

	Observed	Predicted	Residuals
1	0.000000	0.028312	-0.028312
2	0.292707	0.163008	0.129699
3	0.480261	0.453316	0.026945
4	0.759704	0.824008	-0.064304
5	0.893731	1.168341	-0.274610
6	1.772968	1.432742	0.340226
7	1.556874	1.614113	-0.057240
8	1.794416	1.730532	0.063883
9	1.862116	1.802402	0.059715
10	1.835950	1.845767	-0.009817
11	1.735948	1.871585	-0.135637



**5) ANOVA de un criterio para comparar las tasas de crecimiento específico ( $\mu_{max}$ ) de los cuatro cultivos de la segunda resiembra.**

a) Prueba de Levene de homogeneidad de varianzas. Esta prueba evalúa la igualdad de varianzas entre los diferentes tratamientos de interés al poner a prueba el siguiente conjunto de hipótesis:

$$H_0: \sigma_1 = \sigma_2 = \sigma_3 = \dots = \sigma_k$$

$H_1$ : Las varianzas no son homogéneas.

Levene's Test for Homogeneity of Variances (Segunda resiembra (tasas de crecimiento)) Effect: "Tipo de cultivo" Degrees of freedom for all F's: 3, 8				
	MS – Effect	MS - Error	F	P
$\mu_{max}$	0.000516	0.000285	1.811184	0.223068

Dado que  $p > 0.05$  para  $\mu_{max}$ , entonces, no se rechaza  $H_0$ , por lo tanto, se puede considerar que los datos provienen de un muestreo aleatorio y las poblaciones presentan varianzas homogéneas.

b) El ANOVA de un criterio pone a prueba el siguiente conjunto de hipótesis para las medias poblacionales de los diferentes tratamientos:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k$$

$H_1$ : Al menos dos medias poblacionales son diferentes.

Univariate Tests of Significance for $\mu_{\max}$ (Segunda resiembra (tasas de crecimiento)) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	1.338767	1	1.338767	854.6673	2.0298E-09
Tratamientos	0.080897	3	0.026966	17.2148	0.000752
Error	0.012531	8	0.001566		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamientos*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha variable.

c) Prueba Post-Hoc de Tukey. La prueba de Tukey mostró que los tratamientos con acetato-citrato 2.5, 5.0 y 10.0 mM fueron significativamente diferentes del tratamiento control con acetato-citrato 0.0 mM en cuanto a sus tasas de crecimiento específico. Por su parte, entre los cultivos con acetato-citrato 2.5, 5.0 y 10.0 mM no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tukey HSD test; variable $\mu_{\max}$ (Segunda resiembra (tasas de crecimiento)) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00157, df = 8.0000					
	Tratamientos	{1} .20196	{2} .33535	{3} .42154	{4} .37721
1	Acetato-Citrato 0.0 mM		0.014173	0.000803	0.002936
2	Acetato-Citrato 2.5 mM	0.014173		0.106470	0.590430
3	Acetato-Citrato 5.0 mM	0.000803	0.106470		0.548300
4	Acetato-Citrato 10.0 mM	0.002936	0.590430	0.548300	

## 6) ANOVA de un criterio para comparar los tiempos de duplicación ( $t_d$ ) de los cuatro cultivos de la segunda resiembra.

a) Prueba de Levene de homogeneidad de varianzas. Esta prueba evalúa la igualdad de varianzas entre los diferentes tratamientos de interés al poner a prueba el siguiente conjunto de hipótesis:

$$H_0: \sigma_1 = \sigma_2 = \sigma_3 = \dots = \sigma_k$$

$H_1$ : Las varianzas no son homogéneas.

Levene's Test for Homogeneity of Variances (Segunda resiembra (tiempo de duplicación)) Effect: "Tipo de Cultivo" Degrees of freedom for all F's: 3, 8				
	MS - Effect	MS - Error	F	P
$t_d$	0.017846	0.016822	1.060820	0.417956

Dado que  $p > 0.05$  para  $t_d$ , entonces, no se rechaza  $H_0$ , por lo tanto, se puede considerar que los datos provienen de un muestreo aleatorio y las poblaciones presentan varianzas homogéneas.

b) El ANOVA de un criterio pone a prueba el siguiente conjunto de hipótesis para las medias poblacionales de los diferentes tratamientos:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k$$

$H_1$ : Al menos dos medias poblacionales son diferentes.

Univariate Tests of Significance for $t_d$ (Segunda resiembra (Tiempo de duplicación)) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	61.12655	1	61.12655	857.6705	2.0017E-09
Tratamientos	6.06789	3	2.02263	28.3797	0.000129
Error	0.57016	8	0.07127		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamientos*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha variable.

c) Prueba Post-Hoc de Tukey. La prueba de Tukey mostró que los tratamientos con acetato-citrato 2.5, 5.0 y 10.0 mM fueron significativamente diferentes del tratamiento control con acetato-citrato 0.0 mM en cuanto a sus tiempos de duplicación. Por su parte, entre los cultivos con acetato-citrato 2.5, 5.0 y 10.0 mM no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tukey HSD test; variable $t_d$ (Segunda resiembra (tiempo de duplicación)) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .07127, df = 8.0000					
	Tratamientos	{1} - 3.4614	{2} - 2.0741	{3} - 1.6548	{4} - 1.8375
1	Acetato-Citrato 0.0 mM		0.001147	0.000350	0.000517
2	Acetato-Citrato 2.5 mM	0.001147		0.291371	0.707641
3	Acetato-Citrato 5.0 mM	0.000350	0.291371		0.835246
4	Acetato-Citrato 10.0 mM	0.000517	0.707641	0.835246	

## 7) ANOVA de un criterio para comparar la concentración celular al décimo día de crecimiento de los cuatro cultivos de la segunda resiembra.

a) Prueba de Levene de homogeneidad de varianzas. Esta prueba evalúa la igualdad de varianzas entre los diferentes tratamientos de interés al poner a prueba el siguiente conjunto de hipótesis:

$$H_0: \sigma_1 = \sigma_2 = \sigma_3 = \dots = \sigma_k$$

$H_1$ : Las varianzas no son homogéneas.

Levene's Test for Homogeneity of Variances (Segunda resiembra (concentración celular)) Effect: "Tipo de Cultivo" Degrees of freedom for all F's: 3, 8				
	MS - Effect	MS - Error	F	P
Concentración celular	0.000948	0.004879	0.194344	0.897345



Dado que  $p > 0.05$  para *concentración celular*, entonces, no se rechaza  $H_0$ , por lo tanto, se puede considerar que los datos provienen de un muestreo aleatorio y las poblaciones presentan varianzas homogéneas.

b) El ANOVA de un criterio pone a prueba el siguiente conjunto de hipótesis para las medias poblacionales de los diferentes tratamientos:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k$$

$H_1$ : Al menos dos medias poblacionales son diferentes.

Univariate Tests of Significance for Concentración celular (Segunda resiembra (concentración celular)) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of – Freedom	MS	F	P
Intercept	20.02083	1	20.02083	957.5528	1.2928E-09
Tratamientos	2.61930	3	0.87310	41.7585	0.000031
Error	0.16727	8	0.02091		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamientos*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha variable.

c) Prueba Post-Hoc de Tukey. La prueba de Tukey mostró que los tratamientos con acetato-citrato 2.5, 5.0 y 10.0 mM fueron significativamente diferentes del control con acetato-citrato 0.0 mM. A su vez, de los cultivos con citrato, el cultivo con acetato-citrato 2.5 mM es significativamente diferente de los cultivos con acetato-citrato 5.0 mM y acetato-citrato 10.0 mM. De estos dos últimos cultivos no se identificaron diferencias significativas.

Tukey HSD test; variable Concentración celular (Segunda resiembra (Concentración celular)) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .02091, df = 8.0000					
	Tratamientos	{1} - .64000	{2} - 1.9200	{3} - 1.4667	{4} - 1.1400
1	Acetato-Citrato 0.0 mM		0.000238	0.000691	0.012316
2	Acetato-Citrato 2.5 mM	0.000238		0.020794	0.000931
3	Acetato-Citrato 5.0 mM	0.000691	0.020794		0.092527
4	Acetato-Citrato 10.0 mM	0.012316	0.000931	0.092527	

## **1.2 Ajustes de las cinéticas de crecimiento de la cuarta resiembra**

Se muestran los resultados obtenidos de los ajustes de las cinéticas de crecimiento al modelo Gompertz de una y de Gompertz de dos fases de acuerdo con el programa STATISTICA 10 para las cinéticas de crecimiento **de la cuarta resiembra**.

## 1) Cultivo acetato-citrato 0.0 mM (cuarta resiembra).

a) Estimación de los parámetros a, b y c para acetato-citrato 0.0 mM. Primero, se presentan los parámetros para el modelo de Gompertz de una fase. Para los tres parámetros  $p < 0.05$ , por lo cual, las estimaciones son estadísticamente significativas.

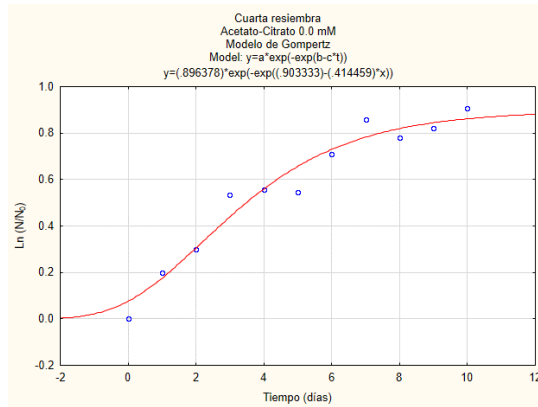
Model is: $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$ (Ajustes de cinéticas cuarta resiembra Acetato-Citrato 0.0 mM) Dep. Var. : y Level of confidence: 95.0% (alpha=0.050)						
	Estimate	Standard - error	t-value - df = 8	p-value	Lo. Conf - Limit	Up. Conf - Limit
<b>a</b>	0.896378	0.067964	13.18895	0.000001	0.739652	1.053105
<b>b</b>	0.903333	0.202120	4.46929	0.002085	0.437244	1.369422
<b>c</b>	0.414459	0.095631	4.33392	0.002499	0.193932	0.634985

Segundo, se presentan los parámetros para el modelo de Gompertz de dos fases. En este caso, sólo dos ( $a_1$  y  $a_2$ ) de los seis parámetros son estadísticamente significativos. Por lo tanto, se decidió descartar este modelo para el cultivo con acetato-citrato 0.0 mM.

Model is: $y=(a_1*\exp(-\exp(b_1-c_1*t))) + (a_2*\exp(-\exp(b_2-c_2*t)))$ (Ajustes de cinéticas cuarta resiembra Acetato-Citrato 0.0 mM) Dep. Var. : y Level of confidence: 95.0% (alpha=0.050)						
	Estimate	Standard - error	t-value - df = 5	p-value	Lo. Conf - Limit	Up. Conf - Limit
<b>a<sub>1</sub></b>	0.25547	0	3.459762	0.018047	0	0
<b>b<sub>1</sub></b>	87.28001	1684223	0.000052	0.999961	-4329346	4329521
<b>c<sub>1</sub></b>	14.61105	280704	0.000052	0.999960	-721558	721587
<b>a<sub>2</sub></b>	0.58833	0	8.820404	0.000311	0	1
<b>b<sub>2</sub></b>	1.19756	0	2.548434	0.051364	-0	2
<b>c<sub>2</sub></b>	0.94961	0	2.559238	0.050693	-0	2

De acuerdo con lo anterior, como el modelo de Gompertz de dos fases no es adecuado para los datos de este cultivo, se procedió a continuar con el análisis estadístico correspondiente al modelo de Gompertz de una fase.

b) Gráfica de la curva ajustada del modelo de Gompertz de una fase a los datos de la cinética de crecimiento del cultivo acetato-citrato 0.0 mM.



c) Análisis de varianza para el ajuste al modelo de Gompertz de una fase de acetato-citrato 0.0 mM. Como  $p < 0.05$ , el ajuste es estadísticamente significativo.

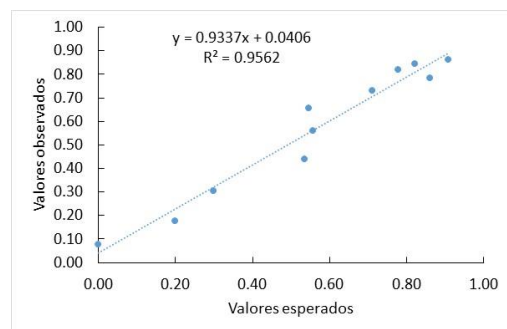
Model is:  $y = a * \exp(-\exp(b * c * t))$  (Ajustes de cinéticas cuarta resiembra Acetato-Citrato 0.0 mM)  
Dep. Var. : y

	1 - Sum of Squares	2 - DF	3 - Mean Squares	4 - F-value	5 - p-value
<b>Regression</b>	4.342685	3.00000	1.447562	301.4060	1.45056E-08
<b>Residual</b>	0.038422	8.00000	0.004803		
<b>Total</b>	4.381107	11.00000			
<b>Corrected Total</b>	0.864617	10.00000			
<b>Regression vs. Corrected Total</b>	4.342685	3.00000	1.447562	16.7422	0.000317

d) Datos de valores observados y valores estimados con base en el modelo de Gompertz de una fase. Se muestra también el ajuste lineal y el valor de  $R^2$ .

Model is:  $y = a * \exp(-\exp(b * c * t))$  (Ajustes de cinéticas cuarta resiembra Acetato-Citrato 0.0 mM) Dep. Var. : y

	Observed	Predicted	Residuals
1	0.000000	0.075986	-0.075986
2	0.198006	0.175543	0.022463
3	0.299647	0.305243	-0.005596
4	0.535946	0.439933	0.096012
5	0.557158	0.560102	-0.002944
6	0.546203	0.656993	-0.110790
7	0.711310	0.730034	-0.018724
8	0.860545	0.782693	0.077853
9	0.779735	0.819551	-0.039816
10	0.822781	0.844851	-0.022070
11	0.908106	0.861994	0.046112



## 2) Cultivo acetato-citrato 2.5 mM (cuarta resiembra).

a) Estimación de los parámetros a,b y c para acetato-citrato 2.5 mM. Primero, se presentan los parámetros para el modelo de Gompertz de una fase. Para los tres parámetros  $p < 0.05$ , por lo cual, las estimaciones son estadísticamente significativas.

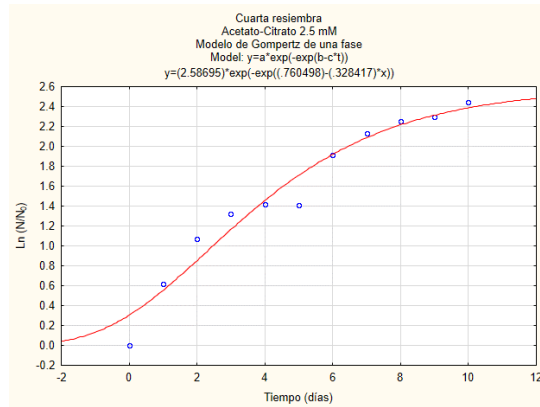
Model is: $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$ (Ajustes de cinéticas cuarta resiembra Acetato-Citrato 2.5 mM) Dep. Var. : y Level of confidence: 95.0% ( alpha=0.050)						
	Estimate	Standard - error	t-value - df = 8	p-value	Lo. Conf - Limit	Up. Conf - Limit
<b>a</b>	2.586949	0.262588	9.851729	0.000009	1.981420	3.192479
<b>b</b>	0.760498	0.157019	4.843361	0.001283	0.398413	1.122584
<b>c</b>	0.328417	0.082614	3.975311	0.004088	0.137908	0.518926

Segundo, se presentan los parámetros para el modelo de Gompertz de dos fases. En este caso, la estimación de los seis parámetros es estadísticamente significativa. Por lo tanto, este modelo también representa un buen ajuste para los datos del cultivo con acetato-citrato 2.5 mM de la cuarta resiembra.

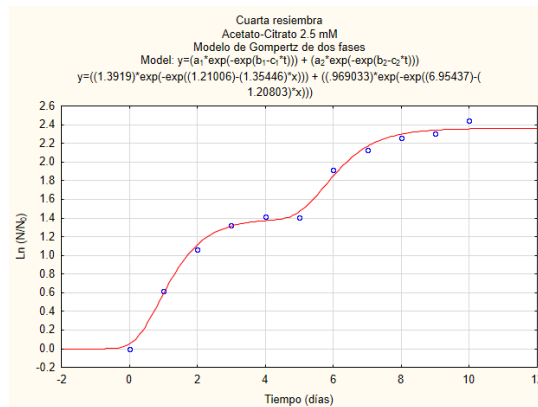
Model is: $y=(a_1*\exp(-\exp(b_1-c_1*t))) + (a_2*\exp(-\exp(b_2-c_2*t)))$ (Ajustes de cinéticas cuarta resiembra Acetato-Citrato 2.5 mM) Dep. Var. : y Level of confidence: 95.0% ( alpha=0.050)						
	Estimate	Standard - error	t-value - df = 5	p-value	Lo. Conf - Limit	Up. Conf - Limit
<b>a<sub>1</sub></b>	1.391897	0.074918	18.57903	0.000008	1.199315	1.58448
<b>b<sub>1</sub></b>	1.210062	0.323812	3.73693	0.013474	0.377677	2.04245
<b>c<sub>1</sub></b>	1.354459	0.320831	4.22172	0.008314	0.529736	2.17918
<b>a<sub>2</sub></b>	0.969033	0.101488	9.54828	0.000213	0.708151	1.22992
<b>b<sub>2</sub></b>	6.954373	2.122369	3.27670	0.022035	1.498649	12.41010
<b>c<sub>2</sub></b>	1.208027	0.354634	3.40641	0.019118	0.296412	2.11964

b) Gráficas de la curva ajustada. Dado que los datos del cultivo con acetato-citrato 2.5 mM se ajustaron significativamente a los modelos de Gompertz de una y dos fases, se realizaron las curvas ajustadas con base en ambos modelos.

Primero, se presenta la curva ajustada a la cinética de crecimiento del cultivo acetato-citrato 2.5 mM con base en el modelo de Gompertz de una fase.



Segundo, se presenta la curva ajustada a la cinética de crecimiento del cultivo acetato-citrato 2.5 mM con base en el modelo de Gompertz de dos fases.



c) Análisis de varianza para el cultivo con acetato-citrato 2.5 mM. Dado que los datos del cultivo con acetato-citrato 2.5 mM se ajustaron significativamente a los modelos de Gompertz de una y dos fases, se realizaron las ANOVAS para ambos modelos.

Primero, se muestra el ANOVA para el modelo de Gompertz de una fase. Dado que  $p < 0.05$ , el ajuste es estadísticamente significativo.

Model is:  $y = a \cdot \exp(-\exp(b - c \cdot t))$  (Ajustes de cinéticas cuarta resiembra Acetato-Citrato 2.5 mM)  
Dep. Var. : y

	1 - Sum of Squares	2 - DF	3 - Mean Squares	4 - F-value	5 - p-value
<b>Regression</b>	31.53602	3.00000	10.51201	312.4250	1.25821E-08
<b>Residual</b>	0.26917	8.00000	0.03365		
<b>Total</b>	31.80519	11.00000			
<b>Corrected Total</b>	5.90835	10.00000			
<b>Regression vs. Corrected Total</b>	31.53602	3.00000	10.51201	17.7918	0.000247

Segundo, se muestra el ANOVA para el modelo de Gompertz de dos fases. Dado que  $p < 0.05$ , el ajuste es estadísticamente significativo.

Model is:  $y=(a_1*\exp(-\exp(b_1-c_1*t))) + (a_2*\exp(-\exp(b_2-c_2*t)))$  (Ajustes de cinéticas cuarta resiembra Acetato-Citrato 2.5 mM) Dep. Var. : y

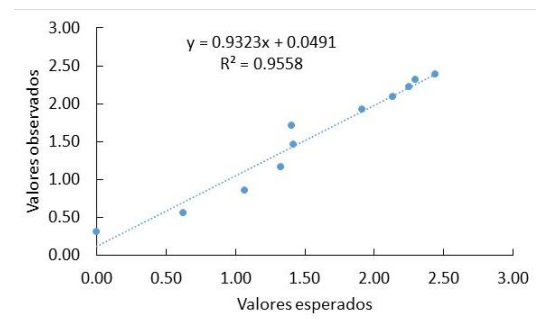
	1 - Sum of Squares	2 - DF	3 - Mean Squares	4 - F-value	5 - p-value
<b>Regression</b>	31.77707	6.00000	5.296178	941.6228	1.8285E-07
<b>Residual</b>	0.02812	5.00000	0.005625		
<b>Total</b>	31.80519	11.00000			
<b>Corrected Total</b>	5.90835	10.00000			
<b>Regression vs. Corrected Total</b>	31.77707	6.00000	5.296178	8.9639	0.001504

d) Datos de valores observados y valores estimados con base en los modelos de Gompertz de una y dos fases. Dado que ambos modelos de Gompertz han resultado significativos, se decidió evaluar el ajuste lineal de los valores observados vs valores estimados para los dos modelos.

Primero, se muestra el ajuste lineal y el valor de  $R^2$  para el modelo de Gompertz de una fase. El ajuste lineal es bastante bueno con un  $R^2 = 0.9558$ .

Model is:  $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$  (Ajustes de cinéticas cuarta resiembra Acetato-Citrato 2.5 mM) Dep. Var. : y

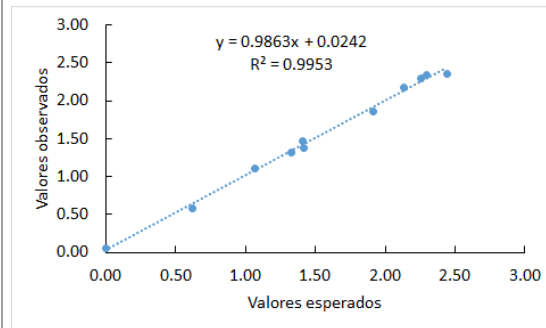
	Observed	Predicted	Residuals
1	0.000000	0.304567	-0.304567
2	0.621218	0.554338	0.066880
3	1.066394	0.853211	0.213184
4	1.325873	1.163888	0.161985
5	1.418480	1.455509	-0.037029
6	1.406020	1.709762	-0.303742
7	1.912003	1.919920	-0.007917
8	2.131074	2.087067	0.044008
9	2.254598	2.216363	0.038234
10	2.300233	2.314397	-0.014164
11	2.442059	2.387662	0.054397



Segundo, se muestra el ajuste lineal y el valor de  $R^2$  para el modelo de Gompertz de dos fases. La gráfica y el valor de  $R^2 = 0.9953$  muestran un mejor ajuste para el modelo de dos fases que de una fase.

Model is:  $y=(a_1*\exp(-\exp(b_1-c_1*t))) + (a_2*\exp(-\exp(b_2-c_2*t)))$  (Ajustes de cinéticas cuarta resiembra Acetato-Citrato 2.5 mM) Dep. Var. : y

	Observed	Predicted	Residuals
1	0.000000	0.048654	-0.048654
2	0.621218	0.585742	0.035476
3	1.066394	1.113248	-0.046854
4	1.325873	1.313920	0.011953
5	1.418480	1.371569	0.046911
6	1.406020	1.466515	-0.060495
7	1.912003	1.850353	0.061649
8	2.131074	2.167093	-0.036018
9	2.254598	2.298451	-0.043854
10	2.300233	2.341829	-0.041596
11	2.442059	2.355184	0.086874



### 3) Cultivo acetato-citrato 5.0 mM (cuarta resiembra).

a) Estimación de los parámetros a, b y c para acetato-citrato 5.0 mM. Primero, se presentan los parámetros para el modelo de Gompertz de una fase. Para los tres parámetros  $p < 0.05$ , por lo cual, las estimaciones son estadísticamente significativas.

Model is:  $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$  (Ajustes de cinéticas cuarta resiembra Acetato-Citrato 5.0 mM) Dep. Var. : y Level of confidence: 95.0% ( alpha=0.050)

	Estimate	Standard - error	t-value - df = 8	p-value	Lo. Conf - Limit	Up. Conf - Limit
a	2.778960	0.309778	8.970811	0.000019	2.064611	3.493310
b	0.830791	0.193475	4.294042	0.002637	0.384636	1.276946
c	0.343747	0.096531	3.560993	0.007390	0.121146	0.566349

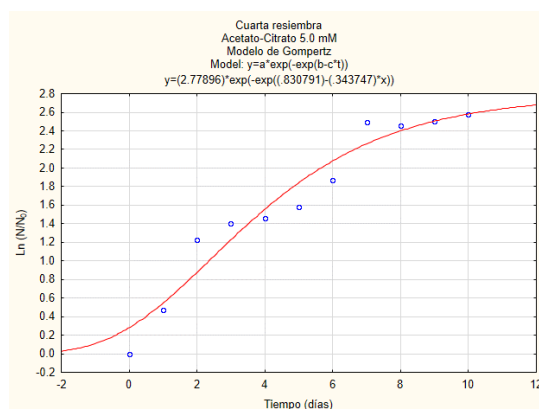
Segundo, se presentan los parámetros para el modelo de Gompertz de dos fases. En este caso, sólo cuatro ( $a_1$ ,  $a_2$ ,  $b_2$  y  $c_2$ ) de los seis parámetros son estadísticamente significativos. Por lo tanto, se decidió descartar este modelo para el cultivo con acetato-citrato 5.0 mM.

Model is:  $y=(a_1*\exp(-\exp(b_1-c_1*t))) + (a_2*\exp(-\exp(b_2-c_2*t)))$  (Ajustes de cinéticas cuarta resiembra Acetato-Citrato 5.0 mM) Dep. Var. : y Level of confidence: 95.0% ( alpha=0.050)

	Estimate	Standard - error	t-value - df = 5	p-value	Lo. Conf - Limit	Up. Conf - Limit
<b>a<sub>1</sub></b>	0.99957	0.05221	19.14508	0.000007	0.8654	1.13378
<b>b<sub>1</sub></b>	23.07651	17.84053	1.29349	0.252372	-22.7840	68.93704
<b>c<sub>1</sub></b>	3.83896	2.97449	1.29063	0.253287	-3.8072	11.48514
<b>a<sub>2</sub></b>	1.51511	0.04047	37.43582	0.000000	1.4111	1.61915
<b>b<sub>2</sub></b>	1.76550	0.29545	5.97566	0.001880	1.0060	2.52497
<b>c<sub>2</sub></b>	1.61468	0.25205	6.40625	0.001374	0.9668	2.26259

De acuerdo con lo anterior, como el modelo de Gompertz de dos fases no es adecuado para los datos de este cultivo, se procedió a continuar con el análisis estadístico correspondiente al modelo de Gompertz de una fase.

b) Gráfica de la curva ajustada del modelo de Gompertz de una fase a los datos de la cinética de crecimiento del cultivo acetato-citrato 5.0 mM.



c) Análisis de varianza para el ajuste al modelo de Gompertz de una fase del cultivo con acetato-citrato 5.0 mM. Dado que  $p < 0.05$ , el ajuste es estadísticamente significativo.

Model is:  $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$  (Ajustes de cinéticas cuarta resiembra Acetato-Citrato 5.0 mM) Dep. Var. : y

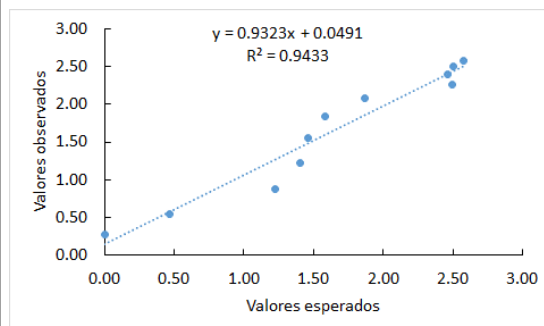
	1 - Sum of Squares	2 - DF	3 - Mean Squares	4 - F-value	5 - p-value
<b>Regression</b>	36.56529	3.00000	12.18843	232.4974	4.05053E-08
<b>Residual</b>	0.41939	8.00000	0.05242		
<b>Total</b>	36.98468	11.00000			
<b>Corrected Total</b>	7.40692	10.00000			
<b>Regression vs. Corrected Total</b>	36.56529	3.00000	12.18843	16.4555	0.000340



d) Datos de valores observados y valores estimados con base en el modelo de Gompertz de una fase. Se muestra también el ajuste lineal y el valor de  $R^2$ .

Model is:  $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$  (Ajustes de cinéticas cuarta resiembra Acetato-Citrato 5.0 mM) Dep. Var. : y

	Observed	Predicted	Residuals
1	0.000000	0.279974	-0.279974
2	0.467656	0.545844	-0.078189
3	1.226297	0.876345	0.349952
4	1.403805	1.225948	0.177857
5	1.457553	1.555457	-0.097905
6	1.579825	1.841492	-0.261668
7	1.866507	2.075658	-0.209151
8	2.494776	2.259538	0.235238
9	2.459995	2.399716	0.060279
10	2.504609	2.504357	0.000252
11	2.576587	2.581312	-0.004726



#### 4) Cultivo acetato-citrato 10.0 mM (cuarta resiembra).

a) Estimación de los parámetros a, b y c para acetato-citrato 10.0 mM. Primero, se presentan los parámetros para el modelo de Gompertz de una fase. Para los tres parámetros  $p < 0.05$ , por lo cual, las estimaciones son estadísticamente significativas.

Model is:  $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$  (Ajustes de cinéticas cuarta resiembra Acetato-Citrato 10.0 mM) Dep. Var. : y Level of confidence: 95.0% ( alpha=0.050)

	Estimate	Standard - error	t-value - df = 8	p-value	Lo. Conf - Limit	Up. Conf - Limit
a	2.799143	0.532134	5.260218	0.000764	1.572039	4.026247
b	0.766995	0.133461	5.746972	0.000430	0.459234	1.074757
c	0.243407	0.080964	3.006347	0.016907	0.056703	0.430111

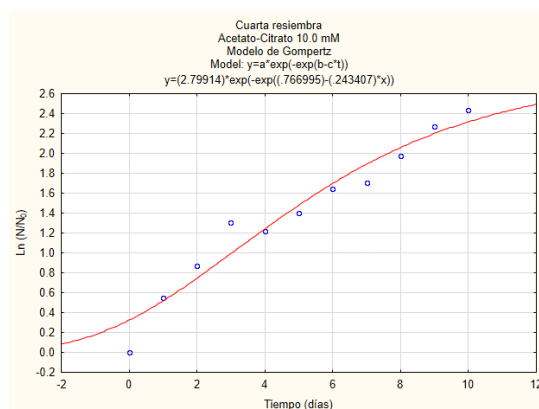
Segundo, se presentan los parámetros para el modelo de Gompertz de dos fases. En este caso, sólo dos ( $a_2$  y  $b_2$ ) de los seis parámetros son estadísticamente significativos. Por lo tanto, se decidió descartar este modelo para el cultivo con acetato-citrato 10.0 mM.

Model is:  $y=(a_1*\exp(-\exp(b_1-c_1*t))) + (a_2*\exp(-\exp(b_2-c_2*t)))$  (Ajustes de cinéticas cuarta resiembra Acetato-Citrato 10.0 mM) Dep. Var. : y Level of confidence: 95.0% ( alpha=0.050)

	Estimate	Standard - error	t-value - df = 5	p-value	Lo. Conf - Limit	Up. Conf - Limit
<b>a<sub>1</sub></b>	2.176907	2.274578	0.957059	0.382491	-3.67008	8.023897
<b>b<sub>1</sub></b>	2.453419	1.833000	1.338472	0.238378	-2.25846	7.165296
<b>c<sub>1</sub></b>	0.295695	0.312717	0.945570	0.387786	-0.50817	1.099559
<b>a<sub>2</sub></b>	1.265049	0.283539	4.461644	0.006630	0.53619	1.993909
<b>b<sub>2</sub></b>	1.151684	0.431720	2.667661	0.044473	0.04191	2.261456
<b>c<sub>2</sub></b>	1.216377	0.564048	2.156513	0.083554	-0.23355	2.666309

De acuerdo con lo anterior, como el modelo de Gompertz de dos fases no es adecuado para los datos de este cultivo, se procedió a continuar con el análisis estadístico correspondiente al modelo de Gompertz de una fase.

b) Gráfica de la curva ajustada del modelo de Gompertz de una fase a los datos de la cinética de crecimiento del cultivo acetato-citrato 10.0 mM.



c) Análisis de varianza para el ajuste al modelo de Gompertz de una fase del cultivo con acetato-citrato 10.0 mM. Dado que  $p < 0.05$ , el ajuste es estadísticamente significativo.

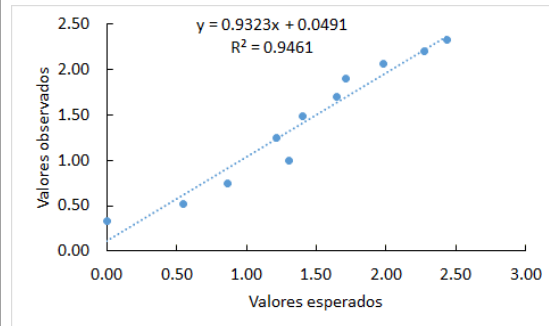
Model is:  $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$  (Ajustes de cinéticas cuarta resiembra Acetato-Citrato 10.0 mM) Dep. Var. : y

	1 - Sum of Squares	2 - DF	3 - Mean Squares	4 - F-value	5 - p-value
<b>Regression</b>	26.55343	3.00000	8.851144	246.1019	3.23536E-08
<b>Residual</b>	0.28772	8.00000	0.035965		
<b>Total</b>	26.84115	11.00000			
<b>Corrected Total</b>	5.34072	10.00000			
<b>Regression vs. Corrected Total</b>	26.55343	3.00000	8.851144	16.5729	0.000331

d) Datos de valores observados y valores estimados con base en el modelo de Gompertz de una fase. Se muestra también el ajuste lineal y el valor de  $R^2$ .

Model is:  $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$  (Ajustes de cinéticas cuarta resiembra Acetato-Citrato 10.0 mM) Dep. Var. : y

	Observed	Predicted	Residuals
1	0.000000	0.324986	-0.324986
2	0.549743	0.517492	0.032251
3	0.867563	0.745234	0.122329
4	1.302822	0.991887	0.310936
5	1.214622	1.241095	-0.026473
6	1.400485	1.479508	-0.079023
7	1.644153	1.698019	-0.053866
8	1.709453	1.891658	-0.182205
9	1.978721	2.058781	-0.080060
10	2.271941	2.200058	0.071884
11	2.439209	2.317558	0.121651



### 5) ANOVA de un criterio para comparar las tasas de crecimiento específico ( $\mu_{max}$ ) de los cuatro cultivos de la cuarta resiembra.

a) Prueba de Levene de homogeneidad de varianzas. Esta prueba evalúa la igualdad de varianzas entre los diferentes tratamientos de interés al poner a prueba el siguiente conjunto de hipótesis:

$$H_0: \sigma_1 = \sigma_2 = \sigma_3 = \dots = \sigma_k$$

$H_1$ : Las varianzas no son homogéneas.

Levene's Test for Homogeneity of Variances (Cuarta resiembra (tasas de crecimiento)) Effect: "Tipo de cultivo" Degrees of freedom for all F's: 4, 10				
	MS - Effect	MS - Error	F	P
$\mu_{max}$	0.003489	0.001639	2.128235	0.151715

Dado que  $p > 0.05$  para  $\mu_{max}$ , entonces, no se rechaza  $H_0$ , por lo tanto, se puede considerar que los datos provienen de un muestreo aleatorio y las poblaciones presentan varianzas homogéneas.

b) El ANOVA de un criterio pone a prueba el siguiente conjunto de hipótesis para las medias poblacionales de los diferentes tratamientos:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k$$

$H_1$ : Al menos dos medias poblacionales son diferentes.

Univariate Tests of Significance for $\mu_{\max}$ (Cuarta resiembra (tasas de crecimiento)) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	2.099615	1	2.099615	166.6868	1.46413E-07
Tratamientos	0.537007	4	0.134252	10.6582	0.001250
Error	0.125962	10	0.012596		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamientos*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha variable.

c) Prueba Post-Hoc de Tukey. La prueba de Tukey mostró que  $\mu_{1\max}$  y  $\mu_{2\max}$  de acetato-citrato 2.5 mM fueron significativamente el mayores respecto a los otros tratamientos. En el resto de los valores de  $\mu_{\max}$  no se encontraron diferencias significativas.

Tukey HSD test; variable $\mu_{\max}$ (Cuarta resiembra (tasas de crecimiento)) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .01260, df = 10.000						
	Tratamientos	{1} - .13859	{2} - .69609	{3} - .43505	{4} - .35193	{5} - .24899
1	Acetato-Citrato 0.0 mM		0.000993	0.054628	0.213098	0.749307
2	Acetato-Citrato 2.5 mM $\mu_{1\max}$	0.000993		0.098957	0.024427	0.004615
3	Acetato-Citrato 2.5 mM $\mu_{2\max}$	0.054628	0.098957		0.887926	0.319012
4	Acetato-Citrato 5.0 mM	0.213098	0.024427	0.887926		0.791373
5	Acetato-Citrato 10.0 mM	0.749307	0.004615	0.319012	0.791373	

## 6) ANOVA de un criterio para comparar los tiempos de duplicación ( $t_d$ ) de los cuatro cultivos de la cuarta resiembra.

a) Prueba de Levene de homogeneidad de varianzas. Esta prueba evalúa la igualdad de varianzas entre los diferentes tratamientos de interés al poner a prueba el siguiente conjunto de hipótesis:

$$H_0: \sigma_1 = \sigma_2 = \sigma_3 = \dots = \sigma_k$$

$H_1$ : Las varianzas no son homogéneas.

Levene's Test for Homogeneity of Variances (Cuarta resiembra (tiempo de duplicación)) Effect: "Tipo de cultivo" Degrees of freedom for all F's: 4, 10				
	MS - Effect	MS - Error	F	P
$t_d$	0.089590	0.029561	3.030656	0.070579

Dado que  $p > 0.05$  para  $t_d$ , entonces, no se rechaza  $H_0$ , por lo tanto, se puede considerar que los datos provienen de un muestreo aleatorio y las poblaciones presentan varianzas homogéneas.

b) El ANOVA de un criterio pone a prueba el siguiente conjunto de hipótesis para las medias poblacionales de los diferentes tratamientos:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k$$

$H_1$ : Al menos dos medias poblacionales son diferentes.

Univariate Tests of Significance for $t_d$ (Cuarta resiembra (tiempo de duplicación)) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	P
Intercept	94.58488	1	94.58488	507.9917	6.6528E-10
Tratamientos	29.27230	4	7.31808	39.3035	0.000004
Error	1.86194	10	0.18619		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamientos*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha variable.

c) Prueba Post-Hoc de Tukey. La prueba de Tukey mostró que los tratamientos con acetato-citrato 2.5, 5.0 y 10.0 mM fueron significativamente menores que el tratamiento control con acetato-citrato 0.0 mM. Por su parte, se encontró que  $t_{d1}$  y  $t_{d2}$  de acetato-citrato 2.5 mM junto con el  $t_d$  de acetato-citrato 5.0 mM fueron significativamente menores que el  $t_d$  de acetato-citrato 10.0 mM.

Tukey HSD test; variable $t_d$ (Segunda resiembra (tiempo de duplicación)) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .18619, df = 10.000						
	Tratamientos	{1} - 5.0735	{2} - 1.0531	{3} - 1.6733	{4} - 1.9726	{5} - 2.7831
1	Acetato-Citrato 0.0 mM		0.000176	0.000181	0.000195	0.000629
2	Acetato-Citrato 2.5 mM $t_{d1}$	0.000176		0.443909	0.141744	0.004418
3	Acetato-Citrato 2.5 mM $t_{d2}$	0.000181	0.443909		0.908760	0.062318
4	Acetato-Citrato 5.0 mM	0.000195	0.141744	0.908760		0.221515
5	Acetato-Citrato 10.0 mM	0.000629	0.004418	0.062318	0.221515	

## 7) ANOVA de un criterio para comparar la concentración celular al décimo día de crecimiento de los cuatro cultivos de la cuarta resiembra.

a) Prueba de Levene de homogeneidad de varianzas. Esta prueba evalúa la igualdad de varianzas entre los diferentes tratamientos de interés al poner a prueba el siguiente conjunto de hipótesis:

$$H_0: \sigma_1 = \sigma_2 = \sigma_3 = \dots = \sigma_k$$

$H_1$ : Las varianzas no son homogéneas.

Levene's Test for Homogeneity of Variances (Cuarta resiembra (Concentración celular)) Effect: "Tipo de cultivo" Degrees of freedom for all F's: 3, 8				
	MS - Effect	MS - Error	F	p
<b>Concentración celular</b>	0.026351	0.008769	3.004886	0.094825

Dado que  $p > 0.05$  *concentración celular*, entonces, no se rechaza  $H_0$ , por lo tanto, se puede considerar que los datos provienen de un muestreo aleatorio y las poblaciones presentan varianzas homogéneas.

b) El ANOVA de un criterio pone a prueba el siguiente conjunto de hipótesis para las medias poblacionales de los diferentes tratamientos:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k$$

$H_1$ : Al menos dos medias poblacionales son diferentes.

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha variable.

Univariate Tests of Significance for Concentración celular (Cuarta resiembra (Concentración celular)) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	45.08563	1	45.08563	894.5562	1.6938E-09
<b>Tratamiento</b>	8.42597	3	2.80866	55.7273	0.000011
<b>Error</b>	0.40320	8	0.05040		

c) Prueba Post-Hoc de Tukey. La prueba de Tukey mostró que los cultivos con acetato-citrato 2.5, 5.0 y 10.0 mM fueron significativamente diferentes del control con acetato-citrato 0.0 mM. Por su parte, entre los cultivos con acetato-citrato 2.5, 5.0 y 10.0 mM no se identificaron diferencias estadísticamente significativas.

Tukey HSD test; variable Concentración celular (Cuarta resiembra (Concentración celular)) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .05040, df = 8.0000					
	Tratamiento	{1} - .50667	{2} - 2.3133	{3} - 2.6400	{4} - 2.2933
<b>1</b>	Acetato-Citrato 0.0 mM		0.000252	0.000234	0.000255
<b>2</b>	Acetato-Citrato 2.5 mM	0.000252		0.347281	0.999527
<b>3</b>	Acetato-Citrato 5.0 mM	0.000234	0.347281		0.303491
<b>4</b>	Acetato-Citrato 10.0 mM	0.000255	0.999527	0.303491	

### **1.3 Análisis estadísticos de los contenidos de clorofila total, paramilo y porcentaje de estados palmela entre la segunda y cuarta resiembra**

Se muestran los resultados obtenidos de los ANOVAs de dos factores realizados con STATISTICA 10 para comparar los contenidos de clorofila total, paramilo y porcentaje de estados palmela entre los cultivos de la segunda y cuarta resiembra.

**Contenidos de clorofila total, paramilo y porcentajes de estados palmela en la aclimatación de *E. gracilis*.** Diferente letra indica diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) en una misma generación, misma letra significa que no hay diferencia ( $p > 0.05$ ). Diferente número indica diferencia estadística entre generaciones ( $p < 0.05$ ) y mismo número indica que no hay diferencia ( $p < 0.05$ ).

		Acetato Citrato 0.0 mM	Acetato Citrato 2.5 mM	Acetato Citrato 5.0 mM	Acetato Citrato 10.0 mM
% de estados palmela	Segunda generación	18.8 ± 4.1 <sup>a1</sup>	7.0 ± 1.8 <sup>b1</sup>	47.9 ± 2.7 <sup>b1</sup>	25.3 ± 1.1 <sup>a1</sup>
	Cuarta generación	3.6 ± 1.8 <sup>c2</sup>	2.4 ± 1.2 <sup>c1</sup>	4.7 ± 1.5 <sup>c2</sup>	10.0 ± 2.6 <sup>c2</sup>
Clorofila total ( $\mu\text{g } 10^{-6}$ células)	Segunda generación	3.1 ± 1.2 <sup>d3</sup>	14.1 ± 2.3 <sup>e4</sup>	11.7 ± 1.5 <sup>e4</sup>	13.3 ± 2.1 <sup>e4</sup>
	Cuarta generación	1.0 ± 0.36 <sup>f3</sup>	11.4 ± 1.5 <sup>g4</sup>	12.2 ± 1.6 <sup>g4</sup>	11.4 ± 0.45 <sup>g4</sup>
Clorofila total ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Segunda generación	1.8 ± 0.78 <sup>h5</sup>	26.2 ± 4.6 <sup>i5</sup>	17.0 ± 0.5 <sup>i5</sup>	16.0 ± 2.7 <sup>i5</sup>
	Cuarta generación	0.50 ± 0.07 <sup>j5</sup>	26.5 ± 1.6 <sup>k5</sup>	31.9 ± 2.3 <sup>k6</sup>	26.1 ± 0.7 <sup>k6</sup>
Paramilo ( $\mu\text{g } 10^{-6}$ células)	Segunda generación	424.7 ± 23.9 <sup>l7</sup>	374.7 ± 39.7 <sup>l7</sup>	308.6 ± 36.8 <sup>l7</sup>	218.0 ± 52.2 <sup>l7</sup>
	Cuarta generación	319.7 ± 96.3 <sup>m7</sup>	562.0 ± 98.9 <sup>n7</sup>	1072.7 ± 112.2 <sup>o8</sup>	996.4 ± 81.9 <sup>o8</sup>
Paramilo ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Segunda generación	270.3 ± 42.4 <sup>p9</sup>	692.9 ± 70.1 <sup>q1</sup>	450.5 ± 59.6 <sup>q1</sup>	263.1 ± 58.5 <sup>q1</sup>
	Cuarta generación	152.6 ± 20.1 <sup>r9</sup>	1292.3 ± 257.3 <sup>s2</sup>	2810.9 ± 14.8 <sup>t2</sup>	2282.7 ± 147.0 <sup>v2</sup>

#### **1) ANOVA factorial para comparar los rendimientos de clorofila total entre la segunda y cuarta resiembra.**

a) Este ANOVA pone a prueba las siguientes hipótesis para medias poblacionales de un experimento con dos factores (variables independientes) que son el número de resiembra (dos niveles, primera y cuarta resiembra) y tratamiento (cuatro niveles, 0.0, 2.5, 5.0 y 10.0 mM de citrato) respecto a una variable de respuesta (variable dependiente) que es el rendimiento de clorofila total al décimo día.

i) ¿Hay un efecto en la variable de respuesta debido a la interacción de los factores A (número de resiembra) y B (tratamiento)? Para este caso, se tiene:

H<sub>0</sub>: Los factores A (número de resiembra) y B (tratamiento) no interactúan sobre la variable de respuesta.

H<sub>1</sub>: Los factores A (número de resiembra) y B (tratamiento) interactúan sobre la variable de respuesta.

ii) ¿Hay un efecto en la variable de respuesta debido al factor A (número de resiembra)? Para este caso, se tiene:

H<sub>0</sub>: No hay diferencia entre las medias debido a los niveles del factor A (número de resiembra).

H<sub>1</sub>: Al menos dos medias difieren entre los niveles del factor A (número de resiembra).

iii) ¿Hay un efecto en la variable de respuesta debido al factor B (tratamiento)? Para este caso, se tiene:

H<sub>0</sub>: No hay diferencia entre las medias debido a los niveles del factor B (tratamiento).

H<sub>1</sub>: Al menos dos medias difieren entre los niveles del factor B (tratamiento).

De acuerdo con los resultados,  $p > 0.05$  para *Tratamiento\*Resiembra*, por lo cual, no se rechaza H<sub>0</sub> y no existe una interacción significativa entre las variables resiembra y tratamiento. Por su parte, para la variable *Tratamiento*  $p < 0.05$ , por lo cual sí se rechaza H<sub>0</sub> y existen diferencias significativas en, al menos, dos medias poblacionales respecto a esta variable. Asimismo, para la variable *Resiembra*  $p < 0.05$ , por lo que también se rechaza H<sub>0</sub> y existen diferencias significativas en, al menos, dos medias poblacionales respecto a esta segunda variable.

Univariate Tests of Significance for Rendimiento de clorofila (Spreadsheet2) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	2294.400	1	2294.400	870.5635	2.22E-15
Tratamiento	480.103	3	160.034	60.7217	5.81E-09
Resiembra	14.093	1	14.093	5.3472	0.034396
Tratamiento*Resiembra	8.596	3	2.865	1.0871	0.382889
Error	42.169	16	2.636		

b) Prueba Post-Hoc de Tukey. Dado que, en la prueba de ANOVA de dos factores, se rechazó H<sub>0</sub> para las variables *Resiembra* y *Tratamiento*, se procedió a realizar una prueba Post-Hoc de Tukey para identificar cuáles eran las medias poblacionales con diferencias significativas.

La prueba de Tukey mostró que los tratamientos con 2.5, 5.0 y 10.0 mM de citrato fueron significativamente diferentes de acetato-citrato 0.0 mM para ambas resiembras. Por su parte, entre los cultivos con citrato no se identificaron diferencias estadísticamente significativas ni entre tratamientos ni entre resiembras.



Tukey HSD test; variable Rendimiento de clorofila (Spreadsheet2) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 2.6355, df = 16.000

	Tratamiento	Resiembra	{1} - 3.0567	{2} - 1.0389	{3} - 14.140	{4} - 11.443	{5} - 11.719	{6} - 12.190	{7} - 13.259	{8} - 11.373
1	Acetato-Citrato 0.0 mM	Segunda resiembra		0.785636	0.000177	0.000361	0.000301	0.000237	0.000185	0.000381
2	Acetato-Citrato 0.0 mM	Cuarta resiembra	0.785636		0.000175	0.000182	0.000179	0.000177	0.000175	0.000183
3	Acetato-Citrato 2.5 mM	Segunda resiembra	0.000177	0.000175		0.490936	0.613247	0.811456	0.996951	0.460812
4	Acetato-Citrato 2.5 mM	Cuarta resiembra	0.000361	0.000182	0.490936		0.999999	0.998931	0.857923	1.000000
5	Acetato-Citrato 5.0 mM	Segunda resiembra	0.000301	0.000179	0.613247	0.999999		0.999949	0.931882	0.999994
6	Acetato-Citrato 5.0 mM	Cuarta resiembra	0.000237	0.000177	0.811456	0.998931	0.999949		0.990257	0.998089
7	Acetato-Citrato 10.0 mM	Segunda resiembra	0.000185	0.000175	0.996951	0.857923	0.931882	0.990257		0.834247
8	Acetato-Citrato 10.0 mM	Cuarta resiembra	0.000381	0.000183	0.460812	1.000000	0.999994	0.998089	0.834247	

## 2) ANOVA factorial para comparar las concentraciones de clorofila total entre la segunda y cuarta resiembra.

a) De acuerdo con los resultados del ANOVA factorial,  $p < 0.05$  para *Tratamiento\*Resiembra*, así que  $H_0$  se rechaza y, en consecuencia, sí existe una interacción significativa entre las variables resiembra y tratamiento para concentración de clorofila. En cuanto a la variable *Tratamiento*, también se encontró que  $p < 0.05$ , por lo tanto, también se rechaza  $H_0$  y existen diferencias significativas en, al menos, dos medias poblacionales para esta variable. Asimismo, también para la variable *Resiembra* se encontró que  $p < 0.05$  y se rechaza  $H_0$ , por lo cual, existen diferencias significativas en, al menos, dos medias poblacionales.

Univariate Tests of Significance for Concentración de clorofila (ANOVA de dos factores para concentración de clorofila al décimo día) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	7963.364	1	7963.364	1710.814	0.000000
Tratamiento	2412.826	3	804.275	172.787	2.13 E-12
Resiembra	209.711	1	209.711	45.053	0.000005
Tratamiento*Resiembra	278.634	3	92.878	19.954	0.000012
Error	74.476	16	4.655		

b) Prueba Post-Hoc de Tukey. Dado que, en la prueba de ANOVA de dos factores, se rechazó  $H_0$  para las variables *Resiembra\* Tratamiento*, *Tratamiento* y *Resiembra*, se procedió a realizar una prueba Post-Hoc de Tukey para identificar las diferencias significativas.

La prueba de Tukey mostró que, para la segunda resiembra, acetato-citrato 0.0 mM fue significativamente diferente de los tratamientos con 2.5, 5.0 y 10.0 mM de citrato y que entre éstos no hubo diferencias. En la cuarta resiembra, también se encontró este mismo patrón significativo. Al comparar entre resiembras, se encontró que no hubo diferencias entre la segunda y cuarta resiembra para acetato-citrato 0.0 y 2.5 mM, pero sí hubo un incremento significativo de clorofila total de la segunda y cuarta resiembra de la segunda a la cuarta resiembra.

Tukey HSD test; variable Concentración de clorofila (ANOVA de dos factores para concentración de clorofila al décimo día) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 4.6547, df = 16.000

	Tratamiento	Resiembra	{1} - 1.7987	{2} - .49432	{3} - 26.200	{4} - 26.182	{5} - 16.998	{6} - 31.943	{7} - 16.042	{8} - 26.067
1	Acetato-Citrato 0.0 mM	Segunda resiembra		0.994093	0.000175	0.000175	0.000176	0.000175	0.000179	0.000175
2	Acetato-Citrato 0.0 mM	Cuarta resiembra	0.994093		0.000175	0.000175	0.000175	0.000175	0.000175	0.000175
3	Acetato-Citrato 2.5 mM	Segunda resiembra	0.000175	0.000175		1.000000	0.001777	0.072738	0.000724	1.000000
4	Acetato-Citrato 2.5 mM	Cuarta resiembra	0.000175	0.000175	1.000000		0.001809	0.071410	0.000735	1.000000
5	Acetato-Citrato 5.0 mM	Segunda resiembra	0.000176	0.000175	0.001777	0.001809		0.000176	0.999165	0.002042
6	Acetato-Citrato 5.0 mM	Cuarta resiembra	0.000175	0.000175	0.072738	0.071410	0.000176		0.000175	0.063378
7	Acetato-Citrato 10.0 mM	Segunda resiembra	0.000179	0.000175	0.000724	0.000735	0.999165	0.000175		0.000816
8	Acetato-Citrato 10.0 mM	Cuarta resiembra	0.000175	0.000175	1.000000	1.000000	0.002042	0.063378	0.000816	

### 3) ANOVA factorial para comparar los rendimientos de paramilo entre la segunda y cuarta resiembra.

a) De acuerdo con los resultados,  $p < 0.05$  para *Tratamiento\*Resiembra*, por lo cual, se rechaza  $H_0$  y sí existe una interacción significativa entre las variables resiembra y tratamiento. Por su parte, para la variable *Tratamiento*  $p < 0.05$ , por lo cual también se rechaza  $H_0$  y existen diferencias significativas en, al menos, dos medias poblacionales respecto a esta variable. Asimismo, para la variable *Resiembra*  $p < 0.05$ , por lo que también se rechaza  $H_0$  y existen diferencias significativas en, al menos, dos medias poblacionales respecto a esta segunda variable.

Univariate Tests of Significance for Rendimiento de paramilo (Spreadsheet17) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	6858945	1	6858945	1076.701	4.44E-16
Tratamiento	362215	3	120738	18.953	0.000016
Resiembra	990092	1	990092	155.422	1.18E-09
Tratamiento*Resiembra	863712	3	287904	45.194	4.90E-08
Error	101925	16	6370		

b) Prueba Post-Hoc de Tukey. Dado que, en la prueba de ANOVA de dos factores, se rechazó  $H_0$  para las variables *Tratamiento\*Resiembra*, *Resiembra* y *Tratamiento*, se realizó una prueba Post-Hoc de Tukey para identificar dónde se encontraban las diferencias significativas. La prueba de Tukey mostró que para la segunda resiembra no hubo diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos. Por su parte, en la cuarta resiembra, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con acetato-citrato 0.0 mM, acetato-citrato 2.5 mM respecto a los tratamientos 5.0 mM y 10.0 mM (no habiendo diferencias entre estos dos últimos). Al comparar las dos resiembas, no hubo diferencias significativas entre acetato-citrato 0.0 y 2.5 mM, pero sí en los tratamientos 5.0 y 10 mM.

Tukey HSD test; variable Rendimiento de paramilo (Spreadsheet17) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 6370.3, df = 16.000										
	Tratamiento	Resiembra	{1} - 424.67	{2} - 319.75	{3} - 374.71	{4} - 562.00	{5} - 308.56	{6} - 1072.7	{7} - 217.99	{8} - 996.41
1	Acetato-Citrato 0.0 mM	Segunda resiembra		0.738610	0.992736	0.450080	0.639650	0.000175	0.085429	0.000175
2	Acetato-Citrato 0.0 mM	Cuarta resiembra	0.738610		0.987377	0.030920	1.000000	0.000175	0.765049	0.000175
3	Acetato-Citrato 2.5 mM	Segunda resiembra	0.992736	0.987377		0.143835	0.965234	0.000175	0.302119	0.000175
4	Acetato-Citrato 2.5 mM	Cuarta resiembra	0.450080	0.030920	0.143835		0.022257	0.000182	0.001609	0.000269
5	Acetato-Citrato 5.0 mM	Segunda resiembra	0.639650	1.000000	0.965234	0.022257		0.000175	0.849272	0.000175
6	Acetato-Citrato 5.0 mM	Cuarta resiembra	0.000175	0.000175	0.000175	0.000182	0.000175		0.000175	0.929414
7	Acetato-Citrato 10.0 mM	Segunda resiembra	0.085429	0.765049	0.302119	0.001609	0.849272	0.000175		0.000175
8	Acetato-Citrato 10.0 mM	Cuarta resiembra	0.000175	0.000175	0.000175	0.000269	0.000175	0.929414	0.000175	

#### 4) ANOVA factorial para comparar las concentraciones de paramilo entre la segunda y cuarta resiembra.

a) De acuerdo con los resultados,  $p < 0.05$  para *Tratamiento\*Resiembra*, por lo cual, se rechaza  $H_0$  y sí existe una interacción significativa entre las variables resiembra y tratamiento. Para *Tratamiento*  $p < 0.05$ , por lo cual también se rechaza  $H_0$  y existen diferencias significativas en, al menos, dos medias poblacionales respecto a esta variable. Asimismo, para la variable *Resiembra*  $p < 0.05$  y también se rechaza  $H_0$  y existen diferencias significativas en, al menos, dos medias poblacionales respecto a esta segunda variable.

Univariate Tests of Significance for Concentración de paramilo (Spreadsheet7) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	25308820	1	25308820	1982.891	0.000000
Tratamiento	6546992	3	2182331	170.981	2.31 E-12
Resiembra	8863709	1	8863709	694.452	1.31 E-14
Tratamiento*Resiembra	6171761	3	2057254	161.181	3.64 E-12
Error	204218	16	12764		

b) La prueba de Tukey mostró que para la segunda resiembra los tratamientos con acetato-citrato 2.5 mM, 5.0 mM y 10.0 mM fueron significativamente mayores que acetato-citrato 0.0 mM. Mientras que, en la cuarta resiembra, los cuatro promedios de los diferentes tratamientos fueron significativamente diferentes, acetato-citrato 5.0 mM fue el tratamiento de mayor valor, seguido de acetato-citrato 10.0 mM, luego, acetato-citrato 2.5 mM y acetato-citrato 0.0 mM.

Tukey HSD test; variable Concentración de paramilo (Spreadsheet7) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 12764., df = 16.000										
	Tratamiento	Resiembra	{1} - 270.30	{2} - 152.60	{3} - 692.94	{4} - 1292.3	{5} - 450.45	{6} - 2810.9	{7} - 263.05	{8} - 2282.7
1	Acetato-Citrato 0.0 mM	Segunda resiembra		0.895087	0.005854	0.000175	0.538213	0.000175	1.000000	0.000175
2	Acetato-Citrato 0.0 mM	Cuarta resiembra	0.895087		0.000634	0.000175	0.077007	0.000175	0.921381	0.000175
3	Acetato-Citrato 2.5 mM	Segunda resiembra	0.005854	0.000634		0.000310	0.215110	0.000175	0.005038	0.000175
4	Acetato-Citrato 2.5 mM	Cuarta resiembra	0.000175	0.000175	0.000310		0.000175	0.000175	0.000175	0.000175
5	Acetato-Citrato 5.0 mM	Segunda resiembra	0.538213	0.077007	0.215110	0.000175		0.000175	0.492674	0.000175
6	Acetato-Citrato 5.0 mM	Cuarta resiembra	0.000175	0.000175	0.000175	0.000175	0.000175		0.000175	0.000769
7	Acetato-Citrato 10.0 mM	Segunda resiembra	1.000000	0.921381	0.005038	0.000175	0.492674	0.000175		0.000175
8	Acetato-Citrato 10.0 mM	Cuarta resiembra	0.000175	0.000175	0.000175	0.000175	0.000175	0.000769	0.000175	

Al comparar los promedios entre resiembras, no se encontró diferencia entre los tratamientos de acetato-citrato 0.0 mM de una generación a otra. Por su parte, para los tratamientos 2.5, 5.0 y 10.0 mM los valores promedio fueron significativamente mayores de la segunda a la cuarta resiembra.

### 5) ANOVA factorial para comparar los porcentajes de estados palmela entre la segunda y cuarta resiembra.

a) De acuerdo con los resultados  $p < 0.05$  para *Tratamiento\*Resiembra*, por lo cual, se rechaza  $H_0$  y existe una interacción significativa. Para *Tratamiento*  $p < 0.05$ , por lo cual también se rechaza  $H_0$ . Asimismo, para la variable *Resiembra*  $p < 0.05$ , por lo que también se rechaza  $H_0$  y existen diferencias significativas.

Univariate Tests of Significance for Porcentaje de estados palmela (ANOVA de dos factores para estados palmela al décimo día) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	5361.070	1	5361.070	245.5218	3.96E-11
Tratamiento	1523.675	3	507.892	23.2600	0.000004
Resiembra	2303.000	1	2303.000	105.4709	1.89E-08
Tratamiento*Resiembra	1227.778	3	409.259	18.7429	0.000017
Error	349.367	16	21.835		

b) Prueba Post-Hoc de Tukey. En la prueba de ANOVA de dos factores se rechazó  $H_0$  para *Tratamiento\*Resiembra*, *Resiembra* y *Tratamiento*.

Tukey HSD test; variable Porcentaje de estados palmela (ANOVA de dos factores para estados palmela al décimo día) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 21.835, df = 16.000										
	Tratamiento	Resiembra	{1} - 18.833	{2} - 3.6000	{3} - 7.0000	{4} - 2.3667	{5} - 47.833	{6} - 4.6333	{7} - 25.300	{8} - 10.000
1	Acetato-Citrato 0.0 mM	Segunda resiembra		0.018231	0.096826	0.009757	0.000187	0.030655	0.690514	0.342983
2	Acetato-Citrato 0.0 mM	Cuarta resiembra	0.018231		0.982771	0.999973	0.000175	0.999992	0.000820	0.700585
3	Acetato-Citrato 2.5 mM	Segunda resiembra	0.096826	0.982771		0.916066	0.000175	0.998022	0.003898	0.991575
4	Acetato-Citrato 2.5 mM	Cuarta resiembra	0.009757	0.999973	0.916066		0.000175	0.998491	0.000516	0.510443
5	Acetato-Citrato 5.0 mM	Segunda resiembra	0.000187	0.000175	0.000175	0.000175		0.000175	0.000593	0.000175
6	Acetato-Citrato 5.0 mM	Cuarta resiembra	0.030655	0.999992	0.998022	0.998491	0.000175		0.001269	0.841774
7	Acetato-Citrato 10.0 mM	Segunda resiembra	0.690514	0.000820	0.003898	0.000516	0.000593	0.001269		0.017628
8	Acetato-Citrato 10.0 mM	Cuarta resiembra	0.342983	0.700585	0.991575	0.510443	0.000175	0.841774	0.017628	

La prueba mostró que para la segunda resiembra hay diferencias significativas entre acetato-citrato 0.0 mM y 10.0 mM respecto de acetato-citrato 2.5 mM y 5.0 mM. Mientras que para la cuarta resiembra no se identificaron diferencias significativas entre los tratamientos. Por su parte, al comparar los datos entre resiembras, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos acetato-citrato 0.0 mM, 5.0 mM y 10.0 mM.

## Anexo 2. Análisis estadísticos para el experimento de caracterización de la biomasa respecto a la remoción de nutrientes de la sexta resiembra

### 2.1 Ajustes de las cinéticas de crecimiento

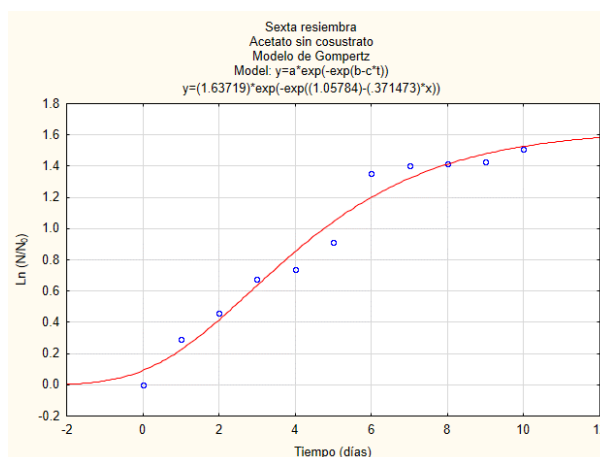
Resultados de los ajustes al modelo de Gompertz de una y dos fases con el programa STATISTICA 10 para las cinéticas de crecimiento **de la sexta resiembra**.

#### 1) Cultivo acetato sin cosustrato (sexta resiembra).

a) Estimación de los parámetros a, b y c para acetato sin cosustrato para el modelo de Gompertz de una fase. Para los tres parámetros  $p < 0.05$ , por lo cual, las estimaciones son estadísticamente significativas para los coeficientes del modelo de Gompertz.

Model is: $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$ (Ajustes de cinéticas sexta resiembra Acetato sin cosustrato) Dep. Var. : y Level of confidence: 95.0% (alpha=0.050)						
	Estimate	Standard - error	t-value - df = 8	p-value	Lo. Conf - Limit	Up. Conf - Limit
<b>a</b>	1.637195	0.129599	12.63278	0.000001	1.338339	1.936050
<b>b</b>	1.057839	0.171634	6.16334	0.000270	0.662050	1.453628
<b>c</b>	0.371473	0.073562	5.04979	0.000990	0.201839	0.541108

b) Gráfica de la curva ajustada del modelo de Gompertz de una fase a los datos de la cinética de crecimiento del cultivo acetato sin cosustrato.

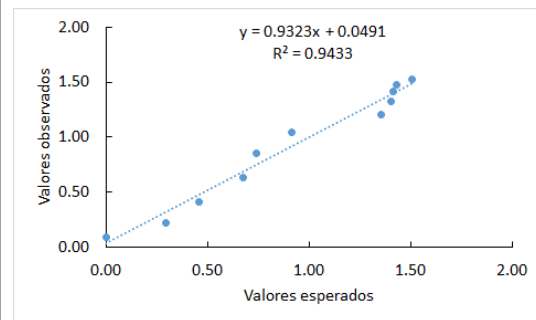


c) Análisis de varianza para el ajuste al modelo de Gompertz de una fase de acetato sin cosustrato. Dado que  $p < 0.05$ , el ajuste es estadísticamente significativo.

Model is: $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$ (Ajustes de cinéticas sexta resiembra Acetato sin cosustrato)					
	1 - Sum of Squares	2 - DF	3 - Mean Squares	4 - F-value	5 - p-value
<b>Regression</b>	12.15698	3.00000	4.052328	411.6433	4.2126E-09
<b>Residual</b>	0.07875	8.00000	0.009844		
<b>Total</b>	12.23574	11.00000			
<b>Corrected Total</b>	2.80650	10.00000			
<b>Regression vs. Corrected Total</b>	12.15698	3.00000	4.052328	14.4391	0.000577

d) Datos de valores observados y valores estimados con base en el modelo de Gompertz de una fase. Se muestra también el ajuste lineal y el valor de  $R^2$ .

Model is: $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$ (Ajustes de cinéticas sexta resiembra Acetato sin cosustrato) Dep. Var. : y			
	Observed	Predicted	Residuals
1	0.000000	0.091891	-0.091891
2	0.293900	0.224585	0.069314
3	0.459505	0.415976	0.043529
4	0.674984	0.636350	0.038634
5	0.741181	0.853174	-0.111993
6	0.912941	1.044400	-0.131459
7	1.352422	1.200727	0.151695
8	1.401623	1.321983	0.079640
9	1.413055	1.412678	0.000378
10	1.428372	1.478832	-0.050460
11	1.506399	1.526257	-0.019857



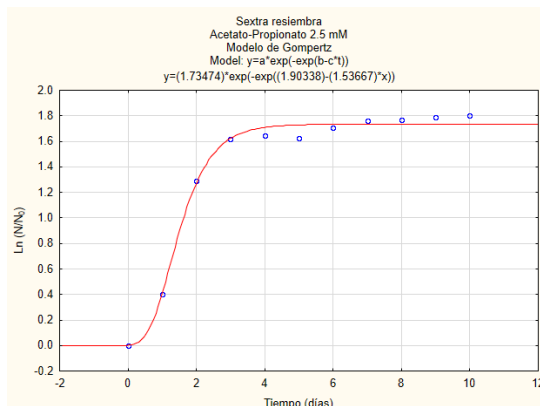
## 2) Cultivo acetato-propionato 2.5 mM (sexta resiembra).

a) Estimación de los parámetros a, b y c para acetato-propionato 2.5 mM correspondientes al modelo de Gompertz. Para los tres parámetros se obtuvieron valores de  $p < 0.05$ , por lo cual, las estimaciones son estadísticamente significativas para cada uno de los coeficientes del modelo de Gompertz de una fase.

Model is: $y=a*\exp(-\exp(b-c*t))$ (Ajustes de cinéticas sexta resiembra Acetato-Propionato 2.5 mM) Dep. Var. : y Level of confidence: 95.0% (alpha=0.050)						
	Estimate	Standard - error	t-value - df = 8	p-value	Lo. Conf - Limit	Up. Conf - Limit
<b>a</b>	1.734739	0.021792	79.60572	0.000000	1.684487	1.784991
<b>b</b>	1.903378	0.222257	8.56386	0.000027	1.390852	2.415903
<b>c</b>	1.536675	0.159720	9.62105	0.000011	1.168359	1.904990



b) Gráfica de la curva ajustada del modelo de Gompertz de una fase a los datos de la cinética de crecimiento del cultivo acetato-propionato 2.5 mM.



c) Análisis de varianza para el ajuste al modelo de Gompertz de una fase de acetato-propionato 2.5 mM. Dado que  $p < 0.05$ , el ajuste es estadísticamente significativo.

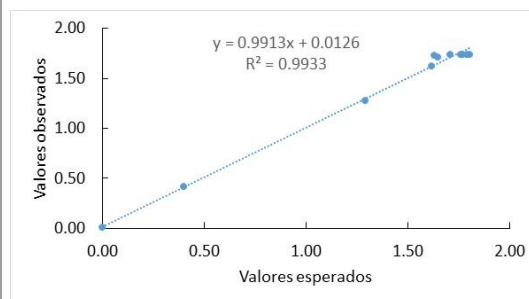
Model is:  $y = a * \exp(-\exp(b-c*t))$  (Ajustes de cinéticas sexta resiembra Acetato-Propionato 2.5 mM)  
Dep. Var. : y

	1 - Sum of Squares	2 - DF	3 - Mean Squares	4 - F-value	5 - p-value
<b>Regression</b>	25.37516	3.00000	8.458388	2643.252	2.5379E-12
<b>Residual</b>	0.02560	8.00000	0.003200		
<b>Total</b>	25.40076	11.00000			
<b>Corrected Total</b>	3.80468	10.00000			
<b>Regression vs. Corrected Total</b>	25.37516	3.00000	8.458388	22.232	0.000096

d) Datos de valores observados y valores estimados con base en el modelo de Gompertz de una fase. Se muestra también el ajuste lineal y el valor de  $R^2$ .

Model is:  $y = a * \exp(-\exp(b-c*t))$  (Ajustes de cinéticas sexta resiembra Acetato-Propionato 2.5 mM)  
Dep. Var. : y

	Observed	Predicted	Residuals
1	0.000000	0.002117	-0.002117
2	0.400490	0.409789	-0.009299
3	1.293056	1.271861	0.021195
4	1.616300	1.622709	-0.006408
5	1.645782	1.710007	-0.064224
6	1.627601	1.729389	-0.101789
7	1.705982	1.733587	-0.027605
8	1.759181	1.734491	0.024690
9	1.770424	1.734686	0.035739
10	1.789231	1.734728	0.054504
11	1.804833	1.734737	0.070096



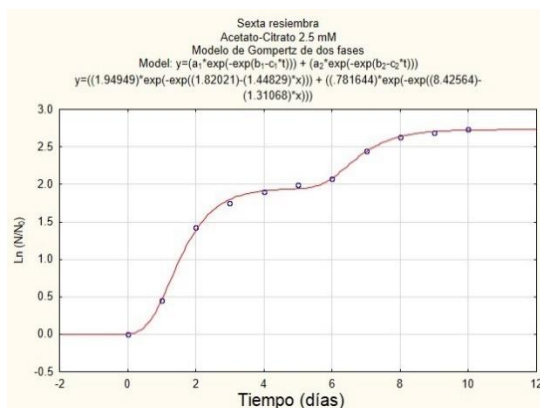
### 3) Cultivo acetato-citrato 2.5 mM (sexta resiembra).

a) Estimación de los parámetros  $a_1$ ,  $b_1$ ,  $c_1$ ,  $a_2$ ,  $b_2$  y  $c_2$  para acetato-citrato 2.5 mM. Se presentan los parámetros para el modelo de Gompertz de dos fases. Para los seis parámetros  $p < 0.05$ , por lo cual, las estimaciones son estadísticamente significativas.

Model is:  $y=(a_1 \cdot \exp(-\exp(b_1-c_1 \cdot t))) + (d_1 \cdot \exp(-\exp(e-g \cdot t)))$  (Ajustes de cinéticas sexta resiembra Acetato Citrato 2.5 mM) Dep. Var. : y Level of confidence: 95.0% ( alpha=0.050)

	Estimate	Standard - error	t-value - df = 5	p-value	Lo. Conf - Limit	Up. Conf - Limit
<b>a<sub>1</sub></b>	1.949489	0.030996	62.89459	0.000000	1.869811	2.02917
<b>b<sub>1</sub></b>	1.820209	0.142095	12.80983	0.000052	1.454943	2.18547
<b>c<sub>1</sub></b>	1.448287	0.108713	13.32206	0.000043	1.168830	1.72774
<b>a<sub>2</sub></b>	0.781644	0.047922	16.31085	0.000016	0.658457	0.90483
<b>b<sub>2</sub></b>	8.425644	1.582602	5.32392	0.003130	4.357437	12.49385
<b>c<sub>2</sub></b>	1.310684	0.244239	5.36640	0.003024	0.682848	1.93852

b) Gráfica de la curva ajustada del modelo de Gompertz de dos fases a los datos de la cinética de crecimiento del cultivo acetato-citrato 2.5 mM.



c) Análisis de varianza para el ajuste al modelo de Gompertz de una fase de acetato-citrato 2.5 mM. Dado que  $p < 0.05$ , el ajuste es estadísticamente significativo.

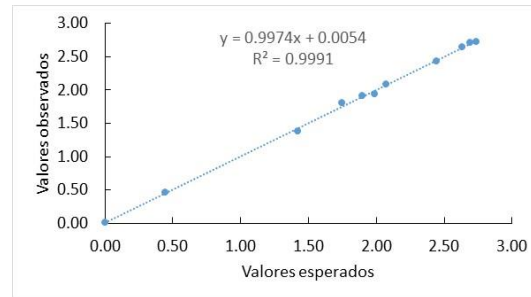
Model is:  $y=(a_1 \cdot \exp(-\exp(b_1-c_1 \cdot t))) + (a_2 \cdot \exp(-\exp(b_2-c_2 \cdot t)))$  (Ajustes de cinéticas sexta resiembra Acetato Citrato 2.5 mM) Dep. Var. : y

	1 - Sum of Squares	2 - DF	3 - Mean Squares	4 - F-value	5 - p-value
<b>Regression</b>	44.76546	6.00000	7.460910	4934.362	2.9160E-09
<b>Residual</b>	0.00756	5.00000	0.001512		
<b>Total</b>	44.77302	11.00000			
<b>Corrected Total</b>	8.11843	10.00000			
<b>Regression vs. Corrected Total</b>	44.76546	6.00000	7.460910	9.190	0.001362

d) Datos de valores observados y valores estimados con base en el modelo de Gompertz de dos fases. Se muestra también el ajuste lineal y el valor de  $R^2$ .

Model is:  $y=(a_1*\exp(-\exp(b_1-c_1*t))) + (a_2*\exp(-\exp(b_2-c_2*t)))$  (Ajustes de cinéticas sexta resiembra Acetato Citrato 2.5 mM) Dep. Var. : y

	Observed	Predicted	Residuals
1	0.000000	0.004064	-0.004064
2	0.445701	0.457055	-0.011354
3	1.419388	1.386435	0.032953
4	1.745658	1.799451	-0.053793
5	1.896426	1.913147	-0.016721
6	1.991372	1.942060	0.049311
7	2.075143	2.082838	-0.007695
8	2.446401	2.436191	0.010210
9	2.630497	2.637470	-0.006973
10	2.689029	2.704697	-0.015668
11	2.740239	2.723916	0.016323



#### 4) ANOVA de un criterio para comparar las tasas de crecimiento específico ( $\mu_{max}$ ) de los tres cultivos de la sexta resiembra.

a) Prueba de Levene de homogeneidad de varianzas. Esta prueba evalúa la igualdad de varianzas entre los diferentes tratamientos de interés al poner a prueba el siguiente conjunto de hipótesis:

$$H_0: \sigma_1 = \sigma_2 = \sigma_3 = \dots = \sigma_k$$

$H_1$ : Las varianzas no son homogéneas.

Levene's Test for Homogeneity of Variances (Sexta resiembra (tasas de crecimiento)) Effect: "Tipo de cultivo" Degrees of freedom for all F's: 3, 8

	MS - Effect	MS - Error	F	p
$\mu_{max}$	0.017423	0.009184	1.897109	0.208558

Dado que  $p > 0.05$  para  $\mu_{max}$ , entonces, no se rechaza  $H_0$ , por lo tanto, se puede considerar que los datos provienen de un muestreo aleatorio y las poblaciones presentan varianzas homogéneas.

b) El ANOVA de un criterio pone a prueba el siguiente conjunto de hipótesis para las medias poblacionales de los diferentes tratamientos:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k$$

$H_1$ : Al menos dos medias poblacionales son diferentes.

Univariate Tests of Significance for $\mu_{\max}$ (Sexta resiembra (tasas de crecimiento)) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	6.251077	1	6.251077	202.8385	0.000001
Tratamiento	2.339756	3	0.779919	25.3072	0.000195
Error	0.246544	8	0.030818		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamientos*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha variable.

c) Prueba Post-Hoc de Tukey. La prueba de Tukey mostró que  $\mu_{1\max}$  de acetato-citrato 2.5 mM y  $\mu_{\max}$  de acetato-propionato 2.5 mM son significativamente diferentes de  $\mu_{2\max}$  de acetato-citrato 2.5 mM y  $\mu_{\max}$  de acetato sin cosustrato.

Tukey HSD test; variable $\mu_{\max}$ (Sexta resiembra (tasas de crecimiento)) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .03082, df = 8.0000					
	Tipo de cultivo	{1} - .22800	{2} - .97967	{3} - 1.3097	{4} - .36967
1	Acetato sin cosustrato		0.003583	0.000490	0.760097
2	Acetato-Propionato 2.5 mM	0.003583		0.176638	0.011991
3	Acetato-Citrato 2.5 mM $\mu_{1\max}$	0.000490	0.176638		0.000968
4	Acetato-Citrato 2.5 mM $\mu_{2\max}$	0.760097	0.011991	0.000968	

### 5) ANOVA de un criterio para comparar los tiempos de duplicación ( $t_d$ ) de los cuatro cultivos de la sexta resiembra.

a) Prueba de Levene de homogeneidad de varianzas. Esta prueba evalúa la igualdad de varianzas entre los diferentes tratamientos de interés al poner a prueba el siguiente conjunto de hipótesis:

$$H_0: \sigma_1 = \sigma_2 = \sigma_3 = \dots = \sigma_k$$

$H_1$ : Las varianzas no son homogéneas.

Levene's Test for Homogeneity of Variances (Sexta resiembra (tiempo de duplicación)) Effect: "Tratamiento" Degrees of freedom for all F's: 3, 8				
	MS - Effect	MS - Error	F	p
$t_d$	0.082315	0.035174	2.340222	0.149607

Dado que  $p > 0.05$  para  $t_d$ , entonces, no se rechaza  $H_0$ , por lo tanto, se puede considerar que los datos provienen de un muestreo aleatorio y las poblaciones presentan varianzas homogéneas.

b) El ANOVA de un criterio pone a prueba el siguiente conjunto de hipótesis para las medias poblacionales de los diferentes tratamientos:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k$$

$H_1$ : Al menos dos medias poblacionales son diferentes.

Univariate Tests of Significance for $t_d$ (Sexta resiembra (tiempo de duplicación)) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	29.38131	1	29.38131	296.6069	1.31484E-07
Tratamiento	11.36660	3	3.78887	38.2489	0.000043
Error	0.79246	8	0.09906		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha variable.

c) Prueba Post-Hoc de Tukey. La prueba de Tukey mostró que  $t_d$  de acetato-propionato 2.5 mM y  $t_{d1}$  de acetato-citrato 2.5 mM son significativamente diferentes de  $t_d$  de acetato sin cosustrato y estos tres son significativamente diferentes de  $t_{d2}$  de acetato-citrato 2.5 mM.

Tukey HSD test; variable $t_d$ (Sexta resiembra (tiempo de duplicación)) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .09906, df = 8.0000					
	Tratamiento	{1} - 3.0453	{2} - .71267	{3} - .67033	{4} - 1.8307
1	Acetato sin cosustrato		0.000280	0.000272	0.006614
2	Acetato-Propionato 2.5 mM	0.000280		0.998331	0.010615
3	Acetato-Citrato 2.5 mM $t_{d1}$	0.000272	0.998331		0.008601
4	Acetato-Citrato 2.5 mM $t_{d2}$	0.006614	0.010615	0.008601	

## 6) ANOVA de un criterio para comparar la concentración celular al décimo día de crecimiento de los cuatro cultivos de la sexta resiembra.

a) Prueba de Levene de homogeneidad de varianzas. Esta prueba evalúa la igualdad de varianzas entre los diferentes tratamientos de interés al poner a prueba el siguiente conjunto de hipótesis:

$$H_0: \sigma_1 = \sigma_2 = \sigma_3 = \dots = \sigma_k$$

$H_1$ : Las varianzas no son homogéneas.

Levene's Test for Homogeneity of Variances (Sexta resiembra (concentración celular)) Effect: "Tipo de cultivo" Degrees of freedom for all F's: 2, 6				
	MS - Effect	MS - Error	F	p
Concentración celular	0.002390	0.002112	1.131502	0.382860

Dado que  $p > 0.05$  para *Concentración celular*, entonces, no se rechaza  $H_0$ , por lo tanto, se puede considerar que los datos provienen de un muestreo aleatorio y las poblaciones presentan varianzas homogéneas.

b) El ANOVA de un criterio pone a prueba el siguiente conjunto de hipótesis para las medias poblacionales de los diferentes tratamientos:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k$$

$H_1$ : Al menos dos medias poblacionales son diferentes.

Univariate Tests of Significance for Concentración celular (Sexta resiembra (concentración celular)) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	27.28321	1	27.28321	2309.961	5.43916E-09
Tratamiento	8.46002	2	4.23001	358.138	0.000001
Error	0.07087	6	0.01181		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha variable.

c) Prueba Post-Hoc de Tukey. La prueba de Tukey mostró que los tres valores de concentración celular de acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM son estadísticamente diferentes.

Tukey HSD test; variable Concentración celular (Sexta resiembra (Concentración celular)) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .01181, df = 6.0000				
	Tipo de cultivo	{1} - .90333	{2} - 1.2200	{3} - 3.1000
1	Acetato sin cosustrato		0.027517	0.000227
2	Acetato-Propionato 2.5 mM	0.027517		0.000227
3	Acetato-Citrato 2.5 mM	0.000227	0.000227	

## **2.2 Comparación de las concentraciones y rendimientos diarios de clorofila total y paramilo.**

De acuerdo con la prueba de Levene para homogeneidad de varianzas, se tienen las siguientes hipótesis:

$$H_0: \sigma_1 = \sigma_2 = \sigma_3 = \dots = \sigma_k$$

$H_1$ : Las varianzas no son homogéneas.

Todas las pruebas de Levene para los datos de concentración y rendimiento de clorofila total, así como para concentración y rendimiento de paramilo presentaron  $p > 0.05$ . Por lo tanto, no se rechaza  $H_0$ , así que se puede considerar

que los datos provienen de un muestreo aleatorio y las poblaciones presentan varianzas homogéneas.

Por su parte, el ANOVA de un criterio pone a prueba el siguiente conjunto de hipótesis para las medias poblacionales de los diferentes tratamientos:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k$$

$H_1$ : Al menos dos medias poblacionales son diferentes.

### 1) ANOVA de un criterio para comparar la concentración de clorofila total de la sexta resiembra.

Univariate Tests of Significance for Concentración de Clorofila total al décimo día (Sexta resiembra décimo día) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	1822.132	1	1822.132	1890.584	9.90612E-09
Tipo de cultivo	1316.958	2	658.479	683.216	8.35568E-08
Error	5.783	6	0.964		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha variable. La prueba de Tukey mostró que el acetato-citrato 2.5 mM es significativamente diferente de los otros dos tipos de cultivos. Mientras que entre acetato sin cosustrato y acetato-propionato 2.5 mM no hubo diferencias significativas.

Tukey HSD test; variable Concentración de Clorofila total al décimo día (Sexta resiembra) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .96379, df = 6.0000				
	Tipo de cultivo	{1} - 6.6726	{2} - 4.7152	{3} - 31.299
1	Acetato sin cosustrato		0.110051	0.000227
2	Acetato-Propionato 2.5 mM	0.110051		0.000227
3	Acetato-Citrato 2.5 mM	0.000227	0.000227	

### 2) ANOVA de un criterio para comparar el rendimiento de clorofila total de la sexta resiembra.

Univariate Tests of Significance for Rendimiento de clorofila total al décimo día (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	469.8535	1	469.8535	625.8659	2.68523E-07
Tratamiento	64.6259	2	32.3129	43.0423	0.000277
Error	4.5044	6	0.7507		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha

variable. La prueba de Tukey mostró que los tres tipos de cultivo son significativamente diferentes entre sí.

Tukey HSD test; variable Rendimiento de clorofila total al décimo día (Sexta resiembra) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .75073, df = 6.0000				
	Tipo de Cultivo	{1} - 7.3767	{2} - 3.8704	{3} - 10.429
1	Acetato sin cosustrato		0.006286	0.012010
2	Acetato-Propionato 2.5 mM	0.006286		0.000415
3	Acetato-Citrato 2.5 mM	0.012010	0.000415	

### 3) ANOVA de un criterio para comparar la concentración de paramilo de la sexta resiembra.

Univariate Tests of Significance for Concentración de paramilo al décimo día (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	5680077	1	5680077	486.2286	0.000001
Tratamiento	439746	2	219873	18.8217	0.002598
Error	70091	6	11682		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha variable. La prueba de Tukey mostró que acetato-citrato 2.5 mM es significativamente diferente respecto de los otros dos tratamientos. Por su parte, entre acetato sin cosustrato y acetato-propionato 2.5 mM no hubo diferencias significativas.

Tukey HSD test; variable Concentración de paramilo al décimo día (Sexta resiembra) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 11682., df = 6.0000				
	Tipo de cultivo	{1} - 643.67	{2} - 632.65	{3} - 1107.0
1	Acetato sin cosustrato		0.991518	0.004764
2	Acetato-Propionato 2.5 mM	0.991518		0.004255
3	Acetato-Citrato 2.5 mM	0.004764	0.004255	

### 4) ANOVA de un criterio para comparar el rendimiento de paramilo de la sexta resiembra.

Univariate Tests of Significance for Redimiento de paramilo al décimo día (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	2542225	1	2542225	350.4750	0.000001
Tipo de cultivo	189596	2	94798	13.0690	0.006507
Error	43522	6	7254		



Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha variable. La prueba de Tukey mostró que acetato-citrato 2.5 mM es significativamente diferente respecto de los otros dos tratamientos. Por su parte, entre acetato sin cosustrato y acetato-propionato 2.5 mM no hubo diferencias significativas.

Tukey HSD test; variable Rendimiento de paramilo al décimo día (Sexta resiembra) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 7253.7, df = 6.0000				
	Tipo de cultivo	{1} - 712.83	{2} - 524.06	{3} - 357.54
1	Acetato sin cosustrato		0.077878	0.005426
2	Acetato-Propionato 2.5 mM	0.077878		0.116890
3	Acetato-Citrato 2.5 mM	0.005426	0.116890	

### **2.3 Comparación de los porcentajes y cinéticas de remoción de DQO, amonio y fósforo, así como del cambio de pH en los cultivos**

De acuerdo con la prueba de Levene para homogeneidad de varianzas, se tienen las siguientes hipótesis:

$$H_0: \sigma_1 = \sigma_2 = \sigma_3 = \dots = \sigma_k$$

$H_1$ : Las varianzas no son homogéneas.

Todas las pruebas de Levene para los datos de concentración y rendimiento de clorofila total, así como para concentración y rendimiento de paramilo presentaron  $p > 0.05$ . Por lo tanto, no se rechaza  $H_0$ , así que se puede considerar que los datos provienen de un muestreo aleatorio y las poblaciones presentan varianzas homogéneas.

Por su parte, el ANOVA de un criterio pone a prueba el siguiente conjunto de hipótesis para las medias poblacionales de los diferentes tratamientos:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k$$

$H_1$ : Al menos dos medias poblacionales son diferentes.

#### **1) ANOVA de un criterio para comparar los porcentajes de remoción de DQO de la sexta resiembra**

Univariate Tests of Significance for Porcentaje de Remoción de DQO (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	3.260167	1	3.260167	1095.470	5.06145E-08
Tratamiento	0.607233	2	0.303617	102.020	0.000023
Error	0.017856	6	0.002976		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha variable. La prueba de Tukey mostró que los porcentajes de remoción entre los tres tratamientos fueron significativamente diferentes entre sí.

Tukey HSD test; variable Porcentaje de Remoción de DQO (Sexta resiembra) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00298, df = 6.0000				
	Tratamiento	{1} - .28476	{2} - .59982	{3} - .92101
1	Acetato sin cosustrato		0.001160	0.000231
2	Acetato-propionato 2.5 mM	0.001160		0.001059
3	Acetato-citrato 2.5 mM	0.000231	0.001059	

## 2) ANOVA de un criterio para comparar las cinéticas de remoción de DQO de la sexta resiembra

Univariate Tests of Significance for Cinética de Remoción de DQO (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	518989.3	1	518989.3	540.6828	4.14852E-07
Tratamiento	110106.9	2	55053.5	57.3547	0.000123
Error	5759.3	6	959.9		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha variable. La prueba de Tukey mostró que las cinéticas de remoción entre los tres tratamientos fueron significativamente diferentes entre sí.

Tukey HSD test; variable Cinética de Remoción de DQO (Sexta resiembra) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 959.88, df = 6.0000				
	Tratamiento	{1} - 103.44	{2} - 242.63	{3} - 374.34
1	Acetato sin cosustrato		0.003796	0.000285
2	Acetato-propionato 2.5 mM	0.003796		0.004956
3	Acetato-citrato 2.5 mM	0.000285	0.004956	

## 3) ANOVA de un criterio para comparar los porcentajes de remoción de amonio de la sexta resiembra

Univariate Tests of Significance for Porcentaje de Remoción de amonio (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	5.147756	1	5.147756	3155.650	2.13733E-09
Tratamiento	0.295089	2	0.147544	90.447	0.000033
Error	0.009788	6	0.001631		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha variable. La prueba de Tukey mostró que los porcentajes de remoción entre los tres tratamientos fueron significativamente diferentes entre sí.

Tukey HSD test; variable Porcentaje de Remoción de amonio (Sexta resiembra) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00163, df = 6.0000				
	Tratamiento	{1} - .70251	{2} - .56635	{3} - 1.0000
1	Acetato sin cosustrato		0.014645	0.000448
2	Acetato-propionato 2.5 mM	0.014645		0.000237
3	Acetato-citrato 2.5 mM	0.000448	0.000237	

#### 4) ANOVA de un criterio para comparar las cinéticas de remoción de amonio de la sexta resiembra

Univariate Tests of Significance for Cinética de Remoción de amonio (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	3667.984	1	3667.984	2591.226	3.85613E-09
Tratamiento	172.871	2	86.435	61.062	0.000103
Error	8.493	6	1.416		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha variable. La prueba de Tukey mostró que acetato-citrato 2.5 mM es significativamente diferente de acetato sin cosustrato y de acetato-propionato 2.5 mM.

Tukey HSD test; variable Cinética de Remoción de amonio (Sexta resiembra) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 1.4155, df = 6.0000				
	Tratamiento	{1} - 18.526	{2} - 15.848	{3} - 26.190
1	Acetato sin cosustrato		0.073870	0.000718
2	Acetato-propionato 2.5 mM	0.073870		0.000288
3	Acetato-citrato 2.5 mM	0.000718	0.000288	

#### 5) ANOVA de un criterio para comparar los porcentajes de remoción de fósforo de la sexta resiembra

Univariate Tests of Significance for Porcentaje de Remoción de fósforo (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	4081.405	1	4081.405	80.91693	0.000106
Tratamiento	204.232	2	102.116	2.02452	0.212853
Error	302.637	6	50.439		

Dado que  $p > 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, no se rechaza  $H_0$ , por lo que no hubo diferencias significativas.

## 6) ANOVA de un criterio para comparar las cinéticas de remoción de fósforo de la sexta resiembra

a) Resultados del ANOVA de un criterio.

Univariate Tests of Significance for Cinética de Remoción de fósforo (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	4081.405	1	4081.405	80.91693	0.000106
Tratamiento	204.232	2	102.116	2.02452	0.212853
Error	302.637	6	50.439		

Dado que  $p > 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, no se rechaza  $H_0$ , por lo que no hubo diferencias significativas.

## 2.4 Comparación de la composición de la biomasa (paramilo, proteína, lípidos totales, clorofila total y cenizas) al décimo día de cultivo

Se presentan los resultados de la composición bromatológica de la biomasa para los cultivos con acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM. Se indican los contenidos en concentración ( $\text{mg L}^{-1}$ ), rendimiento ( $\mu\text{g } 10^{-6}$  células) y porcentaje en peso seco de paramilo, proteína, lípidos totales, clorofila total y cenizas. De acuerdo con la prueba de Levene para homogeneidad de varianzas, se tienen las siguientes hipótesis:

$$H_0: \sigma_1 = \sigma_2 = \sigma_3 = \dots = \sigma_k$$

$H_1$ : Las varianzas no son homogéneas.

Todas las pruebas de Levene para los datos porcentaje en peso seco, concentración en  $\text{mg L}^{-1}$  y rendimiento en  $\mu\text{g } 10^{-6}$  células presentaron  $p > 0.05$ . Por lo tanto, no se rechaza  $H_0$ , así que se puede considerar que los datos provienen de un muestreo aleatorio y las poblaciones presentan varianzas homogéneas.

Por su parte, el ANOVA de un criterio pone a prueba el siguiente conjunto de hipótesis para las medias poblacionales de los diferentes tratamientos:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k$$

$H_1$ : Al menos dos medias poblacionales son diferentes.

**Composición biomasa seca de los cultivos de la sexta resiembra.** Los datos se reportan respecto a porcentaje en peso seco, concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y en rendimiento ( $\mu\text{g } 10^{-6}$  células). Diferente letra indica diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) y la misma letra significa que no hay diferencia ( $p > 0.05$ ) de acuerdo con el ANOVA de un criterio y la respectiva prueba de Tukey.

		Acetato sin cosustrato	Acetato-propionato 2.5 mM	Acetato-citrato 2.5 mM
Paramilo	Porcentaje en peso seco	57.9 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	48.1 $\pm$ 7.9 <sup>a</sup>	56.8 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>
	mg L <sup>-1</sup>	643.7 $\pm$ 79.7 <sup>b</sup>	632.6 $\pm$ 122.4 <sup>b</sup>	<b>1107.0 <math>\pm</math> 111.1<sup>c</sup></b>
	$\mu\text{g } 10^{-6}$ células	<b>712.2 <math>\pm</math> 58.5<sup>d</sup></b>	518.6 $\pm$ 56.4 <sup>e</sup>	357.1 $\pm$ 51.6 <sup>f</sup>
Proteína	Porcentaje en peso seco	26.5 $\pm$ 7.7 <sup>g</sup>	35.4 $\pm$ 8.1 <sup>g</sup>	25.6 $\pm$ 3.7 <sup>g</sup>
	mg L <sup>-1</sup>	288.4 $\pm$ 48.6 <sup>h</sup>	<b>464.7 <math>\pm</math> 39.1<sup>i</sup></b>	<b>495.8 <math>\pm</math> 43.0<sup>i</sup></b>
	$\mu\text{g } 10^{-6}$ células	<b>320.8 <math>\pm</math> 64.3<sup>j</sup></b>	<b>383.5 <math>\pm</math> 43.7<sup>j</sup></b>	159.8 $\pm$ 9.4 <sup>k</sup>
Lípidos totales	Porcentaje en peso seco	6.0 $\pm$ 2.3 <sup>l</sup>	9.2 $\pm$ 2.1 <sup>l</sup>	11.1 $\pm$ 1.9 <sup>l</sup>
	mg L <sup>-1</sup>	70.1 $\pm$ 17.1 <sup>m</sup>	125.1 $\pm$ 21.0 <sup>m</sup>	<b>250.2 <math>\pm</math> 32.0<sup>n</sup></b>
	$\mu\text{g } 10^{-6}$ células	77.8 $\pm$ 20.6 <sup>o</sup>	103.0 $\pm$ 17.1 <sup>o</sup>	81.0 $\pm$ 12.8 <sup>o</sup>
Clorofila total	Porcentaje en peso seco	0.6 $\pm$ 0.1 <sup>p</sup>	0.4 $\pm$ 0.1 <sup>p</sup>	<b>1.6 <math>\pm</math> 0.2<sup>q</sup></b>
	mg L <sup>-1</sup>	6.7 $\pm$ 1.6 <sup>q</sup>	4.7 $\pm$ 0.4 <sup>q</sup>	<b>31.3 <math>\pm</math> 0.2<sup>r</sup></b>
	$\mu\text{g } 10^{-6}$ células	7.4 $\pm$ 1.4 <sup>s</sup>	3.9 $\pm$ 0.5 <sup>t</sup>	<b>10.1 <math>\pm</math> 0.5<sup>u</sup></b>
Cenizas	Porcentaje en peso seco	0.8 $\pm$ 0.1 <sup>v</sup>	0.9 $\pm$ 0.2 <sup>v</sup>	0.9 $\pm$ 0.1 <sup>v</sup>
	mg L <sup>-1</sup>	8.8 $\pm$ 2.0 <sup>x</sup>	11.8 $\pm$ 2.5 <sup>x</sup>	<b>16.7 <math>\pm</math> 3.8<sup>y</sup></b>
	$\mu\text{g } 10^{-6}$ células	<b>9.7 <math>\pm</math> 2.0<sup>z</sup></b>	<b>9.6 <math>\pm</math> 1.5<sup>z</sup></b>	5.4 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>

### 1) ANOVAs de un criterio para comparar los porcentajes en peso seco de las variables bromatológicas de la biomasa.

a) Comparación para los porcentajes de paramilo en peso seco.

Univariate Tests of Significance for Porcentaje de paramilo en peso seco (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	26501.30	1	26501.30	672.1811	2.17 E-07
Tratamiento	171.85	2	85.92	2.1794	0.194326
Error	236.55	6	39.43		

Dado que  $p > 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, no se rechaza  $H_0$ , por lo que no hubo diferencias significativas entre los porcentajes de paramilo en peso seco.

b) Comparación para los porcentajes de proteína en peso seco.

Univariate Tests of Significance for Porcentaje de proteína en peso seco (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	7478.166	1	7478.166	203.2713	0.000007
Tratamiento	191.619	2	95.810	2.6043	0.153391
Error	220.734	6	36.789		

Dado que  $p > 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, no se rechaza  $H_0$ , por lo que no hubo diferencias significativas entre los porcentajes de proteína en peso seco.

c) Comparación para los porcentajes de lípidos totales en peso seco.

Univariate Tests of Significance for Porcentaje de lípidos en peso seco (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	679.5649	1	679.5649	164.9855	0.000014
<b>Tratamiento</b>	33.1621	2	16.5810	4.0256	0.077861
<b>Error</b>	24.7136	6	4.1189		

Dado que  $p > 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, no se rechaza  $H_0$ , por lo que no hubo diferencias significativas entre los porcentajes de lípidos totales en peso seco.

d) Comparación para los porcentajes de clorofila total en peso seco.

Univariate Tests of Significance for Porcentaje de clorofila en peso seco (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	6.791423	1	6.791423	325.0698	0.000002
<b>Tratamiento</b>	2.709815	2	1.354908	64.8523	0.000086
<b>Error</b>	0.125353	6	0.020892		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha variable. La prueba de Tukey mostró que acetato-citrato 2.5 mM es significativamente diferente en comparación con otros dos tratamientos. Entre acetato sin cosustrato y acetato-propionato 2.5 mM no hubo diferencias significativas.

Tukey HSD test; variable Porcentaje de clorofila en peso seco (Sexta resiembra) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .02089, df = 6.0000				
	Tratamiento	{1} - .56355	{2} - .40333	{3} - 1.6391
<b>1</b>	Acetato sin cosustrato		0.418123	0.000435
<b>2</b>	Acetato-propionato 2.5 mM	0.418123		0.000313
<b>3</b>	Acetato-citrato 2.5 mM	0.000435	0.000313	

e) Comparación para los porcentajes de clorofila total en peso seco.

Dado que  $p > 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, no se rechaza  $H_0$ , por lo que no hubo diferencias significativas entre los porcentajes de cenizas en peso seco.

Univariate Tests of Significance for Porcentaje de ceniza en peso seco (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	6.685742	1	6.685742	184.4130	0.000010
Tratamiento	0.017008	2	0.008504	0.2346	0.797841
Error	0.217525	6	0.036254		

## 2) ANOVAs de un criterio para comparar las concentraciones de las variables bromatológicas de la biomasa

a) Comparación para las concentraciones de paramilo.

Univariate Tests of Significance for Concentración de paramilo ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	5680137	1	5680137	506.0523	0.000001
Tratamiento	439735	2	219867	19.5883	0.002343
Error	67346	6	11224		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha variable. La prueba de Tukey mostró que acetato-citrato 2.5 mM es significativamente diferente de acetato-propionato 2.5 mM y de acetato sin cosustrato. Por su parte, entre estos dos últimos tratamientos no hubo diferencias significativas.

Tukey HSD test; variable Concentración de paramilo ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Sexta resiembra) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 11224., df = 6.0000				
	Tratamiento	{1} - 643.69	{2} - 632.65	{3} - 1107.0
1	Acetato sin cosustrato		0.991145	0.004329
2	Acetato-propionato 2.5 mM	0.991145		0.003866
3	Acetato-citrato 2.5 mM	0.004329	0.003866	

b) Comparación para las concentraciones de proteína.

Univariate Tests of Significance for Concentración de proteína total ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	1558921	1	1558921	968.8247	7.30 E-08
Tratamiento	74929	2	37465	23.2831	0.001487
Error	9655	6	1609		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha

variable. La prueba de Tukey mostró que acetato-citrato 2.5 mM y acetato-propionato 2.5 mM son significativamente mayores que acetato sin cosustrato. Por su parte, entre los dos primeros tratamientos no hubo diferencias significativas.

Tukey HSD test; variable Concentración de proteína total ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Sexta resiembra) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 1609.1, df = 6.0000				
	Tratamiento	{1} - 288.43	{2} - 464.34	{3} - 495.79
1	Acetato sin cosustrato		0.004270	0.001943
2	Acetato-propionato 2.5 mM	0.004270		0.625939
3	Acetato-citrato 2.5 mM	0.001943	0.625939	

c) Comparación para las concentraciones de lípidos totales.

Univariate Tests of Significance for Concentración de lípidos totales ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	198382.7	1	198382.7	329.9657	0.000002
Tratamiento	51064.1	2	25532.1	42.4670	0.000287
Error	3607.3	6	601.2		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha variable. La prueba de Tukey mostró que acetato-citrato 2.5 mM es significativamente mayor que acetato-propionato 2.5 mM y acetato sin cosustrato. Por su parte, entre estos dos últimos tratamientos no hubo diferencias significativas.

Tukey HSD test; variable Concentración de lípidos totales ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Sexta resiembra) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 601.22, df = 6.0000				
	Tratamiento	{1} - 70.132	{2} - 125.12	{3} - 250.15
1	Acetato sin cosustrato		0.074802	0.000452
2	Acetato-propionato 2.5 mM	0.074802		0.002071
3	Acetato-citrato 2.5 mM	0.000452	0.002071	

d) Comparación para las concentraciones de clorofila total.

Univariate Tests of Significance for Concentración de clorofila total ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	1822.132	1	1822.132	1890.584	9.90 E-09
Tratamiento	1316.958	2	658.479	683.216	8.35 E-08
Error	5.783	6	0.964		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha



variable. La prueba de Tukey mostró que acetato-citrato 2.5 mM es significativamente mayor que acetato-propionato 2.5 mM y acetato sin cosustrato. Mientras que en estos dos últimos tratamientos no hubo diferencias significativas.

Tukey HSD test; variable Concentración de clorofila total ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Sexta resiembra) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .96379, df = 6.0000				
	Tratamiento	{1} - 6.6726	{2} - 4.7152	{3} - 31.299
1	Acetato sin cosustrato		0.110051	0.000227
2	Acetato-propionato 2.5 mM	0.110051		0.000227
3	Acetato-citrato 2.5 mM	0.000227	0.000227	

e) Comparación para las concentraciones de ceniza.

Univariate Tests of Significance for Concentración de cenizas $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	1391.284	1	1391.284	154.5559	0.000017
Tratamiento	95.601	2	47.800	5.3101	0.047049
Error	54.011	6	9.002		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha variable. La prueba de Tukey mostró que acetato-propionato 2.5 mM y acetato sin cosustrato fueron significativamente menores que acetato-citrato 2.5 mM. Por su parte, entre los primeros dos tratamientos no hubo diferencias significativas.

Tukey HSD test; variable Concentración de cenizas ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Sexta resiembra) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 9.0018, df = 6.0000				
	Tratamiento	{1} - 8.7863	{2} - 11.816	{3} - 16.698
1	Acetato sin cosustrato		0.476824	0.041195
2	Acetato-propionato 2.5 mM	0.476824		0.194831
3	Acetato-citrato 2.5 mM	0.041195	0.194831	

### 3) ANOVAs de un criterio para comparar los rendimientos de las variables bromatológicas de la biomasa

a) Comparación para los rendimientos de paramilo.

Univariate Tests of Significance for Rendimiento de paramilo ( $\mu\text{g}/10^6$ células) (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	2523682	1	2523682	820.7758	1.19 E-07
Tratamiento	190310	2	95155	30.9472	0.000690
Error	18449	6	3075		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha variable. La prueba Tukey mostró que los tres tratamientos son significativamente diferentes entre sí. Acetato sin cosustrato fue el tratamiento de mayor valor, seguido de acetato-propionato 2.5 mM y, por último, acetato-citrato 2.5 mM.

Tukey HSD test; variable Rendimiento de paramilo ( $\mu\text{g}/10^6$ células) (Sexta resiembra) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 3074.8, df = 6.0000				
	<b>Tratamiento</b>	<b>{1} - 712.83</b>	<b>{2} - 518.64</b>	<b>{3} - 357.14</b>
<b>1</b>	Acetato sin cosustrato		0.012336	0.000730
<b>2</b>	Acetato-propionato 2.5 mM	0.012336		0.027568
<b>3</b>	Acetato-citrato 2-5 mM	0.000730	0.027568	

b) Comparación para los rendimientos de proteína.

Univariate Tests of Significance for Rendimiento de proteína total $\mu\text{g}/10^6$ células (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	<b>SS</b>	<b>Degr. of - Freedom</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Intercept</b>	746607.8	1	746607.8	365.4480	0.000001
<b>Tratamiento</b>	79851.8	2	39925.9	19.5428	0.002357
<b>Error</b>	12258.0	6	2043.0		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha variable. La prueba de Tukey mostró acetato sin cosustrato y acetato-propionato 2.5 mM fueron significativamente mayores que acetato-citrato 2.5 mM. Por su parte, entre los primeros dos tratamientos no hubo diferencias significativas.

Tukey HSD test; variable Rendimiento de proteína total $\mu\text{g}/10^6$ células (Sexta resiembra) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 2043.0, df = 6.0000				
	<b>Tratamiento</b>	<b>{1} - 320.77</b>	<b>{2} - 383.47</b>	<b>{3} - 159.82</b>
<b>1</b>	Acetato sin cosustrato		0.280596	0.011438
<b>2</b>	Acetato-propionato 2.5 mM	0.280596		0.002388
<b>3</b>	Acetato-citrato 2-5 mM	0.011438	0.002388	

c) Comparación para los rendimientos de lípidos totales.

Univariate Tests of Significance for Rendimiento de lípidos totales ( $\mu\text{g}/10^6$ células) (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	<b>SS</b>	<b>Degr. of - Freedom</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Intercept</b>	69011.17	1	69011.17	231.3869	0.000005
<b>Tratamiento</b>	1209.20	2	604.60	2.0272	0.212518
<b>Error</b>	1789.50	6	298.25		

Dado que  $p > 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, no se rechaza  $H_0$ , por lo que no hubo diferencias significativas entre los rendimientos de lípidos totales.

d) Comparación para los rendimientos de clorofila total.

Univariate Tests of Significance for Rendimiento de clorofila total ( $\mu\text{g}/10^6$ células) (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	455.7985	1	455.7985	546.3860	4.02 E-07
<b>Tratamiento</b>	57.9762	2	28.9881	34.7493	0.000502
<b>Error</b>	5.0052	6	0.8342		

Dado que  $p < 0.05$  para la variable *Tratamiento*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias en, al menos, dos medias poblacionales respecto a dicha variable. La prueba de Tukey mostró que los tres tratamientos son diferentes entre sí. Acetato-citrato 2.5 mM fue el tratamiento de mayor valor, seguido de acetato sin cosustrato y acetato-propionato 2.5 mM.

Tukey HSD test; variable Rendimiento de clorofila total ( $\mu\text{g}/10^6$ células) (Sexta resiembra) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .83421, df = 6.0000				
	Tratamiento	{1} - 7.3367	{2} - 3.9037	{3} - 10.109
<b>1</b>	Acetato sin cosustrato		0.008907	0.023167
<b>2</b>	Acetato-propionato 2.5 mM	0.008907		0.000582
<b>3</b>	Acetato-citrato 2-5 mM	0.023167	0.000582	

e) Comparación para los rendimientos de cenizas.

Univariate Tests of Significance for Rendimiento de cenizas ( $\mu\text{g}/10^6$ células) (Sexta resiembra) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	610.0574	1	610.0574	241.6656	0.000004
<b>Tratamiento</b>	36.1748	2	18.0874	7.1651	0.025706
<b>Error</b>	15.1463	6	2.5244		

Dado que  $p < 0.05$  para *Tratamiento*, entonces, se rechaza  $H_0$ , por lo que hay diferencias. La prueba de Tukey mostró que acetato sin cosustrato y acetato-propionato 2.5 mM fueron significativamente mayores que acetato-citrato 2.5 mM. Mientras que entre los primeros dos tratamientos no hubo diferencias significativas.

Tukey HSD test; variable Rendimiento de cenizas ( $\mu\text{g}/10^6$ células) (Sexta resiembra) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 2.5244, df = 6.0000				
	Tratamiento	{1} - 9.6994	{2} - 9.6015	{3} - 5.3984
<b>1</b>	Acetato sin cosustrato		0.996925	0.037137
<b>2</b>	Acetato-propionato 2.5 mM	0.996925		0.040677
<b>3</b>	Acetato-citrato 2.5 mM	0.037137	0.040677	

## 2.5 ANOVAs factoriales para comparar los porcentajes de ácidos grasos saturados (AGS), ácidos grasos monoinsaturados (AGM) y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) entre los tratamientos de la sexta resiembra

Se realizaron dos ANOVAs factoriales para analizar datos de los EMAG. En el primer ANOVA, se tomó como variable de respuesta los porcentajes de EMAG agrupados en AGS, AGM y AGPI. En el segundo ANOVA, se seleccionó como variable de respuesta los porcentajes de EMAG por cada tipo de ácido graso.

**Composición porcentual de EMAG agrupados en AGS, AGM y AGPI en los cultivos con acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM.** Diferente letra indica diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) para un tipo de ácido graso respecto a cada tratamiento y la misma letra indica que no hay diferencia estadística ( $p > 0.05$ ).

Sistema n	% respecto al total		
	Acetato sin cosustrato	Acetato-propionato 2.5 mM	Acetato-citrato 2.5 mM
12:0	4.04 ± 0.44 <sup>a</sup>	3.03 ± 1.67 <sup>a</sup>	5.63 ± 0.09 <sup>a</sup>
13:0	0.00	1.40 ± 0.33	0.00
14:0	11.74 ± 2.99 <sup>b</sup>	18.12 ± 1.23 <sup>c</sup>	15.82 ± 4.56 <sup>b</sup>
15:0	0.00	2.02 ± 0.19	0.00
16:0	18.10 ± 0.91 <sup>d</sup>	17.58 ± 0.16 <sup>d</sup>	17.52 ± 2.09 <sup>d</sup>
18:0	2.89 ± 0.19 <sup>e</sup>	5.80 ± 0.80 <sup>e</sup>	5.07 ± 1.04 <sup>e</sup>
<b>Σ AGS</b>	<b>36.77 ± 5.42<sup>f</sup></b>	<b>47.94 ± 3.63<sup>f</sup></b>	<b>44.05 ± 6.70<sup>f</sup></b>
16:1n-9	1.62 ± 0.27 <sup>g</sup>	2.25 ± 0.48 <sup>g</sup>	2.33 ± 0.38 <sup>g</sup>
16:1n-7	2.46 ± 0.23 <sup>h</sup>	1.51 ± 0.08 <sup>h</sup>	0.20 ± 0.07 <sup>h</sup>
trans 18:1n-9	5.47 ± 0.59 <sup>i</sup>	4.50 ± 0.45 <sup>i</sup>	4.50 ± 1.12 <sup>i</sup>
cis 18:1n-9	3.80 ± 0.72 <sup>j</sup>	5.30 ± 1.16 <sup>j</sup>	5.37 ± 0.79 <sup>j</sup>
24:1n-9	2.84 ± 0.40 <sup>k</sup>	2.41 ± 0.13 <sup>k</sup>	1.65 ± 0.59 <sup>k</sup>
<b>Σ AGM</b>	<b>16.19 ± 1.51<sup>l</sup></b>	<b>15.96 ± 2.23<sup>l</sup></b>	<b>14.06 ± 3.01<sup>l</sup></b>
16:2n-6	3.02 ± 0.16 <sup>m</sup>	2.92 ± 0.55 <sup>m</sup>	4.13 ± 0.87 <sup>m</sup>
16:4n-3	2.37 ± 0.62 <sup>n</sup>	1.18 ± 0.13 <sup>n</sup>	2.33 ± 0.32 <sup>n</sup>
18:2n-6	6.43 ± 0.91 <sup>o</sup>	5.69 ± 1.20 <sup>o</sup>	8.61 ± 1.56 <sup>o</sup>
18:3n-3	8.98 ± 0.23 <sup>p</sup>	6.89 ± 1.11 <sup>p</sup>	9.20 ± 1.31 <sup>p</sup>
20:2n-6	2.50 ± 0.67 <sup>q</sup>	2.82 ± 0.27 <sup>q</sup>	1.66 ± 0.34 <sup>q</sup>
20:3n-6	2.30 ± 0.19 <sup>r</sup>	0.97 ± 0.23 <sup>r</sup>	0.60 ± 0.12 <sup>r</sup>
20:4n-6	6.42 ± 0.55 <sup>s</sup>	3.82 ± 1.61 <sup>s</sup>	4.25 ± 0.97 <sup>s</sup>
20:4n-3	3.01 ± 0.08 <sup>t</sup>	2.36 ± 0.65 <sup>t</sup>	1.28 ± 0.09 <sup>t</sup>
20:5n-3	4.35 ± 0.43 <sup>u</sup>	3.03 ± 0.43 <sup>u</sup>	3.70 ± 0.43 <sup>u</sup>
22:5n-6	2.42 ± 0.32 <sup>v</sup>	1.65 ± 0.12 <sup>v</sup>	2.51 ± 0.39 <sup>v</sup>
22:5n-3	2.69 ± 0.38 <sup>x</sup>	2.68 ± 0.31 <sup>x</sup>	1.33 ± 0.32 <sup>x</sup>
22:6n-3	2.56 ± 0.08 <sup>y</sup>	2.07 ± 0.24 <sup>y</sup>	2.30 ± 0.28 <sup>y</sup>
<b>Σ AGPI</b>	<b>47.04 ± 2.70<sup>z</sup></b>	<b>36.09 ± 2.03<sup>z</sup></b>	<b>41.89 ± 5.74<sup>z</sup></b>

a) Primer ANOVA factorial. Se consideró como variable de respuesta el porcentaje de EMAG y como variables independientes o factores el tipo de ácido graso (tres niveles, AGS, AGM y AGPI) y el tratamiento (tres niveles, acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM). De acuerdo con esto, el ANOVA factorial pone a prueba los siguientes conjuntos de hipótesis.

i) ¿Hay un efecto en la variable de respuesta debido a la interacción de los factores A (tipo de ácido graso) y B (tratamiento)? Para este caso, se tiene:

H<sub>0</sub>: Los factores A (tipo de ácido graso) y B (tratamiento) no interactúan sobre la variable de respuesta.

H<sub>1</sub>: Los factores A (tipo de ácido graso) y B (tratamiento) interactúan sobre la variable de respuesta.

ii) ¿Hay un efecto en la variable de respuesta debido al factor A (tipo de ácido graso)? Para este caso, se tiene:

H<sub>0</sub>: No hay diferencia entre las medias *a* en los niveles del factor A (tipo de ácido graso).

H<sub>1</sub>: Al menos dos medias difieren entre los niveles del factor A (tipo de ácido graso).

iii) ¿Hay un efecto en la variable de respuesta debido al factor B (tratamiento)? Para este caso, se tiene:

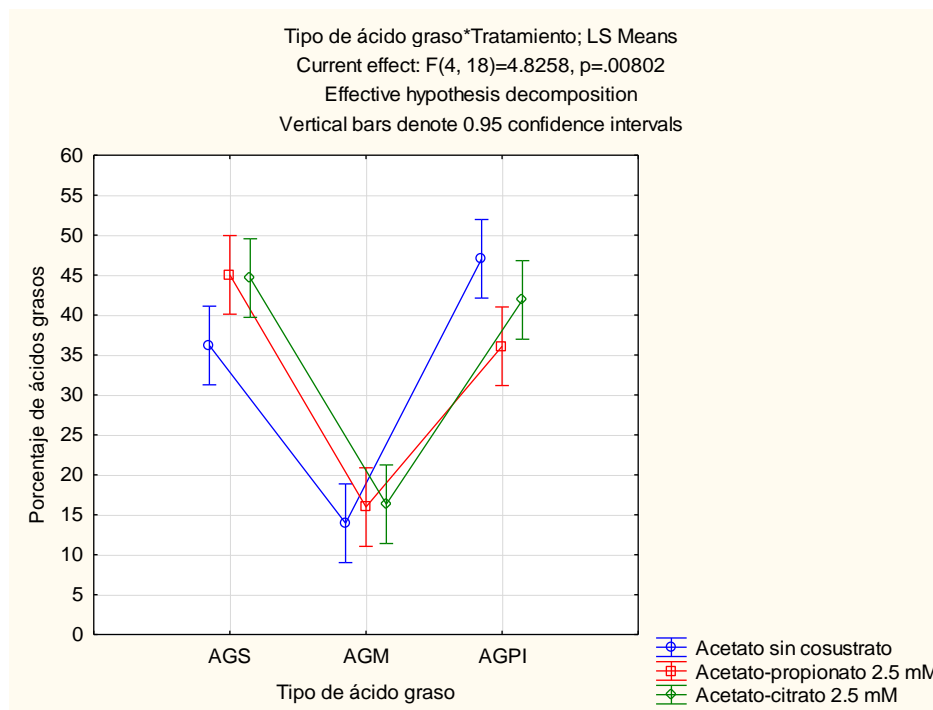
H<sub>0</sub>: No hay diferencia entre las medias *b* en los niveles del factor B (tratamiento).

H<sub>1</sub>: Al menos dos medias difieren entre los niveles del factor B (tratamiento).

Univariate Results for Each DV (ANOVA factorial por tipo de ácidos grasos) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	Degr. of Freedom	Porcentaje de ácidos grasos - SS	Porcentaje de ácidos grasos - MS	Porcentaje de ácidos grasos - F	Porcentaje de ácidos grasos - p
Intercept	1	29420.07	29420.07	1786.875	0.000000
Tipo de ácido graso	2	4184.20	2092.10	127.067	2.42 E-11
Tratamiento	2	21.73	10.86	0.660	0.529011
Tipo de ácido graso*Tratamiento	4	317.82	79.46	4.826	0.008023
Error	18	296.36	16.46		
Total	26	4820.11			

De acuerdo con los resultados,  $p < 0.05$  para *Tipo de ácido graso\*Tratamiento*, por lo cual se rechaza  $H_0$ , así que existen una interacción significativa entre los dos factores. También se encontró que  $p < 0.05$  para *Tipo de ácido graso*, por lo cual, también se rechaza  $H_0$  y hay diferencias significativas respecto a esta variable. En el caso de *Tratamiento*,  $p > 0.05$ , por lo cual, no se rechaza  $H_0$ , así que no hay diferencias significativas respecto a esta variable.

De la prueba de Tukey se obtuvo una matriz de 9 columnas x 9 renglones, así que para mostrar los resultados se muestra el siguiente gráfico. Se observa que el porcentaje de AGM fue significativamente menor en los tres tratamientos respecto a los AGS y AGPI. Por su parte, entre estos dos tipos de ácidos grasos no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

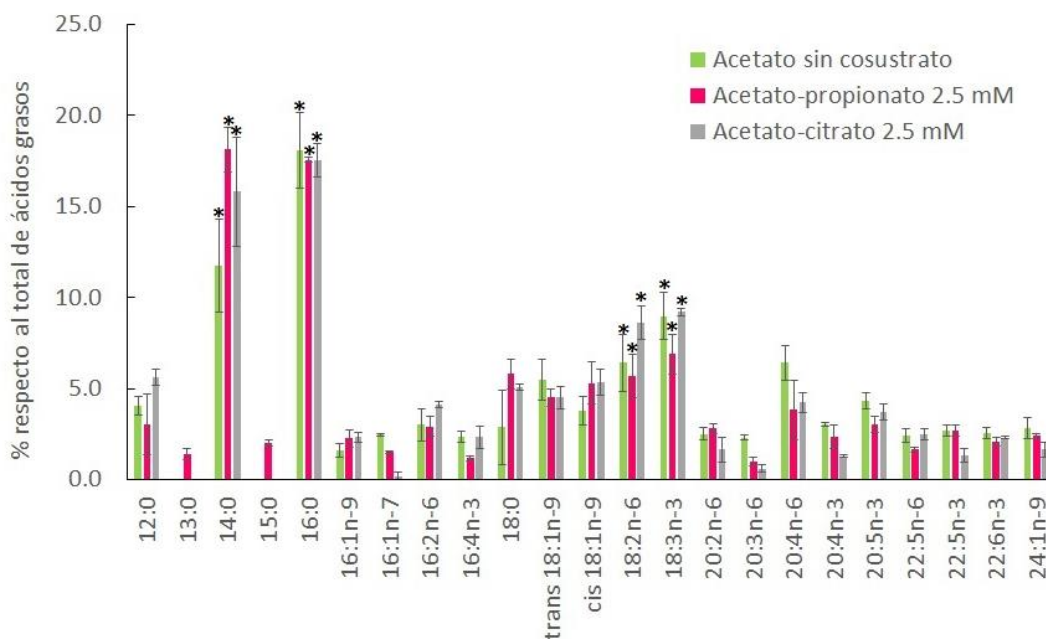


b) Segunda ANOVA factorial. En este caso, se consideró como variable de respuesta el porcentaje de cada EMAG y se tomó como factores *Ácido graso individual* (23 niveles) *Tratamiento* (tres niveles, acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM).

De acuerdo con los resultados,  $p < 0.05$  para *Ácido graso individual\*Tratamiento*, por lo tanto, se rechaza  $H_0$  y existe una interacción significativa entre ambos factores. Por su parte, también para *Ácido graso individual*, se encontró  $p < 0.05$ , así que también se rechaza  $H_0$  y hay diferencias significativas respecto a esta variable. En el caso de *Tratamiento*, se obtuvo  $p > 0.05$ , por que no se rechaza  $H_0$ , en consecuencia, no hay diferencias significativas respecto a esta segunda variable.

Univariate Results for Each DV (ANOVA factorial por cada EMAG) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	Degr. of - Freedom	Porcentaje - SS	Porcentaje - MS	Porcentaje - F	Porcentaje - p
Intercept	1	3664.721	3664.721	1172.901	0.000000
Ácido graso individual	22	3332.867	151.494	48.486	0.000000
Tratamiento	2	0.882	0.441	0.141	0.868445
Ácido graso individual*Tratamiento	44	253.978	5.772	1.847	0.003872
Error	138	431.180	3.124		
Total	206	3961.870			

Dado que se obtuvo una matriz grande de 69 filas por 69 columnas, se muestran los resultados obtenidos en la siguiente gráfica, donde se indican con un asterisco (\*) los ácidos grasos que presentaron mayores porcentajes significativos ( $p < 0.05$ ). Estos ácidos grasos corresponden, en orden descendente a 16:0, 14:0, 18:3n-3 y 18:2n-6. Por su parte, los ácidos grasos con menor porcentaje de abundancia corresponden, en orden descendente a 16:1n-7, 20:3n-6, 15:0 y 13:0, sin embargo, entre estos no hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ )



Comparación de los porcentajes de ácidos grasos para los cultivos acetato sin cosustrato, acetato-propionato 2.5 mM y acetato-citrato 2.5 mM. Con asterisco (\*) se indican los ácidos grasos con mayor porcentaje significativo.

## Anexo 3. Análisis estadísticos para el experimento de comparación entre anaerobiosis y fotoperíodo normal

### 3.1 Comparación de la composición de la biomasa (paramilo, proteína, lípidos totales, clorofila total y cenizas) al décimo día de cultivo

Se muestran los resultados obtenidos de los ANOVAs de dos factores realizados con STATISTICA 10 para analizar la composición bromatológica de la biomasa para los cuatro cultivos realizados en este experimento. Se indican los contenidos en concentración ( $\text{mg L}^{-1}$ ), rendimiento ( $\mu\text{g } 10^{-6}$  células) y porcentaje en peso seco de paramilo, proteína, lípidos totales, clorofila total y cenizas. Todos los cultivos se realizaron con acetato-citrato 2.5 mM para este experimento y corresponde a los tratamientos de 11 días sin anaerobiosis, 11 días con anaerobiosis, 14 días sin anaerobiosis y 14 días con anaerobiosis. De acuerdo con la prueba de Levene para homogeneidad de varianzas, se tienen las siguientes hipótesis:

$$H_0: \sigma_1 = \sigma_2 = \sigma_3 = \dots = \sigma_k$$

$H_1$ : Las varianzas no son homogéneas.

Todas las pruebas de Levene para los datos porcentaje en peso seco, concentración y rendimiento presentaron  $p > 0.05$ . Por lo tanto, no se rechaza  $H_0$ , así que se puede considerar que los datos provienen de un muestreo aleatorio y las poblaciones presentan varianzas homogéneas.

El ANOVA de dos criterios pone a prueba el siguiente conjunto de hipótesis para las medias poblacionales de un experimento con dos factores (variables independientes) que son la condición de anaerobiosis con dos niveles, ausencia o presencia, etiquetada como *Tratamiento*, así como el *Tiempo* de duración de los cultivos con dos niveles, 11 y 14 días, respecto a una variable de respuesta correspondiente a la composición de la biomasa (medida en porcentaje en peso seco, concentración y rendimiento).

i) ¿Hay un efecto en la variable de respuesta debido a la interacción de los factores A (tiempo) y B (tratamiento)? Para este caso, se tiene:

$H_0$ : Los factores A (tiempo) y B (tratamiento) no interactúan sobre la variable de respuesta.

$H_1$ : Los factores A (tiempo) y B (tratamiento) interactúan sobre la variable de respuesta.

ii) ¿Hay un efecto en la variable de respuesta debido al factor A (tiempo)? Para este caso, se tiene:

$H_0$ : No hay diferencia entre las medias debido a los niveles del factor A (tiempo).



H<sub>1</sub>: Al menos dos medias difieren entre los niveles del factor A (tiempo).

iii) ¿Hay un efecto en la variable de respuesta debido al factor B (tratamiento)?  
Para este caso, se tiene:

H<sub>0</sub>: No hay diferencia entre las medias debido a los niveles del factor B (tratamiento).

H<sub>1</sub>: Al menos dos medias difieren entre los niveles del factor B (tratamiento).

### 1) ANOVAs de dos criterios para comparar los porcentajes en peso seco de las variables bromatológicas de la biomasa.

**Composición biomasa seca de los cultivos del experimento de comparación entre anaerobiosis y fotoperíodo normal.** Los datos se reportan respecto a porcentaje en peso seco, concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y en rendimiento ( $\mu\text{g } 10^{-6}$  células). Diferente letra indica diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) respecto a la presencia o ausencia de anaerobiosis, misma letra significa que no hay diferencia ( $p > 0.05$ ). Diferente número indica diferencia estadística respecto a los días de cultivo ( $p < 0.05$ ) y mismo número indica que no hay diferencia ( $p > 0.05$ ).

		Sin anaerobiosis	Con anaerobiosis
Paramilo	Porcentaje en peso seco (11 días)	50.2 ± 7.5 <sup>a1</sup>	41.3 ± 3.1 <sup>a1</sup>
	Porcentaje en peso seco (14 días)	64.3 ± 6.2 <sup>b1</sup>	40.8 ± 5.0 <sup>c1</sup>
	$\mu\text{g mL}^{-1}$ (11 días)	956.0 ± 102.6 <sup>d2</sup>	754.0 ± 93.6 <sup>d2</sup>
	$\mu\text{g mL}^{-1}$ (14 días)	1646.8 ± 219.0 <sup>e3</sup>	519.3 ± 53.7 <sup>f2</sup>
	$\mu\text{g } 10^{-6}$ células (11 días)	328.1 ± 54.4 <sup>g4</sup>	271.9 ± 33.4 <sup>g5</sup>
	$\mu\text{g } 10^{-6}$ células (14 días)	481.5 ± 39.9 <sup>h5</sup>	188.1 ± 16.0 <sup>i5</sup>
Proteína	Porcentaje en peso seco (11 días)	28.0 ± 7.1 <sup>a1</sup>	34.5 ± 3.9 <sup>a1</sup>
	Porcentaje en peso seco (14 días)	18.6 ± 4.0 <sup>b1</sup>	28.2 ± 5.1 <sup>b1</sup>
	$\mu\text{g mL}^{-1}$ (11 días)	552.7 ± 66.5 <sup>c2</sup>	625.4 ± 52.9 <sup>c2</sup>
	$\mu\text{g mL}^{-1}$ (14 días)	509.7 ± 84.1 <sup>d2</sup>	378.8 ± 79.8 <sup>d3</sup>
	$\mu\text{g } 10^{-6}$ células (11 días)	185.6 ± 31.8 <sup>e4</sup>	226.0 ± 25.2 <sup>e4</sup>
	$\mu\text{g } 10^{-6}$ células (14 días)	150.5 ± 31.6 <sup>f4</sup>	129.8 ± 24.4 <sup>f4</sup>
Lípidos totales	Porcentaje en peso seco (11 días)	12.7 ± 3.3 <sup>a1</sup>	16.0 ± 3.5 <sup>a1</sup>
	Porcentaje en peso seco (14 días)	6.5 ± 0.2 <sup>b2</sup>	23.2 ± 5.7 <sup>c1</sup>
	$\mu\text{g mL}^{-1}$ (11 días)	243.6 ± 35.9 <sup>d3</sup>	292.9 ± 72.2 <sup>d3</sup>
	$\mu\text{g mL}^{-1}$ (14 días)	165.1 ± 23.6 <sup>e3</sup>	296.3 ± 24.0 <sup>f3</sup>
	$\mu\text{g } 10^{-6}$ células (11 días)	83.4 ± 14.8 <sup>g4</sup>	106.2 ± 15.5 <sup>g4</sup>
	$\mu\text{g } 10^{-6}$ células (14 días)	48.5 ± 10.1 <sup>h5</sup>	101.7 ± 9.4 <sup>i4</sup>
Clorofila total	Porcentaje en peso seco (11 días)	1.7 ± 0.2 <sup>a1</sup>	1.7 ± 0.1 <sup>a1</sup>
	Porcentaje en peso seco (14 días)	1.4 ± 0.3 <sup>b1</sup>	2.2 ± 0.3 <sup>c2</sup>
	$\mu\text{g mL}^{-1}$ (11 días)	31.9 ± 2.2 <sup>d3</sup>	31.1 ± 2.4 <sup>d3</sup>
	$\mu\text{g mL}^{-1}$ (14 días)	35.4 ± 2.2 <sup>e3</sup>	27.4 ± 3.1 <sup>e3</sup>
	$\mu\text{g } 10^{-6}$ células (11 días)	10.9 ± 1.3 <sup>f4</sup>	11.2 ± 0.8 <sup>f4</sup>
	$\mu\text{g } 10^{-6}$ células (14 días)	10.4 ± 0.9 <sup>g4</sup>	9.4 ± 0.8 <sup>g4</sup>
Cenizas	Porcentaje en peso seco (11 días)	1.1 ± 0.2 <sup>a1</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>a1</sup>
	Porcentaje en peso seco (14 días)	0.7 ± 0.1 <sup>b1</sup>	1.1 ± 0.2 <sup>b1</sup>
	$\mu\text{g mL}^{-1}$ (11 días)	12.5 ± 3.7 <sup>c2</sup>	14.0 ± 3.4 <sup>c2</sup>
	$\mu\text{g mL}^{-1}$ (14 días)	17.1 ± 3.5 <sup>d2</sup>	13.3 ± 3.0 <sup>d2</sup>
	$\mu\text{g } 10^{-6}$ células (11 días)	5.5 ± 1.0 <sup>e3</sup>	5.1 ± 1.6 <sup>e3</sup>
	$\mu\text{g } 10^{-6}$ células (14 días)	5.0 ± 0.9 <sup>f4</sup>	4.6 ± 0.5 <sup>f4</sup>

a) Comparación para los porcentajes de paramilo en peso seco.

Univariate Tests of Significance for Porcentaje de paramilo en peso seco (Spreadsheet29) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	28997.94	1	28997.94	859.4284	1.9856E-09
<b>Tiempo</b>	137.25	1	137.25	4.0678	0.078438
<b>Tratamiento</b>	784.10	1	784.10	23.2389	0.001320
<b>Tiempo*Tratamiento</b>	156.57	1	156.57	4.6403	0.063366
<b>Error</b>	269.93	8	33.74		

De acuerdo con los resultados,  $p > 0.05$  para *Tiempo\*Tratamiento* por lo cual, no se rechaza  $H_0$  y no existe una interacción significativa entre las variables tiempo y tratamiento. Para la variable *Tiempo*  $p > 0.05$ , por lo que tampoco se rechaza  $H_0$  y no existen diferencias significativas respecto a esta variable. Por su parte, para la variable *Tratamiento*  $p < 0.05$ , por lo cual, sí se rechaza  $H_0$  y existen diferencias significativas causadas por la anaerobiosis.

Dado que, en la prueba de ANOVA de dos factores, se rechazó  $H_0$  para la variable *Tratamiento*, se realizó una prueba Post-Hoc de Tukey para identificar las diferencias significativa, la cual se encontró únicamente entre los cultivos de 14 días con y sin anaerobiosis.

Tukey HSD test; variable Porcentaje de paramilo en peso seco (Spreadsheet29) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 33.741, df = 8.0000						
	Tiempo	Tratamiento	{1} - 50.247	{2} - 41.305	{3} - 64.235	{4} - 40.844
1	11 días	sin anaerobiosis		0.305668	0.071533	0.270217
2	11 días	con anaerobiosis	0.305668		0.005788	0.999667
3	14 días	sin anaerobiosis	0.071533	0.005788		0.005152
4	14 días	con anaerobiosis	0.270217	0.999667	0.005152	

b) Comparación para los porcentajes de proteína en peso seco.

Univariate Tests of Significance for Porcentaje de proteína en peso seco (Spreadsheet29) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	8970.655	1	8970.655	283.9392	0.000000
<b>Tiempo</b>	184.920	1	184.920	5.8531	0.041895
<b>Tratamiento</b>	194.451	1	194.451	6.1548	0.038060
<b>Tiempo*Tratamiento</b>	6.982	1	6.982	0.2210	0.650834
<b>Error</b>	252.749	8	31.594		

De acuerdo con los resultados,  $p > 0.05$  para *Tiempo\*Tratamiento* por lo cual, no se rechaza  $H_0$  y no existe una interacción significativa. Para las variables *Tiempo* y *Tratamiento* por separado  $p < 0.05$ , por lo que se rechaza  $H_0$  y existen diferencias significativas respecto a estas variables.

La prueba de Tukey mostró que la diferencia estadísticamente significativa se encontró entre los tratamientos de 11 días con anaerobiosis y 14 días sin anaerobiosis.

Tukey HSD test; variable Porcentaje de proteína en peso seco (Spreadsheet29) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 31.594, df = 8.0000						
	Tiempo	Tratamiento	{1} - 28.004	{2} - 34.530	{3} - 18.628	{4} - 28.204
1	11 días	sin anaerobiosis		0.521288	0.249752	0.999970
2	11 días	con anaerobiosis	0.521288		0.034730	0.544770
3	14 días	sin anaerobiosis	0.249752	0.034730		0.235893
4	14 días	con anaerobiosis	0.999970	0.544770	0.235893	

c) Comparación para los porcentajes de lípidos totales en peso seco.

Univariate Tests of Significance for Porcentaje de lípidos totales en peso seco (Spreadsheet29) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	2567.580	1	2567.580	177.6129	0.000001
Tiempo	0.766	1	0.766	0.0530	0.823714
Tratamiento	304.762	1	304.762	21.0820	0.001775
Tiempo*Tratamiento	133.022	1	133.022	9.2018	0.016224
Error	115.648	8	14.456		

De acuerdo con los resultados,  $p < 0.05$  para *Tiempo\*Tratamiento* por lo cual, se rechaza  $H_0$  y existe una interacción significativa. Para la variable *Tiempo*  $p > 0.05$ , así que no se rechaza  $H_0$  y no existen diferencias significativas respecto a esta variable. Por su parte, para la variable *Tratamiento*  $p < 0.05$ , por lo cual, se rechaza  $H_0$  y existen diferencias significativas causadas por la anaerobiosis.

Tukey HSD test; variable Porcentaje de lípidos totales en peso seco (Spreadsheet29) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 14.456, df = 8.0000						
	Tiempo	Tratamiento	{1} - 12.665	{2} - 16.085	{3} - 6.5112	{4} - 23.249
1	11 días	sin anaerobiosis		0.698579	0.270351	0.037509
2	11 días	con anaerobiosis	0.698579		0.059175	0.175326
3	14 días	sin anaerobiosis	0.270351	0.059175		0.003039
4	14 días	con anaerobiosis	0.037509	0.175326	0.003039	

La prueba de Tukey mostró que hubo diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento de 11 días sin anaerobiosis y 14 días con

anaerobiosis, así como entre el tratamiento de 14 días con anaerobiosis y 14 días sin anaerobiosis.

d) Comparación para los porcentajes de clorofila total en peso seco.

Univariate Tests of Significance for Porcentaje de clorofila en peso seco (Spreadsheet29) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	27.72391	1	27.72391	353.8784	6.58 E-08
<b>Tiempo</b>	0.80817	1	0.80817	10.3158	0.012390
<b>Tratamiento</b>	0.00307	1	0.00307	0.0392	0.847911
<b>Tiempo*Tratamiento</b>	2.04635	1	2.04635	26.1203	0.000918
<b>Error</b>	0.62674	8	0.07834		

De acuerdo con los resultados,  $p < 0.05$  para *Tiempo\*Tratamiento* por lo cual, se rechaza  $H_0$  y existe una interacción significativa. Para la variable *Tiempo*  $p < 0.05$ , así que se rechaza  $H_0$  y hay diferencias significativas respecto a esta variable. Por su parte, para la variable *Tratamiento*  $p > 0.05$ , así que no rechaza  $H_0$  y no hay diferencias significativas.

La prueba de Tukey mostró que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos de 11 días sin anaerobiosis y 11 días con anaerobiosis, pero sí las hubo entre 14 días con anaerobiosis y 14 días sin anaerobiosis. Otra diferencia significativa también se encontró entre 11 días con anaerobiosis y 14 días sin anaerobiosis.

Tukey HSD test; variable Porcentaje de clorofila en peso seco (Spreadsheet29) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .07834, df = 8.0000						
	Tiempo	Tratamiento	{1} - 1.6894	{2} - .83150	{3} - 1.3825	{4} - 2.1764
1	11 días	sin anaerobiosis		0.093352	0.564200	0.222454
2	11 días	con anaerobiosis	0.093352		0.152137	0.001803
3	14 días	sin anaerobiosis	0.564200	0.152137		0.034307
4	14 días	con anaerobiosis	0.222454	0.001803	0.034307	

e) Comparación para los porcentajes de cenizas en peso seco.

Univariate Tests of Significance for Porcentaje de cenizas en peso seco (Spreadsheet29) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	9.800203	1	9.800203	338.6999	0.000000
<b>Tiempo</b>	0.006835	1	0.006835	0.2362	0.639989
<b>Tratamiento</b>	0.013226	1	0.013226	0.4571	0.518046
<b>Tiempo*Tratamiento</b>	0.425884	1	0.425884	14.7188	0.004972
<b>Error</b>	0.231478	8	0.028935		

De acuerdo con los resultados,  $p < 0.05$  para *Tiempo\*Tratamiento* por lo cual, se rechaza  $H_0$  y hay una interacción significativa. Para las variables *Tiempo* y *Tratamiento* por separado, se obtuvo  $p > 0.05$ , así que no se rechaza  $H_0$  y no hay diferencias significativas respecto a estas variables.

Por su parte, al realizar la prueba Tukey, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni entre los tiempos de cultivo ni entre la presencia o ausencia de anaerobiosis.

Tukey HSD test; variable Porcentaje de cenizas en peso seco (Spreadsheet9) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .02893, df = 8.0000						
	Tiempo	Tratamiento	{1} - 1.0828	{2} - .77238	{3} - .65825	{4} - 1.1014
1	11 días	sin anaerobiosis		0.193590	0.061505	0.999108
2	11 días	con anaerobiosis	0.193590		0.842884	0.161194
3	14 días	sin anaerobiosis	0.061505	0.842884		0.050914
4	14 días	con anaerobiosis	0.999108	0.161194	0.050914	

## 2) ANOVAs de dos criterios para comparar las concentraciones de las variables bromatológicas de la biomasa.

a) Comparación para las concentraciones de paramilo.

Univariate Tests of Significance for Concentración de paramilo ( $\mu\text{g/mL}$ ) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	11268195	1	11268195	642.7800	6.27 E-09
Tiempo	155973	1	155973	8.8973	0.017525
Tratamiento	1325620	1	1325620	75.6183	0.000024
Tiempo*Tratamiento	642317	1	642317	36.6401	0.000305
Error	140243	8	17530		

De acuerdo con los resultados,  $p < 0.05$  para *Tiempo\*Tratamiento* por lo cual, se rechaza  $H_0$  y hay una interacción significativa entre las variables tiempo y tratamiento. Para las variables *Tiempo* y *Tratamiento* por separado, se obtuvo  $p < 0.05$ , así que se rechaza  $H_0$  en ambos casos y hay diferencias significativas respecto a estas variables.

La prueba de Tukey mostró que no hay diferencia significativa entre 11 días sin anaerobiosis y 11 días con anaerobiosis, pero sí entre 14 días sin anaerobiosis y 14 días con anaerobiosis. Además, también se encontró diferencia significativa entre el tratamiento de 11 días sin anaerobiosis y 14 días sin anaerobiosis.

Tukey HSD test; variable Concentración de paramilo ( $\mu\text{g/mL}$ ) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 17530., df = 8.0000						
	Tiempo	Tratamiento	{1} - 956.03	{2} - 754.01	{3} - 1646.8	{4} - 519.31
1	11 días	sin anaerobiosis		0.312159	0.001123	0.015912
2	11 días	con anaerobiosis	0.312159		0.000354	0.210911
3	14 días	sin anaerobiosis	0.001123	0.000354		0.000242
4	14 días	con anaerobiosis	0.015912	0.210911	0.000242	

b) Comparación para las concentraciones de proteína.

Univariate Tests of Significance for Concentración de proteína ( $\mu\text{g/mL}$ ) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	3202211	1	3202211	609.1081	7.76 E-09
Tiempo	62801	1	62801	11.9456	0.008615
Tratamiento	2513	1	2513	0.4780	0.508872
Tiempo*Tratamiento	31181	1	31181	5.9310	0.040859
Error	42058	8	5257		

De acuerdo con los resultados,  $p < 0.05$  para *Tiempo\*Tratamiento* por lo cual, se rechaza  $H_0$  y hay una interacción significativa entre las variables tiempo y tratamiento. Para la variable *Tiempo*,  $p < 0.05$ , por lo cual se rechaza  $H_0$  y hay diferencias significativas respecto a esta variable. En cuanto a la variable *Tratamiento*,  $p > 0.05$  así que no se rechaza  $H_0$  y no hay diferencias significativas.

La prueba de Tukey mostró que la única diferencia significativa se presentó entre 11 días con anaerobiosis y 14 días con anaerobiosis. Entre los otros tratamientos, no se encontraron diferencias significativas.

Tukey HSD test; variable Concentración de proteína ( $\mu\text{g/mL}$ ) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 5257.2, df = 8.0000						
	Tiempo	Tratamiento	{1} - 552.42	{2} - 625.42	{3} - 509.68	{4} - 378.79
1	11 días	sin anaerobiosis		0.625139	0.885785	0.073219
2	11 días	con anaerobiosis	0.625139		0.279926	0.013473
3	14 días	sin anaerobiosis	0.885785	0.279926		0.199903
4	14 días	con anaerobiosis	0.073219	0.013473	0.199903	

c) Comparación para las concentraciones de lípidos totales.

De acuerdo con los resultados,  $p > 0.05$  para *Tiempo\*Tratamiento*, por lo cual, no se rechaza  $H_0$  y no hay una interacción significativa entre ambas variables. Para la variable *Tiempo*,  $p > 0.05$  y tampoco se rechaza  $H_0$ , por lo cual, no hay diferencias

significativas respecto a esta variable. Por su parte, para la variable *Tratamiento*  $p < 0.05$ , por lo cual, se rechaza  $H_0$  y sí hay diferencias significativas en cuanto a esta variable.

Univariate Tests of Significance for Concentración de lípidos totales ( $\mu\text{g/mL}$ ) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	746994.1	1	746994.1	391.1830	4.44 E-08
<b>Tiempo</b>	4227.3	1	4227.3	2.2137	0.175106
<b>Tratamiento</b>	24424.0	1	24424.0	12.7903	0.007227
<b>Tiempo*Tratamiento</b>	5037.6	1	5037.6	2.6381	0.142986
<b>Error</b>	15276.6	8	1909.6		

La prueba de Tukey mostró que no hubo diferencia significativa entre 11 días sin anaerobiosis y 11 días con anaerobiosis, pero sí fue significativa la diferencia entre 14 días sin anaerobiosis y 14 días con anaerobiosis. Otra diferencia significativa respecto a la variable *Tratamiento* se encontró entre 11 días con anaerobiosis y 14 días sin anaerobiosis.

Tukey HSD test; variable Concentración de lípidos totales ( $\mu\text{g/mL}$ ) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 1909.6, df = 8.0000						
	Tiempo	Tratamiento	{1} - 243.64	{2} - 292.89	{3} - 165.13	{4} - 296.33
1	11 días	sin anaerobiosis		0.543648	0.202717	0.492244
2	11 días	con anaerobiosis	0.543648		0.029585	0.999673
3	14 días	sin anaerobiosis	0.202717	0.029585		0.025919
4	14 días	con anaerobiosis	0.492244	0.999673	0.025919	

d) Comparación para las concentraciones de clorofila total.

Univariate Tests of Significance for Concentración de clorofila total ( $\mu\text{g/mL}$ ) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	11851.13	1	11851.13	1830.649	9.81 E-11
<b>Tiempo</b>	0.03	1	0.03	0.005	0.946870
<b>Tratamiento</b>	58.61	1	58.61	9.053	0.016843
<b>Tiempo*Tratamiento</b>	38.91	1	38.91	6.010	0.039845
<b>Error</b>	51.79	8	6.47		

De acuerdo con los resultados,  $p < 0.05$  para *Tiempo\*Tratamiento*, por lo cual, se rechaza  $H_0$  y hay una interacción significativa entre ambas variables. Para la variable *Tiempo*,  $p > 0.05$ , así que no rechaza  $H_0$  y no hay diferencias significativas respecto a esta variable. Por su parte, para la variable *Tratamiento*,  $p < 0.05$ , por lo cual, se rechaza  $H_0$  y hay diferencias significativas.

De acuerdo con la prueba de Tukey, la única diferencia significativa se encontró entre 14 días sin anaerobiosis y 14 días con anaerobiosis. Entre los otros tratamientos no se encontraron diferencias significativas.

Tukey HSD test; variable Concentración de clorofila total (µg/mL) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 6.4737, df = 8.0000						
	Tiempo	Tratamiento	{1} - 31.886	{2} - 31.067	{3} - 35.386	{4} - 27.365
1	11 días	sin anaerobiosis		0.977904	0.390018	0.209452
2	11 días	con anaerobiosis	0.977904		0.238297	0.347299
3	14 días	sin anaerobiosis	0.390018	0.238297		0.020207
4	14 días	con anaerobiosis	0.209452	0.347299	0.020207	

e) Comparación para los porcentajes de cenizas en peso seco.

De acuerdo con los resultados  $p > 0.05$  para *Tratamiento*\**Tiempo*, así como para las variables *Tiempo* y *Tratamiento*, por separado. Por lo tanto, no hay diferencias significativas respecto a ninguna variable ni en la interacción entre ellas.

Univariate Tests of Significance for Concentración de cenizas (µg/mL) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	2426.188	1	2426.188	190.4064	0.000001
Tiempo	11.204	1	11.204	0.8793	0.375831
Tratamiento	3.868	1	3.868	0.3036	0.596709
Tiempo*Tratamiento	22.007	1	22.007	1.7271	0.225212
Error	101.937	8	12.742		

### 3) ANOVAs de dos criterios para comparar los rendimientos de las variables bromatológicas de la biomasa.

a) Comparación para los rendimientos de paramilo.

Univariate Tests of Significance for Rendimiento de paramilo (µg/10 <sup>6</sup> células) (Spreadsheet81) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	1208902	1	1208902	895.0815	1.68 E-09
Tiempo	3632	1	3632	2.6895	0.139642
Tratamiento	91718	1	91718	67.9089	0.000035
Tiempo*Tratamiento	42190	1	42190	31.2381	0.000517
Error	10805	8	1351		

De acuerdo con los resultados,  $p < 0.05$  para *Tiempo*\**Tratamiento*, así que se rechaza  $H_0$  y existe una interacción significativa entre ambas variables. Para la



variable *Tiempo*, se obtuvo  $p > 0.05$ , así que no se rechaza  $H_0$  y no hay diferencias significativas respecto a esta variable. En cuanto a la variable *Tratamiento*, se obtuvo  $p < 0.05$ , por lo cual, se rechaza  $H_0$ , así que hay diferencias significativas debidas a la anaerobiosis.

La prueba de Tukey mostró que no hay diferencias significativas entre los cultivos con 11 días sin anaerobiosis y 11 días con anaerobiosis, pero sí hubo diferencias significativas entre los cultivos 14 días sin anaerobiosis y 14 días con anaerobiosis. También se encontró que hubo diferencia significativa entre 11 días sin anaerobiosis y 14 días sin anaerobiosis.

Tukey HSD test; variable Rendimiento de paramilo ( $\mu\text{g}/10^6$ células) (Spreadsheet81) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 1350.6, df = 8.0000						
	Tiempo	Tratamiento	{1} - 328.13	{2} - 271.87	{3} - 481.52	{4} - 188.08
1	11 días	sin anaerobiosis		0.309741	0.004173	0.007113
2	11 días	con anaerobiosis	0.309741		0.000698	0.089252
3	14 días	sin anaerobiosis	0.004173	0.000698		0.000254
4	14 días	con anaerobiosis	0.007113	0.089252	0.000254	

b) Comparación para los rendimientos de proteína.

Univariate Tests of Significance for Rendimiento de proteína ( $\mu\text{g}/10^6$ células) (Spreadsheet81) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	359038.3	1	359038.3	435.3748	2.91 E-08
Tiempo	12927.6	1	12927.6	15.6762	0.004181
Tratamiento	293.2	1	293.2	0.3555	0.567500
Tiempo*Tratamiento	2803.6	1	2803.6	3.3996	0.102445
Error	6597.3	8	824.7		

De acuerdo con los resultados,  $p > 0.05$  para *Tiempo\*Tratamiento*, por lo cual, no se rechaza  $H_0$  y no hay interacción significativa entre las dos variables. Para la variable *Tratamiento*,  $p > 0.05$ , por lo tanto, también se rechaza  $H_0$  y no hay diferencias respecto a esta variable. En el caso de la variable *Tiempo*, se encontró que  $p < 0.05$ , así que hay diferencias significativas respecto a esta variable.

La prueba de Tukey mostró que no hay diferencias significativas entre los cultivos 11 días sin anaerobiosis y 11 días con anaerobiosis. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los cultivos 14 días sin anaerobiosis y 14 días con anaerobiosis. Sin embargo, se encontraron diferencias entre 11 días con anaerobiosis y 14 días sin anaerobiosis, así como entre 11 días con anaerobiosis y 14 días con anaerobiosis.

Tukey HSD test; variable Rendimiento de proteína ( $\mu\text{g}/10^6$ células) (Spreadsheet81) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 824.67, df = 8.0000						
	Tiempo	Tratamiento	{1} - 185.57	{2} - 226.02	{3} - 150.49	{4} - 129.81
1	11 días	sin anaerobiosis		0.371790	0.482330	0.159235
2	11 días	con anaerobiosis	0.371790		0.048790	0.014630
3	14 días	sin anaerobiosis	0.482330	0.048790		0.814236
4	14 días	con anaerobiosis	0.159235	0.014630	0.814236	

c) Comparación para los rendimientos de lípidos totales.

Univariate Tests of Significance for Rendimiento de lípidos totales ( $\mu\text{g}/10^6$ células) (Spreadsheet81) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	86593.44	1	86593.44	566.8058	1.03 E-08
Tiempo	1164.77	1	1164.77	7.6241	0.024630
Tratamiento	4324.76	1	4324.76	28.3081	0.000711
Tiempo*Tratamiento	689.05	1	689.05	4.5102	0.066438
Error	1222.20	8	152.77		

De acuerdo con los resultados,  $p > 0.05$  para *Tiempo\*Tratamiento*, por lo cual, se rechaza  $H_0$  y no hay interacción significativa entre las dos variables. Por su parte, en cuanto a las variables *Tiempo* y *Tratamiento* por separado, se obtuvo  $p < 0.05$ , por lo tanto, se rechaza  $H_0$  y hay diferencias significativas respecto a dichas variables.

La prueba de Tukey mostró que no hay diferencias entre los cultivos de 11 días sin anaerobiosis y 11 días con anaerobiosis, pero sí hubo diferencia significativa entre 14 días sin anaerobiosis y 14 días con anaerobiosis. También se encontró diferencia significativa entre los cultivos de 11 días sin anaerobiosis y 14 días con anaerobiosis. Además, se identificó que el cultivo de 14 días sin anaerobiosis es significativamente diferente de todos los otros tipos de cultivos.

Tukey HSD test; variable Rendimiento de lípidos totales ( $\mu\text{g}/10^6$ células) (Spreadsheet81) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 152.77, df = 8.0000						
	Tiempo	Tratamiento	{1} - 83.393	{2} - 106.21	{3} - 48.534	{4} - 101.66
1	11 días	sin anaerobiosis		0.186967	0.035253	0.335776
2	11 días	con anaerobiosis	0.186967		0.002148	0.967693
3	14 días	sin anaerobiosis	0.035253	0.002148		0.003504
4	14 días	con anaerobiosis	0.335776	0.967693	0.003504	

d) Comparación para los rendimientos de clorofila total.

Univariate Tests of Significance for Rendimiento de clorofila total ( $\mu\text{g}/10^6$ células) (Spreadsheet81) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	1314.204	1	1314.204	1427.911	0.000000
<b>Tiempo</b>	3.682	1	3.682	4.000	0.080508
<b>Tratamiento</b>	0.346	1	0.346	0.376	0.556799
<b>Tiempo*Tratamiento</b>	1.338	1	1.338	1.454	0.262374
<b>Error</b>	7.363	8	0.920		

De acuerdo con los resultados, se encontró que  $p > 0.05$  para *Tiempo\*Tratamiento*, así como las variables por separado *Tiempo* y *Tratamiento*, por separado. Por lo tanto, no se rechaza  $H_0$  para ninguna de las pruebas de hipótesis, así que no hay diferencias significativas respecto a dichas variables y tampoco hay una interacción significativa.

e) Comparación para los rendimientos de cenizas.

Univariate Tests of Significance for Rendimiento de cenizas ( $\mu\text{g}/10^6$ células) (Spreadsheet81) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	1260.295	1	1260.295	194.8396	0.000001
<b>Tiempo</b>	297.851	1	297.851	46.0473	0.000140
<b>Tratamiento</b>	13.314	1	13.314	2.0583	0.189297
<b>Tiempo*Tratamiento</b>	8.560	1	8.560	1.3234	0.283203
<b>Error</b>	51.747	8	6.468		

De acuerdo con los resultados, se encontró que  $p > 0.05$  para *Tiempo\*Tratamiento*, por lo cual, no se rechaza  $H_0$ , así que no hay una interacción significativa entre ambas variables. Por su parte, para la variable *Tiempo*, se obtuvo  $p < 0.05$ , así que no se rechaza  $H_0$  y hay diferencias significativas respecto a esta variable. En cuanto a la variable *Tratamiento*, se obtuvo  $p > 0.05$ , por lo cual, no se rechaza  $H_0$ , así que no hay diferencias significativas respecto a esta variable.

La prueba de Tukey mostró que no hay diferencia significativa entre los cultivos de 11 días sin anaerobiosis y 11 días con anaerobiosis, asimismo, tampoco hubo diferencia entre 14 días sin anaerobiosis y 14 días con anaerobiosis. Pero sí obtuvieron diferencias significativas entre 11 días sin anaerobiosis y 14 días sin anaerobiosis. También se encontró diferencia significativa entre 11 días con anaerobiosis y 14 días con anaerobiosis.

Tukey HSD test; variable Rendimiento de cenizas ( $\mu\text{g}/10^6$  células) (Spreadsheet81) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 6.4684, df = 8.0000

	Tiempo	Tratamiento	{1} - 5.4748	{2} - 5.0574	{3} - 17.128	{4} - 13.332
1	11 días	sin anaerobiosis		0.996936	0.002397	0.022425
2	11 días	con anaerobiosis	0.996936		0.001944	0.017120
3	14 días	sin anaerobiosis	0.002397	0.001944		0.328360
4	14 días	con anaerobiosis	0.022425	0.017120	0.328360	

f) Comparación para las concentraciones celulares.

Univariate Tests of Significance for Concentración celular ( $10^6$  células/mL) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	108.8416	1	108.8416	1795.079	0.000000
Tiempo	0.2760	1	0.2760	4.553	0.065419
Tratamiento	0.3136	1	0.3136	5.173	0.052533
Tiempo*Tratamiento	0.0936	1	0.0936	1.544	0.249173
Error	0.4851	8	0.0606		

De acuerdo con los resultados, se obtuvo  $p > 0.05$  para *Tiempo\*Tratamiento*, por lo cual, no se rechaza  $H_0$  y no hay una interacción significativa entre las variables. También se obtuvo  $p > 0.05$  para las variables *Tiempo* y *Tratamiento*, por separado, por lo cual, tampoco se rechaza  $H_0$  y no hay diferencias significativas respecto a cada una de estas variables.

g) Comparación para los porcentajes de estados palmela.

Univariate Tests of Significance for Porcentaje de estados palmela Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	795.4408	1	795.4408	168.0509	0.000001
Tiempo	338.1408	1	338.1408	71.4382	0.000029
Tratamiento	78.5408	1	78.5408	16.5931	0.003566
Tiempo*Tratamiento	50.8408	1	50.8408	10.7410	0.011232
Error	37.8667	8	4.7333		

De acuerdo con los resultados,  $p < 0.05$  para *Tiempo\*Tratamiento*, por lo tanto, se rechaza  $H_0$ , así que hay una interacción significativa entre las variables. Por su parte, para las variables *Tiempo* y *Tratamiento* por separado se obtuvo  $p < 0.05$ , por lo tanto, existen diferencias significativas respecto a cada una de estas variables.

La prueba de Tukey mostró que respecto a la variable *Tratamiento*, no hubo diferencia significativa entre los cultivos de 11 días sin anaerobiosis y 11 días con anaerobiosis, pero sí hubo diferencia significativa entre 14 días sin anaerobiosis y 14 días con anaerobiosis. Respecto a la variable *Tiempo*, también se encontró diferencia significativa entre 11 días sin anaerobiosis y 14 días sin anaerobiosis, asimismo, también hubo diferencia entre 11 días con anaerobiosis y 14 días con anaerobiosis.

Tukey HSD test; variable Porcentaje de estados palmela Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 4.7333, df = 8.0000						
	Tiempo	Tratamiento	{1} - 2.3333	{2} - 3.3333	{3} - 8.8333	{4} - 18.067
1	11 días	sin anaerobiosis		0.940387	0.026573	0.000293
2	11 días	con anaerobiosis	0.940387		0.058163	0.000349
3	14 días	sin anaerobiosis	0.026573	0.058163		0.003776
4	14 días	con anaerobiosis	0.000293	0.000349	0.003776	

### 3.2 ANOVAs factoriales para comparar los porcentajes de ácidos grasos saturados (AGS), ácidos grasos monoinsaturados (AGM) y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) entre los tratamientos con fotoperíodo normal y anaerobiosis-oscuridad

Se realizaron dos ANOVAs factoriales para analizar los porcentajes de EMAG de este tercer experimento. En el primer ANOVA, se tomó como variable de respuesta los porcentajes de EMAG agrupados en AGS, AGM y AGPI. En el segundo ANOVA, se seleccionó como variable de respuesta los porcentajes de EMAG por cada tipo de ácido graso.

a) Primer ANOVA factorial. Se consideró como variable de respuesta el porcentaje de EMAG y como variables independientes o factores el tipo de ácido graso (tres niveles, AGS, AGM y AGPI), el tiempo (dos niveles, 11 días y 14 días) y el tratamiento (dos niveles, con y sin anaerobiosis). De acuerdo con esto, el ANOVA factorial pone a prueba los siguientes conjuntos de hipótesis.

i) Hay un efecto en la variable de respuesta debido al factor A (tipo de ácido graso).

ii) ¿Hay un efecto en la variable de respuesta debido al factor B (tiempo)?

iii) ¿Hay un efecto en la variable de respuesta debido al factor C (tratamiento)?

iv) ¿Hay un efecto en la variable de respuesta debido a la interacción de los factores A (tipo de ácido graso) y B (tiempo)?

v) ¿Hay un efecto en la variable de respuesta debido a la interacción de los factores A (tipo de ácido graso) y C (tratamiento)?

vi) ¿Hay un efecto en la variable de respuesta debido a la interacción de los factores B (tiempo) y C (tratamiento)?

vii) ¿Hay un efecto en la variable de respuesta debido a la interacción de los factores A (tipo de ácido graso) y B (tiempo) y C (tratamiento)?

Univariate Tests of Significance for Porcentaje de ácidos grasos (ANOVA factorial por tipo de ácidos grasos) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition; Std. Error of Estimate: 6.644979					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	40867.44	1	40867.44	925.5292	0.000000
Tipo de ácido graso	10008.84	2	5004.42	113.3356	5.93 E-13
Tiempo	4.65	1	4.65	0.1054	0.748296
Tratamiento	0.73	1	0.73	0.0165	0.898895
Tipo de ácido graso*Tiempo	767.85	2	383.93	8.6948	0.001445
Tipo de ácido graso*Tratamiento	1752.37	2	876.19	19.8431	0.000008
Tiempo*Tratamiento	0.73	1	0.73	0.0165	0.898895
Tipo de ácido graso*Tiempo*Tratamiento	576.85	2	288.42	6.5319	0.005434
Error	1059.74	24	44.16		

De acuerdo con los resultados del ANOVA factorial, al considerar cada factor por separado, sólo se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con el factor A (*Tipo de ácido graso*). Por lo cual se decidió realizar una prueba de Tukey para este factor y se observó que, considerando todos los tipos EMAG (AGS, AGM y AGPI) en conjunto para todos los tratamientos, hubo diferencias significativas. Los porcentajes de AGS fueron significativamente mayores, seguidos de los porcentajes de AGPI y, por último, los porcentajes de AGM.

Tukey HSD test; variable Porcentaje de ácidos grasos (Tipo de ácido graso) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 44.156, df = 24.000				
	Tipo de ácido graso	{1} - 53.067	{2} - 12.365	{3} - 35.646
1	AGS		0.000129	0.000131
2	AGM	0.000129		0.000129
3	AGPI	0.000131	0.000129	

Posteriormente, el ANOVA factorial mostró que hubo una interacción significativa ( $p < 0.05$ ) entre el factor A (*Tipo de ácido*) y el factor B (*Tiempo*). Por lo cual, se realizó una prueba de Tukey para identificar las diferencias significativas. En cuanto a los AGS no hubo diferencia significativa debida a los tiempos de 11 días y 14 días. Tampoco hubo diferencia significativa en los AGPI entre 11 días y

14 días. Asimismo, no hubo diferencia significativa en los AGM entre 11 días y 14 días. Las diferencias se encontraron en que los porcentajes de AGS tanto de 11 y 14 días fueron significativamente mayores, seguido de los porcentajes de AGPI tanto de 11 y 14 días y, por último, los porcentajes de AGM tanto de 11 y 14 días.

Tukey HSD test; variable Porcentaje de ácidos grasos (Tipo de ácido graso\*Tiempo) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 44.156, df = 24.000

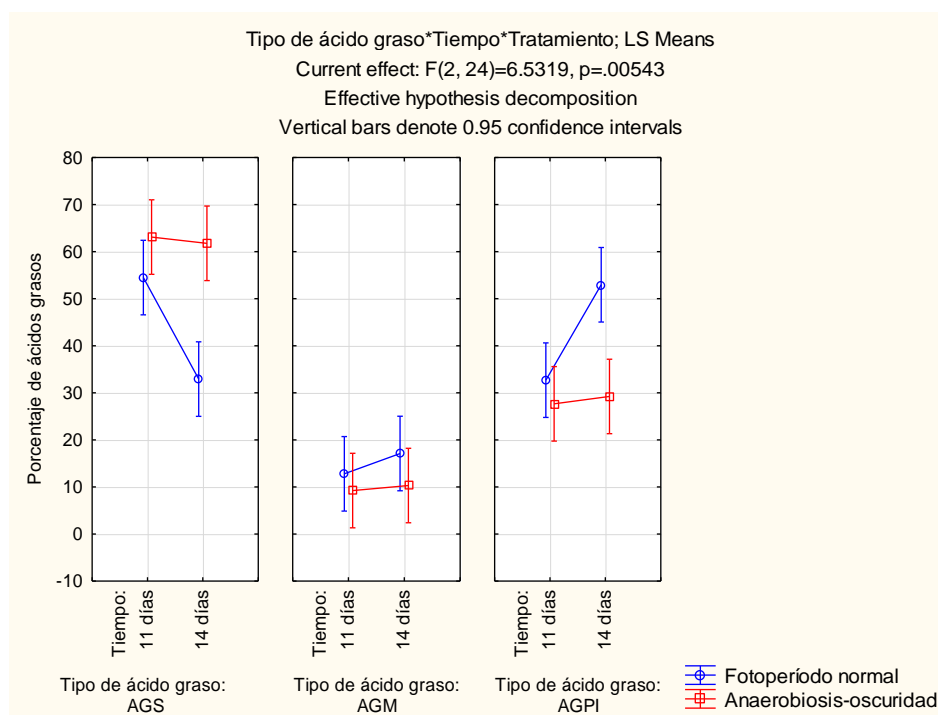
	Tipo de ácido graso	Tiempo	{1} - 58.791	{2} - 47.344	{3} - 11.023	{4} - 13.707	{5} - 30.186	{6} - 41.106
1	AGS	11 días		0.063029	0.000138	0.000138	0.000138	0.001505
2	AGS	14 días	0.063029		0.000138	0.000138	0.002060	0.590527
3	AGM	11 días	0.000138	0.000138		0.980245	0.000656	0.000138
4	AGM	14 días	0.000138	0.000138	0.980245		0.003116	0.000139
5	AGPI	11 días	0.000138	0.002060	0.000656	0.003116		0.083727
6	AGPI	14 días	0.001505	0.590527	0.000138	0.000139	0.083727	

El ANOVA factorial también mostró que hubo una interacción significativa ( $p < 0.05$ ) entre el factor A (*Tipo de ácido graso*) y el factor C (*Tratamiento*). Por lo cual, se también se realizó una prueba de Tukey para hallar las diferencias significativas. Esta prueba mostró que los AGS son significativamente mayores en los tratamientos con anaerobiosis que en los de fotoperíodo normal. Por el contrario, los AGPI disminuyeron significativamente en los tratamientos con anaerobiosis en comparación con los tratamientos de fotoperíodo normal. En cuanto a los AGM, si bien éstos disminuyeron en los tratamientos con anaerobiosis, esto no fue significativo.

Tukey HSD test; variable Porcentaje de ácidos grasos (Tipo de ácido graso\*Tratamiento) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 44.156, df = 24.000

	Tipo de ácido graso	Tratamiento	{1} - 43.707	{2} - 62.428	{3} - 14.959	{4} - 9.7710	{5} - 42.839	{6} - 28.453
1	AGS	sin anaerobiosis		0.000835	0.000138	0.000138	0.999913	0.006649
2	AGS	con anaerobiosis	0.000835		0.000138	0.000138	0.000520	0.000138
3	AGM	sin anaerobiosis	0.000138	0.000138		0.753748	0.000139	0.019450
4	AGM	con anaerobiosis	0.000138	0.000138	0.753748		0.000138	0.000852
5	AGPI	sin anaerobiosis	0.999913	0.000520	0.000139	0.000138		0.011334
6	AGPI	con anaerobiosis	0.006649	0.000138	0.019450	0.000852	0.011334	

En cuanto a la combinación de los tres factores, el ANOVA factorial mostró que hubo diferencias significativas debidas a la interacción de los factores A (*Tipo de ácido graso*), B (*Tiempo*) y C (*Tratamiento*). De la prueba de Tukey se obtuvo una matriz de 12 columnas x 12 renglones, por cual, se decidió presentar mejor el siguiente gráfico para observar las principales diferencias. De acuerdo con esto, los porcentajes AGS disminuyeron significativamente en los cultivos con fotoperíodo normal entre 11 y 14 días; por el contrario, la anaerobiosis no provoca un incremento significativo entre los tratamientos de 11 y 14 días. En cuanto a los AGPI, los porcentajes incrementaron significativamente en los tratamientos con fotoperíodo normal de 11 y 14 días; pero no cambian significativamente debido a la anaerobiosis. Por su parte, los AGM no presentan diferencias significativas ni debido al tiempo ni debido a la anaerobiosis. En general, ninguno de los tres tipos ácidos de grasos presentó cambios significativos en los tratamientos con anaerobiosis a lo largo del tiempo.



b) Segunda ANOVA factorial. En este caso, se consideró como variable de respuesta el porcentaje de cada EMAG y tomando como factores el tipo de ácido graso (23 niveles), el tiempo (dos niveles, 11 y 14 días) y el tipo de tratamiento (dos niveles, con y sin anaerobiosis).

Como primera diferencia significativa, se encontró  $p < 0.05$  para la variable *Tipo de ácido graso*. Dado que de la prueba de Tukey se obtuvo una matriz de 23 columnas por 23 filas, sólo se indican las siguientes tendencias. Se observó que, en general, los ácidos grasos con mayor porcentaje de abundancia significativa fueron, en orden descendente, 14:0, 16:0, 18:3n-3 y 18:2n-6. Por su parte, los ácidos grasos



con menor abundancia fueron, en orden descendente, 20:4n-3, 13:0, 20:3n-6 y 15:0, sin embargo, entre éstos no hubo diferencias significativas.

Univariate Results for Each DV Porcentaje de ácidos grasos (ANOVA factorial por cada tipo de ácido graso en anaerobiosis) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	Degr. of Freedom	Porcentaje de ácido graso - SS	Porcentaje de ácido graso - MS	Porcentaje de ácido graso - F	Porcentaje de ácido graso - p
Intercept	1	5330.535	5330.535	2589.764	0.000000
Tipo de ácido graso	22	7844.020	356.546	173.223	0.000000
Tiempo	1	0.607	0.607	0.295	0.587801
Tratamiento	1	0.095	0.095	0.046	0.830162
Tipo de ácido graso*Tiempo	22	363.085	16.504	8.018	0.000000
Tipo de ácido graso*Tratamiento	22	619.290	28.150	13.676	0.000000
Tiempo*Tratamiento	1	0.095	0.095	0.046	0.830162
Tipo de ácido graso*Tiempo* Tratamiento	22	162.956	7.407	3.599	0.000001
Error	184	378.729	2.058		
Total	275	9368.876			

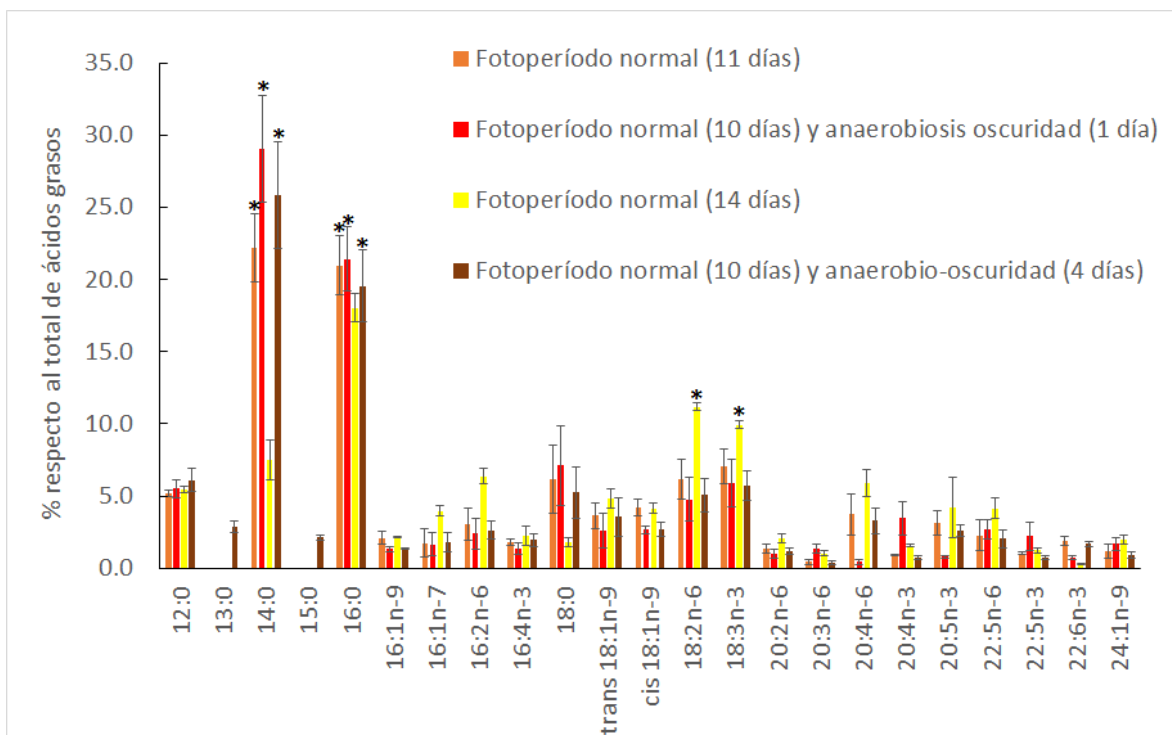
El ANOVA factorial también mostró que hubo una interacción significativa entre las variables *Tipo de ácido graso* y *Tiempo*. Dado que de la prueba de Tukey se obtuvo una matriz de 46 columnas por 46 filas, sólo se indican los pares de ácidos grasos donde hubo diferencias significativas respecto al tiempo. Dos AGS disminuyeron significativamente en los cultivos de los 11 a 14 días fueron 14:0 y 18:0. Por su parte, hubo algunos ácidos grasos que incrementaron en los cultivos de 11 a 14 días, los cuales fueron seis AGPI, 16:2n-6, 18:2n-6, 18:3n-3, 20:4n-6, 22:5n-6 y 22:5n-3, así como dos AGM trans 16:1n-7 y 18:1n-9, pero estos incrementos no fueron estadísticamente significativos.

Asimismo, el ANOVA factorial también mostró que hubo una interacción significativa entre las variables *Tipo de ácido graso* y *Tratamiento*. La prueba de Tukey mostró que estas diferencias se debieron a la disminución significativa de los AGS 14:0 y 18:0 en los cultivos con fotoperíodo normal respecto a los cultivos con anaerobiosis. Por otra parte, se encontraron incrementos significativos en los cultivos con fotoperíodo normal respecto a los cultivos con anaerobiosis en los AGPI 18:2n-6 y 18:3n-3.

Finalmente, el ANOVA factorial mostró que hay una interacción significativa entre los tres factores *Tipo de ácido graso*, *Tiempo* y *Tratamiento*. De acuerdo con la prueba de Tukey, los AGS con mayores valores significativos fueron 14:0, el cual fue significativamente diferente en los cuatro tratamientos; seguido de 16:0, el cual

no fue significativamente diferente entre los cuatro tratamientos y, en tercer 18:0, el cual únicamente tuvo un valor significativo en el tratamiento anaerobio oscuridad de 11 días. En cuanto a los AGPI, únicamente, se encontraron porcentajes significativos en los ácidos grasos 18:2n-6 y 18:3n-6 del cultivo con fotoperiodo normal de 14 días, tal que sus valores fueron mayores respecto a los otros tratamientos. Respecto a los otros tipos de ácidos grasos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En la siguiente gráfica de barras se indica con un asterisco (\*) los ácidos grasos en los que se identificaron los mayores porcentajes significativos. De los 23 EMAG identificados solamente fueron cuatro los que presentaron un porcentaje significativo de acuerdo con la prueba de Tukey. Los promedios de los porcentajes obtenidos para cada tipo de EMAG se indican en la tabla que se ubica después de la gráfica. En dicha tabla también se indican los porcentajes agrupados por tipo de ácido graso en AGS, AGM y AGPI.



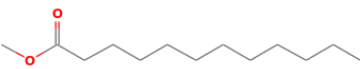
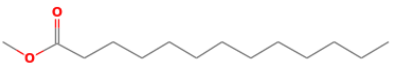
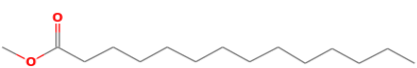
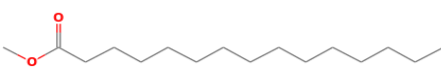
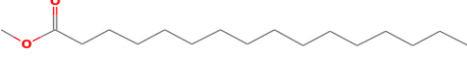
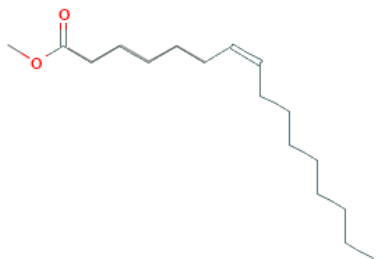
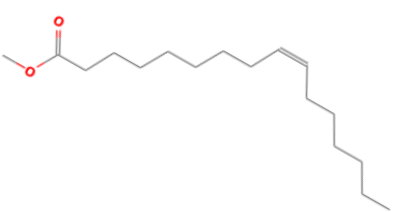
Comparación de los porcentajes de ácidos grasos para los cultivos del experimento con anaerobiosis. Con asterisco (\*) se indican los ácidos grasos con mayor porcentaje significativo. Todos los cultivos se realizaron con acetato-citrato 2.5 mM.

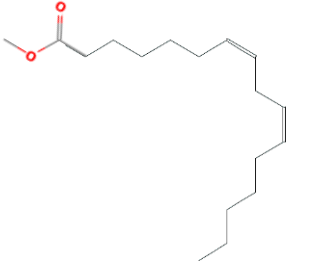
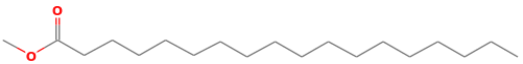
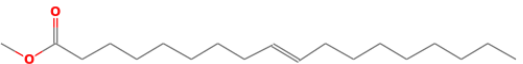
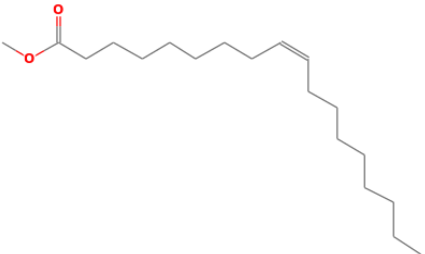
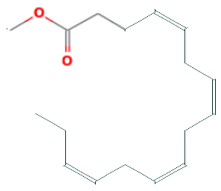
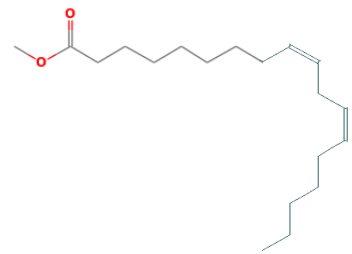
**Composición porcentual de EMAG agrupados en AGS, AGM, y AGPI para los tratamientos con fotoperíodo normal y anaerobiosis-oscuridad.** Diferente letra indica diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) respecto a la presencia o ausencia de anaerobiosis, misma letra significa que no hay diferencia ( $p > 0.05$ ). Diferente número indica diferencia estadística respecto a los días de cultivo ( $p < 0.05$ ) y mismo número indica que no hay diferencia ( $p < 0.05$ ).

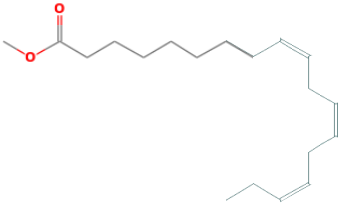
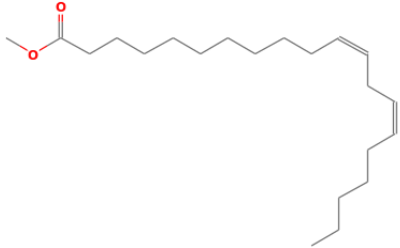
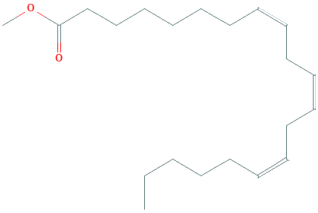
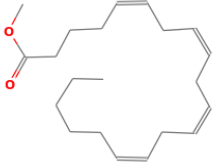
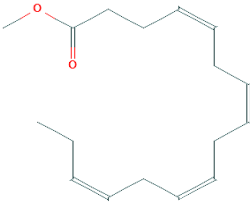
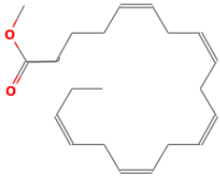
Tipo de ácido graso	% respecto al total			
	Fotoperíodo normal (11 días)	Anaerobio oscuridad (1 día)	Fotoperíodo normal (14 días)	Anaerobio oscuridad (4 días)
12:0	5.15 ± 0.23 <sup>a1</sup>	5.50 ± 0.61 <sup>a1</sup>	5.45 ± 0.79 <sup>a1</sup>	6.09 ± 0.79 <sup>a1</sup>
13:0	0.00	0.00	0.00	2.87 ± 0.43
14:0	22.21 ± 2.39 <sup>b2</sup>	29.05 ± 7.4 <sup>c2</sup>	7.51 ± 1.36 <sup>d3</sup>	25.86 ± 3.71 <sup>e3</sup>
15:0	0.00	0.00	0.00	2.14 ± 0.19
16:0	20.98 ± 2.04 <sup>f4</sup>	21.44 ± 2.20 <sup>f4</sup>	18.04 ± 1.00 <sup>f4</sup>	19.57 ± 2.49 <sup>f4</sup>
18:0	6.15 ± 2.39 <sup>g5</sup>	7.11 ± 2.78 <sup>g5</sup>	1.81 ± 0.33 <sup>h6</sup>	5.23 ± 1.78 <sup>g5</sup>
<b>Σ AGS</b>	<b>54.49 ± 11.61<sup>h7</sup></b>	<b>63.09 ± 11.05<sup>h7</sup></b>	<b>32.81 ± 5.96<sup>i8</sup></b>	<b>61.76 ± 7.71<sup>h7</sup></b>
16:1n-9	2.07 ± 0.44 <sup>i9</sup>	1.31 ± 0.16 <sup>i9</sup>	2.15 ± 0.05 <sup>i9</sup>	1.37 ± 0.04 <sup>i9</sup>
16:1n-7	1.74 ± 0.98 <sup>j1</sup>	1.64 ± 0.82 <sup>j1</sup>	3.97 ± 0.39 <sup>j1</sup>	1.81 ± 0.70 <sup>j1</sup>
trans 18:1n-9	3.63 ± 0.91 <sup>k2</sup>	2.62 ± 1.22 <sup>k2</sup>	4.85 ± 0.69 <sup>k2</sup>	3.56 ± 1.33 <sup>k2</sup>
cis 18:1n-9	4.19 ± 0.55 <sup>l3</sup>	2.67 ± 0.27 <sup>l3</sup>	4.14 ± 0.37 <sup>l3</sup>	2.66 ± 0.48 <sup>l3</sup>
24:1n-9	1.18 ± 0.48 <sup>m4</sup>	1.00 ± 0.30 <sup>m4</sup>	1.99 ± 0.33 <sup>m4</sup>	0.90 ± 0.27 <sup>m4</sup>
<b>Σ AGM</b>	<b>12.81 ± 3.36<sup>n5</sup></b>	<b>9.24 ± 2.54<sup>n5</sup></b>	<b>17.11 ± 1.20<sup>n5</sup></b>	<b>10.31 ± 2.62<sup>n5</sup></b>
16:2n-6	3.01 ± 1.11 <sup>o6</sup>	2.38 ± 1.05 <sup>o6</sup>	6.34 ± 0.53 <sup>o6</sup>	2.63 ± 0.63 <sup>o6</sup>
16:4n-3	1.78 ± 0.22 <sup>p7</sup>	1.33 ± 0.42 <sup>p7</sup>	2.23 ± 0.69 <sup>p7</sup>	1.93 ± 0.45 <sup>p7</sup>
18:2n-6	6.18 ± 1.40 <sup>q8</sup>	4.78 ± 1.53 <sup>q8</sup>	11.19 ± 0.25 <sup>r9</sup>	5.05 ± 1.14 <sup>q8</sup>
18:3n-3	7.05 ± 1.24 <sup>s1</sup>	5.90 ± 1.65 <sup>s1</sup>	9.93 ± 0.28 <sup>t2</sup>	5.72 ± 1.03 <sup>s1</sup>
20:2n-6	1.36 ± 0.28 <sup>t2</sup>	1.34 ± 0.30 <sup>t2</sup>	2.08 ± 0.33 <sup>t2</sup>	1.18 ± 0.19 <sup>t2</sup>
20:3n-6	0.43 ± 0.16 <sup>u3</sup>	0.42 ± 0.18 <sup>u3</sup>	1.02 ± 0.20 <sup>u3</sup>	0.36 ± 0.14 <sup>u3</sup>
20:4n-6	3.73 ± 1.42 <sup>v4</sup>	3.45 ± 1.15 <sup>v4</sup>	5.87 ± 0.93 <sup>v4</sup>	3.27 ± 0.91 <sup>v4</sup>
20:4n-3	0.89 ± 0.07 <sup>w5</sup>	0.78 ± 0.09 <sup>w5</sup>	1.57 ± 0.12 <sup>w5</sup>	0.74 ± 0.14 <sup>w5</sup>
20:5n-3	3.11 ± 0.83 <sup>x6</sup>	2.68 ± 0.67 <sup>x6</sup>	4.18 ± 2.11 <sup>x6</sup>	2.59 ± 0.37 <sup>x6</sup>
22:5n-6	2.27 ± 1.07 <sup>y7</sup>	2.22 ± 0.97 <sup>y7</sup>	4.13 ± 0.73 <sup>y7</sup>	2.03 ± 0.63 <sup>y7</sup>
22:5n-3	1.03 ± 0.10 <sup>z8</sup>	0.72 ± 0.11 <sup>z8</sup>	1.24 ± 0.17 <sup>z8</sup>	0.73 ± 0.10 <sup>z8</sup>
22:6n-3	1.87 ± 0.33 <sup>a1</sup>	1.67 ± 0.45 <sup>a1</sup>	0.31 ± 0.03 <sup>a1</sup>	1.70 ± 0.18 <sup>a1</sup>
<b>Σ AGPI</b>	<b>32.70 ± 8.25<sup>b2</sup></b>	<b>27.67 ± 8.51<sup>b2</sup></b>	<b>50.09 ± 2.78<sup>c3</sup></b>	<b>27.93 ± 6.09<sup>b2</sup></b>

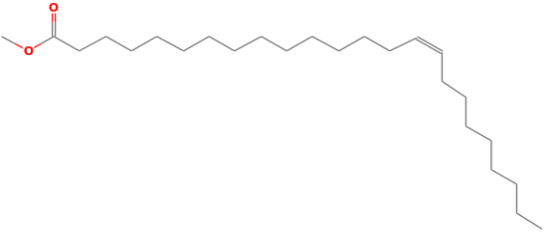
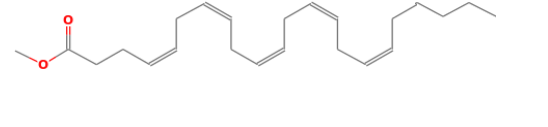
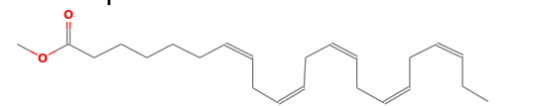
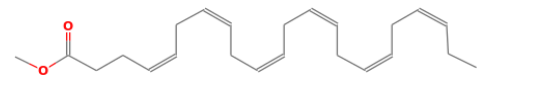
## Anexo 4. Tiempos de retención de los 23 EMAG

Se presenta una lista con los tiempos de retención y la nomenclatura de los 23 EMAG identificados por cromatografía de gases-masas en los tratamientos con acetato-citrato (AC), acetato-propionato (AP) y acetato (A). Los tiempos de retención son el promedio de tres mediciones diferentes.

Éster metílico de ácido graso (EMAG)	Ácido graso (AG)	Tiempo de Retención (min)
Metil dodecanoato 	Ácido dodecanoico Ácido láurico 12:0	AC: 4.238 AP: 4.254 A: 4.239
Metil tridecanoato 	Ácido tridecanoico Ácido tridecílico 13:0	AC: --- AP: 4.640 A: ---
Metil tetradecanoato 	Ácido tetradecanoico Ácido mirístico 14:0	AC: 5.118 AP: 5.137 A: 5.108
Metil pentadecanoato 	Ácido pentadecanoico Ácido pentadecílico 15:0	AC: --- AP: 5.788 A: ---
Metil hexadecanoato 	Ácido hexadecanoico Ácido palmítico 16:0	AC: 6.620 AP: 6.670 A: 6.613
Metil 7-hexadecanoato 	Ácido cis-7-hexadecanoico 16:1c $\Delta^7$ 16:1 $\omega$ -9 16:1n-9	AC: 7.226 AP: 7.253 A: 7.231
Metil 9-hexadecanoato 	Ácido cis-9-hexadecanoico Ácido palmitoleico 16:1c $\Delta^9$ 16:1 $\omega$ -7 16:1n-7	AC: 7.340 AP: 7.372 A: 7.318

Éster metílico de ácido graso (EMAG)	Ácido graso (AG)	Tiempo de Retención (min)
Metil 7,10 hexadecadienoato 	Ácido cis-7,10-hexadecadienoico $16:2c\Delta^{7,10}$ $16:2\omega-6$ $16:2n-6$	AC: 8.305 AP: 8.340 A: 8.321
Metil octadecanoato 	Ácido octadecanoico Ácido esteárico $18:0$	AC: 9.311 AP: 9.344 A: 9.310
Metil trans-9-octadecanoato 	Ácido trans-9-octadecanoico Ácido elaídico $18:1t\Delta^9$ trans $18:1\omega-9$ trans $18:1n-9$	AC: 9.907 AP: 9.932 A: 9.909
Metil cis-9-octadecanoato 	Ácido cis-9-octadecanoico Ácido oleico $18:1c\Delta^9$ cis $18:1\omega-9$ cis $18:1n-9$	AC: 10.334 AP: 10.373 A: 10.320
Metil 4,7,10,13-hexadecatetranoato 	Ácido cis-4,7,10,13-hexadecatetraenoico $16:4c\Delta^{4,7,10,13}$ $16:4\omega-3$ $16:4n-3$	AC: 10.633 AP: 10.676 A: 10.655
Metil 9,12-octadecadienoato 	Ácido cis-9,12-octadecadienoico Ácido linoleico $18:2c\Delta^{9,12}$ $18:2\omega-6$ $18:2n-6$	AC: 11.978 AP: 11.960 A: 11.909

Éster metílico de ácido graso (EMAG)	Ácido graso (AG)	Tiempo de Retención (min)
Metil cis-9,12,15-octadecatrienoato 	Ácido cis-9,12,15-octadecatrienoico Ácido $\alpha$ -linolénico $18:3c\Delta^{9,12,15}$ $18:3\omega-3$ $18:3n-3$	AC: 14.040 AP: 14.086 A: 14.010
Metil cis-11,14-eicosadienoato 	Ácido cis-11,14-eicosadienoico $20:2c\Delta^{11,14}$ $20:2\omega-6$ $20:2n-6$	AC: 16.203 AP: 16.230 A: 16.244
Metil cis-8,11,14-eicosatrienoato 	Ácido cis-8,11,14-eicosatrienoico $20:3c\Delta^{8,11,14}$ $20:3\omega-6$ $20:3n-6$	AC: 17.479 AP: 17.445 A: 17.432
Metil cis-5,8,11,14-eicosatetraenoato 	Ácido cis-5,8,11,14-eicosatetraenoico Ácido araquidónico (ARA) $20:4c\Delta^{5,8,11,14}$ $20:4\omega-6$ $20:4n-6$	AC: 18.422 AP: 18.470 A: 18.452
Metil cis-8,11,14,17-eicosatetraenoato 	Ácido cis-8,11,14,17-eicosatetraenoico $20:4c\Delta^{8,11,14,17}$ $20:4\omega-3$ $20:4n-3$	AC: 19.583 AP: 19.534 A: 19.523
Metil cis-5,8,11,14,17-eicosapentanoato 	Ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico Ácido eicosapentaenoico (EPA) $20:5c\Delta^{5,8,11,14,17}$ $20:5\omega-3$ $20:5n-3$	AC: 20.513 AP: 20.562 A: 20.527

Éster metílico de ácido graso (EMAG)	Ácido graso (AG)	Tiempo de Retención (min)
Metil cis-15-tetracosenoato 	Ácido cis-15-tetracosenoico Ácido nervónico 24:1 $\Delta^{15}$ 24:1 $\omega$ -9 24:1n-9	AC: 22.817 AP: 22.838 A: 22.828
Metil cis-4,7,10,13,16-docosapentanoato 	Ácido cis-4,7,10,13,16-docosapentaenoico Ácido de Osbond 22:5 $\Delta^{4,7,10,13,16}$ 22:5 $\omega$ -6 22:5n-6	AC: 23.517 AP: 23.558 A: 23.525
Metil cis-7,10,13,16,19-docosapentanoato 	Ácido cis-7,10,13,16,19-docosapentanoico 22:5 $\Delta^{7,10,13,16,19}$ 22:5 $\omega$ -3 22:5n-3	AC: 24.756 AP: 24.794 A: 24.766
Metil cis-4,7,10,13,16,19-docosahexanoato 	Ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico Ácido docosahexaenoico (DHA) 22:6 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ 22:6 $\omega$ -3 22:6n-3	AC: 25.481 AP: 25.453 A: 25.491

## Anexo 5. Cromatogramas de los 23 EMAG

Cromatogramas de los EMAG obtenidos en cada tratamiento. Cada pico se ha identificado con un número de acuerdo con la siguiente nomenclatura.

- |                          |                                |                                      |
|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| 1) 12:0                  | 9) 18:0                        | 17) 20:4c $\Delta^{5,8,11,14}$       |
| 2) 13:0                  | 10) 18:1t $\Delta^9$           | 18) 20:4c $\Delta^{8,11,14,17}$      |
| 3) 14:0                  | 11) 18:1c $\Delta^9$           | 19) 20:5c $\Delta^{5,8,11,14,17}$    |
| 4) 15:0                  | 12) 16:4c $\Delta^{4,7,10,13}$ | 20) 24:1c $\Delta^{15}$              |
| 5) 16:0                  | 13) 18:2c $\Delta^{9,12}$      | 21) 22:5c $\Delta^{4,7,10,13,16}$    |
| 6) 16:1c $\Delta^7$      | 14) 18:3c $\Delta^{9,12,15}$   | 22) 22:5c $\Delta^{7,10,13,16,19}$   |
| 7) 16:1c $\Delta^9$      | 15) 20:2c $\Delta^{11,14}$     | 23) 22:5c $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ |
| 8) 16:2c $\Delta^{7,10}$ | 16) 20:3c $\Delta^{8,11,14}$   |                                      |

