



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN SEDE BOGOTÁ

OBTENCIÓN DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA MEDIANTE EL CULTIVO DE CÉLULAS FOTOAUTOTRÓFICAS *in vitro* DE *Bouteloua gracilis*

Luisa Marina Gómez Torres

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá D.C., Colombia

2015

OBTENCIÓN DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA MEDIANTE EL CULTIVO DE CÉLULAS FOTOAUTOTRÓFICAS *in vitro* DE *Bouteloua gracilis*

Luisa Marina Gómez Torres

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de
Doctora en Ingeniería Química

Director:

Doctor Mario Enrique Velásquez Lozano

Codirector:

Doctor Gerardo Armando Aguado Santacruz

Línea de Investigación:

Cultivo de tejidos vegetales

Grupo de Investigación:

Procesos Químicos y Bioquímicos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá D.C., Colombia

2015

*A Dios por darme la vida y las fuerzas para
seguir adelante*

A mis padres por su ejemplo de vida

*A mi esposo y a mi hijo por todo lo que
significan en mi vida.*

Agradecimientos

A mi director de tesis, el Profesor Mario Enrique Velásquez Lozano por su enseñanzas, ideas, consejos siempre acertados y por su guía permanente, por su confianza en mis capacidades académicas y por la libertad investigativa que ayudó a formar mi criterio académico.

A mi codirector de tesis, el Doctor Gerardo Armando Aguado Santacruz, por brindarme las bases del conocimiento en el trabajo con células vegetales clorofílicas, por su apoyo en mi estancia de investigación en su Laboratorio de Biología Molecular de Plantas y por su disposición incondicional para orientarme y brindarme apoyo durante el desarrollo de esta tesis.

Al Departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia, profesores y administrativos que fueron apoyo constante y parte esencial durante mi formación doctoral.

Al profesor Juan Carlos Serrato por su apoyo y colaboración durante la tesis, en especial en los ensayos con el biorreactor de tanque agitado

A la profesora Martha Cristina Bustos, Directora del Laboratorio de Ambiental de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Colombia por su ayuda y colaboración para realizar análisis en el cromatógrafo iónico.

A la profesora Yineth Piñeros de la Universidad Jorge Tadeo Lozano por su valiosa colaboración para la realización de los ensayos de determinación de carbohidratos estructurales y lignina en su laboratorio.

A la profesora Dolly Santos Barbosa por su apoyo incondicional desde siempre.

A los funcionarios del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, por su disposición y colaboración para llevar a cabo diferentes actividades relacionadas al proyecto.

A la Dirección de Investigación (sede Bogotá) de la Universidad Nacional de Colombia por su financiación dentro de la convocatoria Apoyo a Tesis de Programas de Posgrado, Proyecto Código 10944 y por su apoyo económico para la realización de la pasantía investigativa en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en Celaya, Guanajuato, México.

A la Vicerrectora Académica de la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo económico mediante la Beca Estudiantes Sobresalientes de Postgrado.

Al Laboratorio de Biología Molecular de Plantas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), campo experimental Bajío por abrirme sus puertas y permitirme realizar la estancia doctoral, y por todos los conocimientos brindados que contribuyeron enormemente a mi investigación.

A todos los estudiantes de doctorado y maestría con los que compartí y a los integrantes de mi grupo de investigación por sus comentarios, críticas y enseñanzas que contribuyeron en mi aprendizaje, en especial a Juan Pablo Rosas, Ángela Otálvaro, Yolanda Ruíz, Yineth Piñeros, Carlos Castillo, Patricia Castillo, Sandra Rangel, Sandra Rodríguez, Adriana Suesca y Jennifer Serrano.

A mis amigos: Ángela Beltrán, Carolina Rojas, Diana Morales, Dionisio Malagón, Helver Lesmes, Mario Noriega, Liliana Becerra, Angélica Sandoval, Marisol Sandoval, Andrés Gaona, Luz Janneth Vargas, Jaidit Pacheco, Bibiana Vallejo y Balkys Quevedo.

A mi familia y seres queridos por su apoyo incondicional en cada una de las etapas de formación doctoral tan importante para mi vida, y a todas las personas y entidades que no mencioné específicamente pero que contribuyeron de una u otra forma a que pudiera culminar satisfactoriamente mi doctorado.

Resumen

En la presente investigación se logró el establecimiento de una línea celular fotoautotrófica, a partir de la adaptación de células altamente clorofílicas de *Bouteloua gracilis*, cultivadas en medio MS con vitaminas suplementado con 2,4-D (1 mg L^{-1}), BA (2 mg L^{-1}) y adenina (40 mg L^{-1}), a condiciones en las cuales se omitió la adición de azúcares al medio. Las células crecieron a una velocidad de agitación de 100 rpm, irradiancia de $100 \text{ } \mu\text{moles fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y 3% de CO_2 en la atmósfera del cultivo. Se obtuvo un tiempo de duplicación de 9,38 días en términos de peso fresco y el contenido de pigmentos en este cultivo celular fue de $489 \text{ } \mu\text{g}$ de clorofila total g^{-1} PF y $228 \text{ } \mu\text{g}$ de carotenoides g^{-1} PF al día 14 del cultivo.

Posteriormente, las células de *Bouteloua gracilis* fueron cultivadas en un biorreactor de tanque agitado (volumen de trabajo, 2 L). Se definieron las condiciones de aireación y agitación, tales como el tipo de agitador (turbina Rushton), velocidad de agitación (100 rpm), velocidad de aireación (0,5 vvm), e irradiancia ($250 \text{ } \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) para lograr el crecimiento celular. Bajo estas condiciones, las células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* incrementaron su peso fresco cerca de 5,38 veces después de 13 d de cultivo. En el cultivo fotomixotrófico (5% de CO_2 en aire y 0,1% de sacarosa en el medio de cultivo) la masa de las células se incrementó 2,35 veces en los 38 días del cultivo, mientras que en el caso de las células fotoautotróficas que crecieron con la misma concentración de CO_2 en aire, pero sin azúcar en el medio de cultivo, el incremento en peso fresco de las células fue de 2,04 para este mismo periodo de tiempo. Aunque diferentes sistemas de cultivos celulares en suspensión han sido establecidos para cereales y pastos, este es el primer reporte de un cultivo celular fotoautotrófico en Poaceae.

Se analizaron las células heterotróficas, fotomixotróficas y fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis*, obtenidas en el biorreactor, en cuanto a su contenido de azúcares estructurales y lignina, encontrándose concentraciones entre 10,78 y 14,34% para celulosa, entre 4,46 y 9,13% para hemicelulosa y entre 8,84 y 11,2% para lignina.

Palabras clave: *Bouteloua gracilis*, cultivo celular, clorofila, fotoautotrófico, biorreactor, celulosa, hemicelulosa, lignina.

Abstract

In this reasearch a new photoautotrophic cell line was developed by adapting highly chlorophyllic *Bouteloua gracilis* cells, cultured in basal medium MS supplemented with 2,4-D (1mg/L), BA (2 mg/L) and adenine (40 mg/L), to sugar-free growth conditions . The cells grew at a stirring speed of 100 rpm, an irradiance of 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and 3% of CO_2 in the culture atmosphere. A doubling time of 9,38 days was obtained in terms of fresh weight, while the pigments contents were 489 μg total chlorophyll g^{-1} FW and 228 μg carotenes g^{-1} FW culture.

Bouteloua gracilis cells were subsequently cultured in a stirred tank bioreactor (2 L of effective volume), with defined operation conditions such as type of stirrer (Rushton turbine), stirring speed (100 rpm), aeration rate (0,5 vvm), and irradiance (250 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Under these conditions, heterotrophic cells of *Bouteloua gracilis* increased about 5,4 times its fresh weight after 13 days of culture. Additionally, photomixotrophic cells were grown with 5% CO_2 in air, and 0,1 % sucrose in the culture medium. A cell mass increase of 2,3 times was obtained at day 38 day of the growth kinetics, while for those cells grown with the same concentration of CO_2 in air, but without sugar in the medium the fresh weight increase was 2,04 for this date. Although different systems of plant cell cultures in suspension have been described for cereals and grasses, this is the first report for photoautotrophic cell suspension culture in Poaceae.

Finally, the content of structural sugars and lignin concentration were also determined for the heterotrophic, photomixotrophic and photoautotrophic cells from *Bouteloua gracilis* obtained in the bioreactor, with values ranging between 10,8 and 14,3% for cellulose, 4,4 to 9,1% and hemicellulose and 8,8 and 11,2% lignin.

Keywords: palabras: *Bouteloua gracilis*, plant cell culture, clorophyll, photoautotrophic, bioreactor, cellulose, hemicellulose, lignin.

Contenido

	Pág
<i>Resumen</i>	<i>IX</i>
<i>Lista de Figuras</i>	<i>XV</i>
<i>Lista de Tablas</i>	<i>XIX</i>
<i>Introducción</i>	<i>1</i>
1 ESTADO DEL ARTE SOBRE CULTIVOS EN SUSPENSIÓN FOTOAUTOTRÓFICOS.....	5
1.1 Introducción.....	5
1.2 Generalidades del cultivo de células <i>in vitro</i>	7
1.3 Pigmentos fotosintéticos	8
1.4 Establecimiento, mantenimiento y preservación de cultivos celulares fotoautótrofos	10
1.5 Líneas celulares fotosintéticas: 46 años de investigación.....	12
1.6 Factores que afectan el establecimiento de cultivos FA	18
1.6.1 Obtención de líneas celulares con alta tasa de crecimiento.....	18
1.6.2 Medio de cultivo.....	19
1.6.3 Condiciones ambientales.....	21
1.6.4 Escalamiento de cultivos en biorreactores	23
1.7 Cultivos celulares FA en biorreactores	24
1.8 Aplicaciones de los cultivos FA	28
1.8.1 Metabolitos secundarios obtenidos a partir de cultivos FA.....	28
1.8.2 Cultivos FA como sistemas alternativos a las cianobacterias para la producción de biocombustibles	30
1.9 Conclusiones y perspectivas	35
2 DESARROLLO DE UN SISTEMA DE REGENERACIÓN VEGETAL <i>in vitro</i> PARA CINCO VARIEDADES ÉLITE DE <i>Lolium multiflorum</i> Lam.....	37

2.1	Introducción.....	38
2.2	Materiales y Métodos.....	39
2.2.1	Material vegetal.....	39
2.2.2	Medios probados para la inducción de respuestas morfogénicas en <i>Lolium multiflorum</i>	40
2.2.3	Propagación y mantenimiento de callos y regeneración de plantas.....	41
2.2.4	Aclimatación y adaptación de las plantas regeneradas.....	42
2.2.5	Análisis estadístico.....	42
2.3	Resultados y Discusión.....	42
2.3.1	Respuestas <i>in vitro</i> de los ápices de vástago.....	42
2.3.2	Competencia regenerativa de los callos inducidos.....	44
2.3.3	Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de callo.....	51
2.3.4	Morfología de los callos obtenidos.....	52
2.3.5	Efectos de la variación del genotipo sobre la inducción de callo y regeneración de plantas.....	53
2.3.6	Cultivos con potencial de regeneración a largo plazo.....	54
2.4	Conclusiones.....	54
2.5	Recomendaciones.....	56
3	ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS FOTOAUTOTRÓFICOS EN SUSPENSIÓN DE <i>Bouteloua gracilis</i>.....	57
3.1	Introducción.....	57
3.2	Materiales y métodos.....	58
3.2.1	Línea celular clorofílica de <i>Bouteloua gracilis</i>	58
3.2.2	Iniciación del cultivo celular heterotrófico de <i>Bouteloua gracilis</i> , mantenimiento y caracterización.....	60
3.2.3	Iniciación del cultivo celular fotomixotrófico de <i>Bouteloua gracilis</i> , mantenimiento y caracterización.....	63
3.2.4	Iniciación del cultivo celular fotoautotrófico, mantenimiento y caracterización.....	65
3.3	Resultados y discusión.....	66
3.3.1	Caracterización del cultivo celular heterotrófico.....	66
3.3.2	Caracterización de las suspensiones celulares fotomixotróficas.....	74
3.3.3	Caracterización de las suspensiones celulares fotoautotróficas de <i>Bouteloua gracilis</i>	80
3.3.4	Efecto de diferentes niveles de CO ₂ sobre los cultivos en suspensión fotoautotróficos.....	89
3.4	Conclusiones.....	95
3.5	Recomendaciones.....	96
4	CULTIVO DE CÉLULAS FOTOAUTOTRÓFICAS <i>Bouteloua gracilis</i> EN BIORREACTOR DE TANQUE AGITADO.....	99
4.1	Introducción.....	99

4.2	Metodología	101
4.2.1	Adaptación del sistema de biorreacción para el cultivo de células H, FM y FA de <i>Bouteloua gracilis</i>	101
4.2.2	Preparación de los inóculos de células en suspensión H, FM y FA de <i>Bouteloua gracilis</i> usados en el sistema de biorreacción	103
4.2.3	Operación del sistema de biorreacción para el crecimiento de células en suspensión H, FM y FA de <i>Bouteloua gracilis</i>	103
4.2.4	Seguimiento del cultivo de las células en suspensión H, FM y FA de <i>Bouteloua gracilis</i> en el reactor	105
4.2.5	Desmonte del sistema de biorreacción empleado para el crecimiento de células heterotróficas, fotoautotróficas y fotomixotróficas de <i>Bouteloua gracilis</i>	106
4.3	Resultados y análisis	106
4.3.1	Crecimiento de las células heterotróficas en suspensión de <i>Bouteloua gracilis</i>	106
4.3.2	Crecimiento de las células fotomixotróficas en suspensión de <i>Bouteloua gracilis</i>	111
4.3.3	Crecimiento de las células fotoautotróficas en suspensión de <i>Bouteloua gracilis</i>	118
4.4	Conclusiones	126
4.5	Recomendaciones	127
5	CARACTERIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS ESTRUCTURALES EN LAS CÉLULAS FOTOAUTOTRÓFICAS DE <i>Bouteloua gracilis</i>	129
5.1	Introducción	130
5.2	Materiales y métodos	132
5.2.1	Caracterización	132
5.2.2	Componentes extraíbles o extractivos	133
5.2.3	Análisis FTIR	135
5.3	Resultados y discusión	136
5.3.1	Caracterización de las células de <i>Bouteloua gracilis</i> obtenidas en biorreactor	136
5.3.2	Análisis FTIR	142
5.4	Conclusiones	147
5.5	Recomendaciones	148
6	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	149
6.1	Conclusiones	149
6.2	Recomendaciones	153
7	BIBLIOGRAFÍA	157
	ANEXOS	175

Anexo A: Composición del medio Murashige & Skoog.....	175
Anexo B: Análisis estadístico del capítulo 2.....	177
Anexo C: Análisis estadístico del capítulo 3.....	185
Anexo D: Análisis estadístico del capítulo 4.....	237
Anexo E: Sistema de mezclado de los gases en el biorreactor.....	263
Anexo F: Relación entre el IC* y el % K0* para el cultivo de células heterotróficas y fotomixotróficas de <i>Bouteloua gracilis</i>	265
Anexo G: Curva de calibración para la cuantificación de celulosa y hemicelulosa por HPLC	267

Lista de Figuras

	Pág
Figura 1-1 Clasificación de los cultivos vegetales <i>in vitro</i>	7
Figura 1-2 Recipientes de dos niveles para mantenimiento de cultivos celulares FA	11
Figura 2-1 Ápices de vástago de la variedad 'Magnun'.....	43
Figura 2-2 Propagación de callos friables y altamente morfogénicos derivados de ápices de vástago cultivados sobre medio 2D4BA.....	43
Figura 2-3 Formación de brotes a partir del callo morfogénico cultivado en luz.	48
Figura 2-4 Fuerte enraizamiento de los brotes transferidos a medio MS con 0,5 mg L ⁻¹ de AIA.....	48
Figura 2-5 Endurecimiento de plantas regeneradas de variedades de <i>Lolium multiflorum</i>	50
Figura 2-6 Plantas maduras regeneradas de variedades de <i>Lolium multiflorum</i> cultivadas en campo.	50
Figura 3-1 Representación esquemática del procedimiento para el establecimiento y mantenimiento de callo heterotrófico de <i>B. gracilis</i>	59
Figura 3-2 Representación esquemática del procedimiento para el establecimiento y mantenimiento de suspensiones celulares clorofílicas.....	61
Figura 3-3 Esquema del sistema usado para cultivos en suspensión fotomixotróficos y fotoautotróficos.	65
Figura 3-4 Representación esquemática del procedimiento para el establecimiento y mantenimiento de suspensiones celulares fotoautotróficas.....	66
Figura 3-5 Cinética del crecimiento del cultivo en suspensión heterotrófico.	67
Figura 3-6 Comportamiento del pH para el cultivo heterotrófico de células de <i>Bouteloua gracilis</i> en matraz, en condiciones de luz y oscuridad.....	68
Figura 3-7 Comportamiento del OD por unidad de biomasa para el cultivo heterotrófico de células de <i>Bouteloua gracilis</i>	69
Figura 3-8 Perfil de pigmentos para el cultivo heterotrófico de células de <i>Bouteloua gracilis</i> en matraz, en condiciones de luz y oscuridad.....	72

Figura 3-9	Cinética del crecimiento del cultivo en suspensión fotomixotrófico con diferentes concentraciones de sacarosa en el medio y 3% de CO ₂ .	75
Figura 3-10	Comportamiento del pH para el cultivo fotomixotrófico de células de <i>Bouteloua gracilis</i> en matraz con diferentes concentraciones de sacarosa en el medio y 3 % de CO ₂ .	76
Figura 3-11	Comportamiento del OD por unidad de biomasa para el cultivo fotomixotrófico de células de <i>Bouteloua gracilis</i> con diferentes concentraciones de sacarosa en el medio y 3 % de CO ₂ .	77
Figura 3-12	Clorofila total para el cultivo fotomixotrófico de células de <i>Bouteloua gracilis</i> en matraz, tratamiento y control.	78
Figura 3-13	Carotenoides totales para el cultivo fotomixotrófico de células de <i>Bouteloua gracilis</i> en matraz, tratamiento y control.	79
Figura 3-14	Cultivos celulares fotomixotróficos después de 11 d de iniciado el cultivo...	79
Figura 3-15	Cinética de crecimiento fotoautotrófico de células de <i>Bouteloua gracilis</i> .	80
Figura 3-16	Células FA filtradas para la determinación de peso fresco.	81
Figura 3-17	Cinética de crecimiento del cultivo fotoautotrófico de células de <i>Bouteloua gracilis</i> .	82
Figura 3-18	Comportamiento de la conductividad para el cultivo fotoautotrófico de células de <i>Bouteloua gracilis</i> en matraz.	83
Figura 3-19	Relación entre el IC* y % de K ₀ *, para el cultivo de células fotoautotróficas de <i>Bouteloua gracilis</i> en matraz.	84
Figura 3-20	Comportamiento del pH para el cultivo fotoautotrófico de células de <i>Bouteloua gracilis</i> en matraz.	86
Figura 3-21	Comportamiento del OD por unidad de biomasa para el cultivo fotoautotrófico de células de <i>Bouteloua gracilis</i> en matraz.	86
Figura 3-22	Perfil de pigmentos para el cultivo fotoautotrófico de células de <i>Bouteloua gracilis</i> en matraz.	87
Figura 3-23	Cambio en la concentración de aniones en el medio nitrato (NO ₃ ⁻), fosfato (PO ₄ ⁻³) y sulfato (SO ₄ ⁻²) durante un ciclo de crecimiento de 28 días para los cultivos fotoautotróficos de <i>Bouteloua gracilis</i> .	88
Figura 3-24	Comparación de la cinética de crecimiento de células fotoautotróficas de <i>Bouteloua gracilis</i> a diferentes concentraciones de CO ₂ .	89
Figura 3-25	Comportamiento del pH para el cultivo fotoautotrófico de células de <i>Bouteloua gracilis</i> en matraz para diferentes concentraciones de CO ₂ .	91
Figura 3-26	Perfil de pigmentos para el cultivo fotoautotrófico de células de <i>Bouteloua gracilis</i> en matraz a 0,5 % de CO ₂ .	92

Figura 3-27	Perfil de pigmentos para el cultivo fotoautotrófico de células de <i>Bouteloua gracilis</i> en matraz a 1,0 % de CO ₂	92
Figura 3-28	Perfil de pigmentos para el cultivo fotoautotrófico de células de <i>Bouteloua gracilis</i> en matraz a 2,0 % de CO ₂	93
Figura 3-29	Cambio en la concentración de aniones en el medio (NO ₃ ⁻), fosfato (PO ₄ ⁻³) y sulfato (SO ₄ ⁻²) durante un ciclo de crecimiento de 28 d para los cultivos fotoautotróficos de <i>Bouteloua gracilis</i> en matraz a 0,5 % de CO ₂	94
Figura 3-30	Cambio en la concentración de aniones en el medio (NO ₃ ⁻), fosfato (PO ₄ ⁻³) y sulfato (SO ₄ ⁻²) durante un ciclo de crecimiento de 28 d para los cultivos fotoautotróficos de <i>Bouteloua gracilis</i> en matraz a 1,0 % de CO ₂	94
Figura 3-31	Cambio en la concentración de aniones en el medio (NO ₃ ⁻), fosfato (PO ₄ ⁻³) y sulfato (SO ₄ ⁻²) durante un ciclo de crecimiento de 28 d para los cultivos fotoautotróficos de <i>Bouteloua gracilis</i> en matraz a 2,0 % de CO ₂	95
Figura 4-1	Cinética de crecimiento de células heterotróficas de <i>Bouteloua gracilis</i> en peso fresco (PF) y peso seco (PS).	108
Figura 4-2	Comportamiento de la conductividad del medio, a lo largo de 13 d, para el cultivo de células heterotróficas de <i>Bouteloua gracilis</i> en el sistema de biorreacción.	109
Figura 4-3	Comportamiento del pH del medio, para los 13 días de cultivo de células heterotróficas de <i>Bouteloua gracilis</i> en el sistema de biorreacción.	110
Figura 4-4	Comportamiento del oxígeno disuelto del medio, a lo largo de 13 días, para El cultivo de células heterotróficas de <i>Bouteloua gracilis</i> en el sistema de biorreacción.	111
Figura 4-5	Cinética de crecimiento de células fotomixotróficas de <i>Bouteloua gracilis</i> en peso fresco (PF) y peso seco (PS).	113
Figura 4-6	Comportamiento de la conductividad, a lo largo de 38 días, para el cultivo de células fotomixotróficas de <i>Bouteloua gracilis</i>	114
Figura 4-7	Comportamiento del pH del medio, para los 38 días de cultivo de células fotomixotróficas de <i>Bouteloua gracilis</i> en el sistema de biorreacción.	114
Figura 4-8	Comportamiento del oxígeno disuelto, a lo largo de 38 días para el cultivo de células fotomixotróficas de <i>Bouteloua gracilis</i> en sistema de biorreacción..	115
Figura 4-9	Perfil de pigmentos durante el crecimiento fotomixotrófico de <i>Bouteloua gracilis</i> en biorreactor.....	117
Figura 4-10	Cambio en la concentración de aniones en el medio (NO ₃ ⁻), fosfato (PO ₄ ⁻³) y sulfato (SO ₄ ⁻²) durante un ciclo de crecimiento de 38 d para los cultivos fotomixotróficos de <i>Bouteloua gracilis</i> a nivel de biorreactor.	117
Figura 4-11	Cinética de crecimiento de células fotoautotróficas de <i>Bouteloua gracilis</i> En peso fresco (PF) y peso seco (PS).	119

Figura 4-12	Comportamiento de la conductividad del medio, a lo largo de 26 días, para el cultivo de células fotoautotróficas de <i>Bouteloua gracilis</i>	120
Figura 4-13	Comportamiento del pH del medio, para los 26 días de cultivo de células fotoautotróficas de <i>Bouteloua gracilis</i> en el sistema de biorreacción.	121
Figura 4-14	Comportamiento del oxígeno disuelto del medio, a lo largo de 26 días, para el cultivo de células fotoautotróficas de <i>Bouteloua gracilis</i>	122
Figura 4-15	Perfil de pigmentos para el cultivo fotoautotróficas de <i>Bouteloua gracilis</i> en biorreactor.	124
Figura 4-16	Cambio en la concentración de aniones en el medio (NO_3^-), fosfato (PO_4^{3-}) y sulfato (SO_4^{2-}) durante un ciclo de crecimiento de 3 d para los cultivos fotoautotróficos de <i>Bouteloua gracilis</i> a nivel de biorreactor.	125
Figura 4-17	Fotos del crecimiento fotoautotrófico en biorreactor al día 20 del cultivo...	126
Figura 5-1.	Estructura vegetal y composición de los residuos lignocelulósicos.	131
Figura 5-2	Productos de degradación de la biomasa	131
Figura 5-3	Microscopía electrónica de células fotomixotróficas de <i>Bouteloua gracilis</i> ..	142
Figura 5-4	FTIR de las células heterotróficas cultivadas a nivel de biorreactor.	146
Figura 5-5	FTIR de las células fotomixotróficas cultivadas a nivel de biorreactor.	146
Figura 5-6	FTIR de las células fotoautotróficas cultivadas a nivel de biorreactor.....	147

Lista de tablas

Pág

Tabla 1-1	Características de crecimiento de cultivos celulares FA.	14
Tabla 1-2	Cultivos FM y FA obtenidos en monocotiledóneas.	17
Tabla 1-3	Cultivos celulares FA crecidos a nivel de biorreactor.	26
Tabla 1-4	Comparación de la producción de metabolitos secundarios a partir de cultivos en suspensión fotoautotróficos, fotomixotróficos y heterotróficos.	29
Tabla 2-1	Medios utilizados para inducción de respuestas morfogénicas a partir de ápices de vástago de cinco variedades de <i>Lolium multiflorum</i>	41
Tabla 2-2	Eficiencia de inducción de callo primario (%) a partir de ápices de vástago de cinco variedades de <i>Lolium multiflorum</i>	44
Tabla 2-3	Eficiencia de formación de callo morfogénico (%) a partir de ápices de vástago para cinco variedades de <i>Lolium multiflorum</i>	45
Tabla 2-4	Regeneración de plantas <i>in vitro</i> (plantas por g de PF de callo) a partir de callo inducido sobre diferentes formulaciones de medio.	49
Tabla 3-1	Establecimiento de la presión parcial de CO ₂ mediante la solución buffer K ₂ CO ₃ /KHCO ₃	64
Tabla 3-2	Hojas con altas y bajas relaciones de clorofila a/b.	72
Tabla 3-3	Tiempos de duplicación de algunas líneas celulares fotoautotróficas que crecen con 5% de CO ₂	82
Tabla 3-4	Valores de IC _t y % de K ₀ evaluados a cada condición de tiempo durante los 28 días de cultivo de las células de <i>Bouteloua gracilis</i> en matraz.	84
Tabla 3-5	Resumen de las velocidades específicas de crecimiento para diferentes concentraciones de CO ₂ en el ambiente de cultivo.	90

Tabla 4-1	Cálculo de la biomasa en el reactor al final del cultivo de células heterotróficas de <i>Bouteloua gracilis</i> de acuerdo con la conductividad en el biorreactor.	107
Tabla 4-2	Cálculo de la biomasa en el reactor al final del cultivo de células heterotróficas de <i>Bouteloua gracilis</i> de acuerdo con la conductividad en el biorreactor.	112
Tabla 4-3	Cálculo de la biomasa en el reactor al final del cultivo de células fotoautotróficas de <i>Bouteloua gracilis</i> de acuerdo con la conductividad.	118
Tabla 5-1	Azúcares estructurales y tiempo de retención detectados en las células vegetales.....	135
Tabla 5-2	Composición de las células de <i>Bouteloua gracilis</i>	136
Tabla 5-3	Resumen de bandas obtenidas por espectroscopia FT-MIR para los principales componentes de la pared celular.....	143

Introducción

Debido al creciente problema ambiental de las emisiones de CO₂ y la inminente crisis energética como consecuencia del incremento en la demanda de los combustibles fósiles, se ha generado, en las últimas décadas gran interés en la investigación y desarrollo de nuevas fuentes de energía y materias primas. La biomasa lignocelulósica es comúnmente reconocida como una fuente de energía ecológica y renovable a partir de la cual se pueden producir biocombustibles, productos químicos y materiales biodegradables. Entre los constituyentes de la pared celular vegetal se destacan los polisacáridos y la lignina que se pueden convertir a glucosa, xilosa y compuestos químicos intermedios como alcoholes, ácidos orgánicos, xilitol, furfural y diversas sustancias químicas de alto valor agregado (Parajuli *et al.*, 2015).

Los materiales lignocelulósicos, obtenidos de residuos agrícolas y cultivos energéticos han sido ampliamente estudiados debido a su abundancia y a su capacidad para ser renovados continuamente en la naturaleza. El costo de los materiales lignocelulósicos es bajo, pero los procesos de producción de etanol, a partir de éstos, son más costosos, ya que la estructura de la pared celular vegetal es un complejo heterogéneo de celulosa, hemicelulosa y lignina, lo cual dificulta la hidrólisis de los azúcares y su posterior fermentación a etanol. En este mismo contexto, los pastos o forrajes de alta productividad, son materias primas que han generado un interés considerable como sustrato para la producción de azúcares fermentables debido a sus altos rendimientos, bajos costos de producción, buena sostenibilidad y bajos impactos ambientales (Bosworth, 2015).

Sin embargo, la bioconversión de estos pastos está limitada por los constituyentes aromáticos, que incluyen ligninas y ésteres de ácidos fenólicos, que se unen covalentemente con los carbohidratos vegetales y físicamente los ocultan, protegiéndolos de esta manera de la degradación. Debido a esto se requieren procesos como los pretratamientos para liberar los carbohidratos estructurales de la lignina, para la bioconversión a etanol y a otras sustancias químicas de interés para la industria (Srivastava *et al.*, 2015).

Una alternativa para obtener biomasa con altas concentraciones de celulosa y bajos niveles de lignina es el establecimiento de cultivos fotoautotróficos a nivel de biorreactor. Los cultivos celulares vegetales son sistemas únicos para el análisis controlado de procesos fisiológicos, bioquímicos, citológicos y genéticos de plantas superiores a nivel celular (Widholm, 1992). Los cultivos fotoautotróficos obtenidos a partir de plantas superiores, proveen nuevas alternativas de investigación sobre el incremento de la productividad de las células vegetales y al ser modelos menos complicados y más realistas que los cultivos heterotróficos, sirven para estudiar la fotosíntesis y la producción de metabolitos secundarios específicos. Además, poseen la ventaja de usar la energía lumínica y CO₂ como fuente de carbono directa, en lugar de fuentes de carbono heterotróficas, como la gran mayoría de cultivos vegetales (Roitsch y Sinha, 2002; Sato, 2013).

Los cultivos de suspensiones celulares fotoautotróficas de plantas superiores a nivel de biorreactor ofrecen una tecnología alternativa para la producción continua de biomasa, con bajos niveles de lignina y concentraciones de material celulósico similares a las obtenidas agrónomicamente (Treat *et al.*, 1990). Las células vegetales, cultivadas en biorreactores, requieren condiciones diferentes a las estudiadas tradicionalmente con microorganismos, tales como altas intensidades de luz y niveles adecuados de oxígeno y dióxido de carbono. Además, el mejoramiento del crecimiento de estos sistemas requiere la optimización de los componentes de los medios y las condiciones de cultivo incluyendo reguladores de crecimiento, nutrientes, pH del medio, niveles de oxígeno y dióxido de carbono, temperatura y luz (Eibl y Eibl, 2008).

El objetivo general de la tesis fue producir biomasa lignocelulósica, a nivel de biorreactor, empleando cultivos de células fotoautotróficas *in vitro* de *Bouteloua gracilis*. Los objetivos específicos fueron establecer las condiciones de cultivo fotoautotrófico en suspensión de células de *Bouteloua gracilis*, caracterizar el cultivo en suspensión fotoautotrófico en un sistema de biorreacción, y por último, analizar y cuantificar los carbohidratos estructurales y la lignina, presentes en la biomasa obtenida a partir del cultivo celular fotoautotrófico del pasto *Bouteloua gracilis*.

En el capítulo 1 de la tesis se muestra el estado del arte sobre cultivos vegetales en suspensión fotoautototróficos, teniendo en cuenta las generalidades del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* y de los pigmentos fotosintéticos, las líneas celulares fotoautotróficas desarrolladas hasta la fecha, los factores que afectan el establecimiento de estos cultivos, como los diferentes constituyentes del medio y condiciones ambientales. Adicionalmente se recopilan las características de los cultivos de células fotoautotróficas en biorreactor y otras aplicaciones de estos cultivos como son la obtención de metabolitos secundarios y su potencial futuro para la producción de biocombustibles. El capítulo finaliza con las conclusiones y perspectivas de este tipo de cultivos vegetales.

En una primera etapa se trabajó con ápices de vástago de *Lolium multiflorum* Lam con el propósito de generar callos friables, con altas concentraciones de clorofila, para obtener suspensiones celulares a partir de esta especie y establecer una línea celular fotoautotrófica. Sin embargo, la generación de callos friables clorofílicos no fue posible a partir de ninguna de las variedades probadas de *Lolium multiflorum* Lam, aun cuando se utilizaron concentraciones de auxinas y citocininas en el medio de cultivo y condiciones de luz que favorecían la inducción de callo con potencial fotosintético. Los resultados obtenidos en esta etapa de la tesis se aprovecharon para establecer un sistema de regeneración *in vitro* de *Lolium multiflorum* Lam, que se presenta en el capítulo 2 de este trabajo. Esta parte de la investigación se realizó en el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas del Instituto de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en Celaya, Guanajuato, México. En este capítulo se muestra el desarrollo de un sistema de regeneración vegetal *in vitro* para cinco variedades élite de *Lolium multiflorum* Lam, mediante la inducción de callo morfogénico utilizando como explantes ápices de vástago. Posteriormente se probó la capacidad regenerativa de estos callos transfiriéndolos a medios de regeneración donde se obtuvieron plántulas *in vitro* que luego de alcanzar su desarrollo fueron aclimatadas y transferidas a campo.

Se trabajó a continuación con una línea clorofílica obtenida a partir de *Bouteloua gracilis*, un pasto originario de Norte América, la cual se adaptó paulatinamente a bajas concentraciones de azúcar en el medio y a una atmósfera enriquecida con 3 % de CO₂ para lograr un cultivo fotoautotrófico en suspensión a nivel de matraz. En el capítulo 3 de esta tesis se muestra el establecimiento de la primera línea celular fotoautotrófica en Poaceae y la caracterización de los cultivos heterotróficos, fotomixotróficos y fototautotróficos de la especie *Bouteloua*

gracilis mediante la cinética de crecimiento en peso fresco y el comportamiento de variables como pH, oxígeno disuelto, conductividad eléctrica, pigmentos fotosintéticos y consumo de iones del medio de cultivo. En el capítulo 4 se muestra el crecimiento de las células en suspensión heterotróficas, fotomixotróficas y fotoautotróficas de la especie *Bouteloua gracilis* en un biorreactor de tanque agitado de 2L. Se caracterizan los cultivos en cuanto a la cinética de crecimiento en peso fresco y peso seco, y el comportamiento de variables como pH, oxígeno disuelto, conductividad eléctrica, pigmentos fotosintéticos y consumo de iones del medio de cultivo.

Finalmente, en el capítulo 5 se muestra el análisis químico de las células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en cuanto al contenido de celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas mediante las metodologías adaptadas del Laboratorio Nacional de Energías Renovables “NREL” por sus iniciales en inglés, así mismo se realizó un análisis de espectroscopía de reflectancia total atenuada ATR-FTIR para ver los grupos funcionales característicos de los carbohidratos estructurales y otras moléculas presentes en la células vegetales heterotróficas, fotomixotróficas y fotoautotróficas crecidas a nivel de biorreactor.

Este proyecto está relacionado con los intereses del grupo de investigación Procesos Químicos y Bioquímicos del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Colombia, en cuanto a que la biomasa lignocelulósica puede ser obtenida a partir de cultivos celulares fotoautotróficos en un sistema de biorreacción, para obtener azúcares fermentables sin necesidad de llevar a cabo pretratamientos que liberen la celulosa y la hemicelulosa. Por lo anterior, es importante explorar este proceso con un pasto de alta productividad, como es el *Bouteloua gracilis*, para obtener biomasa vegetal con menores contenidos de lignina y por lo tanto disponible a la acción de enzimas celulolíticas. Con este proyecto de investigación se pretendió contribuir al fortalecimiento de la industria de biocombustibles en Colombia, disminuir la presión sobre los cultivos destinados a la alimentación humana y animal, reducir el impacto sobre el medio ambiente y además, investigar y desarrollar sistemas que fortalezcan nuevos campos de aplicación en la bioingeniería y la bioindustria.

Este primer estudio constituirá la base para que en futuros trabajos se pueda valorar su potencial como sistema alternativo a las cianobacterias para la producción de biocombustibles y otras sustancias químicas de interés para la industria.

1 ESTADO DEL ARTE SOBRE CULTIVOS EN SUSPENSIÓN FOTOAUTOTRÓFICOS

1.1 Introducción

Los cultivos celulares representan un tipo especial del cultivo *in vitro* de organismos en el cual las células crecen en forma aislada e independiente. Estos sistemas permiten el análisis controlado de procesos genéticos, fisiológicos y bioquímicos que operan en plantas superiores a nivel celular (Lerner, 1985; Ziegler y Scheibe, 1989; Widholm, 1992; Hampp *et al.*, 2012). Los cultivos de suspensiones celulares han demostrado ser sistemas experimentales valiosos para analizar diferentes aspectos como respuestas de defensa, transporte de iones, producción de metabolitos secundarios, regulación genética y transducción de señales (Ebel y Mithofer, 1998). Debido a que están conformados por poblaciones uniformes de células que pueden ser crecidas en condiciones controladas, estos sistemas pueden ser utilizados para el establecimiento de procesos confiables y reproducibles de producción a nivel de biorreactor.

Con base en sistemas de células aisladas se han realizado diversos estudios relacionados con los procesos fisiológicos, moleculares y bioquímicos que operan durante el estrés salino, osmótico y térmico (Bressan *et al.*, 1982; Bhaskaran *et al.*, 1985; Tholakalabavi *et al.*, 1994; Leonardi *et al.*, 1995; Robertson *et al.*, 1995; Hawkins y Lips, 1997; Tholakalabavi *et al.*, 1997; Cazalé *et al.*, 1998) y han permitido el aislamiento de genes relacionados con estrés osmótico y salino (Umeda *et al.*, 1994). Los cultivos en suspensión también son considerados importantes para la obtención de productos valiosos como endulzantes, farmacéuticos, saborizantes, fragancias, compuestos aromáticos y enzimas (Mühlbach, 1998).

Los cultivos celulares que desarrollan altos contenidos de clorofila (suspensiones celulares clorofilicas) ofrecen ventajas adicionales como modelo para el estudio de la bioquímica,

genética y fisiología celular debido a que varias enzimas del metabolismo vegetal se encuentran localizadas en los cloroplastos (Widholm, 1992; Joyard *et al.*, 1998). Por ejemplo, en la ruta biosintética del ácido abscísico que es iniciada en los cloroplastos, se destacan las enzimas zeaxantina epoxidasa (ZEP) que cataliza la conversión de zeaxantina a trans-violaxantina y la 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED), que cataliza el primer paso que compromete la biosíntesis del ácido absícico (ABA), al facilitar el corte de cis-xantofila para formar xantoxina (Seo y Koshiba, 2002).

Si bien la principal función de los cloroplastos es su participación en la fotosíntesis, estos organelos también participan en otras funciones fundamentales de las células vegetales como son la síntesis de aminoácidos, nucleótidos, lípidos, almidón y hormonas. La vía de la desoxixilulosa 5-fosfato para la síntesis de terpenoides está localizada casi exclusivamente en los cloroplastos (Lange *et al.*, 2000); los primeros pasos de esta biosíntesis, empezando con isopentenil PPi, se realizan en el estroma mientras que los pasos finales se asocian con la membrana interna (tilacoide).

Por otro lado, los cloroplastos son un blanco importante dentro de la biotecnología del estrés hídrico (Hayashi *et al.*, 1997; Sakamoto *et al.*, 1998) debido al confinamiento de ciertos solutos compatibles, o enzimas involucradas en su biosíntesis, dentro de estos organelos. Por ejemplo, el osmorregulador glicina betaína se localiza principalmente en cloroplastos (Robinson y Jones, 1986) donde se supone que estabiliza el aparato fotosintético, y por ende a la tasa fotosintética; durante condiciones de estrés hídrico (Rhodes y Hanson, 1993). Las proteínas BADH (betaína aldehído deshidrogenasa) y colina monooxigenasa son enzimas involucradas en la biosíntesis de glicina betaína que se encuentran localizadas casi exclusivamente en el estroma de los cloroplastos (Weigel *et al.*, 1986; Brouquisse *et al.*, 1989). Asimismo, los cloroplastos son un importante centro de producción de especies reactivas de oxígeno durante el estrés hídrico (Noctor y Foyer, 1998), por lo que cuentan con sistemas de detoxificación para la inactivación de radicales oxígeno y H₂O₂ que se generan en situaciones de deficiencia de agua (Bohnert y Shen, 1999) y en estos plástidos se localiza la enzima zeaxantina epoxidasa que lleva a cabo la primera reacción de la biosíntesis de ABA mediante una epoxidación de la zeaxantina en anteraxantina y violaxantina (Marin *et al.*, 1996).

En este capítulo se pretende presentar algunas características de los cultivos fotoautotróficos (FA), las estrategias para lograr su establecimiento y mejorar su crecimiento y las aplicaciones potenciales de estos sistemas, particularmente las relacionadas con la producción de biocombustibles.

1.2 Generalidades del cultivo de células *in vitro*

Según la fuente de energía que utilizan para su crecimiento, los cultivos pueden ser clasificados en cultivos celulares heterotróficos (H), fotomixotróficos (FM) y fotoautotróficos (FA) (Widholm, 1992). Los cultivos de células vegetales FM y FA poseen cloroplastos desarrollados y fisiológicamente activos para obtener toda (FA) o parte de su energía (FM) a partir de la fotosíntesis (Figura 1-1), con el empleo de las sales minerales añadidas al medio de crecimiento, así como el suministro exógeno de CO_2 y luz a estos sistemas celulares (Roitsch y Sinha, 2002). Esto contrasta con los sistemas celulares H, los cuales no poseen cloroplastos y requieren necesariamente de la adición de sacarosa (u otro carbohidrato) al medio de cultivo para poder crecer. Los cultivos FM constituyen una interfase entre los sistemas anteriores y se definen como los cultivos que poseen la habilidad para sintetizar clorofila y asimilar CO_2 , pero que además requieren de alguna fuente exógena de carbohidrato para su crecimiento (Nagai *et al.*, 1989).

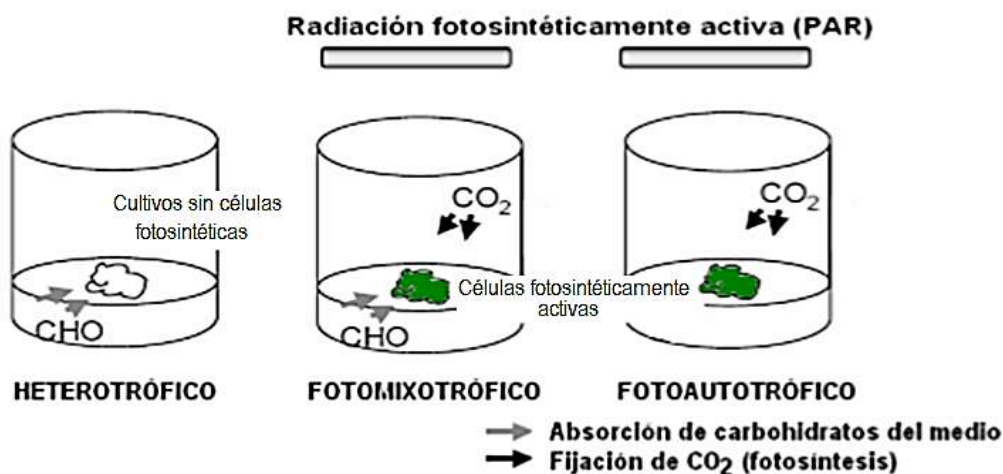


Figura 1-1 Clasificación de los cultivos vegetales *in vitro*. Adaptado de (Kozai *et al.*, 2005)

Los cultivos *in vitro* también pueden ser clasificados en cultivos en medio sólido (callos) y en medio líquido (suspensiones celulares). Un callo es una masa no diferenciada de células en crecimiento activo que, de forma natural, se origina a partir de tumores, heridas o por interacción del tejido con patógenos invasores. Los callos originados en *cultivos in vitro* se generan al depositar un fragmento seleccionado de tejido vegetal (explante) en un medio de cultivo adecuado, de manera que sus células proliferan y comienzan a perder la estructura y organización tisular que mantenían en el tejido original hacia células no diferenciadas (Eibl y Eibl, 2008).

Las suspensiones celulares se obtienen mediante la transferencia de una porción de callo friable (tejido que se dispersa fácilmente en células y pequeños agregados celulares) a un medio de cultivo líquido. Este sistema es más conveniente que el cultivo de callos, porque generalmente las células crecen más rápido y al estar en agitación se garantiza un aporte equitativo de nutrientes y de CO₂ (Godoy-Hernández, 2012).

Los cultivos FA combinan las ventajas de los cultivos H con la autotrofia como la característica esencial de las células vegetales. Los cultivos FA son sistemas biológicos experimentalmente valiosos para el análisis del metabolismo vegetal, particularmente el relacionado con los cloroplastos y la actividad fotosintética, así como con la producción de metabolitos secundarios específicos (Roitsch y Sinha, 2002).

A pesar de sus ventajas como modelo de estudio, el establecimiento y mantenimiento de cultivos FA es un proceso largo y difícil, por lo que existen pocos reportes sobre estos sistemas celulares, la mayoría publicados en las décadas de 1980 y 1990.

1.3 Pigmentos fotosintéticos

Las clorofilas junto con los carotenoides se localizan en el cloroplasto y su función es la absorción de energía luminosa para la realización de la fotosíntesis. Existen dos tipos de clorofilas en las plantas superiores: la clorofila *a* y la clorofila *b*. La cantidad de éstas depende de la especie de planta, las condiciones de luz y de la disponibilidad de minerales como el magnesio. El contenido normal de clorofila *a* es 2 a 4 veces mayor que el de clorofila *b*, aunque se ha encontrado que esta relación puede variar según la especie vegetal (Jiménez-Francisco, 2013). Las plantas que crecen en oscuridad contienen menos

clorofila *a* y más clorofila *b*. El color verde en las suspensiones celulares FA es debido a la habilidad de la clorofila para absorber la luz en la región visible, principalmente en la región del azul (420 a 460 nm) y roja (650 a 700 nm), y reflejan la luz verde alrededor de los 550 nm (Nishio, 2000).

Estos pigmentos son derivados porfirínicos cuyo principal esqueleto es un arreglo de 4 anillos de pirroles que contienen un átomo de magnesio en el centro de la molécula de clorofila, el cual participa activamente en la absorción. El anillo de tetrapirrol crea una estructura de dobles enlaces conjugados, el cual facilita la absorción de fotones de luz. También posee una cadena de fitol (20 carbonos) que le confiere el carácter hidrofóbico y permite anclarse a los sistemas de membrana. Las diferencias en la estructura entre la clorofila *a* y *b* son mínimas; solo en el grupo unido en el tercer carbono del segundo anillo tetrapirrólico. La clorofila *a* posee un grupo metilo (CH_3), mientras que la clorofila *b* posee un grupo formilo (CHO) (Heldt y Piechulla, 2004).

La clorofila es sintetizada en el cloroplasto. En la primera fase, el ácido glutámico es convertido a ácido delta-aminolevulínico. A partir de ahí, varias fases metabólicas son requeridas para la formación de los cuatro anillos que forman los tetrapirroles. En esta ruta metabólica, la presencia de luz es necesaria durante la reacción que produce la protoporfirina IX. Esta es una ruta metabólica importante debido a que, además de la clorofila, se producen también los tetrapirroles. En ambos casos la ruta es similar hasta el punto donde se sintetiza la protoporfirina IX, la cual es producida en los cloroplastos. Otras enzimas de los cloroplastos pueden luego insertar en el centro del tetrapirrol ya sea Mg^{2+} para iniciar la síntesis de clorofila, o bien Fe^{2+} para iniciar la síntesis de grupos hemo. La protoporfirina IX puede también ser exportada del cloroplasto hacia la mitocondria, donde es utilizada para producir grandes cantidades de citocromos. Esta ruta biosintética es también importante porque los grupos hemo sirven de sustrato para la síntesis del fitocromo, una molécula fotosensible esencial para la fotomorfogénesis normal de la planta. Por lo tanto, los productos de los tetrapirroles están involucrados tanto en la fotosíntesis (clorofilas y citocromos en los cloroplastos), como en la respiración (citocromos en las mitocondrias) y el desarrollo de la planta, fitocromo (Heldt y Piechulla, 2004; Jiménez-Francisco, 2013).

La otra clase de pigmentos fotosintéticos son los carotenoides. La mayoría de las plantas terrestres contienen una gran variedad de carotenoides, incluyendo beta-caroteno, luteína,

neoxantina y violaxantina. La estructura básica de todas estas moléculas está compuesta de una unidad ramificada repetida de cinco carbonos. Las moléculas formadas a partir de esta unidad básica de cinco carbonos son conocidas comúnmente como isoprenoides. Las estructuras de los carotenoides también contienen sistemas de enlaces dobles conjugados, que son los responsables de la absorción de la luz. La mayoría de los carotenoides absorben fotones en la región azul del espectro luminoso (400 a 500 nm), y muestran una coloración amarilla. En plantas superiores los carotenoides actúan como pigmentos accesorios en el aparato fotosintético para asistir en la captación de luz. Otra función de estas moléculas es la fotoprotección para prevenir el daño foto oxidativo. La ruta biosintética de los carotenoides ha sido ampliamente estudiada y sus productos caracterizados, los cuales están localizados en el núcleo, pero las enzimas codificadas deben ser transportadas hacia los diferentes plastidos donde los carotenos son sintetizados (Cunningham y Gantt, 1998).

La síntesis de los carotenoides sigue la ruta metabólica del isoprenoide. Esta ruta es también la base para la producción de moléculas tan diversas como las que confieren aromas, las vitaminas (por ejemplo la vitamina A), los esteroides y el caucho. La bioquímica de esta ruta involucra la adición consecutiva de unidades de cinco carbonos, seguida de reordenamientos moleculares, ciclizaciones, y la adición de grupos funcionales (Heldt y Piechulla, 2004). La ruta también es importante ya que el compuesto intermedio geranilgeranil pirofosfato es utilizado para la producción de un grupo fitol durante la síntesis de la clorofila. La síntesis de los carotenoides toma lugar en la membrana que rodea al cloroplasto, no en las membranas interiores que contienen la clorofila (Heldt y Piechulla, 2004).

1.4 Establecimiento, mantenimiento y preservación de cultivos celulares fotoautótrofos

Los cultivos FA son establecidos a partir de cultivos FM con concentraciones altas de clorofila. Inicialmente las células en suspensión FM crecen con una fuente de carbono y con una concentración adecuada de CO₂ en la atmósfera del cultivo. El contenido de azúcar del medio, para el crecimiento FM, se disminuye lenta y gradualmente para finalmente establecer un cultivo FA (Hampp *et al.*, 2012). El incremento de la actividad fotosintética se monitorea rutinariamente mediante la determinación del contenido de clorofila, la asimilación de carbono en presencia de luz y la ultraestructura de los

cloroplastos (Widholm, 1992). La mayoría de los cultivos fotoautotróficos son mantenidos bajo régimen continuo de luz, lo cual parece ser importante para la síntesis y acumulación de clorofila.

Los cultivos fotoautotróficos demandan elevadas concentraciones de CO_2 y la mayoría de estos cultivos crecen en presencia de al menos 1%. Un método ampliamente usado para mantener cultivos FA es agitarlos en recipientes de dos niveles los cuales son esencialmente dos Erlenmeyers que están conectados por un tubo de vidrio (Figura 1-2). Las células en suspensión están presentes en la parte superior mientras que el frasco inferior contiene un sistema de buffer carbonato ($\text{K}_2\text{CO}_3/\text{KHCO}_3$) para asegurar las concentraciones de CO_2 adecuadas entre 0,5 y 3%. Otros sistemas para el mantenimiento de los cultivos FA incluyen cultivos en cajas de Petri, frascos burbujeados, frascos con ambiente controlado, y varias clases de biorreactores (Roitsch y Sinha, 2002). Sin embargo, para la mayoría de las aplicaciones los frascos de dos niveles son convenientes porque proveen condiciones de crecimiento favorables, son fáciles de manejar, y se puede escoger la proporción adecuada de buffer $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{KHCO}_3$ en el frasco inferior para controlar la concentración de CO_2 a niveles elevados y constantes (Roitsch y Sinha, 2002).

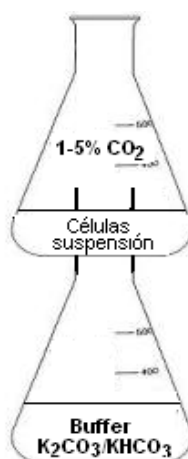


Figura 1-2 Recipientes de dos niveles para mantenimiento de cultivos celulares FA

Existen varios reportes donde se describen las técnicas para preservación de cultivos FA, los cuales comprenden criopreservación (Luo y Widholm, 1998) transferir los cultivos a condiciones heterotróficas (Lozovaya *et al.*, 1996), y almacenar los cultivos en condiciones de baja iluminancia (100-200 lux; Malik, 1996). Estas técnicas aseguran una fuente continua de inóculo, ya que al reestablecer las condiciones adecuadas se observa un crecimiento rápido y continuo y una recuperación en los niveles de clorofila y desarrollo de cloroplastos.

1.5 Líneas celulares fotosintéticas: 46 años de investigación

El primer cultivo fotoautotrófico (FA) en suspensión fue establecido para la especie *Nicotiana tabacum* (Bergmann, 1967). En este sistema se describió el uso de dióxido de carbono como única fuente de carbono y el efecto de dos auxinas sobre la fijación fotosintética de carbono en las células cultivadas. Los cultivos FA de briófitas como *Marchantia paleacea* var. *Diptera* (Taya *et al.*, 1995) y de muchas especies de plantas superiores de la división Antofita han sido descritos en la literatura. Muchas especies de la familia Solanaceae son capaces de crecer bajo condiciones fotoautotróficas, incluyendo *Nicotiana tabacum* (Bergmann, 1967), *Nicotiana plumbaginifolia* (Rey *et al.*, 1989), híbridos de *Nicotiana tabacum* x *Nicotiana glutinosa* (Goldstein y Widholm, 1990), *Solanum tuberosum* (LaRosa *et al.*, 1984), *Lycopersicum esculentum* y *Lycopersicum peruvianum* (Stocker *et al.*, 1993). En la Tabla 1-1 se muestra una lista de dicotiledóneas y briófitas capaces de crecer fotoautotróficamente. Por lo general, estas líneas celulares se caracterizan por tener tasas de crecimiento bajas con tiempos de duplicación ubicados entre 2,3 y 23,0 días, mientras que para sistemas H las tasas de duplicación varían entre 0,6 y 5 días (Smetanska, 2008).

Por otro lado, aunque se han descrito diferentes cultivos celulares para cereales (Bhaskaran y Smith, 1990) y pastos (Ahloowalia, 1989), existen solo tres reportes de cultivos *in vitro* de células vegetales no diferenciadas con alto contenido de clorofila para monocotiledóneas (Tabla 1-2). Las posibles explicaciones a este hecho incluyen la ausencia de uniformidad de formación de clorofila en las células verdes (Widholm, 1992) y

las altas concentraciones de auxinas requeridas para la inducción de callos en las gramíneas (Yamada, 1985; Yamada y Sato, 1978).

Se han logrado desarrollar cultivos clorofílicos en gramíneas, como por ejemplo la generación de suspensiones celulares FM con potencial de regeneración del pasto *Bouteloua gracilis* (Aguado-Santacruz *et al.*, 2001; García-Valenzuela *et al.*, 2005); y el cultivo de callos verdes de *Zea mays* (Lavergne *et al.*, 1992; Vargas-Suarez *et al.*, 1996). Aunque no se probó el crecimiento fotoautotrófico de las líneas celulares de *B. gracilis*, la velocidad de crecimiento y los niveles de clorofila son suficientes para el establecimiento de este cultivo.

El establecimiento de cultivos FA a partir de gramíneas es una tarea difícil que no ha sido lograda satisfactoriamente. El uso de células fotomixotróficas con altos contenidos de clorofila como material de inicio podría ser el primer paso para alcanzar esta meta (Widholm, 1992). Trabajos previos con callos obtenidos de maíz mostraron que la sacarosa es incapaz de promover cultivos FM estables (Solís *et al.*, 1989). Se ha demostrado que la glucosa promueve la iniciación del color verde en el callo, aunque limita los niveles de clorofila (Lavergne *et al.*, 1992). La reciente identificación del factor de transcripción *OsGLK1* que regula el desarrollo de los cloroplastos ha hecho posible el establecimiento de cultivos celulares verdes, aún en gramíneas (Nakamura *et al.*, 2009). Las estrategias para lograr células FA de gramíneas tienen que centrarse en las condiciones ambientales del cultivo, así como en los requerimientos nutricionales, como el balance entre auxinas y citocininas, azúcares para inducir el crecimiento de las células clorofílicas, nutrientes inorgánicos, intensidad de luz, temperatura y composición de la fase gaseosa.

Tabla 1-1 Características de crecimiento de cultivos celulares FA.

Especie	Medio basal	Reguladores crecimiento	(μM)	Irradiancia ($\mu\text{mol de fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$) [Fotoperiodo]	CO_2 en aire (%)	[X] (g L^{-1}) PS	μ (d^{-1})	Referencia
<i>Amaranthus cruentus</i>	MS	Cinetina	0,93	300 [continuo]	5	DNR	0,05	(Xu <i>et al.</i> , 1988)
		Picloram	0,3					
		ANA	5,4					
<i>Arabidopsis thaliana</i>	B5	2,4-D	0,2	180 [continuo]	2	DNR	0,07	(Hampp <i>et al.</i> , 2012)
<i>Amaranthus powellii</i>	MS	Cinetina	0,93	300 [continuo]	5	7,92 (28 d)	0,09	(Xu <i>et al.</i> , 1988)
		Picloram	0,3					
		ANA	5,4					
<i>Catharanthus roseus</i>	B5	ANA	5,4	100 [continuo]	2	15,12 (56 d)	0,04	(Tyler <i>et al.</i> , 1986)
		Cinetina	4,6					
<i>Chenopodium rubrum</i>	MS	2,4-D	0,1	87 [continuo]	0,5-1	8,9 (14 d)	0,06	(Hüsemann y Barz, 1977)
<i>Chenopodium rubrum</i>	MS	2,4-D	0,1	120 [continuo]	2	13,5 (14 d)	0,14	(Hüsemann, 1979)
<i>Chenopodium rubrum</i>	MS	2,4-D	0	120 [continuo]	2	18 (14 d)	0,3	(Hüsemann, 1981)
<i>Datura inoxia</i>	MS	Picloram	0,3	300 [continuo]	5	5,4 (28 d)	0,05	(Xu <i>et al.</i> , 1988; Goldstein y Widholm, 1990)
		Cinetina	5,4					
<i>Datura carota</i>	DNR	AIA	11,4	100 [continuo]	0,035	DNR	0,03	(Bender <i>et al.</i> , 1985)
		Cinetina	0,46					

Tabla 1-1 Características de crecimiento de cultivos celulares FA (*Continuación*).

Especie	Medio Basal	Reguladores crecimiento	(μM)	Irradiancia ($\mu\text{mol de fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$) [Fotoperiodo]	CO_2 (%) en aire	[X] (g L^{-1}) PS	μ (d^{-1})	Referencia
<i>Dianthus caryophyllus</i>	MS	ANA	10,8	120	1	5,3 (24 d)	0,07	(Rebeille <i>et al.</i> , 1988)
		BA	0,39	[continuo]				
<i>Digitalis purpurea</i>	MS	AIA	5,7	90 [cotinuo]	1	8,1 (21 d)	DNR	(Hagimori <i>et al.</i> , 1982)
<i>Euphorbia characias</i>	MS	Sin reguladores de crecimiento		100 [18/6]	2	DNR	0,11	(Rebeille <i>et al.</i> , 1988)
<i>Glycine max</i>	MS	ANA	5,4	300	5	5,5 (14 d)	0,17	(Horn <i>et al.</i> , 1983)
		Cinetina	0,93	[continuo]				
<i>Gossypium hirsutum</i>	MS	ANA	5,4	200	5	21,6 (40 d)	0,05	(Blair <i>et al.</i> , 1988)
		Cinetina	0,93	[continuo]				
<i>Gossypium hirsutum</i>	MS	ANA	5,4	300 [continuo]	0,035	3,96 (28 d)	0,09	(Xu <i>et al.</i> , 1988)
		Cinetina	0,93					
		Picloram	0,3					
<i>Nicotiana tabacum</i>	MS	ANA	5,37	75 [continuo]	1	0,38 DNR	0,14	(Bergmann, 1967)
<i>Nicotiana tabacum x Nicotiana glutinosa</i>	MS	Picloram	0,3	300 [continuo]	5	6,84 (28 d)	0,05	(Horn <i>et al.</i> , 1983; Xu <i>et al.</i> , 1988)
		ANA	5,4					
		Cinetina	0,93					

Tabla 1-1 Características de crecimiento de cultivos celulares (*Continuación*).

Especie	Medio Basal	Reguladores crecimiento	(μM)	Irradiancia ($\mu\text{mol de fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$) [Fotoperiodo]	CO_2 (%) en aire	[X] (g L^{-1}) PS	μ (d^{-1})	Referencia
<i>Nicotiana tabacum</i> x <i>Nicotiana glutinosa</i>	KTP ^o (MS)	Picloram	0,3	250 [continuo]	5	DNR	0,06	(Goldstein y Widholm, 1990)
		ANA	5,4					
		Cinetina	0,93					
<i>Nicotiana tabacum</i>	LS	ANA	10,7	100 [18/6]	2	6,4 (15 d)	DNR	(Carriere <i>et al.</i> , 1989)
		BA	0,89					
<i>Nicotiana tabacum</i>	MS	ANA	1	100 [continuo]	2	1,22 (28 d)	0,08	(Ikemeyer y Barz, 1989)
		Cinetina	2,3					
<i>Morinda lucida</i>	B5	2,4-D	9	90 [continuo]	2	4,8 (14 d)	0,05	(Igbavboa <i>et al.</i> , 1985)
		ANA	2,7					
		AIA	2,9					
		Cinetina	0,93					
<i>Peganum harmala</i>	MS	2,4-D	0,1	120 [continuo]	2	DNR	DNR	(Barz <i>et al.</i> , 1980)
		ANA	0,1					
<i>Ruta graveolens</i>	H	ANA	0,2	30 [continuo]	1 en N_2	DNR	DNR	(Corduan, 1970)
		Cinetina	0,02					
<i>Solanum tuberosum</i>	MS	2,4-D	14	110 [15/9]	2	10 (28 d)	0,09	(LaRosa <i>et al.</i> , 1984)
		Cinetina	0,93					

MS: medio Murashige & Skoog (Murashige y Skoog, 1962); LS: medio Lismaier & Skoog (Lismaier y Skoog, 1965); H: medio Hildebrandt modificado (Corduan, 1970); N: medio Nitsch (Nitsch y Nitsch, 1969); B5: medio Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968); ANA: ácido naftalenacético; 2,4-D: ácido 2,4 diclorofenoxiacético; BA: benzilaminopurina; AIA: ácido indol acético; PS: masa seca; [X]: concentración de biomasa final; μ : velocidad de crecimiento exponencial; DNR: datos no reportados

Tabla 1-2 Cultivos FM y FA obtenidos en monocotiledóneas.

Especie	Material generado	Medio basal/ Fuente de carbono (g/L)	Reguladores de crecimiento (mg/L)		Irradiancia ($\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$) [fotoperiodo]	Incremento en PF (%)	Clorofila total ($\mu\text{g g}^{-1}$, PF)	Referencia
<i>Asparagus officinalis</i>	Suspensión	N 1% CO ₂ en aire	ANA	5,4	130 [continuo]	100	DNR	(Chaumont y Gudin, 1985)
			Cinetina	0,4				
<i>Asparagus officinalis</i>	Suspensión	MS 2% CO ₂ en aire	ANA	5,4	120 [16/8]	DNR	440	(Peel, 1982)
			Cinetina	2,3				
<i>Bouteloua gracilis</i>	Suspensión	MS Sacarosa (30)	2,4 D	1	55 [continuo]	323	116	(Aguado-Santacruz <i>et al.</i> , 2001)
			BA	2				
			Adenina	40				
<i>Bouteloua gracilis</i>	Suspensión	MS + polietilen glicol 8000 Sacarosa (30)	2,4 D	1	55 [continuo]	DNR	368,1	(García-Valenzuela <i>et al.</i> , 2005)
			BA	2				
			Adenina	40				
<i>Zea mays</i>	Callo	MS Glucosa (10)	Ácido picolínico	10	115 [18/6]	269	110	(Lavergne <i>et al.</i> , 1992)
			Cinetina	0,2				
<i>Zea mays</i>	Callo	MS modificado Almidón Aire + 3% CO ₂	Cinetina	0,2	180 [16/8]	DNR	11	(Vargas-Suarez <i>et al.</i> , 1996)

PF: peso fresco; MS: medio Murashige & Skoog (Murashige y Skoog, 1962); N: medio Nitsch (Nitsch y Nitsch, 1969); MS modificado: (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1988); ANA: ácido naftalenacético; 2,4-D: ácido 2,4 diclorofenoxiacético; BA: benzilaminopurina; DNR: datos no reportados.

1.6 Factores que afectan el establecimiento de cultivos FA

En las décadas pasadas se han logrado progresos considerables para estimular la producción de biomasa y clorofila en los cultivos celulares FA. Entre las estrategias adoptadas para mejorar el crecimiento de estos cultivos destacan principalmente: (a) obtención de líneas celulares con una alta tasa de crecimiento intrínseca; (b) modificaciones al medio para obtener un mejor crecimiento, (c) modificación de variables de proceso y, (d) escalamiento de cultivos celulares en biorreactores. Uno de los factores más importantes para el establecimiento de cultivos FA exitosos es la selección de líneas celulares con alto potencial fotosintético, lo cual se logra seleccionando células que posean alta tasa de crecimiento y acumulación de clorofila, así como cloroplastos bien desarrollados (Yamada y Sato, 1978; Sato, 2013).

1.6.1 Obtención de líneas celulares con alta tasa de crecimiento.

El cambio de crecimiento fotoheterotrófico (i.e., células clorofílicas que crecen en presencia de luz y que requieren azúcar exógena como principal fuente de carbono) al modo de nutrición fotoautotrófico, con dióxido de carbono como única fuente de carbono, resulta inicialmente en una reducción drástica del crecimiento del cultivo y el contenido de clorofila de las células. Solamente las células con la capacidad fotosintética deseada pueden sobrevivir este proceso de selección. Por lo tanto, un crecimiento rápido (incremento superior al 300% en peso fresco en 10 días) y cultivos celulares altamente clorofílicos (más de 70 μg de clorofila g^{-1} de PF) son prerequisites necesarios para la selección de líneas celulares que son capaces de crecer fotoautotróficamente (Hüsemann, 1984).

Es necesario un monitoreo visual cuidadoso durante los subcultivos para seleccionar las suspensiones celulares FA de rápido crecimiento y de color verde oscuro. Solamente los agregados celulares más verdes son transferidos a un medio de cultivo fresco. En general, el establecimiento de cultivos celulares fotoautotróficos es un proceso largo (Roitsch y Sinha, 2002), que toma al menos 6 meses para suspensiones celulares de *Chenopodium rubrum*, *Peganum harmala* y *Morinda lucida* (Hüsemann, 1984).

1.6.2 Medio de cultivo

Las formulaciones de medio para cultivo de células vegetales dependen principalmente de los requerimientos nutricionales de cada especie, y deben ser formulados como una mezcla químicamente definida de sales minerales (macro y microelementos) en combinación con una fuente de carbono (usualmente sacarosa). Además de estos constituyentes, generalmente se adicionan vitaminas, aminoácidos, polioles, y reguladores de crecimiento (Takayama, 2014).

La disponibilidad de nutrientes es uno de los principales factores en el cultivo de células vegetales *in vitro*, la cual afecta la acumulación de biomasa y la biosíntesis de metabolitos (Paek *et al.*, 2005). Los medios comúnmente utilizados para el crecimiento de los cultivos celulares FA son: Murashige & Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962); B5 (Gamborg *et al.*, 1968); y Lismaier & Skoog (LS) (Lismaier y Skoog, 1965). Ciertas especies vegetales requieren tiamina y adenina para el crecimiento de cultivos fotoautótrofos. Sin embargo, la meta deseable con los cultivos FA es eliminar todos los constituyentes orgánicos del medio para tener un crecimiento autótrofo absoluto (Roitsch y Sinha, 2002).

1.6.2.1 Azúcares

En cuanto a la adición de azúcares, se ha comprobado que la sacarosa inhibe la actividad fotosintética y el desarrollo de los cloroplastos de las células cultivadas (Yamada, 1985). Se han realizado estudios relacionados con la influencia de la adición de carbohidratos sobre el crecimiento y acumulación de clorofila en cultivos FM. Las principales conclusiones encontradas muestran que los azúcares rápidamente utilizables como sacarosa, glucosa, fructosa y maltosa inhiben la acumulación de clorofila, mientras que otros carbohidratos como rafinosa, inulina y almidón son aprovechados lentamente, lo que limita el crecimiento del cultivo pero favorece el desarrollo de los cloroplastos (Xu *et al.*, 1988).

1.6.2.2 Nitrógeno

La concentración de nitrógeno afecta el nivel de las proteínas y aminoácidos en los cultivos de células vegetales. La relación de amonio/nitrato y los niveles generales de nitrógeno total han mostrado un efecto marcado sobre el crecimiento y desarrollo de las células vegetales. Numerosos hechos experimentales indican que el amonio podría jugar un papel

regulador en muchos procesos dentro de las células vegetales tales como el crecimiento celular (Mohanty y Fletcher, 1978), biosíntesis de los polisacáridos de la pared celular (Günter y Ovodov, 2005), síntesis de proteínas (Mohanty y Fletcher, 1980), actividad de las enzimas de asimilación de nitrógeno (Leleu y Vuylsteker, 2004), fijación heterotrófica de CO₂ (Wright y Givan, 1988) y movilización del nitrato vacuolar (Beck y Renner, 1989). También podría tener acción reguladora sobre la síntesis enzimática (Mohanty y Fletcher, 1978), el pH citoplasmático (Wright y Givan, 1988) y en los procesos de transporte de membrana (Beck y Renner, 1989).

El metabolismo del nitrógeno ha sido estudiado extensivamente con cultivos FA de *Chenopodium rubrum*. Estos cultivos mostraron un consumo preferencial de amonio (NH₄⁺) en la primera semana, seguido por la absorción posterior tanto de amonio como de nitrato (NO₃⁻) (Campbell *et al.*, 1984). En otra investigación se demostró que la adición de NH₄⁺ a los cultivos FA que crecieron en un medio con NO₃⁻ como única fuente de nitrógeno incrementó la actividad de la enzima nitrato reductasa por movilización y por estimulación de la absorción de nitrato (Peters *et al.*, 1995). Por otro lado, en cultivos FA de soya se reportó una correlación positiva entre el contenido de nitrógeno inicial del medio y el contenido de clorofila celular (Horn y Widholm, 1994).

1.6.2.3 Reguladores de crecimiento

La concentración de reguladores de crecimiento es un factor crucial en la acumulación de biomasa. El tipo y concentración de auxinas o citocininas y la relación auxina/citocinina alteran significativamente tanto el crecimiento como la formación de las células (Ramachandra y Ravishankar, 2002). Los reguladores de crecimiento son importantes para la obtención de células fotosintéticas. El ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) es una auxina usada para la inducción y propagación de callos, pero inhibe la síntesis de clorofila y por lo tanto la fotosíntesis (Bergmann, 1967; Hüsemann y Barz, 1977; Yamada y Sato, 1978). El ácido indolacético (AIA), una auxina natural, es favorable, pero se descompone fácilmente bajo iluminación. Ensayos realizados con ácido naftalenacético (ANA) muestran que este regulador de crecimiento es más efectivo que el ácido 3-indolbutírico (IBA) o el 2,4-D para promover la síntesis de clorofila (Widholm, 1992).

El uso de citocininas estimula el desarrollo de cloroplastos. En particular, la cinetina incrementa los niveles de clorofila, el número de cloroplastos por célula y el grado de desarrollo de los tilacoides porque induce ciertos genes envueltos en el metabolismo fuente o de fijación neta de CO₂ (Roitsch y Sina, 2002). Varios investigadores recomiendan adicionar BA (Benzilaminopurina) o cinetina al medio de cultivo (Yamada, 1985).

1.6.3 Condiciones ambientales

Las condiciones ambientales como luz, temperatura, pH del medio y altas concentraciones de CO₂, han sido estudiadas por sus efectos sobre el establecimiento de cultivos FA (Roitsch y Sinha, 2002).

1.6.3.1 Luz

Los cultivos de vegetales *in vitro*, en general, son susceptibles a la radiación luminosa y a consecuencia de esto se generan varios cambios metabólicos y/o fisiológicos. Algunas reacciones importantes a la luz son: (a) fotosíntesis, (b) activación de enzimas específicas para inducir la producción de metabolitos secundarios, (c) fotomorfogénesis como por ejemplo el desarrollo de hojas (Takayama, 2014).

En este trabajo el término luz, se define como la radiación electromagnética que promueve la fotosíntesis en las plantas. La radiación con longitudes de onda entre 400 y 700 nm es llamada radiación fotosintéticamente activa (PAR), y sus unidades en el Sistema Internacional (SI) corresponden a W m⁻². El término flujo de fotones fotosintéticos (PPF) se define como la tasa de flujo de fotones por unidad de superficie y su unidad de medida es el SI es mol fotón m⁻² s⁻¹. El término iluminancia significa el flujo luminoso sobre unidad de superficie y su unidad de medida son los lux (Kozai, 2005).

La intensidad, la calidad espectral de la luz y el fotoperiodo pueden afectar los cultivos de células vegetales. Se ha encontrado que los cultivos vegetales que crecen con intensidades bajas de luz (40 a 60 μmol fotón m⁻² s⁻¹) muestran menor contenido de carotenoides, arreglos tilacoidales irregulares, tasas de transporte de electrones reducidas, baja eficiencia de carboxilación (menor contenido y actividad de Rubisco) y por lo tanto bajas tasas fotosintéticas (Fuentes *et al.*, 2006). En cultivos celulares FA la iluminación se

suministra continuamente con lámparas fluorescentes que proveen un nivel de iluminación adecuado para el crecimiento fotoautotrófico entre 6000 a 10000 lux (100 a 300 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); según Whidholm (1992) la luz continua suministra mayor energía y disminuye las pérdidas por respiración. Sin embargo, cultivos FA de *Euphorbia* y *Asparagus* crecieron con fotoperiodos de 18 y 16 h respectivamente, lo cual permitió la expresión de los procesos metabólicos normales que ocurren en las plantas durante la noche, como por ejemplo la utilización de almidón (Roitsch y Sinha, 2002).

1.6.3.2 Temperatura

El intervalo de temperatura de 17 a 25°C es usado normalmente para la inducción de callos y el crecimiento de cultivos FA. Sin embargo, cada especie de planta posee sus propios valores óptimos de temperatura.

1.6.3.3 pH

Por otro lado, el pH del medio usualmente se ajusta entre 5 y 6 antes de la esterilización y no se controla durante el desarrollo del cultivo. La concentración de iones hidrógeno en el medio cambia durante el desarrollo del mismo, principalmente porque el pH del medio decrece durante la asimilación de amonio y se incrementa durante el consumo del nitrato (McDonald y Jackman, 1989), un ejemplo que comprueba este proceso entre la actividad celular y el pH del medio de cultivo es el que ofrece Hüseman *et al.* (1992), donde se estudió la relación entre el pH externo, los cambios del pH intracelular y las modificaciones en el modo de asimilación de CO_2 fotosintético en células FA de *Chenopodium rubrum*. Un aumento en el pH del medio de 4,5 a 6,3 incrementó el pH citosólico en 0,3 unidades y el pH vacuolar en 1,3 unidades. El efecto del pH del medio sobre el pH intracelular y enzimas envueltas en el proceso de fotosíntesis dependen probablemente de las reacciones de carboxilación.

1.6.3.4 Dióxido de carbono

El enriquecimiento de la atmósfera con CO_2 promueve la fotosíntesis y el crecimiento celular en los cultivos vegetales FA (Roitsch y Sinha, 2002). La mayoría de los cultivos FA crecen en presencia de 1% o mayores niveles de CO_2 en aire. Hasta la fecha *Dianthus*

caryophyllus, *Euphorbia* sp, *Chenopodium rubrum*, *Gossypium hirsutum*, *Glycine max* y un híbrido de *Nicotiana tabacum* x *Nicotiana glutinosa* son capaces de crecer fotoautotróficamente con los niveles de CO₂ normales del aire (0,035 %) (Widholm, 1992).

Se han utilizado 2 métodos diferentes para establecer altas concentraciones de CO₂ (1-2 %) en la atmósfera gaseosa del cultivo. Las células pueden ser gaseadas con una corriente continua de una mezcla gaseosa de composición conocida enriquecida con CO₂ (1-2 % v/v), o se pueden establecer presiones parciales altas de CO₂ en los frascos de cultivo con una mezcla de carbonato-bicarbonato (Hüsemann, 1984; Warburg et al., 1962).

1.6.3.5 Aireación y agitación

El requerimiento de oxígeno de las células vegetales, en general, es muy bajo comparado con los microorganismos (Takayama, 2014). Kato et al. (1975) estudió el efecto del KLa en la producción de biomasa. Ellos observaron que el coeficiente de transferencia de oxígeno volumétrico, KLa fue constante después de 10 horas y la concentración final de biomasa permaneció constante en 0,43 g de peso seco g⁻¹ sacarosa. El efecto de la velocidad de agitación también ha sido estudiado ampliamente y se ha encontrado que velocidades de agitación entre 50 y 100 rpm parecen ser óptimas para la producción de biomasa celular y también para evitar problemas en el cultivo, como por ejemplo la formación de espuma (Kato et al., 1975).

1.6.3.6 Contaminación microbiana

De acuerdo con Manfredini et al. (1982), los factores que frecuentemente causan contaminación en los cultivos de células vegetales incluyen: (a) materiales de fabricación, (b) sellos y válvulas, (c) complejidad del sistema de crecimiento, (d) errores de operación, (e) líneas de transferencia y alimentación, (f) contaminación del inóculo, g) composición crítica del medio y, g) procedimientos inadecuados. Debido a que los cultivos de células FA requieren tiempos de crecimiento muy largos, se necesitan diseños y métodos de operación especiales para evitar cualquier tipo de contaminación (Takayama, 2014).

1.6.4 Escalamiento de cultivos en biorreactores

Hay varios temas a considerar en el escalamiento de procesos de laboratorio a nivel industrial, y que se definen en la fase de escala piloto, entre ellos se destacan: a) suministro

de oxígeno requerido por las células para alcanzar apropiadas actividades metabólicas; b) selección de un modo de operación del proceso de cultivo; c) medida de propiedades reológicas del medio de cultivo; d) modelamiento y formulación de las estrategias de control del proceso; e) fabricación de sensores, biorreactores y otros equipos periféricos.

1.7 Cultivos celulares FA en biorreactores

Pocos cultivos vegetales FA se han propagado en biorreactores, y los que existen utilizan principalmente reactores de tanque agitado y “airlift” (Tabla 1-3), con volúmenes nominales que no exceden de 20 L, en contraste con los cultivos celulares H que se han llevado a volúmenes industriales superiores a 75,000 L (Fischer *et al.*, 1994). Los principales problemas encontrados en el crecimiento de células vegetales a nivel de biorreactor se relacionan con el suministro de luz a las células; en muchos casos, el crecimiento fotoautotrófico exhibe bajas tasas de crecimiento comparado con las células que crecen bajo condiciones fotomixotróficas o heterotróficas, por lo cual persisten solamente por cortos periodos de tiempo en crecimiento por lote (las excepciones son las líneas celulares de *Asparagus officinalis* y *Glycine max*).

Los dos reportes de cultivos FA de *Asparagus officinalis* demostraron rápido crecimiento de la biomasa (Peel, 1982; Chaumont y Gudin, 1985), pero no hay información adicional que haya sido reportada concerniente a estos cultivos. En cuanto a la línea celular FA de *Glycine max* se reportó que ha crecido continuamente por muchos años bajo condiciones FA, por lo cual ha mejorado gradualmente sus características fotosintéticas, hasta alcanzar valores similares en muchos aspectos a los de las hojas de esta especie (Widholm, 1992).

Por otro lado, los fotobiorreactores requieren una gran superficie para iluminación por lo que las paredes del reactor deben ser construidas de material transparente y el espesor del tanque debe ser relativamente delgado para permitir la máxima penetración de la luz; todos estos factores limitan el tamaño de este tipo de reactores. Los fotobiorreactores se caracterizan por el control de importantes parámetros biotecnológicos y porque reducen el riesgo de contaminación, no hay pérdidas de CO₂, las condiciones del cultivo son reproducibles, se controla la temperatura y la hidrodinámica, y además los diseños son flexibles. Adicionalmente, las células fotoautotróficas, tanto las microalgas como las células vegetales FA cultivadas en biorreactores, requieren condiciones diferentes a las

estudiadas tradicionalmente con microorganismos, tales como disponibilidad de luz, el balance de CO_2/O_2 , la temperatura, la salinidad, los nutrientes y el pH del medio y la turbulencia, ya que todos estos parámetros tienen gran influencia en la fotosíntesis (Pulz, 2001; Treat *et al.*, 1990).

La luz como fuente de energía para la vida fotoautotrófica es el principal factor limitante en la fotobiotechnología. Algunas especies de algas crecen con velocidades óptimas a $50 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y son fotoinhibidas a $130 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$, mientras que las células vegetales FA a nivel de biorreactor han sido cultivadas entre 110 y $420 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ según la especie (Tabla 1-3). La mayoría de los cultivos agrícolas se adaptan fácilmente a densidades de flujo de fotones mucho más altas, de aproximadamente $900 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Pulz, 2001). Los fermentadores agitados con varios elementos luminosos sumergidos permiten obtener una productividad para microalgas del orden de 100 a 1000 mg masa seca d^{-1} .

Para lograr altas tasas de fotosíntesis, el balance de CO_2/O_2 tiene que ser ajustado en función de los requerimientos de la enzima Rubisco de tal modo que se facilite el suministro de CO_2 para el ciclo de Calvin y se restrinja el uso del O_2 para la fotorrespiración. Por tanto, en cultivos de algas de altas densidades debe haber suficiente CO_2 disponible, mientras que el O_2 liberado tiene que ser removido antes que alcance concentraciones inhibitorias. El problema que representa la fotorrespiración aún no está completamente resuelto en los cultivos FA (Pulz, 2001).

El oxígeno puede llegar a ser un problema en cultivos de algas a altas densidades por la limitación en la tasa de fotosíntesis y porque, aún cuando el CO_2 sea suministrado de forma óptima, la producción de oxígeno puede alcanzar fácilmente concentraciones sobre 40 mg/L, y con la radiación pueden desarrollarse radicales de oxígeno durante el intercambio de gases de la respiración y causar efectos tóxicos sobre las células debido a daño en las membranas (Pulz, 2001).

Tabla 1-3 Cultivos celulares FA crecidos a nivel de biorreactor.

Especie	Tipo de reactor [Volumen]	Modo de operación	CO ₂ en aire (%)	Irradiancia (μmol fotón m ⁻² s ⁻¹)	μ (d ⁻¹)	[X]	Referencia
<i>Chenopodium rubrum</i>	“airlift” [1,5 L]	Discontinuo	2	110	0,09	1,5 x 10 ⁶ células/mL	(Hüsemann, 1982)
<i>Chenopodium rubrum</i>	“airlift” 2 L	Continuo	2	140	0,16	1,1 x 10 ⁶ células/mL	(Hüsemann, 1983)
<i>Chenopodium rubrum</i>	“airlift” 20 L	Semi-continuo	3	420	0,22	2,9 g/L (PS)	(Fischer <i>et al.</i> , 1994)
<i>Chenopodium rubrum</i>	“airlift” 20 L	Discontinuo	1 5	104 420	0,11 0,22	1,6 g/L 2,5 g/L (PS)	(Fischer y Alfermann, 1995)
<i>Glycine max</i>	Tanque agitado 5 L	Discontinuo	5	300	0,18	6,0 g/L (PS)	(Treat <i>et al.</i> , 1990)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Tanque agitado [5 L]	Discontinuo	1	110	0,06	7,0 mg/L (PF)	(Yamada <i>et al.</i> , 1981)
<i>Spinacia oleracea</i>	Tanque agitado [1,7 L]	Continuo	1	120	0,14	DNR	(Dalton, 1980)

PF: peso fresco; PS: peso seco; [X]: concentración de biomasa final; μ: velocidad de crecimiento exponencial; DNR: datos no reportados

Las concentraciones de CO₂ se mantienen usualmente en márgenes muy estrechos. Mientras que la concentración de CO₂ del aire (0,035 %) es subóptima para el crecimiento de las plantas, la mayoría de las plantas tolerarían concentraciones solamente de 0,1%. Sin embargo, para muchas especies de microalgas se ha observado que toleran concentraciones hasta 12 % de CO₂ a una temperatura de 35°C, y los cultivos vegetales FA en biorreactor crecen a concentraciones entre 1 y 5 % de CO₂ (Pulz, 2001; Widholm, 1992).

La temperatura tiene mayor influencia en la respiración y la fotorrespiración que en la fotosíntesis. Cuando la fotosíntesis está limitada por el suministro de CO₂ o la luz, la influencia de la temperatura no es significativa. Con un incremento en la temperatura, la respiración se eleva significativamente, mientras que el flujo de CO₂ a través del ciclo de Calvin se incrementa sólo marginalmente; por tanto, la eficiencia neta de la fotosíntesis declina a altas temperaturas. Este efecto puede empeorar en cultivos en suspensión por la diferencia en la disminución de la solubilidad de CO₂ y O₂ a temperaturas elevadas (Pulz, 2001).

Un suministro suficiente de nutrientes para microalgas es una condición indispensable para una fotosíntesis óptima. Las deficiencias pueden causar perturbaciones en el metabolismo y producción desproporcionada de intermediarios de la fotosíntesis. La desviación del pH óptimo y el crecimiento en condiciones subóptimas en cuanto a las condiciones osmóticas o de salinidad del medio causan reacciones fisiológicas y problemas de productividad. Por tanto, estas condiciones fácilmente controlables deben ser mantenidas en relaciones óptimas en los fotobiorreactores. La fuente de carbono parece ser importante para algunos sistemas de producción de biomasa mixotróficos o heterotróficos. Las algas viven en su ambiente natural a densidades de 10³ células mL⁻¹ y distancias de más de 1 µm entre ellas. En cultivos de alta densidad de algas (*i.e.*, más de 10⁹ células/mL) las condiciones naturales no son adecuadas para lograr altas productividades (Pulz, 2001; Yen *et al.*, 2014).

En la literatura se encuentran avances en nuevos tipos de fotobiorreactores usados para el crecimiento de microorganismos fotosintéticos. Muchas configuraciones de fotobiorreactores han sido evaluadas experimentalmente y cada una tiene ventajas y

desventajas. El reactor tipo “airlift” y el reactor de columna burbujeada son sistemas adecuados para el crecimiento de microalgas, pero desafortunadamente su peor desventaja es la limitación de disponibilidad de luz (Grima, 199; Carlozzi, 2008; Yen *et al.*, 2014).

Una solución para superar las limitaciones debidas a la mala penetración de la luz en cultivos con altas densidades celulares, es emplear fibras ópticas. El fotobiorreactor tubular curvado es mejor que el tipo bucle tradicional para incrementar el rendimiento de biomasa. Los reactores en espiral son buenos para llevar a cabo la correcta exposición de las células a ciclos de luz-oscuridad gracias al radio de curvatura de la espiral y a la buena relación superficie/volumen (Carlozzi, 2008; Zittelli *et al.*, 2013; Wang, 2012).

El fotobiorreactor en dos planos produce mayor biomasa que el fotobiorreactor de un solo plano. Los paneles planos son otro grupo de fotobiorreactores. Ellos requieren aire comprimido, inyectado en el fondo del panel, para mezclar el cultivo y remover el oxígeno producido por el proceso fotosintético. Los paneles planos, junto con columnas anulares y los fotobiorreactores tipo “airlift”, permiten obtener una mezcla adecuada para que las microalgas crezcan, ya que son muy sensibles al estrés hidrodinámico. Muchos estudios también se han llevado a cabo sobre los efectos de la agitación del cultivo, tasa de flujo de aire, dimensiones de la burbuja y velocidad de entrada del aire al difusor (Carlozzi, 2008; Ugwu, 2008). Sin embargo, estas configuraciones de biorreactores son difíciles de utilizar en células vegetales FA debido a las estrictas condiciones de esterilidad que requieren para su crecimiento.

1.8 Aplicaciones de los cultivos FA

1.8.1 Metabolitos secundarios obtenidos a partir de cultivos FA

Muchas líneas celulares vegetales se han iniciado con el propósito de producir compuestos de alto valor agregado, utilizados principalmente en la industria farmacéutica y de alimentos. Muchos estudios comparan la producción de metabolitos secundarios en cultivos en suspensión H, FM y FA, como se muestra a continuación (Tabla 1-4). Las líneas celulares FA exhiben características que pueden hacerlas muy convenientes para la producción de metabolitos secundarios ya que crecen a altas densidades, tienen tiempos

de duplicación razonables y crecen en un ambiente que permite una fácil manipulación de factores que podrían ser usados para estimular el incremento de las velocidades biosintéticas de los productos deseados. Debido a su particular metabolismo fotosintético, los cultivos FA poseen un potencial único para la producción de metabolitos secundarios específicos, ya que el metabolismo primario hace disponible los precursores necesarios para la producción de los metabolitos secundarios, como los alcaloides lupanina y trigonelina (Wink y Hartman, 1980; Ikemeyer y Barz, 1989), lipoquinonas (Igbavboa *et al.*, 1985) y compuestos volátiles aromáticos (Reil y Berger, 1996), entre otros.

Tabla 1-4 Comparación de la producción de metabolitos secundarios a partir de cultivos en suspensión fotoautotróficos (FA), fotomixotróficos (FM) y heterotróficos (H).

Especie	Metabolito secundario	Concentración del metabolito ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)				Referencia
		Planta	Cultivo FA	Cultivo FM	Cultivo H	
<i>Cicer arietinum</i>	Pinitol	19400	970	0	0	(Orthen <i>et al.</i> , 2000)
<i>Digitalis purpurea</i>	Digitoxina	40	DNR	0,18	0,21	(Hagimori <i>et al.</i> , 1984)
<i>Lupinus polyphyllus</i>	Lupanina	8	DNR	11	DNR	(Wink y Hartmann, 1980)
<i>Morinda lucida</i>	Vitamina K1	34,1	9,7	4,5	0	(Igbavboa <i>et al.</i> , 1985)
	α -tocoferol	235,0	268,9	12,9	0	
	Plastoquinona	1288,0	568,3	160,7	0	
	Ubiquinona	34,3	40,7	3,2	0	
<i>Nicotiana tabacum</i>	Trigonelina	DNR	72	0	0	(Ikemeyer y Barz, 1989)
<i>Peganum harmala</i>	Alcaloides Harman	9000	0	55	767	(Barz <i>et al.</i> , 1980)
	Lípidos totales	DNR	101000	56000	31000	
<i>Petroselinum crispum</i>	Graveolina	DNR	DNR	133	DNR	(Reil y Berger, 1996)

PS: peso seca; DNR: datos no reportados

1.8.2 Cultivos FA como sistemas alternativos a las cianobacterias para la producción de biocombustibles

La inminente necesidad de buscar fuentes energéticas alternativas a los combustibles fósiles ha impulsado el desarrollo de nuevas tecnologías de producción energética, que incluyen las relacionadas con la generación de bioetanol, butanol, y biodiesel, entre otras. Los avances en la ingeniería metabólica proporcionan herramientas poderosas para utilizar microorganismos fotosintéticos en la producción de diversos productos de aplicación industrial. Las células en suspensión FA de plantas superiores al igual que las microalgas (cianobacterias) capturan CO₂ mediante el ciclo de Calvin y lo pueden convertir en una gran diversidad de compuestos orgánicos. Estos organismos fotosintéticos con requerimientos nutricionales sencillos (agua, luz, dióxido de carbono y sales), pueden producir durante su crecimiento cantidades considerables de carbohidratos, lípidos y proteínas en cortos periodos (John *et al.*, 2011). Además los organismos fotosintéticos no ocupan tierra cultivable y pueden ser una opción desde el punto de vista de sostenibilidad ambiental y de los recursos naturales.

Recientes avances en la manipulación genética y la caracterización de las rutas metabólicas de las bacterias fotosintéticas abren la puerta a la ingeniería metabólica (Desai y Atsumi, 2013). En muchos estudios, los genes heterólogos se expresan en estos microorganismos para mejorar la productividad o para producir un compuesto de interés. Después de la introducción de estos genes en la cepa hospedera, la producción bioquímica objetivo se optimiza mediante la aplicación de métodos de ingeniería metabólica, tales como la eliminación de las rutas metabólicas competitivas o el mejoramiento de la actividad enzimática (Desai y Atsumi, 2013; Ducat y Silver, 2012), lo cual se traduciría en un incremento de carbono en la célula y por tanto en la posibilidad de obtener una productividad mejorada. Se ha encontrado que la mayor fijación de carbono ocurre por el incremento de la expresión de los carboxisomas en los cloroplastos (Savage *et al.*, 2010) o la expresión heteróloga de los genes de Rubisco (*rbcLS*) (Atsumi *et al.*, 2009). En microalgas, el esfuerzo para incrementar la fijación de dióxido de carbono se ha llevado a cabo por la creación de un híbrido de la enzima Rubisco que contiene tanto unidades vegetales como de microalgas (Genkov *et al.*, 2010).

El uso de las cianobacterias para la producción de biodiesel y bioetanol comienza a ser más atractivo gracias a las ventajas de producir biomasa sobre sustratos de empleo tradicional (inclusive los materiales lignocelulósicos) y que incluyen un rápido crecimiento, tiempos cortos de cosecha y capacidad de crecer en sustratos sólidos y líquidos, entre otros (Harun *et al.*, 2010). Además, la producción de biocombustibles en los organismos fotosintéticos, los cuales no producen estas sustancias naturalmente en altas cantidades, se ha vuelto más factible con la ayuda de la ingeniería metabólica y la biología sintética. Recientemente se reportaron resultados relacionados con la transformación de células procariotas para la conversión de CO₂ en biocombustibles líquidos, que incluyen etanol, butanol, ácidos grasos, isoprenoides, alcoholes grasos e hidrocarburos (Dexter y Fu, 2009; Lindberg *et al.*, 2010; Lan y Liao 2011; Liu *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2011).

El etanol fue producido en concentraciones de 550 mg/L mediante la introducción de una piruvato descarboxilasa (PDC) y una alcohol deshidrogenasa (ADH) en la bacteria fotosintética, *Synechocystis sp.* PCC 6803 (Dexter y Fu, 2009). Otra opción para la obtención de etanol a partir de los microorganismos FA consiste en el cultivo de las células, la recolección de la biomasa producida y el pretratamiento de la misma mediante su rompimiento mecánico o hidrólisis química o enzimática que libere las largas moléculas de carbohidratos y dejen disponibles los azúcares fermentables para su posterior conversión a etanol u otros productos de interés industrial.

Los ácidos grasos también se han utilizado como precursores para la producción de biocombustibles. La producción de biodiesel implica el crecimiento de bacterias y la aplicación de un tratamiento para aumentar principalmente la producción de triacilglicerol (normalmente a través del empleo de un tratamiento de estrés por limitación del suministro de nitrógeno, alta luminosidad o salinidad) y una transesterificación (Chisti, 2007). Se ha demostrado que la sobreexpresión de una acil-ACP sintetasa (*slr1609*) en *Synechocystis sp.* PCC 6803, permitió aumentar la activación de ácidos grasos y mejorar el rendimiento de la producción de alcohol graso (Gao *et al.*, 2012). *Synechocystis sp.* PCC 6803 se modificó de tal manera que producía y secretaba ácidos grasos hacia fuera de la célula (Liu *et al.*, 2011).

Las algas eucariotas también se utilizan para la producción de ácidos grasos, ya que pueden acumular lípidos hasta 70% de su biomasa seca (Sivakumar *et al.*, 2012); sin

embargo, existen limitaciones en el uso de tales algas, como la disponibilidad de herramientas genéticas debido a la complejidad del sistema eucariota (Desai y Atsumi, 2013). Por otro lado, se han identificado las condiciones de estrés y enzimas clave para la síntesis de ácidos grasos en el alga verde *Haematococcus pluvialis* (Lei *et al.*, 2012), y también se han hecho estudios para optimizar las condiciones de luz para la producción de ácidos grasos en *Nannochloropsis* (Anandarajah *et al.*, 2012).

Una de las grandes ventajas de las cianobacterias es que pueden ser modificadas para lograr el rompimiento celular y liberar los biocombustibles en condiciones apropiadas (Hallenbeck, 2012). Adicionalmente a los biocombustibles, las bacterias fotosintéticas pueden ser utilizadas para la producción de hidrógeno, bioplásticos y antioxidantes. Estos químicos de alto valor agregado se han obtenido a través de ingeniería metabólica, expresión de genes heterólogos y la manipulación de las condiciones de crecimiento microbiano.

Se ha alcanzado tal progreso en este campo que ahora es posible realizar manipulaciones genéticas y mejorar la productividad de los compuestos de interés. Sin embargo, estos resultados aún no han sido aplicados a escala de producción industrial ya que se requieren grandes cantidades de materias primas a bajo costo, producción continua y altos volúmenes de insumos. Estas nuevas rutas de la producción autotrófica de biocombustibles son preliminares, y se necesitan muchos trabajos futuros para mejorar los rendimientos de los productos, y la optimización de las condiciones de operación y diseño de los biorreactores, lo que posibilitará que en un futuro próximo se pueda alcanzar la meta en la producción de biocombustibles y químicos a gran escala y con aplicaciones reales (Desai y Atsumi, 2013).

Las células vegetales FA en suspensión comparten muchas ventajas de las cianobacterias, como su posibilidad de ser transformadas genéticamente, aunque son células mucho más complejas. Sin embargo, muchos transgenes se han integrado y expresado de forma estable a través del genoma del cloroplasto de *Nicotiana tabacum* para conferir características agronómicas importantes que incluyen resistencia a herbicidas, insectos, enfermedades, tolerancia a sequía y sal, y fitorremediación. Por otra parte, muchos antígenos de vacunas y proteínas biofarmacéuticas se han expresado a niveles elevados a través del genoma del cloroplasto y su funcionalidad se ha evaluado en cultivos de células *in vitro* y modelos animales. Esta tecnología se ha extendido a otras

especies vegetales para la introducción de características agronómicas y producción de antígenos de vacunas de bajo costo y proteínas terapéuticas. Además la tecnología del cloroplasto es también una buena plataforma para la producción de productos industriales. Sin embargo, al momento no se ha explorado la posibilidad de considerar a las células FA como una alternativa al empleo de las cianobacterias para la producción de biocombustibles.

Recientemente, la tecnología de la manipulación de los cloroplastos se ha extendido para la producción de enzimas utilizadas en la producción de etanol (Singh y Daniell, 2010). Un ejemplo de la tecnología del cloroplasto para la producción de biocombustibles tiene que ver con el gen *xynA* que fue transformado en cloroplastos de *Nicotiana tabacum* y dió como resultado la acumulación de xilanasa termoestable (Leelavathi *et al.*, 2003). Esta tecnología también se ha extendido a los sistemas de expresión para las diferentes enzimas responsables de la conversión de biomasa lignocelulósica en glucosa durante la producción de etanol por fermentación (Verma *et al.*, 2010). Los microorganismos capaces de degradar celulosa secretan un sistema complejo de enzimas extracelulares, celulasas y xilanasas, que actúan en forma conjunta en la degradación de celulosa y hemicelulosa. Dos celulasas termoestables de *Thermobifida fusca*, Cel6A y Cel6B, se han expresado en cloroplastos de tabaco y los ensayos enzimáticos han demostrado que ambos son activos en la hidrólisis de la celulosa cristalina (Yu *et al.*, 2007; Gray *et al.*, 2009).

A pesar de los muchos logros en la transformación de cloroplastos, la aplicación extensiva a diferentes especies vegetales se ha visto obstaculizada por la falta de protocolos de transformación de plástidos para cultivos de interés agrícola. Algunos de los principales obstáculos incluyen el desarrollo de protocolos ineficientes para el cultivo *in vitro* de tejidos y de regeneración, falta de marcadores de selección adecuados y bajos niveles de expresión transgénica en plástidos no verdes. Los tejidos foliares son generalmente preferidos en dicotiledóneas para la transformación de plástidos, porque se producen rápidamente en grandes cantidades y permiten múltiples rondas sucesivas de selección y regeneración para lograr plantas homoplásmicas.

Desafortunadamente, este sistema es difícil para los cultivos de cereales en los que se utiliza tejido no verde como explante y no existen protocolos eficientes disponibles para la producción de plantas transplastómicas estables para la mayoría de las especies de cultivos de cereales (Singh y Daniell, 2010). Adicionalmente, la poca disponibilidad de

secuencias de genomas es otro de los obstáculos para extender esta tecnología a la mayoría de cultivos. Por tanto, es urgente secuenciar los genomas de cloroplastos para facilitar la transformación de especies vegetales, construir vectores de cloroplasto específicos para cada especie y así desarrollar nuevos sistemas de selección para la transformación de plástidos de monocotiledóneas (Singh y Daniell, 2010).

Se requieren estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares que determinen las propiedades de la biomasa producida por las líneas celulares FA a escala de biorreactor y, con base en esta información, establecer la posibilidad de emplear esta biomasa para la generación de biodiesel o bioetanol. Existe solamente una investigación relacionada con el cultivo a nivel de biorreactor de células fotoautotróficas de *Glycine max* (Treat *et al.*, 1990), en la cual se analizó el crecimiento celular y las características de la biomasa producida, que incluyeron ensayos de hidrólisis enzimática. La composición de la biomasa obtenida fotoautotróficamente fue 7,8 % lignina, 20,7 % celulosa, 23 % hemicelulosa, 5,5 % almidón, 14,5 % proteína y 6,5 % ácidos nucleicos; aunque las células obtenidas están compuestas principalmente por hexosas y pentosas (44 %), este material resultó ser recalcitrante a la digestión enzimática, al producir solamente 12,5 % de azúcares reductores. Al hacer pretratamiento alcalino con 1 % y 5 % de KOH, y posteriormente hidrólisis ácida con 3 % de H₂SO₄, los azúcares reductores resultantes fueron 15,4 y 20,7 %, respectivamente (Treat *et al.*, 1990). Por otro lado, se sugiere la manipulación genética para desarrollar líneas celulares altamente productivas con mayores niveles de biomasa hidrolizable.

La producción de biomasa FA y metabolitos de interés, que incluyen los biocombustibles, en ambientes controlados a nivel de biorreactor, actualmente es muy costosa. Los principales costos se derivan de las operaciones de extracción y separación. Las estrategias que faciliten estas operaciones deben ser perfeccionadas a fin de que las células liberen las moléculas de biocombustible al medio, ya sea a través de lisis celular o por secreción.

1.9 Conclusiones y perspectivas

Los cultivos en suspensión FA son sistemas eficientes tanto para áreas de investigación básica como aplicada en el área de fisiología, bioquímica celular, ingeniería genética y biotecnología. Estos cultivos se han utilizado tradicionalmente como sistemas para el análisis controlado de procesos fisiológicos, bioquímicos, citológicos y genéticos de plantas superiores a nivel celular. Los cultivos FA tienen las ventajas de los cultivos en suspensión H, en cuanto a que son fáciles de transferir, hay contacto directo entre las células y el medio, están constituidos por poblaciones celulares uniformes que crecen en condiciones controladas, libres de microorganismos y son capaces de ser multiplicadas en diferentes configuraciones de biorreactores.

Hasta la fecha, no se ha valorado adecuadamente el potencial de los cultivos en suspensión FA para producir biomasa celulósica. Una tecnología alternativa para la producción continua de biomasa, con bajos niveles de lignina y altas concentraciones de celulosa, podría ser lograda mediante el escalamiento a nivel de biorreactor de cultivos en suspensión fotosintéticos de plantas superiores. Entre las ventajas de estos sistemas de producción de biomasa sobre los tecnologías disponibles actualmente destacan: (a) Establecimiento de líneas celulares con altos niveles de celulosa y bajos niveles de lignina; (b) Biomasa con características homogéneas que permitirían la optimización de procesos como los pretratamientos y la hidrólisis; (c) La biomasa producida por hectárea podría ser mayor a la generada en los cultivos agrícolas; (d) Los biorreactores utilizarían la luz solar y el CO₂ generado por plantas industriales, lo cual representaría una alternativa para mitigar el calentamiento global y la escasez de agua en muchas zonas del mundo; (e) La producción de biomasa sería continua y no dependería de las condiciones ambientales.

No se ha reportado la manipulación genética de cultivos FA. La transformación de cloroplastos tiene varias ventajas sobre la transformación nuclear y debe ser alcanzada para cultivos FA en un futuro cercano. Los cultivos FA podrían ser muy útiles para elucidar rutas metabólicas que se presentan exclusivamente en los cloroplastos. Estas rutas metabólicas no ocurren en humanos ni en animales, lo que hace convenientes a los cultivos FA para la producción de antibióticos novedosos y vacunas. Por otro lado, el genoma de los cloroplastos presenta una oportunidad única para el campo de la biología

sintética. La mayoría de los genomas de cloroplastos oscilan entre 150 y 205 kb, y muchos genomas se han secuenciado y están disponibles públicamente.

La transformación del genoma de los cloroplastos es una tecnología relativamente bien establecida en plantas y algas, por lo que estos genomas naturalmente minimizados y manipulables son de gran interés para la ingeniería metabólica de alimentos, biocombustibles y un sinnúmero de productos biológicos, por lo cual son un objetivo idealmente conveniente para la biología sintética. Como puerta entre los mundos inorgánico y orgánico, el cloroplasto es un objetivo relevante en la ingeniería metabólica. Un aparato fotosintético mejorado puede conducir a aumentos en el rendimiento de los cultivos para alimentar a la población mundial en expansión, mediante el desarrollo de una industria química verde sostenible que posibilite su consideración como una alternativa a los biocombustibles de algas o plantas comercialmente viables.

2 DESARROLLO DE UN SISTEMA DE REGENERACIÓN VEGETAL *in vitro* PARA CINCO VARIEDADES ÉLITE DE *Lolium* *multiflorum* Lam

Se desarrolló un sistema de regeneración eficiente y reproducible para variedades comerciales de *Lolium multiflorum* Lam, denominadas 'Magnun', 'Bargala', 'Tetragold', 'Hercules' y 'Maximus'. Se estudió la eficiencia de formación de callo morfogénico y la regeneración usando como explantes ápices de vástago que fueron cultivados en 6 formulaciones de medio Murashige y Skoog (MS), suplementadas con diferentes concentraciones de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D; 1 a 2 mg L⁻¹), benzilaminopurina (BA; 2 a 4 mg L⁻¹) y adenina (40 a 80 mg L⁻¹). Los mayores porcentajes de formación de callo morfogénico (37% en 'Tetragold' y 'Hércules' vs. 58% y 65% en las variedades 'Maximus' y 'Magnun', respectivamente se lograron en el medio 2D4B80A, con 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, 4 mg L⁻¹ de BA y 80 mg L⁻¹ de adenina. El mayor número de plántulas regeneradas por g peso fresco (PF) de callo morfogénico fue de 48,71 para la variedad 'Magnun' en el medio 2D4BA, con 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, 4 mg L⁻¹ de BA y 40 mg L⁻¹ de adenina. Las plantas regeneradas crecieron en suelo bajo condiciones de invernadero alcanzaron la madurez y posteriormente produjeron semillas.

Palabras clave: *Lolium multiflorum*, cultivo *in vitro*, embriogénesis, regeneración.

2.1 Introducción

El “ryegrass” italiano o “ryegrass” anual (*Lolium multiflorum* Lam) es uno de los pastos más importantes en los climas templados y es ampliamente usado como forraje debido a sus características deseables como alta producción, rápido establecimiento y crecimiento, precocidad extraordinaria, y alto valor nutricional. El mejoramiento genético de *Lolium multiflorum* tiene un alto potencial por el interés en desarrollar nuevas variedades con resistencia a pestes y enfermedades, sequía y tolerancia a bajas temperaturas, incremento de la digestibilidad, mayor producción de biomasa y mejor contenido de nutrientes (Ran *et al.* 2007).

Se sabe que los pastos están entre las especies más recalcitrantes al cultivo de tejidos *in vitro* y por lo tanto para transformación genética (Ahloowalia, 1989). Consecuentemente, existen solo unos pocos reportes de variedades comerciales de *Lolium multiflorum* con capacidad de regeneración *in vitro* consistente y eficiente, y son especialmente variedades japonesas, surcoreanas y europeas. Los reportes de variedades comerciales de *Lolium multiflorum* están basados principalmente en cultivos *in vitro* organogénicos o embriogénicos (Ran, 2007). Los callos embriogénicos para *Lolium multiflorum* han sido inducidos a partir de cultivos meristemáticos tales como semillas maduras (Chenna-Reddy *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2009), ápices de vástago (Takahashi *et al.*, 2004), óvulos (Kumlehn y Nitzsche, 1996) y embriones inmaduros (Dale, 1980). De otro lado, las suspensiones celulares (Pavlova y Kordyum, 1996) y protoplastos (Dalton, 1988) también han sido usados como sistemas de regeneración.

Los principales problemas de los cultivos de tejidos vegetales en pastos, han sido la baja regeneración, la pérdida de capacidad de regeneración con el tiempo y la obtención de plantas albinas. Estas restringen mucho la aplicación del cultivo *in vitro* en *Lolium multiflorum*. Además, la existencia de una amplia diversidad genética presente en esta especie que resulta en una gran variedad de respuestas al cultivo de tejidos, dificulta aún más el establecimiento de protocolos eficientes y reproducibles para el cultivo *in vitro* de esta especie.

El desarrollo de protocolos eficientes y reproducibles en cultivo de tejidos *in vitro* es un prerequisite para aplicar herramientas biotecnológicas modernas tendientes a la producción de nuevas variedades y mejora genética de cultivos, tales como recuperación de variantes somaclonales, producción de plantas transgénicas y libres de patógenos y

propagación de germoplasma deseable, entre otros (Aguado-Santacruz *et al.*, 2011). Se han obtenido plantas transgénicas de *Lolium multiflorum* mediante el bombardeo con microproyectiles (Ye *et al.*, 1997, Dalton *et al.*, 1999) y el empleo de *Agrobacterium* (Bettany *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2010). Sin embargo, la optimización de condiciones de cultivo que requiere cada genotipo de esta especie en cuanto a tipo de explante, medio de cultivo y suplementos es necesaria para lograr una transformación genética exitosa de *Lolium multiflorum*. El objetivo de este capítulo fue probar diferentes formulaciones de reguladores de crecimiento para la inducción de respuestas morfogénicas en explantes de ápices de vástago de cinco genotipos de *Lolium multiflorum* LAM y desarrollar un sistema de cultivo de tejidos regenerable en el tiempo para su manejo biotecnológico.

En este capítulo de la tesis se muestra la inducción de callo morfogénico y la capacidad de regeneración de plantas de cinco variedades élite de *Lolium multiflorum* Lam. Se utilizaron como explantes ápices de vástago de 3-5 días de edad, que se sembraron en 6 formulaciones diferentes de medio, en condiciones ambientales de luz y oscuridad. Se midieron rutinariamente las eficiencias de inducción de callos primarios y posteriormente las de generación de callos morfogénicos. Luego los callos morfogénicos fueron llevados a medios de regeneración donde se obtuvieron brotes y se midió el número de plantúlas obtenidas por g de callo morfogénico. Después que las plántulas regeneradas *in vitro* alcanzaron el estado de desarrollo esperado fueron aclimatadas y transferidas a campo. Hasta donde se sabe, ninguna de las variedades utilizadas en este estudio ha sido previamente considerada para el análisis de la capacidad de regeneración *in vitro* de plantas.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Material vegetal

El germoplasma de 5 variedades élite de *Lolium multiflorum* Lam, denominadas 'Magnun', 'Bargala', 'Tetragold', 'Hercules' y 'Maximus', fue utilizado para los experimentos de cultivo de tejidos. Se utilizaron ápices de vástago como material de inicio para evaluar la respuesta morfogénica de estas cinco variedades de *Lolium multiflorum* al cultivo *in vitro*. Las semillas de las cinco variedades de *Lolium multiflorum* fueron tratadas con 50% (v/v) de ácido sulfúrico por 30 minutos para remover la lema y posteriormente fueron cuidadosamente enjuagadas con agua destilada. Subsecuentemente, las semillas fueron esterilizadas

superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio (5,6% v/v) por 20 minutos y enjuagadas cinco veces con agua destilada estéril. Las semillas fueron germinadas *in vitro*, colocándolas en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) y solidificado con 2,5 g L⁻¹ de Gelrite. La composición del medio MS se presenta en el Anexo A. Los ápices de vástago fueron aislados a partir de las plántulas de 3 a 5 días de germinación. Para aislar estos explantes, las semillas fueron germinadas en la oscuridad para promover la elongación del internodo subcoleoptilar y entonces se disectaron usando un estereoscopio.

2.2.2 Medios probados para la inducción de respuestas morfogénicas en *Lolium multiflorum*

Con el objetivo de inducir callos, los segmentos de 1 cm de largo que incluían el nodo coleoptilar fueron sembrados en cajas de Petri que contenían 30 mL de los diferentes medios de inducción. Se usaron cinco cajas de Petri (réplicas) con 10 ápices de vástago en cada una para cada variedad de *Lolium multiflorum* y condición de luz u oscuridad. Las seis formulaciones de medio contenían las vitaminas y las sales basales del medio MS, 1 a 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, 40 a 80 mg L⁻¹ de adenina, 2 a 4 mg L⁻¹ de BA, 500 mg L⁻¹ de hidrolizado de caseína, 3% de sacarosa y fueron solidificados con 2,5 g L⁻¹ de Gelrite (Tabla 2-1).

Las concentraciones de reguladores de crecimiento escogidas para el experimento fueron sugeridas por un experto en el tema de cultivo de tejidos vegetales en gramíneas. La combinación de auxinas y citocininas utilizadas en estos experimentos, fueron similares a las que se usaron para desarrollar la única línea celular clorofílica en Poaceae reportada hasta la fecha, la cual corresponde al pasto *Bouteloua gracilis* (Aguado Santacruz *et al.*, 2001). Los explantes fueron cultivados bajo dos condiciones diferentes, oscuridad y luz fluorescente continua (40 μmol de fotón m⁻² s⁻¹, a 25 $\pm$ 1°C) para evaluar el efecto de la luz en la inducción de callos morfogénicos. El medio fue ajustado a un pH de 5,8 y entonces esterilizado a 121°C por 15 minutos.

La eficiencia de inducción de callo primario fue medida como porcentaje de ápices de vástago que produjeron callo. Los porcentajes de inducción de callo fueron cuantificados 30 días después de sembrar los explantes en los diferentes medios. El medio MS, la sacarosa y el hidrolizado de caseína fueron comprados a Phyto Technology (Shawnee Mission, KS). Los reguladores de crecimiento y el Gelrite fueron adquiridos a través de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Tabla 2-1 Medios utilizados para inducción de respuestas morfogénicas a partir de ápices de vástago de cinco variedades de *Lolium multiflorum*.

Número	Medio	Sales basales	2,4-D mg L ⁻¹	BA mg L ⁻¹	Adenina mg L ⁻¹
1	MPC	MS	1	2	40
2	MPC80	MS	1	2	80
3	D3BA	MS	1	3	40
4	D4B80A	MS	1	4	80
5	2D4BA	MS	2	4	40
6	2D4B80A	MS	2	4	80

MS: Medio Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962); **2,4-D:** Ácido diclorofenoxiacético; **BA:** Benzilaminopurina.

2.2.3 Propagación y mantenimiento de callos y regeneración de plantas

Las líneas individuales de callos se propagaron disectando y subcultivando las masas iniciales de callos formados sobre el mismo medio de inducción durante tres subcultivos (30 días para cada uno) en la oscuridad o en presencia de luz ($40 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y humedad relativa de 13%. Se observó formación de callo morfogénico, multiplicación y necrosis de los callos en cada subcultivo. La eficiencia de formación de callo morfogénico fue medida como porcentaje de ápices de vástago que produjeron callo morfogénico. Los porcentajes de inducción de callo fueron cuantificados 90 días después de sembrar los callos primarios en los diferentes medios.

Para determinar la capacidad de las líneas celulares individuales para regenerar plantas completas, parte de los callos multiplicados fueron transferidos a cajas de Petri que contenían MS o 1/2 MS y entonces fueron colocadas en un cuarto de crecimiento a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, humedad relativa de 13% y un fotoperiodo de 8 horas ($40 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Posteriormente, los brotes de 1 a 2 cm de altura fueron transferidos a cajas Magenta GA7 de 400 mL de capacidad, que contenían 50 mL de medio 1/2 MS suplementado con 0,5 a 1,0 mg L⁻¹ de ácido indolacético (AIA) y mantenidos en las condiciones ambientales ya mencionadas hasta que las plántulas alcanzaron alturas de 7 a 9 cm y desarrollaron de tres a cinco raíces con longitudes entre 2 y 4 cm.

2.2.4 Aclimatación y adaptación de las plantas regeneradas

Después que las plántulas regeneradas *in vitro* alcanzaron el estado de desarrollo proyectado, fueron removidas de las cajas de Magenta, y las raíces formadas se enjuagaron con agua corriente para eliminar el medio residual. Subsecuentemente, las plántulas fueron transferidas a macetas de medio litro que contenían una mezcla estéril de suelo arcilloso y arena (50: 50), cubiertas con bolsas de polietileno transparentes y colocadas en un cuarto de crecimiento a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 13% de humedad relativa y $40\text{ }\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. Después de 15 a 20 días de aclimatación en el cuarto de crecimiento y cuando las plántulas tenían 20 a 25 cm fueron transferidas a campo donde se les aplicaron dos dosis de 10 g cada una de fertilizante tNPK (17-17-17) cada 20 días.

2.2.5 Análisis estadístico

Se evaluaron las diferencias estadísticas entre los porcentajes de inducción de callo primario y de formación de callos morfogénicos obtenidos para los distintos medios y para las distintas variedades de *Lolium multiflorum* LAM evaluadas utilizando un análisis ANOVA factorial (abc/y). Las medias fueron analizadas usando la prueba de Fisher LSD con un nivel de confianza de 99 %. El software usado para los análisis estadísticos fue Stat-graphics centurion XVI. Los resultados del análisis estadístico ANOVA y las pruebas de múltiples rangos para determinar cuáles medias son significativamente diferentes se muestran en el Anexo B.

2.3 Resultados y Discusión

2.3.1 Respuestas *in vitro* de los ápices de vástago

Una semana después del cultivo en los diferentes medios (Tabla 2-1), en condiciones de oscuridad o luz fluorescente continua ($40\text{ }\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) a $25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, los ápices de vástago continuaron su desarrollo y aparecieron nuevas hojas (Figura 2-1). Por lo tanto, los ápices de vástago tuvieron que ser rediseccionados para eliminar esas nuevas hojas y se volvieron a sembrar en el mismo medio de inducción. Un mes después, el callo empezó a formarse en la mayoría de los ápices de vástago. En la Tabla 2-2 se presentan los resultados de la inducción de callo primario. La eficiencia de inducción de callo primario osciló entre 40 y 94 % después de 4 semanas de cultivo. El callo primario fue separado y

transferido al medio para subcultivo. El callo morfogénico fue obtenido después de tres subcultivos (Figura 2-2).



Figura 2-1 Ápices de vástago de la variedad 'Magnun'.

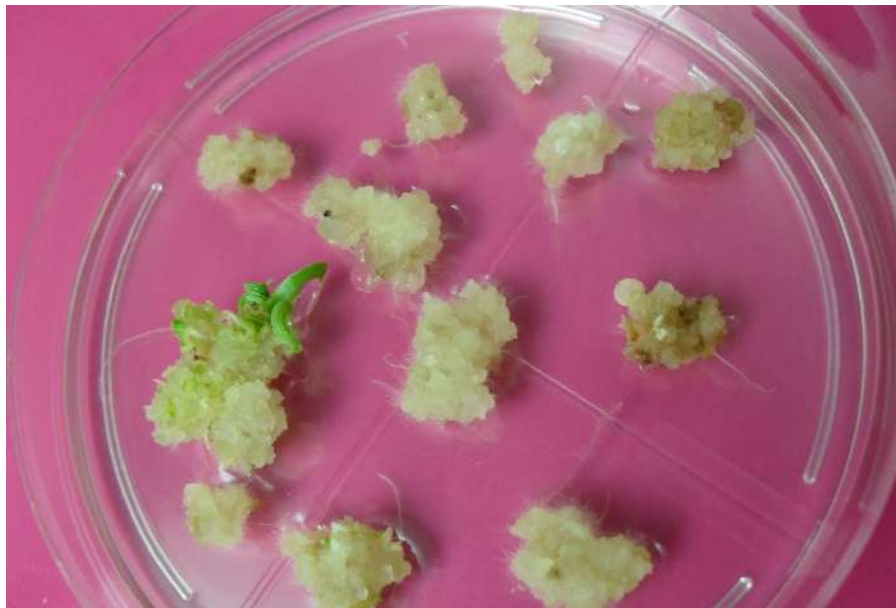


Figura 2-2 Propagación de callos friables y altamente morfogénicos derivados de ápices de vástago cultivados sobre medio 2D4BA.

Tabla 2-2 Eficiencia de inducción de callo primario (%) a partir de ápices de vástago de cinco variedades de *Lolium multiflorum*.

Luz Medio	Variedad				
	'Magnun'	'Bargala'	'Tetragold'	'Hercules'	'Maximus'
MPC	56 ± 2,8	88 ± 13,0	80 ± 12,2	58 ± 13,0	76 ± 8,9
MPC80	54 ± 5,5	60 ± 3,8	58 ± 2,7	52 ± 8,4	88 ± 13,0
D3BA	64 ± 3,6	72 ± 5,9	62 ± 13,0	60 ± 8,7	88 ± 10,9
D4B80A	56 ± 5,5	88 ± 17,9	72 ± 14,8	66 ± 13,4	78 ± 2,7
2D4BA	70 ± 7,1	52 ± 16,4	46 ± 5,5	60 ± 12,2	94 ± 8,9
2D4B80A	66 ± 15,2	70 ± 2,4	80 ± 2,0	68 ± 13,0	88 ± 8,4
Oscuridad Medio	Variedad				
	'Magnun'	'Bargala'	'Tetragold'	'Hercules'	'Maximus'
MPC	70 ± 2,1	82 ± 10,9	66 ± 11,4	82 ± 14,8	54 ± 9,5
MPC80	56 ± 2,7	74 ± 11,4	74 ± 8,9	78 ± 13,0	40 ± 14,1
D3BA	74 ± 8,2	82 ± 8,4	76 ± 16,7	78 ± 4,5	46 ± 18,2
D4B80A	58 ± 10,9	70 ± 2,2	68 ± 8,4	74 ± 11,4	64 ± 8,9
2D4BA	68 ± 16,4	86 ± 5,5	76 ± 8,9	68 ± 10,9	62 ± 10,9
2D4B80A	76 ± 5,5	64 ± 31,3	78 ± 8,4	68 ± 17,9	62 ± 10,4

Al realizarse el análisis estadístico ANOVA no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,01$) en términos de eficiencia de inducción de callo primario, en condiciones de luz u oscuridad, variedades y medio de cultivo usado (Tabla B-1). Sin embargo, se observó que los porcentajes de inducción de callo primario son relativamente altos para todas las variedades y concentraciones de reguladores de crecimiento probadas en el medio.

2.3.2 Competencia regenerativa de los callos inducidos

Después de obtener el callo primario probando diferentes genotipos, condiciones de luz y oscuridad y formulaciones de medio se estudió la eficiencia de formación de callo morfogénico (Tabla 2-3). Durante los experimentos de formación de callo, se obtuvieron diferentes morfologías de callos. Algunas de estas estructuras fueron duras, compactas, nodulares y amarillentas, así como suaves, acuosas, sueltas, friables y entre color crema

y translúcidas. Cuando se transfirió a la luz, el callo morfogénico se tornó verde, exhibiendo un mejor crecimiento y al realizar el subcultivo, en el mismo medio cada 30 d, en algunos callos se inició el proceso de regeneración. Aunque la mayoría de los ápices de vástago fueron capaces de producir callo primario, una gran parte de este material no fue estable, generó raíces y no mostró una capacidad completa para la regeneración de plantas, la apariencia de este callo no morfogénico fue predominantemente suave y esponjoso. No hubo diferencias significativas en la inducción de callo morfogénico a partir de las condiciones de luz u oscuridad. Sin embargo, si hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre las variedades probadas y los medios utilizados (Tabla B-2).

Tabla 2-3 Eficiencia de formación de callo morfogénico (%) a partir de ápices de vástago para cinco variedades de *Lolium multiflorum*.

Medio	Variedad				
	'Magnun'	'Bargala'	'Tetragold'	'Hercules'	'Maximus'
MPC	28 ± 10,33 ^a	22 ± 11,35 ^b	29 ± 8,76 ^a	11 ± 13,70 ^a	26 ± 13,50 ^{ab}
MPC80	41 ± 8,70 ^{bc}	6 ± 6,99 ^a	34 ± 8,43 ^a	10 ± 11,55 ^a	28 ± 17,51 ^{ab}
D3BA	32 ± 13,17 ^{ab}	30 ± 12,47 ^b	36 ± 17,76 ^a	35 ± 12,69 ^b	20 ± 18,26 ^a
D4B80A	32 ± 4,22 ^{ab}	19 ± 11,01 ^{ab}	34 ± 5,16 ^a	38 ± 6,32 ^b	37 ± 12,52 ^b
2D4BA	49 ± 7,38 ^c	6 ± 12,65 ^a	33 ± 13,37 ^a	35 ± 12,69 ^b	55 ± 13,54 ^c
2D4B80A	65 ± 15,09 ^d	7 ± 12,65 ^a	37 ± 10,59 ^a	37 ± 4,83 ^b	58 ± 19,89 ^c

Nota: Las medias seguidas por distintas letras son significativamente diferentes ($P \leq 0,01$) entre formulaciones de medio. Los experimentos fueron llevados a cabo cinco veces.

La variedad 'Hercules' tuvo una media de formación de callo morfogénico de 27,7%, sin diferencias significativas con la variedad 'Tetragold' que presentó una media de 33,8%. Las variedades que presentaron las mayores medias fueron Tetragold' (33,83 %), 'Maximus' (37,3%) y 'Magnun' (41,2%), las cuales no presentaron diferencias significativas entre ellas en cuanto al porcentaje de formación de callo morfogénico. Por su parte, la variedad que tuvo el menor porcentaje de formación de callo morfogénico fue la variedad Bargala (15,0%).

Para la variedad 'Magnum' se observa que hay diferencias estadísticamente significativas al cambiar la concentración de adenina de 40 a 80 mg L⁻¹, esto se puede ver al comparar el porcentaje de formación de callos morfogénicos entre los medios MPC y MPC80 y los medios 2D4BA y 2D4B80A. Cuando se varía la concentración de BA de 2 a 3 mg L⁻¹ y de 2 a 4 mg L⁻¹ no se observan diferencias significativas, por lo que a estas concentraciones de BA no hay mejora en la formación de callos morfogénicos, manteniendo los demás reguladores de crecimiento en concentraciones constantes (Tabla B-3). Al aumentar 2,4-D de 1 a 2 mg L⁻¹ si se encuentran diferencias significativas en la formación de callos morfogénicos. Para esta variedad los mayores porcentajes de formación de callo morfogénico se obtuvieron en los medios 2D4BA (49%) y 2D4B80A (65%) con diferencias significativas entre ellos ($p < 0.01$), indicando que las concentraciones de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D y 4 mg L⁻¹ de BA y el aumento de adenina de 40 a 80 mg L⁻¹ potencializó la generación de callo morfogénico.

En términos generales, la variedad 'Bargala' tuvo los menores porcentajes de formación de callos morfogénicos entre las 5 variedades analizadas con una media de 15%, y encontrándose diferencias estadísticamente significativas con las demás variedades ($p \leq 0,01$). Para esta variedad los menores valores de formación de callo morfogénico fueron para los medios de inducción MPC80, 2D4BA y 2D4B80A, 6, 6 y 7%, respectivamente, y los mayores valores, sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0,01$), se observaron en los medios MPC y D3BA, 22 y 30%, respectivamente, por lo que el mejor porcentaje de formación de callo morfogénico se obtiene con concentraciones de 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, 40 mg L⁻¹ de adenina y una concentración de BA entre 2 y 3 mg L⁻¹. Al comparar los medios MPC y MPC 80 se observa una disminución en la eficiencia de generación de callo morfogénico de 22 a 6 %. El aumento de la concentración de adenina de 40 a 80 mg L⁻¹ no mejora la eficiencia de formación de callo morfogénico para esta variedad, lo mismo sucede cuando se aumenta la concentración de 2,4-D de 1 a 2 mg L⁻¹ (Tabla B-4).

La respuesta de formación de callos morfogénicos en la variedad 'Tetragold' no presenta diferencias significativas entre los medios utilizados (Tabla B-5). El porcentaje de inducción de callos morfogénicos se encuentra en el intervalo de 29 a 37%. Estos valores de formación de callo morfogénico son relativamente buenos y las concentraciones de reguladores de crecimiento probadas, 2,4-D (1 a 2 mg L⁻¹), BA (1 a 4 mg L⁻¹) y adenina (40 a 80 mg L⁻¹) son adecuadas para la obtención de callo morfogénico en esta variedad.

En cuanto a la variedad 'Hercules' se observa que los menores valores de porcentaje de formación de callo morfogénico se presentaron en los medios MPC y MPC80 con 10 y 11%, respectivamente, y los mayores valores, sin diferencias significativas ($p > 0,01$), en los medios D3BA, 2D4BA, 2D4BA80A, D4B80A con porcentajes entre 35 y 38%. Esto demuestra que para este genotipo, la capacidad regenerativa aumenta principalmente cuando se incrementa el valor de BA en el medio de cultivo de 1 a 3 mg L⁻¹ y de 2 a 4 mg L⁻¹, a concentraciones de 2,4-D y adenina constantes (Tabla B-6). El aumento de las concentraciones de 2,4-D entre 1 y 2 mg L⁻¹ y de adenina entre 40 y 80 mg L⁻¹ no afectó significativamente la formación de callo morfogénico para esta variedad.

En cuanto a la variedad 'Maximus' se puede observar que con los medios 2D4BA (55%) y 2D4B80A (58%) se obtuvieron los mejores porcentajes de formación de callo morfogénico, sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0,01$). Entre los medios MPC y MPC80 no hubo diferencias significativas en la formación de callo morfogénico al aumentar la concentración de adenina de 40 a 80 mg L⁻¹, lo mismo sucedió al incrementar la concentración de este regulador de crecimiento en los medios 2D4BA y 2D4B80A (Tabla B-7). Solo se observaron diferencias significativas entre los medios D4B80A y 2D4B80A al aumentar la concentración de 2,4-D de 1 a 2 mg L⁻¹, manteniendo las concentraciones de BA y adenina constantes en 4 mg L⁻¹ y 80 mg L⁻¹, respectivamente.

Después de transferir las líneas germinales a medio que contiene MS o MS a la mitad y cultivarlas en condiciones de luz, el callo morfogénico regenerable se tornó verde, germinó y formó múltiples embriones (Figura 2-3). Subsecuentemente, los embriones somáticos desarrollaron brotes y formaron raíces. Aunque los brotes espontáneamente formaron raíces después de su transferencia a medio MS y medio MS a la mitad, la incorporación de AIA al medio fortaleció el desarrollo de las raíces (Figura 2-4).



Figura 2-3 Formación de brotes a partir del callo morfogénico cultivado en luz.



Figura 2-4 Fuerte enraizamiento de los brotes transferidos a medio MS con $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA. Los brotes fueron generados a partir de callos morfogénicos obtenidos de la variedad 'Magnun', cultivados en medio D3BA.

Además, como paso final dentro de la evaluación de la capacidad de los medios probados, para inducir respuestas morfogénicas en las variedades de *Lolium multiflorum*, el potencial de regeneración del callo morfogénico fue medido para algunas variedades y medios, en términos de plantas regeneradas por gramo de peso fresco (PF) de callo (Tabla 2-4).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre las variedades probadas y entre los medios utilizados en cuanto a la regeneración de plantas (Tabla B-8). Este análisis mostró que el número de plantas recuperadas por gramo de callo fresco varió entre 0 y 48,71. Para la variedad 'Magnum' el mayor número de plantas obtenido fue en el medio 2D4BA (48,71), el cual contenía MS, 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, 4 mg L⁻¹ de BA y 40 mg L⁻¹ de adenina. Para la variedad Bargala el mayor número de plantas regeneradas se alcanzó en el medio MPC (17,42%) y para la variedad Tetragold el mayor valor se obtuvo en el medio 2D4BA (5,80%).

Tabla 2-4 Regeneración de plantas *in vitro* (plantas por g de PF de callo) a partir de callo inducido sobre diferentes formulaciones de medio.

Medio	'Magnum'	'Bargala'	'Tetragold'
MPC	20,07±4,03 ^b	17,42±1,07 ^c	DNR
D3BA	0,00±0,00 ^a	9,68 ±0,30 ^b	DNR
2D4BA	48,71±2,99 ^c	0,00±0,00 ^a	5,80±2,33

Nota: Las medias seguidas por distintas letras son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) entre formulaciones de medio. Los experimentos fueron llevados a cabo al menos cinco veces.
DNR: datos no reportados

Después de un periodo de aclimatación de 15 días en el cuarto de crecimiento, las plantas fueron transferidas a un invernadero donde terminaron de consolidar su proceso de adaptación (Figura 2-5). Subsecuentemente, las plantas de *Lolium multiflorum* de 20 a 25 cm en altura fueron removidas de las macetas, plantadas en campo y fertilizadas químicamente dos veces cada 20 días. Todas las plantas transferidas a campo fueron establecidas exitosamente, se desarrollaron hasta madurez y dieron semillas (Figura 2-6).



Figura 2-5 Endurecimiento de plantas regeneradas de variedades de *Lolium multiflorum*.



Figura 2-6 Plantas maduras regeneradas de variedades de *Lolium multiflorum* cultivadas en campo.

2.3.3 Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de callo

El rol de la auxina 2,4-D y su combinación con citocininas como BA para la inducción de embriogénesis somática es común en pastos y cereales, las concentraciones óptimas de estos reguladores de crecimiento varían entre diferentes pastos y especies estudiadas (Ahloowalia, 1989; Creemers-Molenaar y Beerepoot, 1992). Zhang *et al.* (2012) encontraron tasas de inducción de callo embriogénico de 82% a partir de epicótilos de *Miscanthus sinensis* cultivados en medio MS suplementado con 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, 0,5 mg L⁻¹ de BA y 0,1 mg L⁻¹ de tiamina; bajo esas condiciones también se alcanzó la mayor capacidad de regeneración. Thomas y Yoichiro (2011) reportaron un protocolo estandarizado de regeneración para el pasto *Brachypodium distachyon* mediante el uso de ápices de vástago y se obtuvieron respuestas de inducción de callo hasta de 100% con medio MS suplementado con 4 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0,5 mg L⁻¹ de cinetina. Barampuram *et al.* (2009) encontraron que 0,48 mg L⁻¹ de 2,4-D fue efectivo para la inducción de callo y la formación de embriones somáticos, usando como explantes bases de brotes jóvenes de *Eremochloa ophiuroides*. De forma similar, Liu *et al.* (2006) hallaron que los explantes de brotes jóvenes de *Lolium perenne* respondieron mejor en términos de inducción de callo usando medio MS con 5 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0,5 mg L⁻¹ de BA. En los reportes más recientes de sistemas de regeneración de *Lolium multiflorum*, Lee *et al.* (2009) encontraron que la mayor tasa de inducción de callo embriogénico fue de 39,1% a partir de semillas cultivadas en MS fortificado con 5 mgL⁻¹ de 2,4-D y 0,5 mg L⁻¹ de BA. Takahasy *et al.* (2004) estudiaron la inducción de callo embriogénico y potencial de regeneración a partir de ápices de vástago que crecieron en medio MS con concentraciones entre 0 y 7 mg L⁻¹ 2,4-D y de 0 a 0,2 mg L⁻¹ de BA, obteniendo porcentajes de hasta 100% de callos embriogénicos y porcentajes de regeneración de una eficiencia similar.

También se ha sugerido en varios estudios que la concentración de auxinas en combinación con bajos niveles de citocininas es superior para la generación de plantas vía formación de callo (Lee *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2008). En el presente estudio, los ápices de vástago cultivados en todos los medios probados formaron rápidamente callos primarios y estructuras morfogénicas, con una media de inducción de callo primario de 69,13 % en oscuridad y 70,40 % cuando los explantes fueron sometidos a luz fluorescente (40 μmol fotón m⁻² s⁻¹). En cuanto a la formación de callo morfogénico se presentaron diferencias significativas y se encontraron resultados similares a los reportados en la literatura,

mostrando que la combinación de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, 4 mg L⁻¹ de BA y 80 mg L⁻¹ de adenina fue benéfica para la inducción de callo morfogénico para la variedad Magnun (65%) con alta capacidad de regeneración. Además, la adición de adenina, en la variedad 'Magnun', complementó el efecto de 2,4-D y BA en la inducción y formación de callo organogénico y embriogénico debido a sus diversas funciones bioquímicas y baja actividad como citocinina. Por otro lado es un metabolito central requerido para la síntesis de aminoácidos. Estos hallazgos están de acuerdo con Sanchez *et al.* (2002) y Aguado-Santacruz *et al.* (2011).

Aguado-Santacruz *et al.* (2001) encontraron una rápida inducción de respuestas morfogénicas en *Bouteloua gracilis* en tratamientos que contenían 2 mg L⁻¹ BA más 1 mg L⁻¹ de 2,4-D con adición de 40 u 80 mg L⁻¹ de adenina. Ellos obtuvieron de 9 a 37,2 plántulas por 500 mg PF de callo cuando usaron diferentes combinaciones de 2,4 (1 a 2 mg L⁻¹), BA (0,25 a 2 mg L⁻¹) y adenina (0 a 80 mg L⁻¹). En este estudio, también se encontraron resultados similares al usar 2,4-D en combinación con BA y adenina, sin embargo su efecto fue dependiente del genotipo.

También, se ha reportado en la literatura que concentraciones mayores de 5 mg L⁻¹ de 2,4-D resultan en un baja frecuencia de inducción de callo embriogénico y de regeneración de *Lolium multiflorum* (Lee *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2006) y pueden generar una alta probabilidad de mutación de las plantas (Liu *et al.*, 2006).

2.3.4 Morfología de los callos obtenidos

La naturaleza morfogénica de los callos no fue exclusiva porque algunas veces los callos embriogénicos mostraron pequeños sectores de tejido organogénico. Muchos de los tejidos embriogénicos desarrollaron sectores con brotes vía organogénesis. Adicionalmente como la mitad de los callos embriogénicos fueron mantenidos en condiciones de luz continua, en algunos casos la germinación era espontánea.

Tagahashi *et al.* (2004) describieron 3 tipos de callos a partir de semillas maduras, ápices de vástago y ápices de raíz de la especie *Lolium multiflorum*. Los tres tipos de callo fueron friables, acuosos y compactos con finas raíces en su superficie. Ellos encontraron que esta diferencia era principalmente debida al tipo de explante utilizado, mientras que Jackson y Dale (1988) reportaron que las diferencias se debían principalmente al genotipo. En este

estudio no se encontraron diferencias morfológicas marcadas debido al genotipo, ya que se obtuvieron callos principalmente friables y acuosos en todas las variedades estudiadas. A partir de los callos friables fue posible la generación de brotes, mientras que a partir del callo acuoso esto no fue posible. Estos resultados están de acuerdo con los de Tagahashi *et al.* (2004) que explican que los callos friables y acuosos se formaron a partir de ápices de vástago utilizados como explantes y que las diferencias morfológicas entre los callos fueron importantes en cuanto a su potencial de regeneración, ya que cuando el callo friable se pasó a medio de regeneración se formaron brotes verdes.

El callo formado a partir de los ápices de vástago, usados como explantes en este estudio, fue un callo de color entre blanco y verde, morfogénico, granular y friable que pudo ser inducido después de 90 d de cultivo. Después de tres subcultivos el callo obtenido se hizo más friable y se pudieron observar más fácilmente los embriones somáticos. No se realizaron pruebas de sus características de desarrollo o diferentes estadios morfológicos embrionarios, por lo que se asume que el callo obtenido es una combinación de callo organogénico y embriogénico.

2.3.5 Efectos de la variación del genotipo sobre la inducción de callo y regeneración de plantas

De la misma forma que en estudios anteriores realizados con cereales y pastos (Takahashi *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009; Aguado-Santacruz *et al.*, 2011;), los resultados obtenidos también revelaron que la inducción de callo morfogénico y la frecuencia de regeneración dependió fuertemente de la variación del genotipo entre las cinco variedades probadas. La variación de la eficiencia de formación de callo morfogénico entre los cultivos probados fue estadísticamente significativa ($p \leq 0,01$) de acuerdo al análisis estadístico ANOVA (Tabla A-2). El porcentaje de formación de callo embriogénico varió de 6 a 65% entre genotipos (Tabla 2-3) y los mayores porcentajes de inducción de callo morfogénico se presentaron en la variedad 'Magnun' para todos los medios probados con una media de 41,2 %, mientras que en el medio 2D4B80A se observó el mayor porcentaje de formación de callo morfogénico (65%). Con la variedad 'Magnun' también se obtuvo la mayor regeneración de plantas (48,71 plántulas por g PF callo), en el medio 2D4BA. En contraste, la variedad 'Bargala' mostró los menores porcentajes de formación de callo morfogénico con una media de 15% para todos los medios estudiados y para el medio 2D4B80A resultó en uno de los porcentajes más bajos de formación de callo morfogénico (7%). La regeneración *in*

vitro para esta variedad resultó en 9,68 y 17, 42 plántulas g⁻¹ PF de callo para los medios D3BA y MPC, respectivamente.

En este estudio no se regeneraron plantas albinas en ninguna de la variedades evaluadas, 'Magnun', 'Bargala', 'Tetragold', 'Hercules' y 'Maximus'. La formación de plantas albinas se ha reportado ampliamente en la literatura y ocurre frecuentemente en cultivo de tejidos de pastos que incluyen *Lolium multiflorum* y *Lolium perenne* (Creemers-Molenaar y Beerepoot, 1992). Se han encontrado muchos factores que afectan el grado de albinismo, tales como el genotipo y el estado fisiológico de las plantas donantes, el envejecimiento de los cultivos, condiciones ambientales y composición del medio (Creemers-Molenaar y Beerepoot, 1992; Liu *et al.*, 2002). Una característica molecular de las plantas albinas, es la presencia de grandes delecciones en el ADN del cloroplasto, sin embargo no se ha elucidado la causa del albinismo y la posible participación de los genomas nucleares y citoplasmáticos en la inhabilidad de los proplástidos de transformarse en cloroplastos (Makowska y Oleszczuk, 2014).

2.3.6 Cultivos con potencial de regeneración a largo plazo

Algunas de las líneas de callos morfogénicos generadas aquí para las variedades 'Magnun', 'Bargala' y 'Tetragold' han sido mantenidas por más de tres años sin pérdida de su naturaleza morfogénica, capacidad regenerativa o potencial para producir plantas fértiles y normales de *Lolium multiflorum*. El principal problema en los cultivos de cereales y pastos es mantener el potencial de regeneración a largo plazo y prevenir la formación de plantas anormales (Creemers-Molenaar y Beerepoot, 1992). Consecuentemente, hay pocos reportes en los cuales el potencial morfogénico y regenerativo de los cultivos de *Lolium multiflorum* sean mantenidos por más de un año (Creemers-Molenaar y Beerepoot, 1992; Takahashi *et al.*, 2007).

2.4 Conclusiones

Los resultados obtenidos en cuanto a eficiencia de formación de callo morfogénico y habilidad de regeneración entre las cinco variedades probadas indicaron que las diferencias en las respuestas fueron debidas a la influencia de los genotipos y a las distintas combinaciones de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo. No hubo

diferencias en la eficiencia de formación de callo morfogénico a partir de las condiciones de luz u oscuridad.

En este estudio 'Magnun' (65 %) y 'Maximus' (55 a 58 %) mostraron los más altos porcentajes de eficiencia de generación de callo morfogénico. 'Tetragold' (34 %) y Hércules (35%) tuvieron una respuesta similar y la variedad que presentó la menor eficiencia de generación de callos fue 'Bargala' (6 %).

Se encontró que la combinación de diferentes concentraciones de 2,4-D, BA y adenina fue buena para la inducción de callo morfogénico en todos los genotipos de *Lolium multiflorum* Lam. Las formulaciones que contenían 2 mg L⁻¹ de 2,4-D más 4 mg L⁻¹ de BA y 40 u 80 mg L⁻¹ de adenina parecieron ser adecuadas para la formación de callos organogénicos y embriogénicos en las variedades 'Magnun' y 'Maximus' y fueron también convenientes para las otras variedades probadas, exceptuando la variedad 'Bargala', donde con estos medios se obtuvieron las respuestas más bajas de formación de callos morfogénicos. Para la variedad 'Tetragold' con cualquiera de las combinaciones de reguladores de crecimiento se obtuvieron buenos resultados y finalmente, para la variedad Hércules se encontró que adicionalmente a la combinación mencionada, los medios con 1 a 2 mg L⁻¹ de 2,4-D más 3 a 4 mg L⁻¹ de BA y 40 a 80 mg L⁻¹ de adenina dieron como resultado callos morfogénicos con eficiencias estadísticamente iguales.

En cuanto a la habilidad de regeneración de plantas, la variedad 'Magnun' y el medio que contenía 2 mg L⁻¹ de 2,4-D más 4 mg L⁻¹ de BA y 40 mg L⁻¹ de adenina resultaron en el mayor número de plantas regeneradas por g de callo de fresco (48,71). Con la variedad 'Tetragold' y esta misma concentración de reguladores de crecimiento se obtuvieron 5,80 plantas por g de callo fresco. En contraste la variedad 'Bargala' cultivada en este medio no regeneró ninguna planta, teniendo en cuenta que con esta combinación de reguladores de crecimiento se había obtenido una de las más bajas eficiencias de generación de callo morfogénico.

Se demostró, que los ápices de vástago de plantas germinadas *in vitro* son útiles para cultivo de tejidos de *Lolium multiflorum* Lam, ya que se alcanzaron altas eficiencias de formación de callo embriogénico y regeneración de plantas.

Se espera que el uso de los medios 2D4BA y 2D4B80A con genotipos adecuados de *Lolium multiflorum*, como la variedad 'Magnun' y 'Maximus' puedan cumplir con algunos de los requerimientos para la aplicación exitosa de diferentes herramientas biotecnológicas, tales como la producción de plantas libres de patógenos y la propagación de germoplasma deseable o transformación genética, teniendo en cuenta que los callos fueron de rápido crecimiento, ya que después de 3 subcultivos luego de la inducción de callo primario se empezó el proceso de regeneración de plantas, adicionalmente los callos obtenidos fueron altamente morfogénicos (combinación de callo embriogénico y organogénico) y adicionalmente este material fue capaz de retener su potencial regenerativo y de producción de plantas normales y fértiles por más de 3 años.

2.5 Recomendaciones

Aunque 2,4-D ha sido la auxina más utilizada en cultivo de tejidos de cereales y pastos, y en este trabajo dio buenos resultados en combinación con citocininas, es conveniente evaluar otras auxinas como por ejemplo Picloram y Dicamba las cuales, según la literatura, pueden ser más efectivas para la inducción de respuestas morfogénicas en algunos pastos.

Comprobar el carácter embriogénico de los callos obtenidos mediante análisis histológico de los mismos y observación con microscopio óptico. Adicionalmente, sería conveniente realizar observaciones y fotografías con microscopía electrónica de barrido para diferenciar los callos morfogénicos producidos.

3 ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS FOTOAUTOTRÓFICOS EN SUSPENSIÓN DE *Bouteloua gracilis*

Se obtuvo una suspensión celular fotoautotrófica a partir de la adaptación de células altamente clorofílicas de *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. ex Steud, a un medio carente de fuentes de carbohidratos, que contenía medio MS (Murashige y Skoog) suplementado con ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D; 1 mg L⁻¹), benzilaminopurina (BA; 2 mg L⁻¹) y adenina (40 mg L⁻¹) y 3% de CO₂ en el medio ambiente de cultivo. Cuando la línea celular creció en este medio con agitación a 100 rpm, se obtuvieron tiempos de duplicación de 9,38 días en términos de peso fresco. El contenido de pigmentos en este cultivo celular fue de 489 µg de clorofila total por g de PF y 228 µg de carotenoides por g peso fresco (PF) al día 14 del cultivo, mientras que la relación de clorofila a/b estuvo en el intervalo de 1,92 y 2,58. Aunque diferentes sistemas de cultivos vegetales en suspensión han sido descritos a partir de cereales y pastos, este es el primer reporte de cultivos celulares fotomixotróficos y fotoautotróficos en suspensión en Poaceae.

Palabras clave: Cultivo celular, clorofila, fotoautotrófico, cereales, pastos, *Bouteloua gracilis*

3.1 Introducción

Los cultivos celulares vegetales representan cultivos únicos para el análisis controlado de procesos fisiológicos, bioquímicos, citológicos y procesos genéticos de plantas superiores a nivel celular. Los cultivos celulares fotoautotróficos ofrecen ventajas como modelos de estudio ya que representan sistemas más sencillos para estudiar el fenómeno de fotosíntesis, analizar los efectos de estrés osmótico y térmico y examinar el desarrollo de

los cloroplastos, a la vez que permiten la producción de metabolitos secundarios específicos. En el año de 2001 se desarrolló el primer cultivo en suspensión clorofílico a partir de *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. ex. Steud (Aguado-Santacruz *et al.* 2001), el cual es un pasto muy importante de las regiones semiáridas de Estados Unidos y México. Este pasto produce abundante forraje para ganado de muy alta calidad y conforma parte del hábitat de la fauna nativa. Debido a la importancia económica de este pasto, sus características de resistencia a la sequía y amplia distribución, se ha investigado de manera intensiva ecológica y fisiológicamente.

El objetivo de este capítulo fue establecer las condiciones de cultivo fotoautotrófico en suspensión para la especie *Bouteloua gracilis*. Se adaptó una suspensión celular clorofílica a bajas concentraciones de sacarosa en el medio y a altos niveles de CO₂ en la atmósfera del cultivo, para finalmente establecer una línea celular FA de *Bouteloua gracilis*. Se muestra la caracterización del crecimiento de los cultivos celulares heterotróficos (H), fotomixotróficos (FM) y fotoautotróficos (FA), mediante la determinación rutinaria de peso fresco (PF), pH, oxígeno disuelto (OD), conductividad eléctrica, concentración de pigmentos (clorofila y carotenoides) y finalmente consumo de algunos iones del medio de cultivo para elucidar las características de crecimiento de las células H, FM y FA a nivel de matraz. Hasta donde se sabe esta es la primera línea celular FA establecida para Poaceae.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Línea celular clorofílica de *Bouteloua gracilis*

En la primera etapa de la investigación se buscó la generación de callos friables de *Lolium multiflorum* Lam con altas concentraciones de clorofila, para obtener una línea celular FA. Sin embargo, la formación de callos friables clorofílicos no fue posible a partir de ninguna de las variedades probadas de *Lolium multiflorum* Lam, aun cuando se utilizaron concentraciones de auxinas y citocininas en el medio de cultivo y condiciones de luz que favorecían la inducción de callo con potencial fotosintético.

En la segunda etapa de la investigación se utilizó una línea celular con alto contenido de clorofila, la cual correspondió a una nueva línea desarrollada por Aguado-Santacruz en 2008 para la especie *Bouteloua gracilis*. El procedimiento de iniciación de callo

embriogénico y altamente clorofílico de *Bouteloua gracilis* fue descrito previamente por Aguado-Santacruz *et al.* (2001). A continuación se detalla la metodología empleada para lograr esta línea celular altamente clorofílica.

Ápices de vástago de tres días de edad de *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag ex. Steud., fueron utilizados como material de inicio y cultivados en la oscuridad (10 ápices por caja de Petri) sobre medio MPC solidificado, el cual contenía medio MS (Phyto Technology Laboratories ®) suplementado con 2,4-D (1 mg L^{-1} ; Sigma), BA (2 mg L^{-1} ; Sigma), adenina (40 mg L^{-1} ; Sigma), sacarosa (3%; Sigma) y Gelrite ($2,2 \text{ g L}^{-1}$; Phyto Technology Laboratories ®).

El pH del medio fue ajustado a 5,6 antes de esterilizar en autoclave (121°C por 15 min). El callo fue subcultivado cada 25 días sobre el mismo medio de inducción. Los callos producidos por cada explante se transfirieron a condiciones de luz continua utilizando lámparas fluorescentes ($40 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y una temperatura de $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 38 días después de la iniciación del cultivo. En la Figura 3-1 se presenta el procedimiento para el establecimiento y mantenimiento del callo heterotrófico clorofílico.

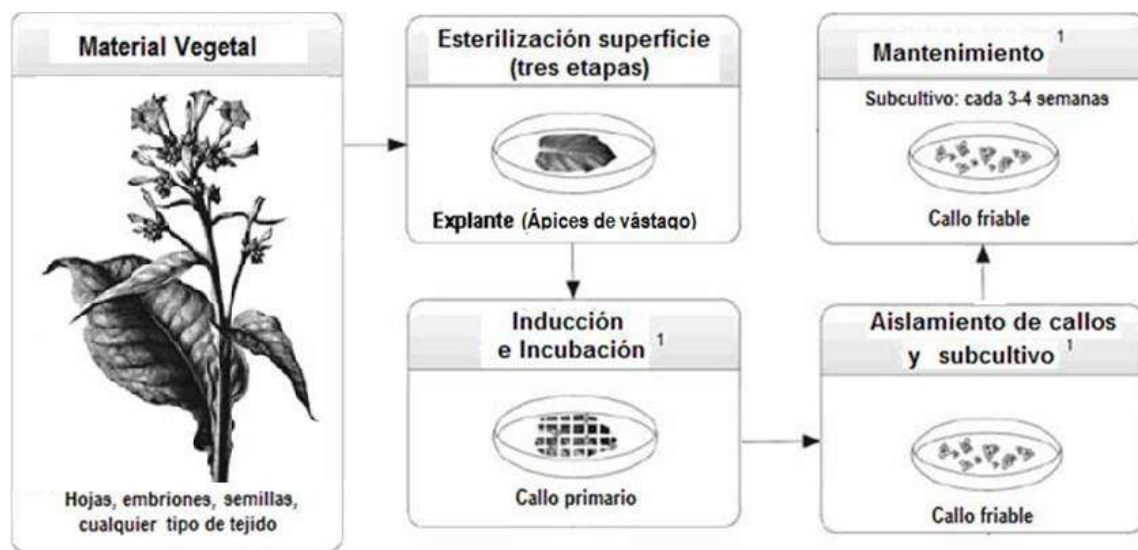


Figura 3-1 Representación esquemática del procedimiento para el establecimiento y mantenimiento de callo heterotrófico de *B. gracilis*. Adaptado de Eibl y Eibl (2009).

Después de 2 meses de crecimiento bajo condiciones de luz, un callo verde altamente friable se desarrolló a partir de un solo explante, el cual fue entonces transferido a medio MPC líquido y mantenido en un agitador giratorio a 70 rpm bajo luz fluorescente continua ($100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y a una temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Después de 3 semanas de agitación se obtuvo una suspensión celular clorofílica, homogénea y finamente dispersa.

A partir de esta suspensión celular se inició el proceso de adaptación para desarrollar una línea celular fotomixotrófica y fotoautotrófica en el Laboratorio de Ingeniería Bioquímica ubicado en los Laboratorios de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

3.2.2 Iniciación del cultivo celular heterotrófico de *Bouteloua gracilis*, mantenimiento y caracterización

El mantenimiento de la línea celular de *Bouteloua gracilis* se hizo subcultivando las células cada 12 días en el mismo medio MPC en el cual se inició la suspensión celular y manteniéndolas en las mismas condiciones de agitación, luz y temperatura. En la Figura 3-2 se presenta el procedimiento para el establecimiento y mantenimiento de suspensiones celulares heterotróficas. El mantenimiento de las células clorofílicas se ha logrado por subcultivo de las mismas en medio sólido MPC, y en medio líquido MPC. El cultivo de estas células en medio sólido y en suspensión se ha realizado en los Laboratorios de Ingeniería Química de la Universidad Nacional por más de 4 años.

Para realizar la curva de crecimiento se subcultivó el material celular, cuidando que estuviera en la fase exponencial (fase de división celular, 8 días) para tener una respuesta de crecimiento favorable. La proporción de inóculo/medio considerado fue de 0,4 a 0,5 g de material celular por 25 mL de medio MPC contenidos en matraces de 125 mL. El medio MPC utilizado estaba conformado por el medio MS ($4,42 \text{ g L}^{-1}$), sacarosa (30 g L^{-1}); el pH de este medio fue ajustado a 5,6 y entonces esterilizado a 121°C por 15 minutos; suplementado con 2.4-D (1 mg L^{-1}), BA (2 mg L^{-1}) y adenina (40 mg L^{-1}). Este inóculo inicial se creció a 100 rpm durante los 8 días previos a la cinética. Se emplearon 5 repeticiones por cada fecha de colecta y el muestreo se realizó cada 3 días a partir del día de la inoculación, tomando éste como día cero. Todos los matraces fueron lavados perfectamente y esterilizados por calor seco. Los matraces eran de la misma marca, ya que se encontró que la geometría incide en el error de las mediciones, se rotularon de tal manera que se identificaron la fecha de cosecha, la repetición, la relación inóculo/medio,

la generación y fecha de cultivo de las células de las cuales se tomó el inóculo. Después de haber inoculado todos los matraces, éstos se incubaron en una cámara de ambiente controlado $30 \pm 1^\circ\text{C}$, en un agitador a 100 rpm, con una irradiancia de $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 12 días.

Los muestreos se realizaron cada 3 días hasta los 12 días de crecimiento (3, 6, 9 y 12 días), tomando 5 matraces al azar. Más allá de este tiempo de muestreo, las células comenzaban a tornarse de color marrón, lo que indica pérdida de viabilidad. En cada día de muestreo se tomaron fotos de los matraces representativos. Adicionalmente, el material celular se recolectó por filtración a vacío suave durante 5 segundos. Para este paso se colocó un disco de papel filtro cualitativo grado 1 WHATMAN®, previamente pesado, en el sistema de filtración. Después de realizar la determinación de peso fresco (PF) y peso seco (PS), se usaron cinco de las muestras para la determinación del contenido de clorofila (total, *a* y *b*) y carotenoides en cada fecha de muestreo. La clorofila y los carotenoides fueron extraídos de las células con acetona acuosa (80 % v/v) y determinados de acuerdo al procedimiento de Lichtenthaler y Buschmann (2001) y Porra (2002).

La determinación del pH se realizó rutinariamente durante el cultivo de células en suspensión utilizando un potenciómetro Orion 4 Star TM, marca Metler Toledo®. El pH no se controló durante el cultivo de las células en suspensión.

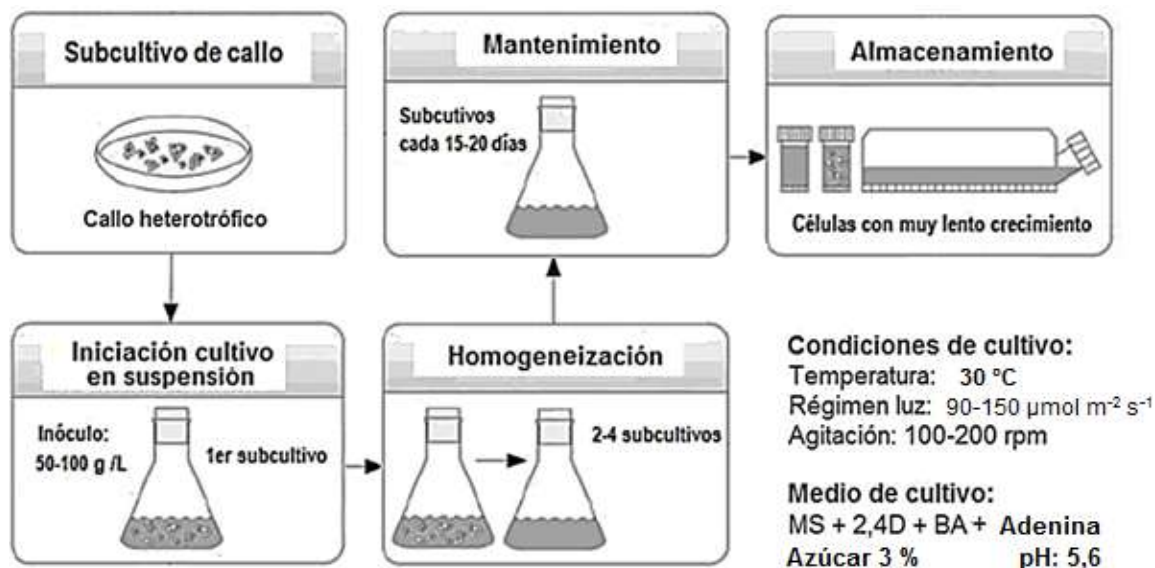


Figura 3-2 Representación esquemática del procedimiento para el establecimiento y mantenimiento de suspensiones celulares clorofílicas. Adaptado de Eibl y Eibl (2009).

La conductividad se midió utilizando un conductímetro Orion 4 Star™, marca Metler Toledo®. Este parámetro en cultivos líquidos permite monitorear indirectamente el crecimiento de la biomasa, ya que existe una relación inversa entre la disminución de la conductividad eléctrica y el incremento de la masa celular. En el caso de cultivos en suspensión, varios autores han demostrado que el incremento en el peso seco puede ser correlacionado linealmente con la disminución de la conductividad en el medio (Godoy-Hernández *et al.*, 2012). Se realizaron curvas de peso fresco contra porcentaje de conductividad inicial con el fin de establecer correlaciones que permitieran estudiar la biomasa de manera indirecta.

El oxígeno disuelto se midió con un medidor de oxígeno portátil, YSI ProODO® para determinar el consumo de oxígeno por parte de las células clorofílicas. La velocidad a la que las células consumen oxígeno determina la velocidad a la que se requiere transferirlo. Muchos factores influyen en la demanda de oxígeno, siendo los más importantes la especie celular utilizada, la fase de crecimiento del cultivo y la naturaleza de la fuente de carbono en el medio (Torres López *et al.*, 2008).

Los contenidos de clorofila *a* y *b* se determinaron espectrofotométricamente, con un equipo GENESYS™ 10 UV, en un extracto de acetona acuosa al 80% a 0°C. La extracción de la clorofila se llevó a cabo macerando 0,04-0,06 g de material celular para cada tratamiento, utilizando un dispersor Ultraturrax T-10 de Ika® y extrayendo el pigmento con acetona acuosa al 80%. La suspensión se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. Al momento de la toma de la lectura cada muestra se aforó a 750 µL debido a la volatilización de la acetona durante la extracción. Durante todo el proceso de extracción las muestras se mantuvieron en un baño de hielo a 0°C y en oscuridad para evitar al máximo la degradación de los pigmentos. Las lecturas de clorofila se obtuvieron por espectrofotometría a 646,6 nm y 663,6 nm utilizando acetona fría como blanco. Se utilizaron las siguientes ecuaciones para la cuantificación de clorofila:

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg/g)} = \frac{12,25 A_{663,6} - 2,55 A_{646,6}}{1000 \times W} \times V \quad (\text{Porra, 2002})$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (mg/g)} = \frac{20,31 A_{646,6} - 4,91 A_{663,6}}{1000 \times W} \times V \quad (\text{Porra, 2002})$$

$$\text{Clorofila total (mg/g)} = \frac{17,76 A_{646,6} + 7,34 A_{663,6}}{1000 \times W} \times V \quad (\text{Porra, 2002})$$

Dónde:

V: volumen final del extracto (mL)

W: Peso fresco de las células (g)

El contenido de carotenoides se determinó espectrofotométricamente, con un equipo GENESYS™ 10 UV, en un extracto de acetona acuosa al 80% a 0°C, utilizando una longitud de onda de 470 nm. El procedimiento de extracción es el mismo que se describió anteriormente para clorofila. Se utilizó la siguiente ecuación propuesta por Lichtenthaler y Buschmann (2001) para la cuantificación de carotenoides (carotenos y xantofilas):

$$\text{Carotenoides totales (mg/g)} = \frac{1000A_{470} - 1,90C_a - 63,14C_b}{214} \times \frac{V}{1000 \times W}$$

Dónde:

C_a: contenido de clorofila a en (µg/mL)

C_b: contenido de clorofila b en (µg/mL)

V: volumen final del extracto (mL)

W: peso fresco de las células (g)

3.2.3 Iniciación del cultivo celular fotomixotrófico de *Bouteloua gracilis*, mantenimiento y caracterización

La iniciación de la línea fotomixotrófica se realizó a partir de la línea heterotrófica adaptada de la suspensión celular clorofílica de *Bouteloua gracilis* mantenida previamente en medio MPC, con luz continua (100 µmol fotón m⁻² s⁻¹), una temperatura de 30 ± 1°C y suplementada con 0,25 % de sacarosa.

Uno de los métodos más convenientes para iniciar y mantener cultivos FA en suspensión, es la utilización de matraces de dos niveles (Hüsseman, 1977), pero para este experimento se utilizaron dos matraces de 125 mL con desprendimiento (Kitasatos), conectados por una manguera de silicona (Figura 3-3). Las bocas de cada uno de los frascos se sellan con papel aluminio y se cubren con láminas de papel vinipel para disminuir al máximo el intercambio gaseoso con el exterior. El compartimiento derecho del sistema contiene una

mezcla *buffer* de concentración 3 M ($K_2CO_3/KHCO_3$) en relaciones que generen presiones parciales de CO_2 específicas en el sistema (Tabla 3-1). La concentración de la mezcla *buffer* se ajusta para obtener una presión parcial de CO_2 de 0,5 a 3 % (v/v).

Tabla 3-1 Establecimiento de la presión parcial de CO_2 mediante la solución *buffer* $K_2CO_3/KHCO_3$.

Solución Stock $K_2CO_3/KHCO_3$ (moles /L)	Mezcla de Buffer mL K_2CO_3 / mL $KHCO_3$	Presión parcial de CO_2	
		mm solución Brodie	% (v/v)
3,0	50/50	51	0,5 ± 0,1
3,0	38/62	104	1,0 ± 0,1
3,0	27/73	203	2,0 ± 0,1
4,0	27/73	398	3,0 ± 0,1

Fuente: Hüssemann *et al.* (1982); Tripathi *et al.* (2001).

Según Tripathi *et al.* (2001), no hubo diferencia en la generación de presión parcial usando soluciones *buffer* esterilizadas en autoclave a (121°C por 20 minutos) o sin esterilizar. En esta tesis se usaron soluciones estériles de las soluciones *buffer* de $K_2CO_3/KHCO_3$, para disminuir la posibilidad de contaminación del cultivo.

Las presiones parciales de CO_2 sobre las soluciones buffers son calculadas para 25°C con la siguiente ecuación:

$$K = \frac{[KHCO_3]^2}{[K_2CO_3][CO_2]}$$

Los valores para $K_{30^\circ C}$ se calculan por interpolación entre $K_{20^\circ C} = 3,35 \times 10^{-2}$ y $K_{38^\circ C} = 1,78 \times 10^{-2} \left(\frac{\text{mol/litro}}{\text{mm Brodie}} \right)$ de acuerdo a Warburg *et al.* (1962).

La concentración de CO_2 en el sistema se mantiene prácticamente constante a través del tiempo del cultivo, según lo manifiestan los investigadores que han trabajado con este método de propagación de células FA (Hüssemann, 1982; Tripathi *et al.*, 2001). Por ejemplo, Tripathi *et al.* (2001) encontraron que la concentración de CO_2 en el sistema permaneció constante durante las tres semanas que duró el experimento, ellos monitorearon la presión parcial de CO_2 en la atmósfera del cultivo con un analizador de gases portátil para CO_2 y O_2 . En los experimentos realizados en esta tesis no se renovó la solución *buffer* $K_2CO_3/KHCO_3$ durante el tiempo de crecimiento de los cultivos.

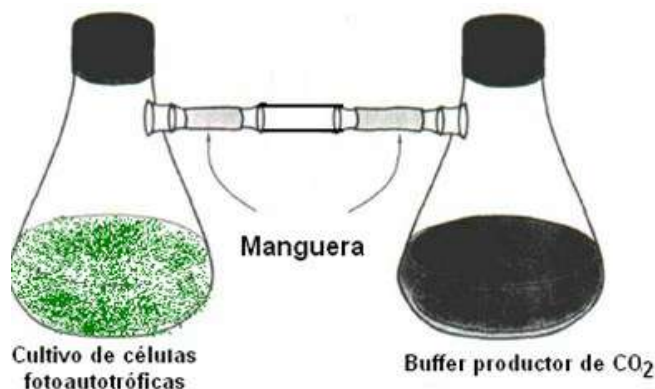


Figura 3-3 Esquema del sistema usado para cultivos en suspensión fotomixotróficos y fotoautotróficos.

El cultivo fotomixotrófico fue iniciado en el sistema descrito anteriormente con *buffer* carbonato/bicarbonato en uno de los compartimientos para mantener la concentración de CO₂ en la atmósfera del sistema a aproximadamente 3%. Este tratamiento fue seguido por una serie de subcultivos en los cuales se disminuyó progresivamente la concentración de sacarosa del medio desde 0,25 % a 0,1 % y finalmente a 0,05 %; durante cada una de estas etapas de adaptación las tasas de crecimiento de las células disminuían. Cuando la tasa de crecimiento se recuperaba al nivel previo, el siguiente paso fue intentar una concentración de sacarosa inferior.

Para mantener los cultivos en suspensión fotomixotróficos se realizaron subcultivos cada 21 días aproximadamente. Después de varios subcultivos las células en suspensión se tornaron más verdes y mantenían tasas de crecimiento adecuadas. La cinética de crecimiento fotomixotrófico se realizó utilizando el mismo protocolo que para las células heterotróficas.

3.2.4 Iniciación del cultivo celular fotoautotrófico, mantenimiento y caracterización

Como material de partida se usaron las suspensiones celulares fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis* adaptadas a 0,1 % y 0,05 % de sacarosa en el medio de cultivo, una atmósfera de CO₂ de aproximadamente 3 %, con luz continua ($100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Posteriormente, se disminuyó la sacarosa gradualmente hasta que finalmente, después de un periodo de cerca de dos años, se alcanzó un crecimiento estable de las células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en un medio libre de sacarosa.

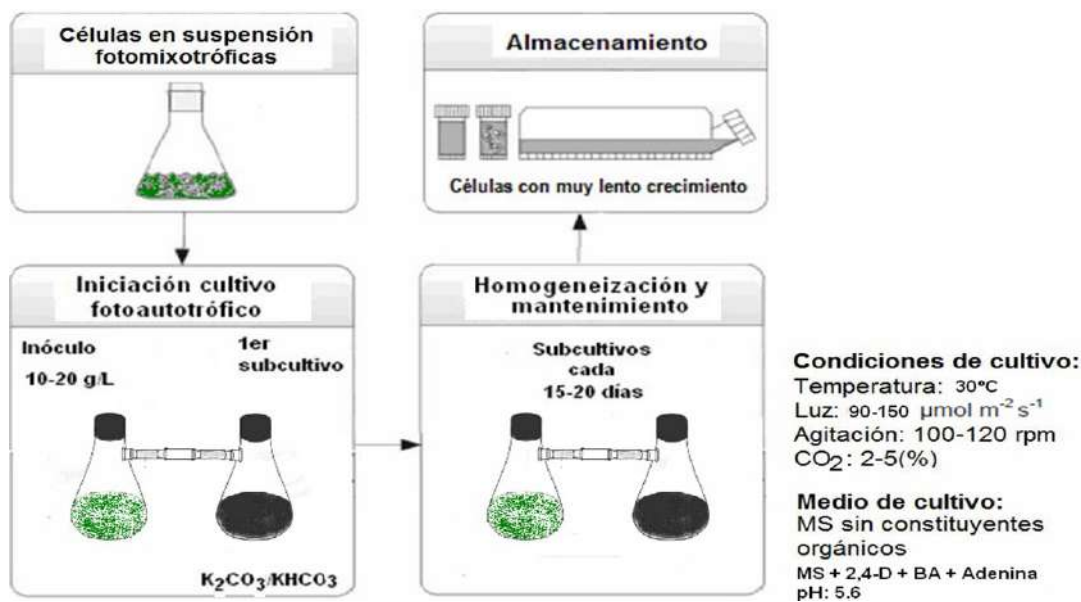


Figura 3-4 Representación esquemática del procedimiento para el establecimiento y mantenimiento de suspensiones celulares fotoautotróficas. Adaptado de Eibl y Eibl (2009).

La cinética de crecimiento fotomixotrófico se realizó utilizando el mismo protocolo que para las células heterotróficas, el tiempo de cultivo fue de 4 semanas, tomándose muestras durante los días 0, 7, 14, 21 y 28 del mismo.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Caracterización del cultivo celular heterotrófico

Las suspensiones celulares heterotróficas clorofílicas han sido cultivadas por más de 4 años. Aunque esta dispersión celular tendió a formar agregados, fue mantenida realizando un subcultivo rutinario cada 12 d, transfiriendo 2 mL de la suspensión en 25 mL de medio fresco usando una micropipeta de 1 mL equipada a una punta de 1 mm de diámetro.

Aunque se han desarrollado diferentes sistemas de cultivos celulares *in vitro* para cereales y pastos, la suspensión celular clorofílica de *Bouteloua gracilis* es el primer reporte de cultivos con esta característica en Poaceae. Explicaciones de esta notable escasez de reportes de cultivos clorofílicos o fotoautotróficos en esta familia incluyen la ausencia general de color verde en las células cultivadas (Widholm, 1992) y la inhibición de la

diferenciación de cloroplastos debido a la alta concentración de auxinas requerida para la inducción de callo en las gramíneas (Yamada, 1985).

Los resultados correspondientes a esta parte, están relacionados con el seguimiento de la cinética del cultivo de las células en suspensión clorofilicas de *Bouteloua gracilis*. Se registraron el pH, el oxígeno disuelto (OD) por unidad de biomasa, la concentración de clorofila e incremento de la biomasa a lo largo de 12 días. El registro de las variables mencionadas se presenta en el Anexo C, así como su análisis estadístico.

El registro del peso fresco de las células obtenidas en condiciones de luz y oscuridad se encuentra en la tabla C-1. Se observa un incremento en la pendiente de crecimiento entre los días 3 a 6 para las células clorofilicas crecidas en condiciones de luz y entre los días 6 a 9 para las células cultivadas en condiciones de oscuridad (Figura 3-5). No se tomaron mediciones después del día 12 de cultivo. Tomando los datos correspondientes a la fase exponencial, es decir al periodo comprendido entre los 0 y 6 días para la condición de luz y aproximadamente de 0 a 9 días para la condición de oscuridad, se puede establecer una relación para determinar la velocidad específica de crecimiento.

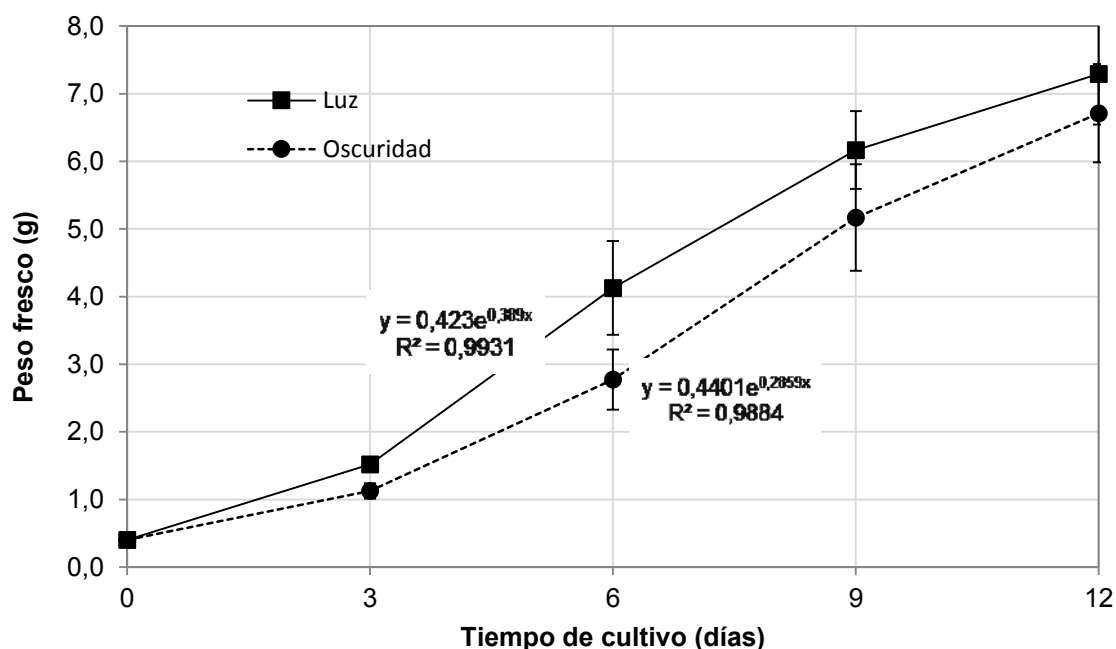


Figura 3-5 Cinética del crecimiento del cultivo en suspensión heterotrófico.

Los datos se ajustaron a un modelo exponencial, para las células en condiciones de luz hasta el día 6 y para las células en condiciones de oscuridad hasta el día 9. Puede decirse entonces que la biomasa durante esta etapa tiene un crecimiento del tipo $X = X_0 e^{\mu t}$, en donde X corresponde a la biomasa en un tiempo t ; X_0 es la masa del inóculo; μ es la velocidad específica de crecimiento; y t es el tiempo del cultivo. De acuerdo con lo anterior, la velocidad específica de crecimiento, μ de células de *Bouteloua gracilis* en condiciones de luz, durante su etapa de crecimiento exponencial, es de $0,389 \text{ d}^{-1}$, con un tiempo de duplicación de la biomasa de 1,8 días, este valor es 5,3 veces menor al tiempo de duplicación de 9,5 d reportado previamente por Aguado Santacruz *et al.* (2001). Para las células heterotróficas que crecieron en oscuridad la velocidad específica de crecimiento es de $0,286 \text{ d}^{-1}$, con un tiempo de duplicación de 2,42 días.

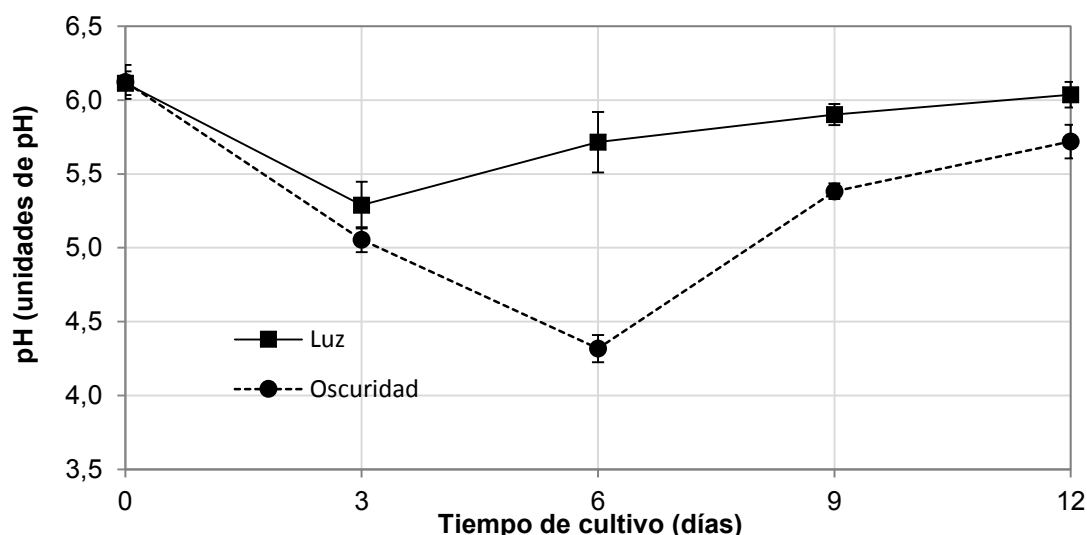


Figura 3-6 Comportamiento del pH para el cultivo heterotrófico de células de *Bouteloua gracilis* en matraz, en condiciones de luz y oscuridad.

En la tabla C-5 se presenta el registro de los valores de pH durante el cultivo heterotrófico. De acuerdo con la Figura 3-6, se puede observar que el pH del medio alcanza un valor mínimo de 5,29 para el día 3 en presencia de luz y de 4,32 el día 6 en condiciones de oscuridad. Posteriormente, en los dos ensayos, el pH comienza a aumentar nuevamente hasta valores cercanos al pH inicial. Este comportamiento concuerda con otros reportes de crecimiento de células vegetales, donde una caída gradual en el pH a un valor de

alrededor de 4,0 refleja el consumo inicial de amonio, el pH retorna luego a un valor estable cercano a 6,0 y está relacionado al consumo de nitratos después de pocos días del cultivo (Eibl y Eibl, 2009). También se ha reportado que el pH decrece a valores cercanos a 5,0 durante la fase lag del cultivo y comienza a incrementarse cuando las células comienzan a crecer (Yamada *et al.*, 1981). Al ajustar los datos al modelo exponencial, no se observó fase lag, pero a partir del día 3 y del día 6, cuando ocurre la mayor disminución de pH, hay aumento en la pendiente de las curvas de crecimiento de las células vegetales en condiciones de luz y oscuridad respectivamente y a partir de ese momento el pH comienza a incrementarse para los dos cultivos.

Los cultivos celulares vegetales consisten principalmente de grupos de células o agregados celulares de más de 2 mm de diámetro. Las células vegetales crecen muy lentamente (tiempos de duplicación de 2 a 3 días y consecuentemente tienen un requerimiento bajo de oxígeno (Scragg, 1992). La velocidad de consumo de oxígeno en cultivos vegetales es del orden de 0,2 a 1,0 mmol de O_2 g⁻¹ PS (peso seco biomasa) h⁻¹ (Pépin *et al.*, 1995).

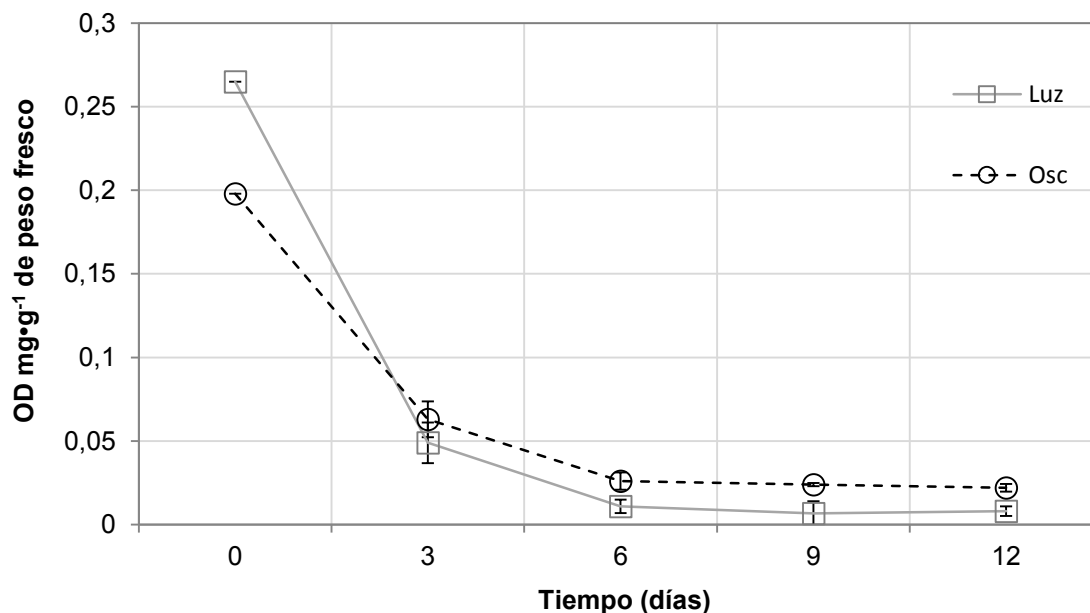


Figura 3-7 Comportamiento del OD por unidad de biomasa para el cultivo heterotrófico de células de *Bouteloua gracilis*

La concentración de oxígeno disuelto (OD) disminuyó durante el crecimiento heterotrófico de las células en condiciones de luz y oscuridad (Tabla C-9) hasta un valor del orden de 55 % y 71 % del valor de OD inicial, respectivamente. Este resultado indicó que las células clorofílicas que crecieron en condiciones de luz consumieron más oxígeno que las células heterotróficas crecidas en oscuridad, lo cual es congruente con el mayor crecimiento celular en presencia de luz.

En la Figura 3-7 se muestra el comportamiento del OD por unidad de biomasa en peso fresco. Se observa que a partir del día 6 para condiciones de luz y oscuridad la concentración de OD g⁻¹ de PF de células de *Bouteloua gracilis*, permanece prácticamente constante en 0,008 mg OD g⁻¹ PF y 0,022 mg OD g⁻¹ PF, respectivamente. De acuerdo a los datos obtenidos la concentración de OD es un factor muy importante, ya que durante los tres primeros días después de la inoculación de las células crecidas en luz el consumo de oxígeno por unidad de biomasa fue muy alto hasta que el pH de las células bajó a 5,29; cuando el pH se estabilizó a partir del día 6-9 del cultivo el OD por unidad de biomasa alcanzó valores constantes. Para la condición de oscuridad, el consumo de OD disminuyó durante los 6 días después de la inoculación de las células, lo cual correspondió a una caída del pH a un valor de 4,32 y posteriormente cuando el pH tendió a estabilizarse el OD por unidad de biomasa alcanzó valores constantes. Estas observaciones están de acuerdo con la literatura, cuando el oxígeno se vuelve un sustrato limitante, el pH rápidamente se incrementa (Kevács *et al.*, 1995).

EL comportamiento del OD contra el tiempo es similar al comportamiento del pH (Tabla C-5), se observa un mínimo de 1,72 y 1,624 mg L⁻¹ de OD sin diferencias significativas entre estos valores durante los días 6 y 9 para las células que crecen en condiciones de luz y luego el OD se incrementa hasta un valor de 2,34 mg L⁻¹. Para las células que crecen en oscuridad el OD también disminuyó a partir del día 6 del cultivo a un valor de 2,29 mg L⁻¹ para incrementarse posteriormente a un valor cercano a 2,81 mg L⁻¹ al final del cultivo. La reducción de la concentración de oxígeno disuelto conduce a una menor tasa de crecimiento seguida por una fase estacionaria (Kevács *et al.*, 1995). Pépin *et al.* (1995) encontraron un comportamiento similar de OD para cultivos de *Vitis vinifera*, donde la concentración de OD varió marcadamente durante el experimento, disminuyendo de 80 % de saturación a un valor mínimo de 17 % de saturación durante los días 5 y 7 del cultivo, incrementándose nuevamente entre los días 11 y 14 del cultivo a valores de 53 % de

saturación y decreciendo nuevamente. Ellos explicaron este comportamiento demostrando que al día 7 la concentración de biomasa permaneció baja (60 g PF L^{-1}), así como la viscosidad del cultivo y la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) fue máxima durante este tiempo, por lo que el valor mínimo de OD correspondió a la velocidad máxima de consumo de oxígeno (OUR). Posteriormente la concentración de biomasa aumentó y el OUR disminuyó, la tasa específica de consumo de oxígeno (q_{O_2}) disminuyó a partir del día 7. Cuando se alcanzó la segunda mayor concentración de OD la concentración de la biomasa se había incrementado alrededor de 2 veces, así como la viscosidad del cultivo.

Asimismo, durante el período de crecimiento de las células clorofilicas en suspensión de *Bouteloua gracilis*, se realizó el seguimiento del contenido de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total y carotenoides (Tabla C-13). Las concentraciones de pigmentos permanecen prácticamente constantes desde el día cero hasta el día tres, tiempo a partir del cual comienzan a aumentar, hasta llegar a valores máximos de clorofila total y carotenoides de $278 \mu\text{g g}^{-1} \text{ PF}$ y $109 \mu\text{g g}^{-1} \text{ PF}$ respectivamente para el día 6 del cultivo. Al final del cultivo los niveles de clorofila (*a*, *b* y total) no son significativamente diferentes a los valores de pigmentos iniciales (Figura 3-8), pero se observó una disminución en la concentración de clorofila (*a*, *b* y total) y carotenoides para el día 12 comparado con el día 6, esta reducción podría estar relacionada al agotamiento de algunos nutrientes en el medio.

Para las células en oscuridad se observa que la concentración de pigmentos es muy baja, y tiende a disminuir con el tiempo de cultivo. Al calcular la relación de clorofila *a/b* se encuentran valores entre 2,32 y 2,63 para el crecimiento de las células en condiciones de luz, valores que concuerdan con los reportados en la literatura para células obtenidas a partir de hojas, cultivos embriogénicos y FA de *Glycine max* (Zhang *et al.*, 2001). Para las células heterotróficas que crecieron en oscuridad, la relación de clorofila *a/b* es mucho menor a los valores reportados por la literatura, entre 0,58 y 1,03.

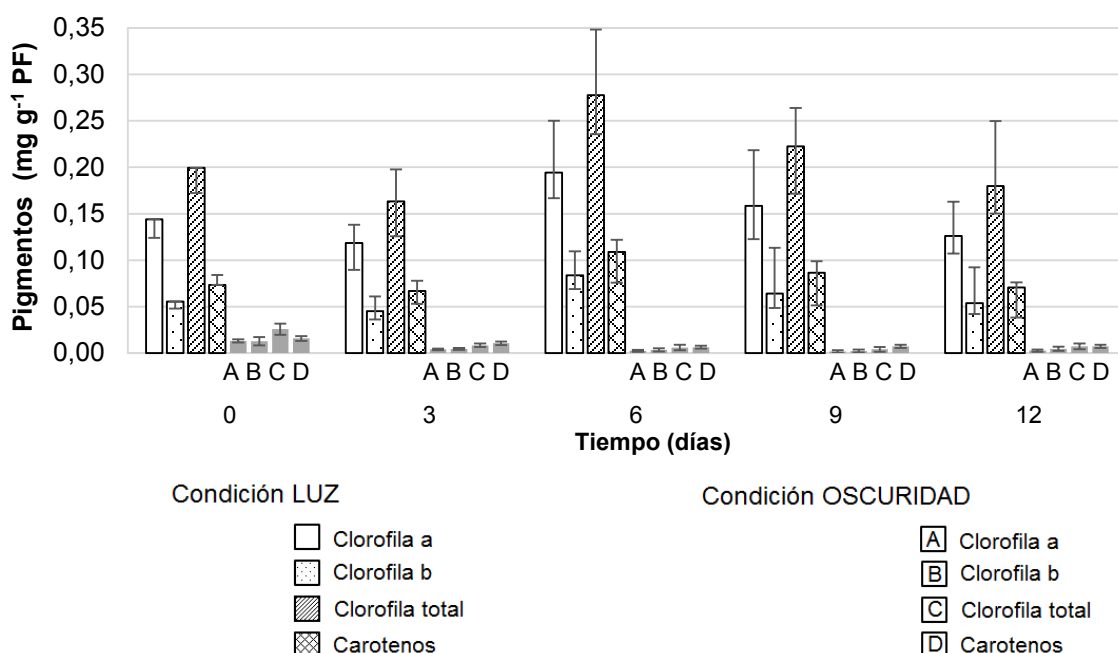


Figura 3-8 Perfil de pigmentos para el cultivo heterotrófico de células de *Bouteloua gracilis* en matraz, en condiciones de luz y oscuridad.

La determinación de clorofila *a* y *b* y la relación clorofila *a/b* han jugado un papel importante en las investigaciones de como las plantas superiores y las algas adaptan su aparato fotosintético durante la aclimatación a nuevos regímenes de luz para hacer un uso óptimo de las intensidades y calidades de luz ambiente (Porra, 2002). Algunos ejemplos de altas y bajas relaciones de clorofila *a/b* en hojas de diferentes estados de desarrollo y crecimiento de hojas completamente desarrolladas a bajas y altas condiciones de luz, se presentan en la tabla 3-2.

Tabla 3-2 Hojas con altas y bajas relaciones de clorofila *a/b*

Altas relaciones a/b	Bajas relaciones a/b
Verdeamiento de hojas etioladas (4,0 - 10)	Hojas verdes completamente desarrolladas (2,5-3,5)
Hojas expuestas al sol (3,0- 3,8)	Hojas en sombra (2,4 a 2,7)
Hojas de plantas C ₄ (3,0- 5,0)	Hojas de plantas C ₃ (2,5- 3,5)

Fuente: Lichtenthaler y Buschmann (2001)

Las relaciones de clorofila a/b y clorofila $(a+b)/\text{carotenoides totales } (x+c)$, son un indicador del verdor de las plantas. La relación $(a+b)/(x+c)$ normalmente se sitúa entre 5,5 y 7,0 para las hojas expuestas a la sombra. Menores valores de la relación $(a+b)/(x+c)$ son un indicador de senescencia, estrés o daño de la planta o de su aparato fotosintético, lo cual se expresa por una descomposición más rápida de clorofilas que de carotenoides. Las hojas que son más amarillas exhiben valores para la relación $(a+b)/(x+c)$ de 3,5 o valores menores de 2,5 a 3,0 que indican el proceso de senescencia. Durante el desarrollo de cromoplastos en frutas, la relación alcanza valores de 1,0 (Lichtenthaler y Buschmann, 2001; Porra; 2002).

De acuerdo a Widholm (1992) el contenido de clorofila total en los cultivos fotoautotróficos se encuentra en el intervalo de 30 a 2000 $\mu\text{g g}^{-1}\text{PF}$, siendo el nivel promedio de la mayoría de los cultivos 200 $\mu\text{g g}^{-1}\text{PF}$ aproximadamente. En la suspensión celular heterotrófica clorofílica y bajo las condiciones experimentales, se encontró que el contenido de clorofila total varió entre 163 y 222 $\mu\text{g g}^{-1}\text{PF}$, dentro del ciclo de crecimiento y el contenido de carotenoides entre 67 y 109 $\mu\text{g g}^{-1}\text{PF}$. El contenido de clorofila en el inóculo inicial del cultivo clorofílico fue de 200 $\mu\text{g g}^{-1}\text{PF}$.

Se ha encontrado que la sacarosa inhibe la acumulación de clorofila en cultivos de células verdes de *Spinacia oleracea* (Dalton y Street, 1977), *Solanum tuberosum* (LaRosa *et al.*, 1984) y *Euphorbia characias* (Hardy *et al.*, 1987). A pesar que las células clorofílicas de *Bouteloua gracilis* están adaptadas a altas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo (3%) y se alcanzan niveles de clorofila relativamente altos, a medida que la sacarosa se va agotando en el medio los niveles de clorofila aumentan hacia la mitad del cultivo alcanzando el máximo contenido de pigmentos al día 6 con 278, 194 y 84 $\mu\text{g g}^{-1}\text{PF}$ para clorofila total, a y b , respectivamente. En cuanto a concentración de carotenoides, al día 6 se alcanzó también el mayor contenido de este pigmento con 109 $\mu\text{g g}^{-1}\text{PF}$. Los carotenoides son componentes esenciales de la maquinaria fotosintética y juegan un papel crítico en la prevención del daño foto-oxidativo, además los carotenoides son componentes estructurales y funcionales de los cloroplastos los cuales ayudan a capturar la luz en los centros de reacción y en los complejos de recolección de luz extendiendo la absorción de la luz dentro de las regiones azul y verde del espectro (Pogson *et al.*, 1998; Howitt y Pogson, 2006; Cazzonelli, 2011).

Hüsemann (1984) consideró un incremento en peso seco de 300 % dentro de los 10 días de cultivo y un alto contenido de clorofila (más de 70 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF) como prerequisite para la iniciación de un cultivo celular fotoautotrófico. Los niveles de clorofila (180 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF) y el incremento en el PF (1825 %) a los 12 días de cultivo de las células clorofílicas de *Bouteloua gracilis* están dentro de los niveles requeridos para la iniciación de cultivos FA. Contrario a los hallazgos de otros investigadores (Bergmann, 1967; Hüsemann y Barz, 1977; Yamada *et al.*, 1978; Chaumont y Gudin, 1985), se encontró que el 2,4-D no fue perjudicial para el desarrollo de los cloroplastos, al menos no con la concentración usada de 1 mg L⁻¹. Sin embargo, no se probó la conveniencia de utilizar otras auxinas tales como ácido naftalenacético o ácido indolbutírico, las cuales son más compatibles con la acumulación de clorofila.

3.3.2 Caracterización de las suspensiones celulares fotomixotróficas

Los resultados iniciales, correspondientes a esta parte, están relacionados con el seguimiento del crecimiento del cultivo de las células en suspensión fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis* con respecto a un control. En los tratamientos se probaron tres concentraciones diferentes de sacarosa (0,25 %, 0,1 % y 0,05 %) y 3 % de CO₂; los controles tenían las mismas concentraciones de sacarosa, pero sin CO₂ en la atmósfera del cultivo. Se registró el pH, el OD, la concentración de pigmentos y el incremento de la biomasa en PF a lo largo de 11 días de cultivo. El propósito fue verificar el potencial de las células H para el establecimiento de una línea celular fotoautotrófica, ya que se conoce que la flexibilidad adaptativa de las células FM cultivadas ha sido el factor más importante en el establecimiento de la mayoría de los cultivos FA (LaRosa *et al.*, 1984).

En la Tabla C-26 se presentan los resultados de la cinética inicial de crecimiento de las células desarrolladas con tres concentraciones de sacarosa y 3 % de CO₂, con sus respectivos controles (matraces con la misma concentración de sacarosa, pero sin CO₂). El crecimiento celular observado en los controles y en los tratamientos fue totalmente dependiente de la sacarosa, según el análisis estadístico (Tabla C-27). Sin embargo, hay

que tener en cuenta que las células comienzan lentamente el proceso de adaptación a las nuevas condiciones de CO₂ en el ambiente del cultivo.

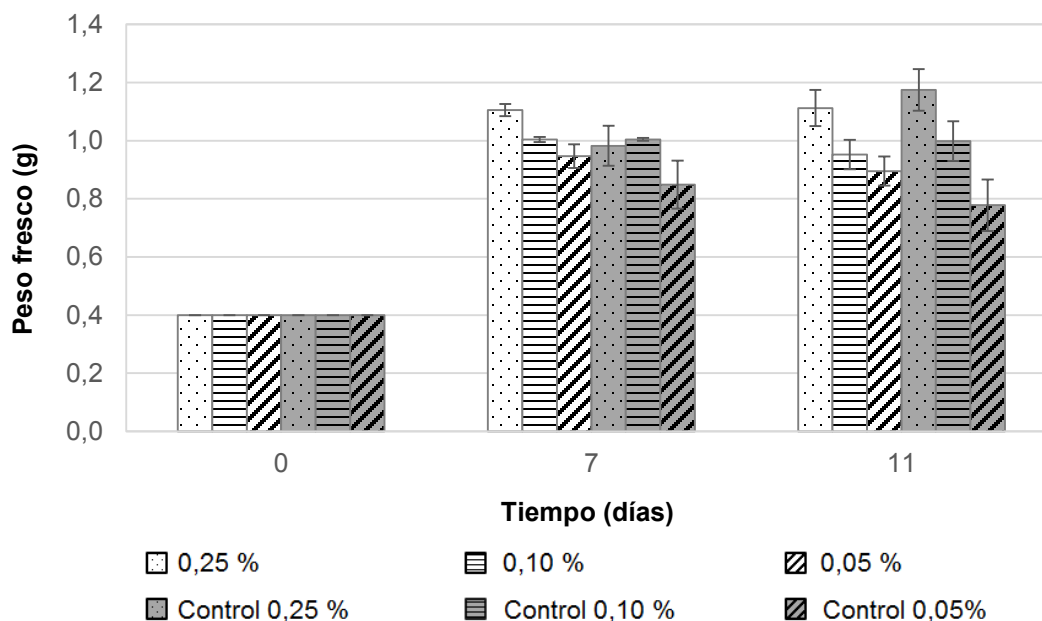


Figura 3-9 Cinética del crecimiento del cultivo en suspensión fotomixotrófico con diferentes concentraciones de sacarosa en el medio y 3% de CO₂.

Visualmente se encontró que los controles con 0,1 % y 0,05 % de sacarosa pierden clorofila, mientras que las células que crecieron con 0,1 % y 0,05 % de sacarosa y una atmósfera de 3% CO₂ mantuvieron el color verde más allá del día 11 del cultivo (Figura 3-14), lo que indica el potencial de estas células para el establecimiento de suspensiones fotosintéticas estables después de un proceso de adaptación que incluye la disminución gradual de sacarosa en el medio y el enriquecimiento de la atmósfera de cultivo con CO₂. El crecimiento del cultivo en suspensión fotomixotrófico se presenta en la Figura 3-9.

Los cultivos celulares fotomixotróficos tienen cloroplastos fotosintéticamente activos que experimentan fotoasimilación junto con la asimilación de azúcar del medio de cultivo y ambos fenómenos soportan el crecimiento celular (Wang *et al.*, 1989). Estos sistemas celulares tienen potencial para la selección de variantes fotosintéticas, porque tienen fotosistemas I y II completamente funcionales (Wang *et al.*, 1989).

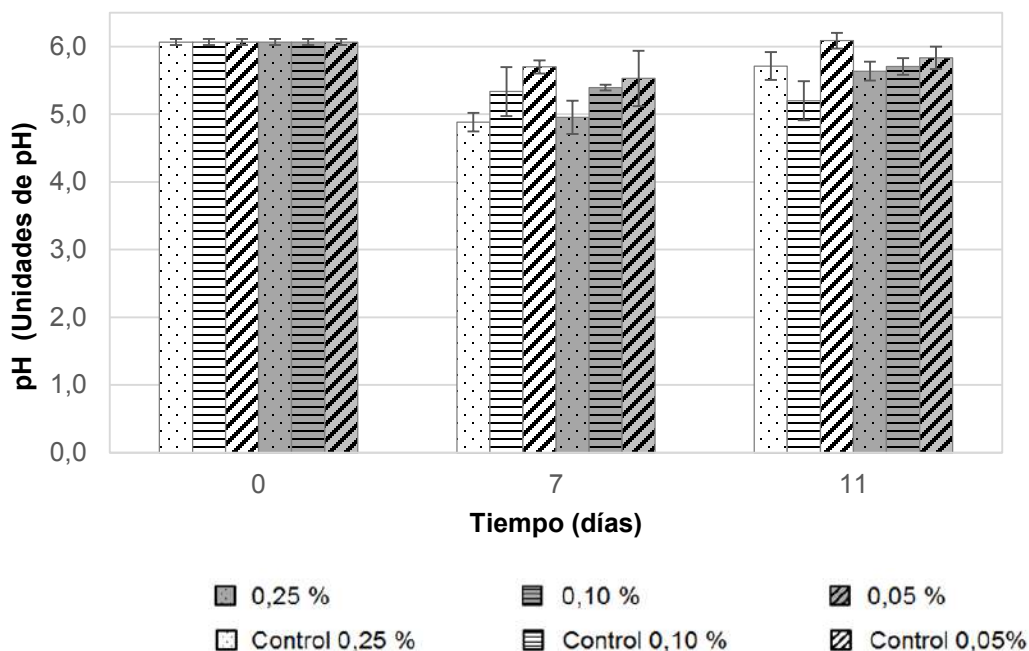


Figura 3-10 Comportamiento del pH para el cultivo fotomixotrófico de células de *Bouteloua gracilis* en matraz con diferentes concentraciones de sacarosa en el medio y 3 % de CO₂.

En la Tabla C-34 se observa el comportamiento del pH para el cultivo FM de células de *Bouteloua gracilis*. El comportamiento es similar entre tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa y 3 % de CO₂ en la atmósfera del cultivo y sus respectivos controles. En todos los casos el pH decrece a valores cercanos a 5,0 para el día 7 de cultivo y se incrementa estabilizándose en valores cercanos al pH inicial del cultivo al día 11 (Figura 3-10). De acuerdo al análisis de varianza (Tabla C-35) el efecto de las diferentes concentraciones de sacarosa tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre el comportamiento del pH ($p \leq 0,05$).

De acuerdo al análisis de varianza (Tabla C- 43) el efecto de la concentración de 3 % de CO₂ sobre el OD fue estadísticamente significativo ($p \leq 0,05$). La concentración de OD fue ligeramente mayor en los tratamientos con CO₂ que en los controles (Tabla C-42), esto podría ser explicado por el cambio de metabolismo de los cultivos fotomixotróficos que empiezan a hacer fotosíntesis.

En la Figura 3-11 se muestra el comportamiento del OD por unidad de biomasa en peso fresco. Se observa que a partir del día 7 para los tratamientos y controles, la concentración de OD por g de PF de células de *Bouteloua gracilis*, permanece prácticamente constante, en un intervalo entre 0,12 mg OD g⁻¹ PF y 0,18 mg OD g⁻¹ PF. Estos valores son mayores a los encontrados en cultivos heterotróficos adaptados a 3% de sacarosa que corresponden a 0,08 mg OD g⁻¹ PF (Figura 3-7).

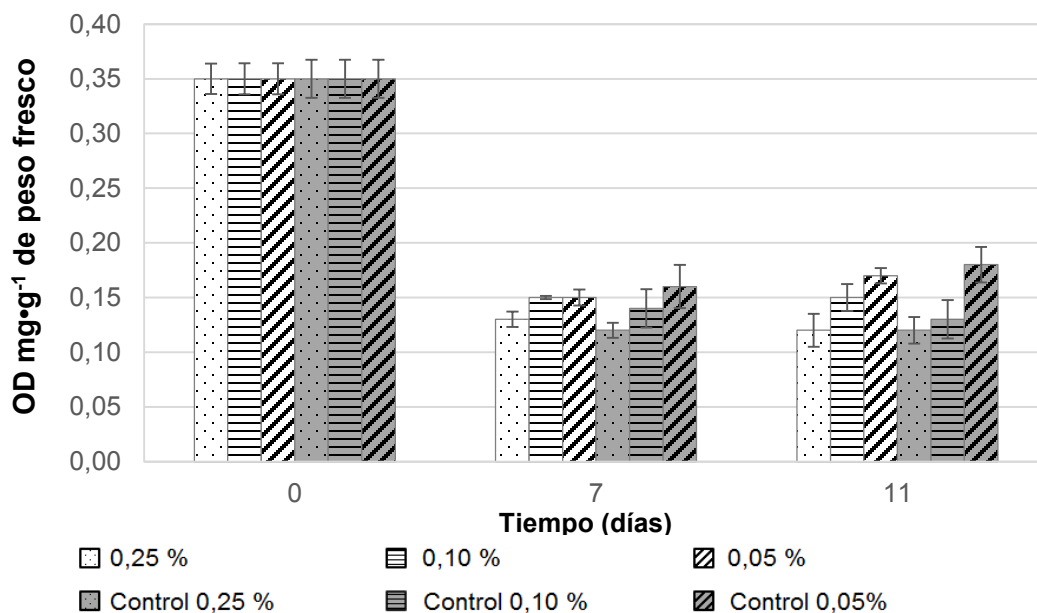


Figura 3-11 Comportamiento del OD por unidad de biomasa para el cultivo fotomixotrófico de células de *Bouteloua gracilis* con diferentes concentraciones de sacarosa en el medio y 3 % de CO₂.

En la Tabla C-50 se presentan los valores correspondientes al contenido de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total y carotenoides de las células fotomixotróficas en suspensión de *Bouteloua gracilis* con 3 % de CO₂ en la atmósfera de cultivo y diferentes concentraciones de sacarosa, así como de sus respectivos controles. Según el análisis estadístico el factor que afecta la concentración de pigmentos (clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total y carotenoides) fue la concentración de azúcar, mientras que la concentración de CO₂ no tiene un efecto significativo sobre la concentración de clorofilas y carotenoides durante el tiempo de cultivo (Tablas C-51, C-58, C-65 y C-64). La concentración de pigmentos aumenta desde el día cero hasta el día siete, tiempo a partir del cual las concentraciones de clorofila se mantienen constantes o empiezan a disminuir principalmente para los

controles con 0,1 % y 0,05 % de sacarosa en el medio (Figura 3-12 y 3-13). El tratamiento y el control que corresponden a 0,25 % de sacarosa son los que mejor crecimiento presentan y acumulan mayor cantidad de pigmentos durante el periodo de cultivo, hasta llegar a una concentración de 133 y 154 μg de clorofila total g^{-1} PF, respectivamente y una concentración de carotenoides de 53 y 60 μg g^{-1} PF, respectivamente (Figura 3-13). Aunque las diferencias de la concentración de pigmentos entre las células que crecieron con 0,10 % de sacarosa y 3% de CO_2 y el control correspondiente no son significativas, visualmente se nota que las células que crecieron con 3 % en la atmósfera de cultivo son más verdes (Figura 3-14), por lo que se decidió empezar a realizar la adaptación a condiciones fotoautotróficas con las células que crecieron a 0,1 % de sacarosa en el medio y una atmósfera de 3 % de CO_2 .

Al calcular la relación de clorofilas *a/b* se encuentran valores en el intervalo entre 0,84 y 2,5 para el crecimiento de las células en condiciones fotomixotróficas y sus controles. El factor que tiene un efecto significativo sobre la relación de clorofilas *a/b* fue la concentración de sacarosa en el medio de cultivo. Además, las células FM mantuvieron su genotipo verde aún después de 4 años de cultivo.

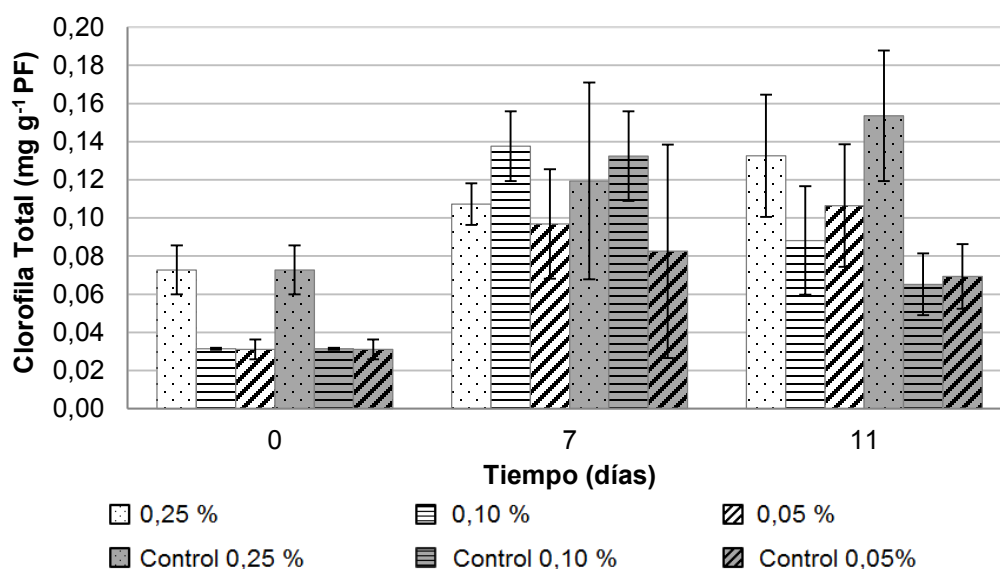


Figura 3-12 Clorofila total para el cultivo fotomixotrófico de células de *Bouteloua gracilis* en matraz, tratamiento y control.

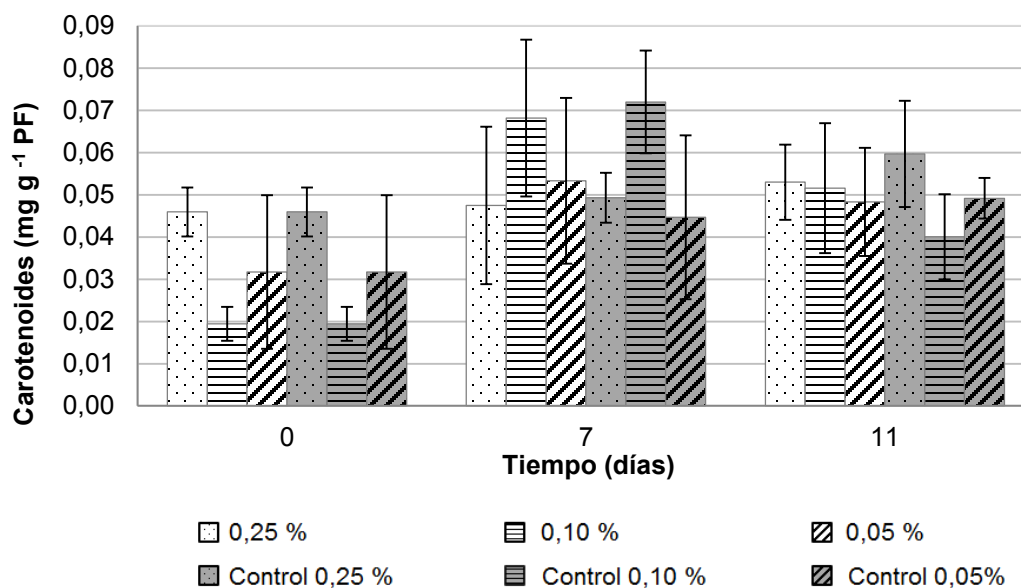


Figura 3-13 Carotenoides totales para el cultivo fotomixotrófico de células de *Bouteloua gracilis* en matraz, tratamiento y control.

A continuación se presentan fotos de ensayos iniciales del crecimiento fotomixotrófico de células de *Bouteloua gracilis*.



Figura 3-14 Cultivos celulares fotomixotróficos después de 11 días de iniciado el cultivo.

El ciclo de crecimiento de la línea fotomixotrófica de *Bouteloua gracilis* mostró grandes diferencias con la línea celular heterotrófica madre, debido a que empezó el proceso de adaptación a las condiciones de baja concentración de sacarosa en el medio y una atmósfera enriquecida con 3% de CO₂. Las células heterotróficas (controles) a 0,1 % y 0,05 %, como se observa en la foto, no se adaptan a bajas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo por lo que con el tiempo empiezan a perder clorofila y a tornarse de color marrón (Figura 3-14). Mientras que las células cultivadas con las mismas concentraciones de sacarosa en el medio y una atmósfera de 3% de CO₂ se adaptan lentamente con cada subcultivo, y van aumentando su tasa de crecimiento y su concentración de pigmentos a través del tiempo. Se hizo una inspección visual rutinaria de la adaptación del cultivo fotomixotrófico con 0,1 % de sacarosa en el medio y 3 % de CO₂, se realizaron subcultivos cada 15 días aproximadamente hasta obtener suspensiones adaptadas a las cuales se les disminuía progresivamente la sacarosa en el medio de cultivo.

3.3.3 Caracterización de las suspensiones celulares fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis*

Los cultivos fueron adaptados utilizando medio MPC que contenía medio MS suplementado con 2,4-D (1 mg L⁻¹), BA (2 mg L⁻¹), adenina (40 mg L⁻¹), sin sacarosa y 3% de CO₂ en el medio ambiente de cultivo. Esta línea celular fotoautotrófica se subcultivó por más de 48 meses mostrando un crecimiento estable y continuo (Figura 3-15 y 3-16).

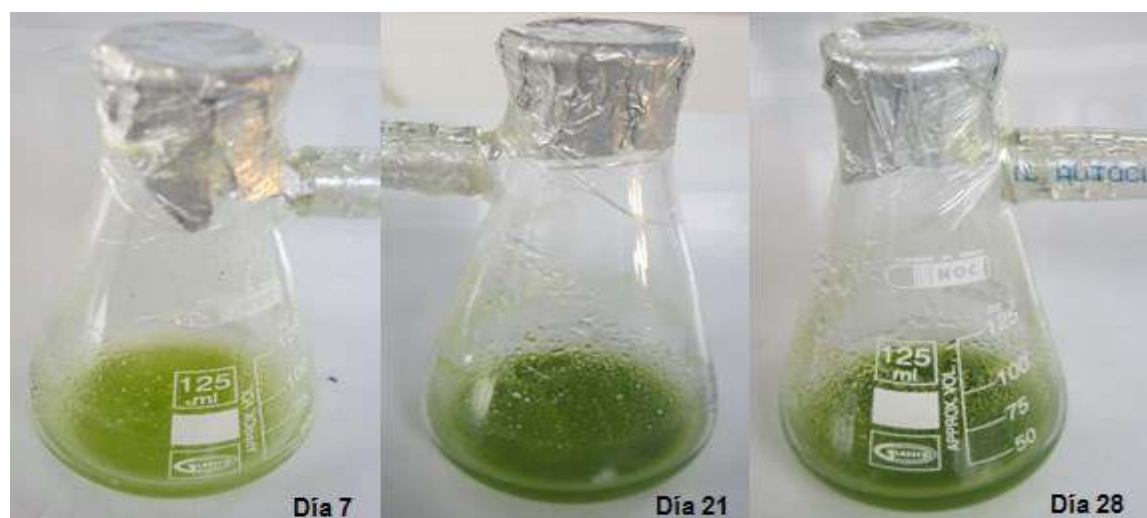


Figura 3-15 crecimiento fotoautotrófico de células de *Bouteloua gracilis*.

Los resultados correspondientes a esta parte del capítulo, están relacionados con el seguimiento que se realizó al cultivo de células fotoautotróficas en suspensión de *Bouteloua gracilis*. Durante 4 semanas se registraron la conductividad, el pH, el consumo de oxígeno disuelto, el incremento del peso fresco de las células, la concentración de pigmentos y el consumo de aniones en el medio de cultivo.



Figura 3-16 Células FA filtradas para la determinación de peso fresco.

El incremento del peso fresco en el cultivo FA que creció en medio MPC sin sacarosa con 3 % de CO₂, se acumuló inicialmente de forma más lenta que en cualquiera de los cultivos cuyo crecimiento fue soportado por 3% de sacarosa en el medio de cultivo (Figura 3-5). Sin embargo, los valores de esta variable se incrementaron continuamente durante las 4 semanas que duró el experimento (Tabla C-79), después del cual el cultivo FA exhibió una cantidad de peso fresco comparable al 56 % del cultivo heterotrófico en condiciones de luz y de 61 % del cultivo heterotrófico en condiciones de oscuridad.

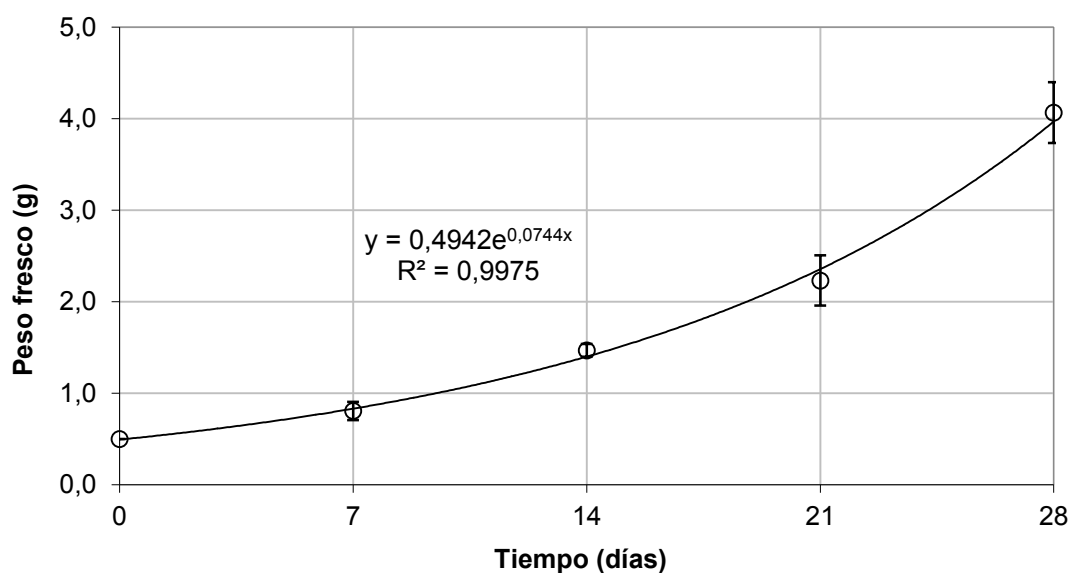


Figura 3-17 Cinética de crecimiento del cultivo fotoautotrófico de células de *Bouteloua gracilis*.

El crecimiento de la línea celular fotoautotrófica en los 28 días que duró el cultivo se ajustó a un modelo de exponencial (Figura 3-17), con una velocidad de crecimiento de $0,0744 \text{ d}^{-1}$ y un tiempo de duplicación de 9,38 días. Los tiempos de duplicación de muchos cultivos fotoautotróficos se encuentran en el intervalo de 6 a 12 días para *Glycine max*, *Datura innoxia*, *Gossypium hirsutum*, *Amaranthus powellii* y *Nicotiana tabacum* (Tabla 3-3).

Tabla 3-3 Tiempos de duplicación de algunas líneas celulares fotoautotróficas que crecen con 5% de CO_2 .

Línea celular	Tiempo de duplicación (d)	Referencia
<i>Gossypium hirsutum</i> (COT-P)	6	(Blair <i>et al.</i> 1988)
<i>Glycine max</i> variedad Corsoy (SB-P)	8	(Horn <i>et al.</i> 1983)
<i>Glycine max</i> PI 437833	9	(Rogers y Widholm 1988)
<i>Amaranthus powellii</i> (APO-P)	12	(Xu <i>et al.</i> 1988)
<i>Datura innoxia</i> (DAT-P)	13	(Xu <i>et al.</i> 1988)
<i>Nicotiana tabacum</i> - <i>Nicotiana glutinosa</i> (NTG-P)	13	(Xu <i>et al.</i> 1988)

Se presenta el comportamiento de la conductividad (Tabla C-88), variable que tiende a disminuir a lo largo del tiempo de cultivo debido al consumo de las sales que se encuentran disueltas en el medio (Figura 3-18). Esta variable indica la concentración de iones disueltos en el medio de crecimiento ya que un descenso de la conductividad se relaciona con el consumo de nutrientes por parte de las células en suspensión. Esta variable está en relación inversa con el crecimiento celular, puesto que si aumenta el número de células, éstas consumirán más nutrientes y descenderá la conductividad (Taya *et al.*, 1989; Godoy-Hernández y Vázquez, 2012).

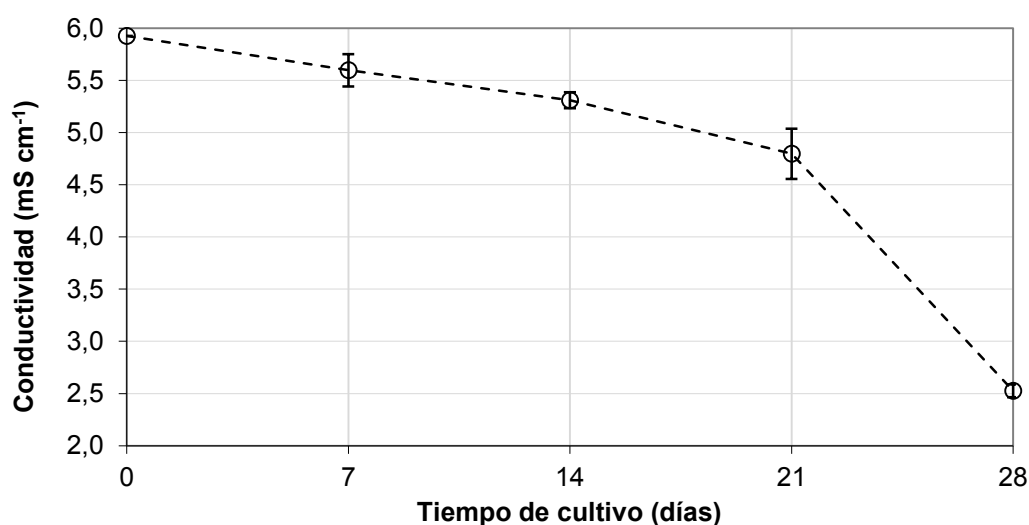


Figura 3-18 Comportamiento de la conductividad para el cultivo fotoautotrófico de células de *Bouteloua gracilis* en matraz.

En la suspensión FA, la conductividad desciende de manera brusca cuando se incrementa rápidamente la masa de células, lo que ocurre a partir del día 21 y hasta el día 28. No se realizaron determinaciones de la conductividad más allá de este día pero se esperaría que la conductividad se mantenga en valores inferiores a 2,53 mS cm⁻¹ cuando el cultivo entre en fase estacionaria.

Pensando en el modo de efectuar una medida indirecta de la biomasa en el biorreactor, se realizó la correlación entre la biomasa y la conductividad. Se establecieron dos nuevas variables a partir de los datos existentes, para relacionar la conductividad con el incremento en la biomasa (Otálvaro-Álvarez, 2009). Estas variables fueron:

$$IC_t = (X_t - X_0)/X_0 \quad (\text{Godoy-Hernández y Vásquez, 2013})$$

IC_t : índice de crecimiento en el tiempo t.

X_t : biomasa en el tiempo t.

X_0 : biomasa inoculada (t=0).

Los valores de IC_t y % de K_{0t} se presentan en la Tabla 3-4.

Tabla 3-4 Valores de IC_t y % de K_0 evaluados a cada condición de tiempo durante los 28 días de cultivo de las células de *Bouteloua gracilis* en matraz.

Tiempo de cultivo (d)	% de K_0^*	IC_t
0	100,00	0,000
7	94,43	0,616
14	89,60	1,939
21	80,93	3,464
28	42,62	7,131

*Los valores iniciales de K_0 y X_0 , son 6,06 mS/cm y 0,5 g respectivamente

Con estos valores se procedió a realizar una gráfica para establecer una relación lineal entre ellos. De la Figura 3-19 obtiene la siguiente relación:

$$IC_t = -0,12 * \left(\frac{K_t}{K_0} \right) * 100 + 12,62$$

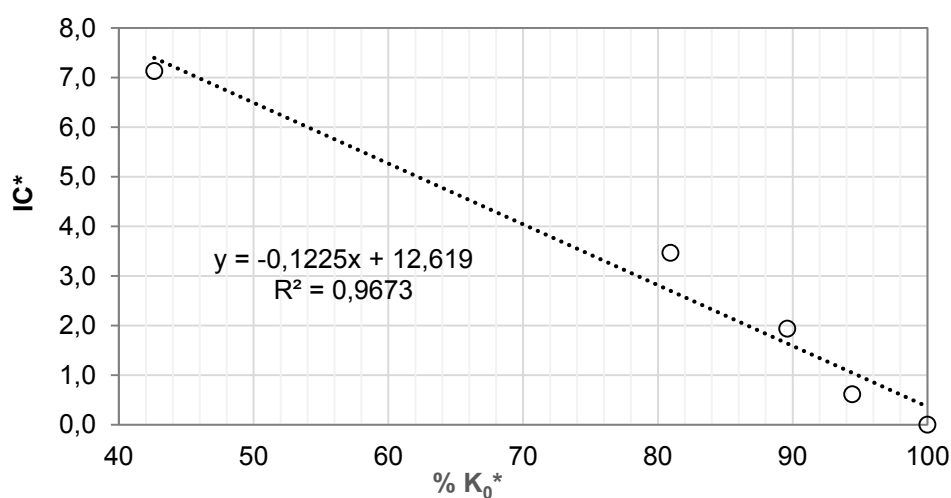


Figura 3-19 Relación entre el IC^* y % de K_0^* , para el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en matraz.

Para los datos experimentales obtenidos se tiene un índice de correlación de 0,97. En este caso si se quisiera determinar la biomasa en un tiempo t , ésta sería equivalente a:

$$x_t = (x_0 \times IC_t) + x_0 \quad (\text{Otálvaro-Álvarez, 2009})$$

Este índice es usado para evaluar la generación de biomasa durante el tiempo de cultivo. Los índices reportados en este trabajo son calculados con respecto a pesos frescos.

Se ha demostrado la factibilidad de monitorear mediante la medición de conductividad el crecimiento de la biomasa en los cultivos de células vegetales (Ryu *et al.*, 1990). Taya *et al.*, (1989) mostraron que existía una relación lineal entre la masa celular en peso seco y el cambio en la conductividad para los cultivos en suspensión de *Coffea arabica*, *Nicotiana tabacum*, *Withania somnifera*, y *Catharanthus roseus*. Ellos demostraron que el efecto del pH (4,5-7,0) y los cambios en la concentración de azúcar (0 a 1 %) pueden ser despreciados. Ryu *et al.* (1990) encontraron una buena correlación lineal entre la disminución de la conductividad y el incremento en el peso seco de las células. El coeficiente de crecimiento celular, el cual corresponde a un incremento en la concentración celular por unidad de volumen por mS cm^{-1} equivale al consumo de los nutrientes iónicos por parte de las células y fue prácticamente constante en un valor cercano a $4,6 \text{ g células L}^{-1} (\text{mS/cm})^{-1}$. Ellos midieron el efecto de otros nutrientes importantes sobre la conductividad y no encontraron un efecto significativo, por lo que concluyeron que el cambio en la conductividad eléctrica fue debido al cambio en la concentración de los compuestos iónicos del medio tales como minerales, ión amonio, nitratos, fosfatos, entre otros.

En la Figura 3-20 se observa el comportamiento del pH para el cultivo FA de *Bouteloua gracilis*. El pH del cultivo fotoautotrófico disminuyó a un valor cercano a 4,0 la primera semana del cultivo, obteniéndose el menor valor al día 21 (3,54), tiempo a partir del cual el pH tiende a incrementarse hasta alcanzar un valor cercano a 4,5 hacia el final del cultivo. Esta disminución del pH concuerda con el mayor crecimiento celular y con el comienzo de la disminución rápida en las sales del medio, medida como conductividad eléctrica.

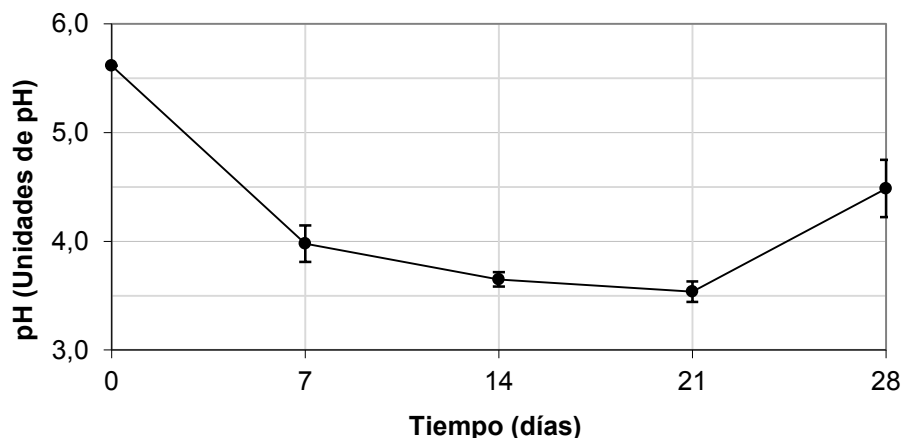


Figura 3-20 Comportamiento del pH para el cultivo fotoautotrófico de células de *Bouteloua gracilis* en matraz.

La concentración de oxígeno disuelto disminuyó hasta el día 21 del crecimiento fotoautotrófico de las células de *Bouteloua gracilis* (Tabla C-85), posteriormente la concentración de OD aumentó hasta que su concentración final fue de 61 % del valor inicial. La mayor disminución de OD correspondió al menor valor de pH, un rápido descenso de la conductividad eléctrica y la mayor pendiente del crecimiento celular. Se observa que el OD aumenta al final del cultivo, debido a que las células FA crecieron exclusivamente mediante el proceso de fotosíntesis. En la Figura 3-21 se muestra el comportamiento del OD por unidad de biomasa, se observa que al día 28, la concentración de OD g⁻¹ de PF de células de *Bouteloua gracilis*, tiende a un valor de 0,02 mg OD g⁻¹ PF (Figura 3-19). Este valor es 4 veces menor al encontrado en cultivos heterotróficos que crecieron con 3 % de sacarosa, el cual correspondió a 0,08 mg OD g⁻¹ PF (Figura 3-7).

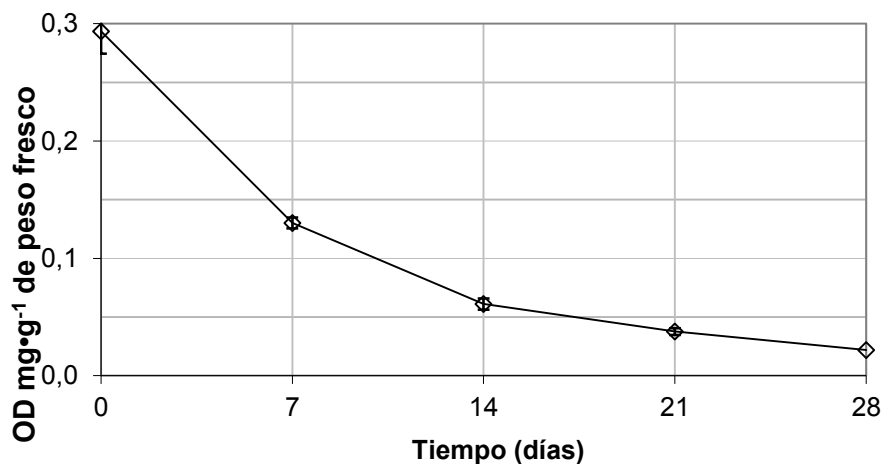


Figura 3-21 Comportamiento del OD por unidad de biomasa para el cultivo fotoautotrófico de células de *Bouteloua gracilis* en matraz.

Se alcanzaron concentraciones de 489 μg de clorofila total por g de PF y 228 μg de carotenoides por g PF al día 14 del cultivo fotoautotrófico, y la relación de clorofila *a/b* estuvo en el intervalo de 1,92 a 2,58. La presencia de luz y de un aparato fotosintético competente son prerequisites para el crecimiento en un ambiente en el cual el CO_2 es la única fuente de carbono (Ziegler y Scheibe, 1989). El rápido crecimiento de los cultivos FA mantenidos a 3 % de CO_2 fue posible debido a la presencia de una maquinaria fotosintética bien desarrollada desde el inicio del experimento. El crecimiento del cultivo FA al día 14 se correlacionó con un aumento en la síntesis de pigmentos (Tabla C-97). Posteriormente la concentración de pigmentos permaneció prácticamente constante sin diferencias significativas entre los valores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total y carotenoides hasta el día 28 del cultivo. Esto indica que el crecimiento de los cultivos FA en términos de desarrollo fotosintético no se completó en las 4 semanas que duró el experimento (Figura 3-22) pues no hubo disminución de clorofila y carotenoides de las células.

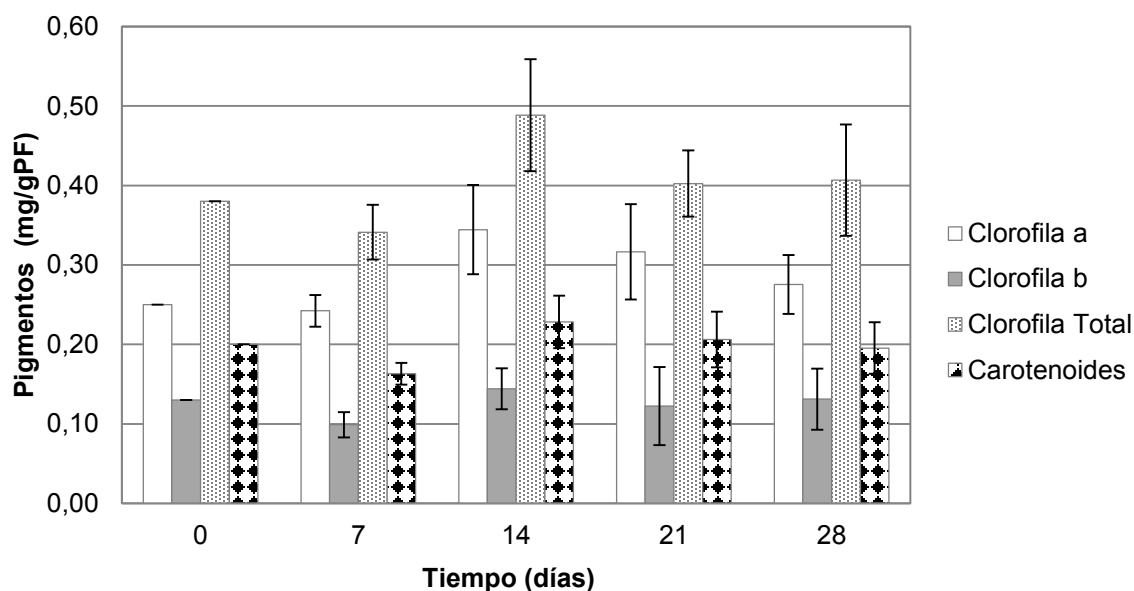


Figura 3-22 Perfil de pigmentos para el cultivo fotoautotrófico de células de *Bouteloua gracilis* en matraz.

Las diferencias importantes entre los cultivos FA, FM y H es que los cultivos FA y FM son capaces de renovar su crecimiento al transferirlos a medio fresco luego de 12 y 8 semanas de cultivo respectivamente, mientras que los cultivos H pierden la viabilidad a los 15-20 días si no se subcultivan nuevamente en medio fresco con concentraciones de sacarosa entre 0,25 y 3 %. Esto puede ser debido a las bajas velocidades de crecimiento de los cultivos FM y FA y también podría corresponder con los hallazgos de Ziegler y Scheibe (1989), relacionados con el contenido constante de proteínas solubles diferentes a Rubisco

y la no disminución en la mayoría de las actividades enzimáticas medidas, lo cual sugiere que algunos aspectos del crecimiento celular estaban aún en progreso después de un mes del cultivo en los cultivos fotosintéticos. La particular longevidad de los cultivos FA cultivos cuenta, por lo tanto, con una fase prolongada de metabolismo altamente activo, el cual en etapas tardías probablemente representa la subsistencia de la fotoautotrofia.

En la Tabla C-118 y la Figura 3-23 se presenta el consumo de fluoruro, cloruro, nitrato, fosfato y sulfato presentes en el medio de cultivo, durante un tiempo de 28 días. El fosfato y el sulfato se consumieron en 96 y 76 % respectivamente. Mientras que el consumo de nitrato fue de 54 %. Se presentan las concentraciones de fluoruro y cloruro cuyo consumo fue de 40 y 27 % respectivamente. De acuerdo a la figura 3-23 se puede decir que el fosfato y el sulfato se consumen rápidamente y que el fosfato puede ser uno de los compuestos limitantes para el crecimiento fotoautotrófico después de los 28 días de cultivo.

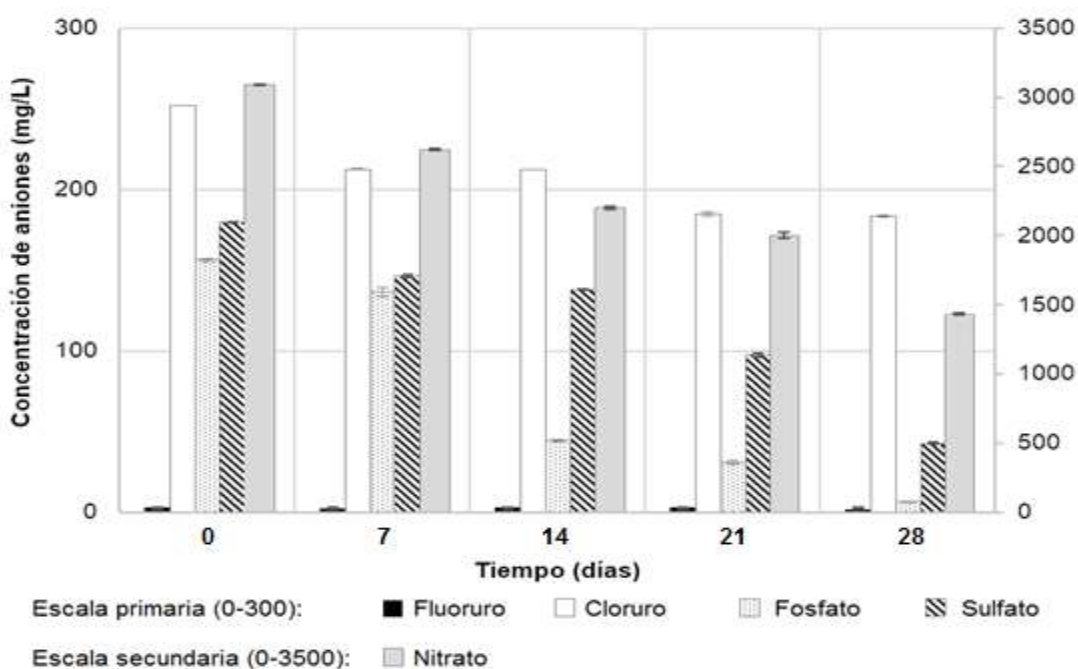


Figura 3-23 Cambio en la concentración de aniones en el medio nitrato (NO_3^-), fosfato (PO_4^{3-}) y sulfato (SO_4^{2-}) durante un ciclo de crecimiento de 28 días para los cultivos fotoautotróficos de *Bouteloua gracilis*.

La conductividad del medio está relacionada con la concentración de los iones principales como el (NO_3^-), se observa una disminución de la conductividad eléctrica entre 5,9 y 2,54 mS cm^{-1} a medida que se consume rápidamente el nitrato en el cultivo. Esto concuerda con los hallazgos de Taya *et al.* (1989) quienes reportaron que la principal contribución a

la disminución de la conductividad del medio fue el consumo de nitrato por parte de células de *Glycine max*.

3.3.4 Efecto de diferentes niveles de CO₂ sobre los cultivos en suspensión fotoautotróficos

Se evaluó el efecto de 0,5 %, 1 % y 2 % v/v de CO₂ sobre el crecimiento fotoautotrófico de los cultivos en suspensión de *Bouteloua gracilis*, la acumulación de pigmentos y la disminución de aniones en el medio de cultivo y se comparó el crecimiento con la línea celular fotoautotrófica adaptada a 3 % v/v de CO₂. Se realizaron las cinéticas de crecimiento fotoautotrófico (Tabla 3-24) a diferentes concentraciones de CO₂ en la atmósfera del cultivo. La Figura 3-24 presenta además el incremento en peso fresco (PF) de los cultivos.

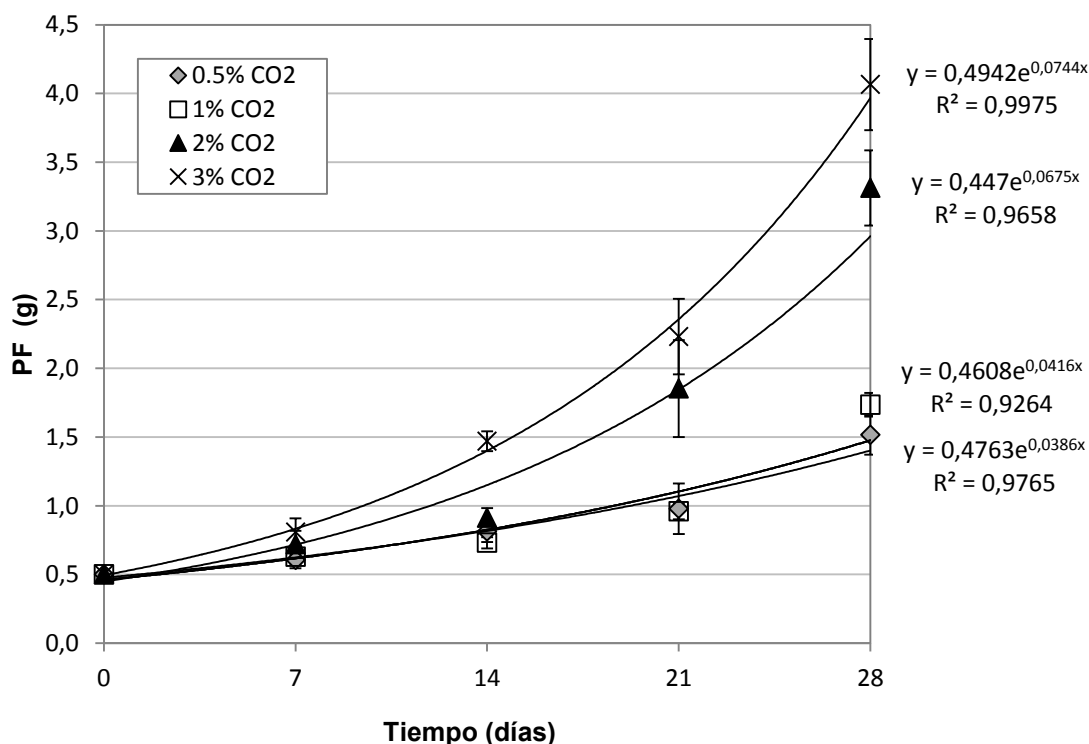


Figura 3-24 Comparación de la cinética de crecimiento de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* a diferentes concentraciones de CO₂ en el medio ambiente de cultivo.

Tabla 3-5 Resumen de las velocidades específicas de crecimiento para diferentes concentraciones de CO₂ en el ambiente de cultivo.

Concentración de CO ₂ (% v/v)	Tasa de crecimiento μ (d ⁻¹)	Tiempo de duplicación (d)
0,5	0,038	18,24
1,0	0,042	16,46
2,0	0,068	10,25
3,0	0,074	9,39

Del resumen anterior se puede concluir que el menor tiempo de duplicación corresponde a la línea celular fotoautotrófica que creció a 3 % v/v de CO₂ y el mayor tiempo de duplicación se presenta cuando la concentración de CO₂ en el medio de cultivo es de 0,5 %. En ocasiones, los cultivos celulares presentan una fase lag en el crecimiento, debido a la adaptación de las células a las nuevas condiciones, pero aquí esta fase se pudo haber suprimido por la elevada concentración celular inicial de 20 g L⁻¹. Después de 28 días las células aún no entran en la fase estacionaria; sin embargo, visualmente se notó que los cultivos continuaban viables aún después de tres meses de iniciado el cultivo.

En la Figura 3-25 se muestra el comportamiento del pH para las células fotoautotróficas expuestas a diferentes concentraciones de CO₂ en la atmósfera del cultivo. El pH disminuye hasta valores cercanos a 3,8 al día 21 del cultivo para los tres ensayos realizados (Tabla C-91), esto ocurre a diferentes velocidades y disminuye más rápidamente a medida que se va incrementando el peso de las células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis*. A partir del día 21 del cultivo se observa en las curvas de cinética que la pendiente de crecimiento aumenta. En todos los cultivos celulares de *Bouteloua gracilis* se ha observado el mismo perfil de valores de pH por lo que esta variable podría ser usada como un método indirecto de medición del crecimiento celular para esta especie en particular.

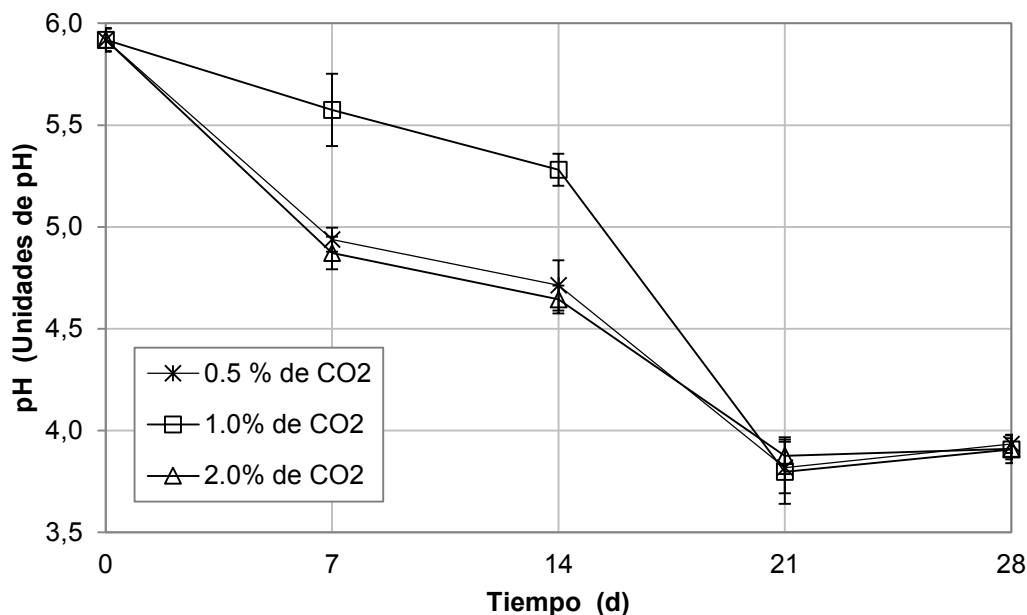


Figura 3-25 Comportamiento del pH para el cultivo fotoautotrófico de células de *Bouteloua gracilis* en matraz para diferentes concentraciones de CO₂.

Se determinó la mejor concentración de CO₂ en el ambiente de cultivo para inducir el mayor crecimiento y acumulación de clorofila en células FA de *Bouteloua gracilis*. Con 0,5 % de CO₂ se obtuvo el menor crecimiento y una menor acumulación de clorofila en las células, 223 ± 28 µg de clorofila total por gramo de PF a la semana 3 de iniciado el cultivo, a partir de este día la concentración de pigmentos permanece constante. La relación de clorofilas *a/b* de 2,19 fue la menor entre todos los tratamientos con diferentes concentraciones de CO₂ y se alcanzó al día 21 del cultivo (Figura 3-26 y Tabla C-97). Se reporta en la literatura que la acumulación de pigmentos y la relación clorofila *a/b* se mejora por la exposición de las células a atmósferas enriquecidas con CO₂ (Vargas-Suarez *et al.*, 1996).

A concentraciones de CO₂ correspondientes a 1,0% y 2,0 % se obtuvieron valores máximos de clorofila total de $378 \mu\text{g g}^{-1}$ de PF y $735 \mu\text{g g}^{-1}$ PF al día 14 del cultivo, respectivamente (Figuras 3-27 y 3-28). Las mayores relaciones de clorofila *a/b* fueron de 2,77 y 2,43 para el día 21, con las dos condiciones de CO₂ en el medio de cultivo. A 3,0 % de CO₂ en la atmósfera de cultivo también se encontró que la relación de clorofilas *a/b* fue de 2,58 para el día 21 del cultivo.

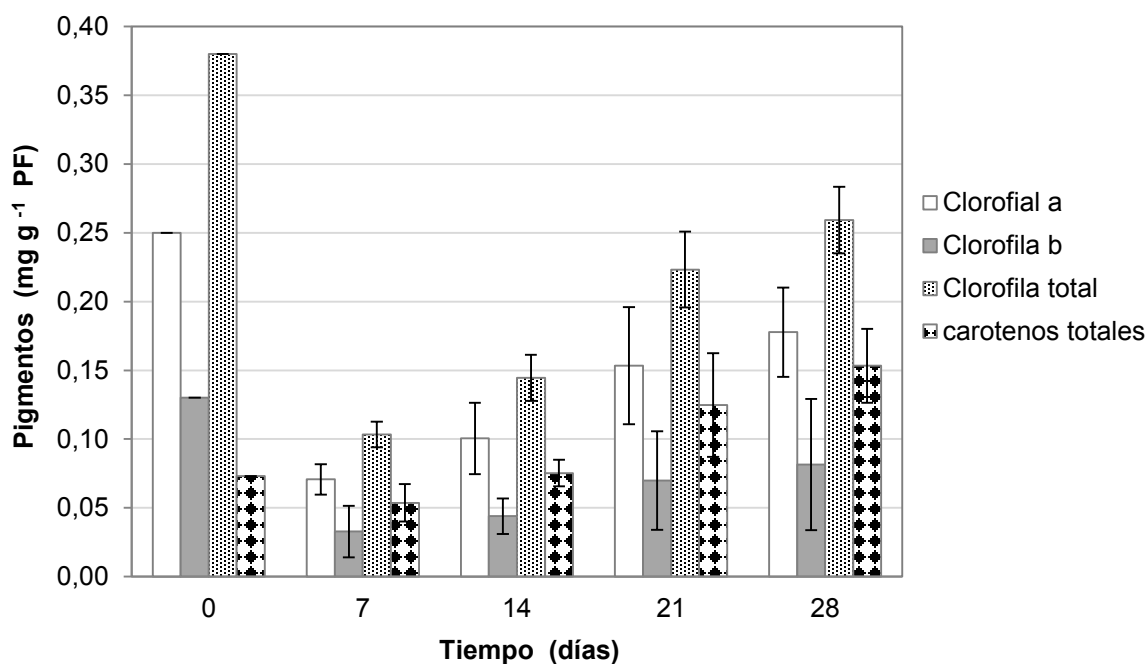


Figura 3-26 Perfil de pigmentos para el cultivo fotoautotrófico de células de *Bouteloua gracilis* en matraz a 0,5 % de CO₂.

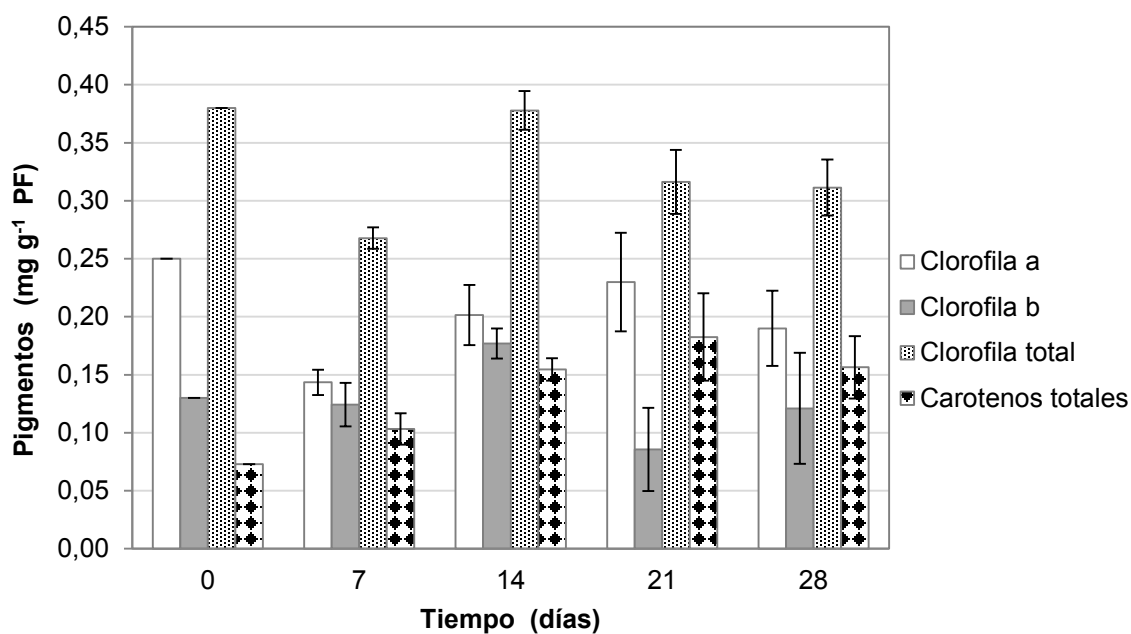


Figura 3-27 Perfil de pigmentos para el cultivo fotoautotrófico de células de *Bouteloua gracilis* en matraz a 1,0 % de CO₂.

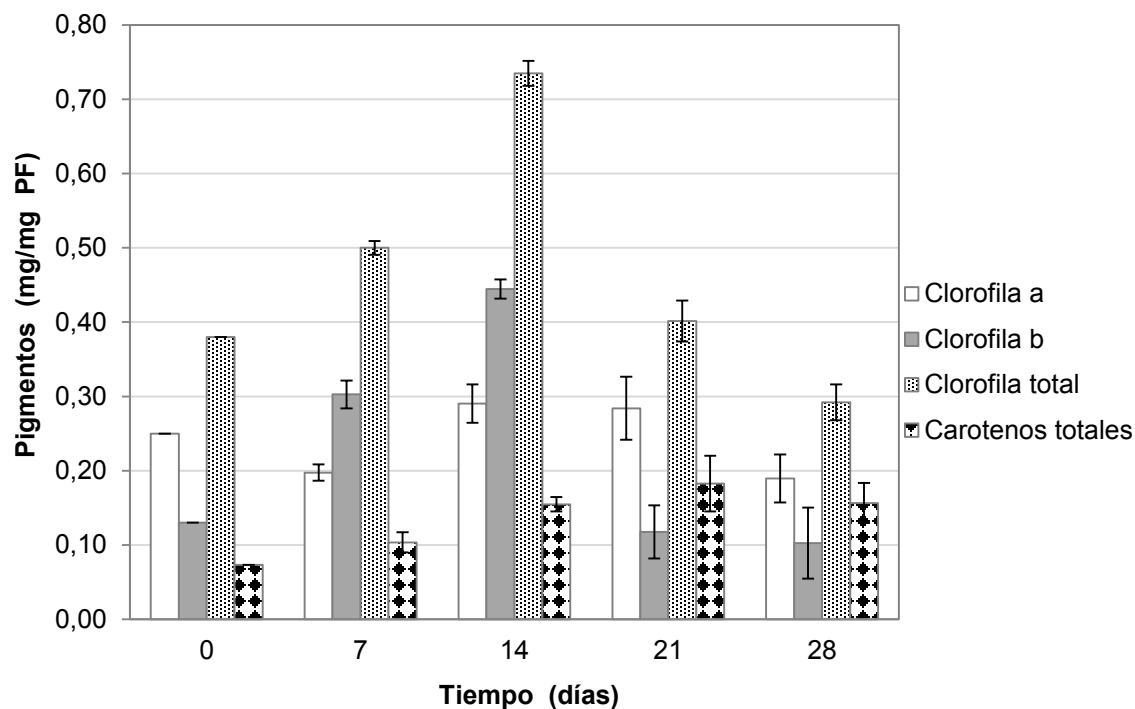


Figura 3-28 Perfil de pigmentos para el cultivo fotoautotrófico de células de *Bouteloua gracilis* en matraz a 2,0 % de CO₂.

En la Tabla C-118 y las Figuras 3-29, 3-30 y 3-31 se presenta la disminución de aniones en el medio de cultivo a diferentes concentraciones de CO₂ (0,5, 1 y 2 %). Se puede ver que el fosfato y el sulfato son consumidos muy rápidamente por las células fotoautotróficas, principalmente en los cultivos que crecieron a 1 y 2 % de CO₂, en la atmósfera del cultivo, debido a que a estas condiciones se incrementa la velocidad de crecimiento de las células. El sulfato se agota totalmente a concentraciones de 1 y 2 % de CO₂ en la atmósfera del cultivo, confirmándose que es una de las sales limitantes para el crecimiento de las células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis*. El nitrato se consume a una velocidad menor que el sulfato y fosfato y está relacionado principalmente con el aumento en el pH y la disminución de la conductividad eléctrica en el medio de cultivo.

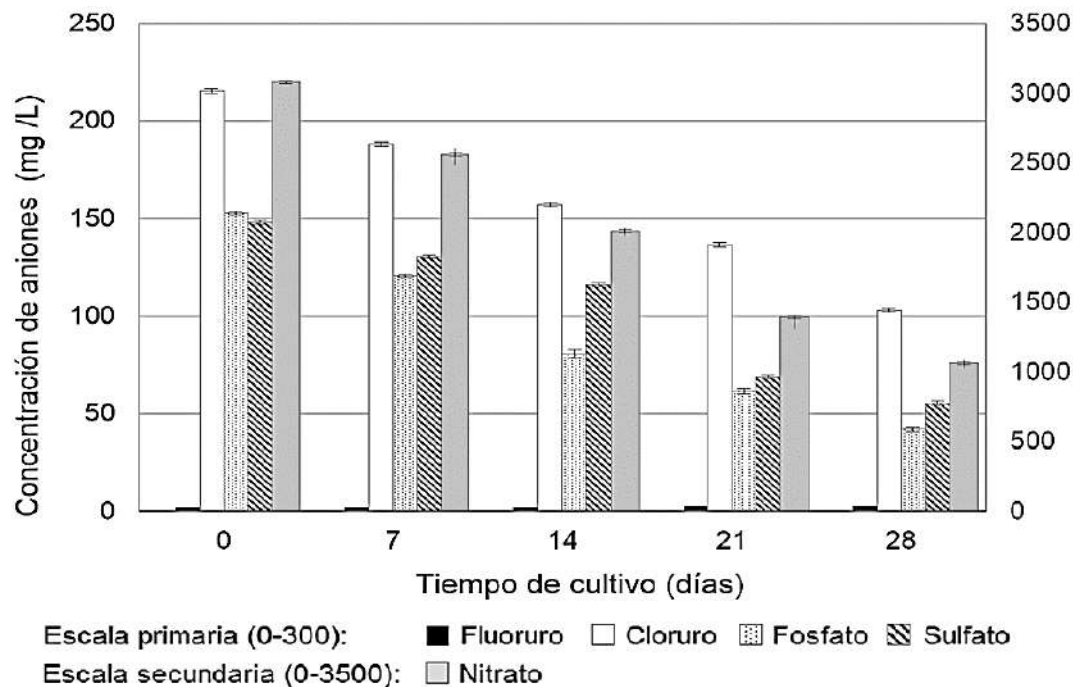


Figura 3-29 Cambio en la concentración de aniones en el medio (NO_3^-), fosfato (PO_4^{3-}) y sulfato (SO_4^{2-}) durante un ciclo de crecimiento de 28 d para los cultivos fotoautotróficos de *Bouteloua gracilis* en matraz a 0,5 % de CO_2 .

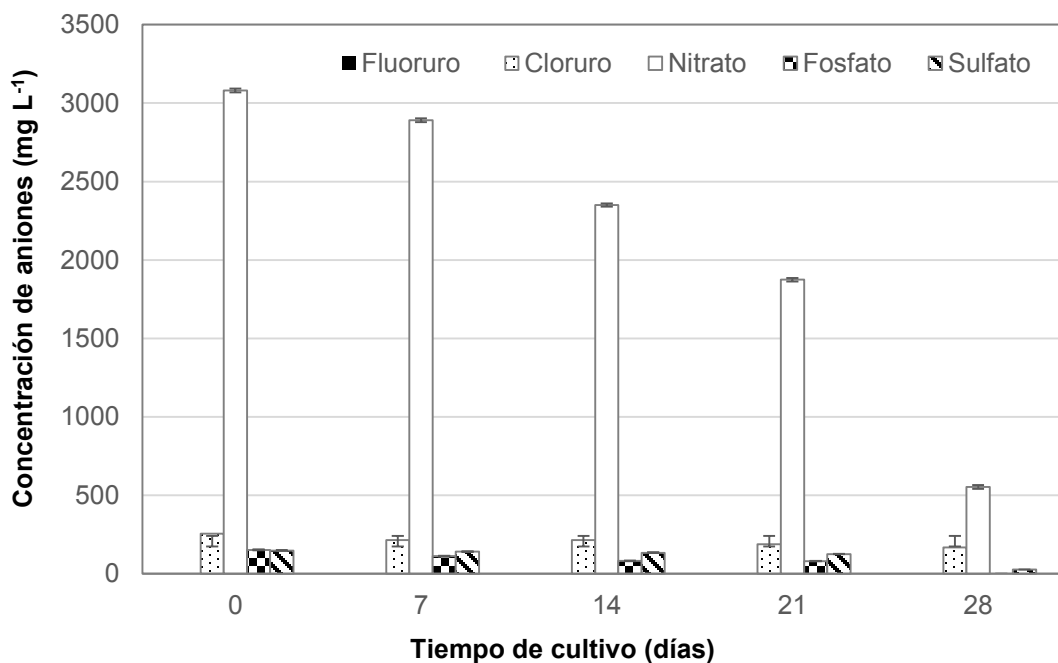


Figura 3-30 Cambio en la concentración de aniones en el medio (NO_3^-), fosfato (PO_4^{3-}) y sulfato (SO_4^{2-}) durante un ciclo de crecimiento de 28 d para los cultivos fotoautotróficos de *Bouteloua gracilis* en matraz a 1,0 % de CO_2 .

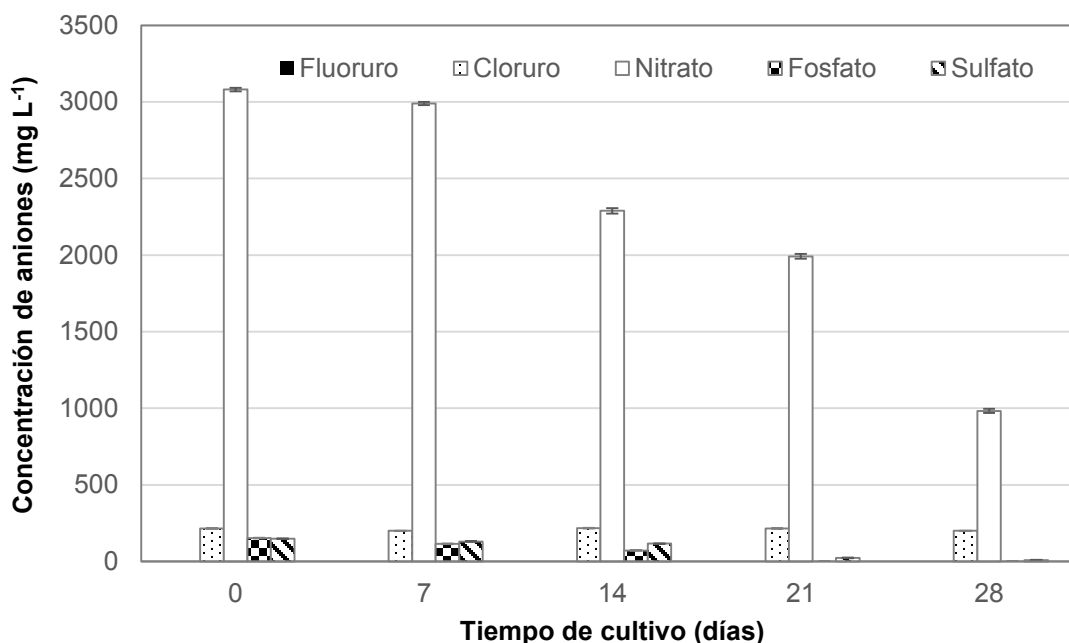


Figura 3-31 Cambio en la concentración de aniones en el medio (NO_3^-), fosfato (PO_4^{3-}) y sulfato (SO_4^{2-}) durante un ciclo de crecimiento de 28 d para los cultivos fotoautotróficos de *Bouteloua gracilis* en matraz a 2,0 % de CO_2 .

3.4 Conclusiones

Los experimentos presentados aquí demostraron por primera vez que las células cultivadas en suspensión de *Bouteloua gracilis* pueden crecer fotoautotróficamente por un periodo mayor a 4 años. El crecimiento fue promovido por la luz ($100 \mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y la concentración de CO_2 (0,5 a 3 % v/v) en el medio ambiente del cultivo. La línea celular fue iniciada de una suspensión heterotrófica clorofílica que se subcultivó fotomixotróficamente disminuyendo paulatinamente la sacarosa en el medio (desde 0,1 % hasta 0 %) con 3 % de CO_2 en aire. Cuando se alcanzó un crecimiento estable del cultivo, después de 2 años de adaptación, el tiempo de duplicación fue de 9,39 días y la tasa de crecimiento (μ) de $0,074 \text{ d}^{-1}$. Los niveles de clorofila total se incrementaron desde el primer subcultivo fotomixotrófico (0,1 % de sacarosa en el medio y 3 % de CO_2) de $138 \mu\text{g g}^{-1} \text{PF}$ a valores de $489 \mu\text{g g}^{-1} \text{PF}$, cuando el cultivo fotoautotrófico fue establecido.

La suspensión celular fotoautotrófica, presenta una mayor concentración de pigmentos que las suspensiones celulares heterotróficas y fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis*. Se observó una mayor concentración intracelular de clorofila total ($489 \mu\text{g g}^{-1}$ PF) a la mitad del cultivo (día 14), posteriormente el contenido de clorofila total disminuyó a valores iguales a la concentración inicial del cultivo, y esto posiblemente podría estar relacionado al agotamiento de algunos nutrientes en el medio.

Al comparar el crecimiento de las células fotoautotróficas a diferentes niveles de CO_2 se demostró que al incrementar la concentración de CO_2 de 0,5 a 3 %, la velocidad de crecimiento de las células aumenta dos veces. Adicionalmente, se encontró que la acumulación de pigmentos en las células también aumenta cuando se incrementa la concentración de CO_2 .

Para determinar de manera indirecta el crecimiento de las suspensiones celulares H, FM y FA de *Bouteloua gracilis*, se pueden establecer relaciones con la conductividad del medio de cultivo, obteniéndose buenos coeficientes de correlación. Adicionalmente los cultivos heterotróficos, fotomixotróficos y fotoautotróficos pueden ser monitoreados mediante el registro de la disminución del pH, el comportamiento del oxígeno disuelto, y el consumo de iones en el medio ya que estas variables están relacionadas con el crecimiento de las células en suspensión de *Bouteloua gracilis*.

3.5 Recomendaciones

Se recomienda trabajar con fuentes de carbono diferentes a la sacarosa, como por ejemplo glucosa y almidón, las cuales han demostrado ser convenientes para mejorar la acumulación de pigmentos fotosintéticos. Basados en este conocimiento se propone evaluar el efecto de otros carbohidratos sobre el desarrollo de los cloroplastos y células fotomixotróficas con una atmósfera enriquecida con CO_2 , previo al desarrollo de una línea celular fotoautotrófica.

Evaluar el efecto de otros tipos de auxinas y su concentración en el medio sobre el crecimiento y la acumulación de clorofila por parte de las células heterotróficas, fotomixotróficas y fotoautotróficas también sería importante.

Sería conveniente evaluar el consumo de iones amonio y otros cationes presentes en el medio de cultivo para correlacionar estos datos con el comportamiento del pH y la disminución de la conductividad eléctrica en los tres tipos de cultivos celulares.

El método de cultivo propuesto en la tesis es más fácil de manejar que los matraces de dos niveles y permite una presión parcial constante de CO₂ en el sistema cerrado del cultivo. Sin embargo para próximos trabajos, se recomienda monitorear la concentración de CO₂ durante el cultivo para asegurar que permanezca constante y si no es así cambiar la solución buffer K₂CO₃/KHCO₃ para que el crecimiento continúe en las mismas condiciones.

Evaluar la posibilidad de adaptar la línea celular fotoautotrófica de *Bouteloua gracilis* a condiciones de CO₂ ambientales (0,035 %).

Caracterizar las células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en cuanto a sus características fisiológicas, como por ejemplo determinación de tasas fotosintéticas mediante la evolución de oxígeno, determinación del punto de compensación, actividades de las enzimas principales involucradas en el proceso de fotosíntesis (Rubisco y PEP carboxilasa) y análisis de la ultraestructura de los cloroplastos.

4 CULTIVO DE CÉLULAS FOTOAUTOTRÓFICAS DE *Bouteloua gracilis* EN BIORREACTOR DE TANQUE AGITADO

Células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* fueron cultivadas en un biorreactor de tanque agitado (volumen de trabajo, 2 L). Se definieron las condiciones de aireación y agitación, i.e. el tipo de agitador (turbina Rushton), velocidad de agitación (100 rpm), velocidad de aireación (0,5 vvm), e irradiancia ($250 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) para lograr el crecimiento celular. Bajo estas condiciones, las células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* incrementaron su peso fresco cerca de 5,38 veces después de 13 días de cultivo. En el cultivo fotomixotrófico, la concentración de CO_2 en aire fue de 5 %, y 0,1 % de sacarosa en el medio de cultivo, la masa de las células se incrementó 2,35 veces en los 38 días de cultivo, y en el caso de las células fotoautotróficas que crecieron con la misma concentración de CO_2 en aire, pero sin sacarosa en el medio de cultivo, el incremento en peso fresco de las células fue de 2,04 en 26 días.

Palabras clave: *Bouteloua gracilis*, fotobiorreactor, cultivo fotoautotrófico.

4.1 Introducción

Las células vegetales en suspensión son capaces de crecer en sistemas de cultivo a gran escala. Ésto ya ha sido demostrado desde 1950 cuando diversos cultivos celulares heterotróficos de diferentes especies fueron exitosamente cultivados en tanques aireados y reactores de tanque agitado (Kieran *et al.*, 1997). Estos biorreactores fueron equipados con agitadores mecánicos para lograr un buen mezclado, evitar la sedimentación celular y asegurar a las células un suministro suficiente de nutrientes y oxígeno. El concepto de agitación mecánica, que fue desarrollado originalmente para la propagación de

microorganismos, también es apropiado para el crecimiento de los cultivos celulares vegetales en suspensión en volúmenes de hasta varios miles de litros (Kieran *et al.*, 1997). Los reactores de tanque agitado han sido siempre convenientes para la propagación de cultivos celulares vegetales y se han propuesto diseños alternativos de biorreactores (Eibl y Eibl, 2009). Las ventajas del reactor de tanque agitado son su aplicación a nivel industrial por la capacidad que tiene de manejar grandes volúmenes; además, permite mantener condiciones homogéneas lo que aporta mayor facilidad para la toma de muestras, el monitoreo y el control del equipo. Una limitante de este sistema radica en el uso de impulsores mecánicos para la agitación, debido a la sensibilidad de corte de las células vegetales necesitando bajas velocidades de agitación (<100 rpm). Sin embargo, las modificaciones que se han implementado tanto al tipo de impulsor como a la altura y posición, han dado resultados satisfactorios para el cultivo de células de algunas especies vegetales y la producción de metabolitos secundarios (Orozco *et al.*, 2002; Eibl y Eibl, 2009).

Velicky y Martin (1970) usaron un reactor de frasco invertido una combinación de turbulencia e inyección de gas para agitar células de *Ipomoea*. Wagner y Vogelmann (1977) compararon las eficiencias de diferentes diseños de biorreactores sobre el crecimiento de suspensiones de *Morinda citrifolia* y sobre la producción de antraquinonas. Ellos encontraron que las células que crecieron en biorreactores “airlift” tuvieron la más alta productividad y concluyeron que los reactores impulsados por aire fueron superiores para el cultivo de algunas células vegetales. Es generalmente aceptado que los biorreactores tipo “airlift” pueden tener ventajas para el cultivo de células en suspensión, ya que el gas usado para agitación produce bajo estrés mecánico lo cual contrasta con los reactores de tanque agitado convencionales. La sensibilidad de las células vegetales al estrés hidrodinámico es esencialmente causada por su tamaño y por las paredes celulares rígidas. Los reactores tipo “airlift” fueron exitosamente usados para la propagación de suspensiones vegetales heterotróficas, fotomixotróficas y fotoautotróficas (Hüsemann, 1982; 1983; Fischer *et al.*, 1994; 1995).

Los cultivos fotoautotróficos representan un tipo especial de cultivos celulares, los cuales están caracterizados por su habilidad para crecer mediante la asimilación de CO₂ en presencia de luz, en un medio sin suplementos orgánicos. Un cultivo exitoso de células FA a gran escala generalmente depende de un suministro suficiente de luz y CO₂ a las células. En los últimos 30 años se reportan muy pocas investigaciones con respecto a los cultivos

celulares FA en sistemas de biorreacción, y la mayoría de estos trabajos estaban limitados a pequeños biorreactores con volúmenes de trabajo que no exceden los 2,0 L (Dalton, 1980; Hüsemann, 1982; Peel, 1982). Bender *et al.* (1985) y Yamada *et al.* (1981) realizaron experimentos de cultivos a escala 5,0 L, pero se alcanzaron pobres velocidades de crecimiento para células autotróficas de *Daucus carota*, *Arachis hipogaea* y *Nicotiana tabacum* ($0,06\text{ d}^{-1}$). Solo hay un reporte de Fischer *et al.* (1994) que describe un sistema de biorreacción tipo “airlift” con velocidades de crecimiento altas ($0,223\text{ d}^{-1}$) y reproducibles por al menos 37 ciclos de crecimiento.

En este capítulo de la tesis se muestra el crecimiento de las células H, FM y FA en un biorreactor de tanque agitado. Se utilizó como material de inóculo, los cultivos heterotróficos, fotomixotróficos y fotoautotróficos crecidos en matraz. Se midieron varias variables rutinariamente, como por ejemplo pH, oxígeno disuelto, conductividad, clorofila, carotenoides, y consumo de algunos iones del medio de cultivo para elucidar las características de crecimiento de las células H, FM y FA a nivel de biorreactor. Hasta donde se sabe, esta es la primera investigación donde se escala un cultivo fotoautotrófico de una gramínea en un biorreactor de tanque agitado de 2 L.

4.2 Metodología

4.2.1 Adaptación del sistema de biorreacción para el cultivo de células H, FM y FA de *Bouteloua gracilis*

Inicialmente, los cultivos de células vegetales heterotróficos, fotomixotróficos y fotoautotróficos de células de *Bouteloua gracilis* en suspensión crecieron en matraces de 125 mL, con volúmenes de medio de aproximadamente 25 mL, probando los efectos de diferentes variables sobre el cultivo hasta establecer las mejores condiciones para el crecimiento del mismo, después de una adaptación prolongada. Las condiciones permitieron un balance adecuado entre la generación de biomasa y la generación de clorofila para mantener la viabilidad de los cultivos en suspensión heterotróficos, fotomixotróficos y fotoautotróficos. Luego de esto, se buscó que los procesos fueran viables a una escala de producción mayor, pasando de los matraces al nivel de biorreactor.

Después de analizar las diferentes configuraciones de los sistemas de biorreacción presentados para el cultivo de células fotoautotróficas en suspensión de diferentes

especies vegetales (Tabla 1-3) y teniendo en cuenta la disponibilidad del equipo, las condiciones de operación y sus ventajas y desventajas, se optó por adaptar un fotobiorreactor de tanque agitado para el cultivo de células vegetales de *Bouteloua gracilis*. Con este biorreactor se puede lograr un mezclado adecuado para evitar la sedimentación celular y asegurar un suministro suficiente de nutrientes, oxígeno y CO₂, así como la facilidad para la toma de muestras, el monitoreo y control del cultivo.

A nivel experimental se contó con un reactor Applikon Z61101C006, de 3,2 L de capacidad (H/D=1,9), el cual disponía de un sistema de control de temperatura por medio de un intercambiador de calor, una sonda para la toma de muestras y un sistema de agitación (turbina Rushton), en el cual se podía controlar la velocidad de la agitación. No se instalaron en el interior del reactor sensores de pH y oxígeno disuelto. El aire empleado para el crecimiento provenía del compresor ubicado en los Laboratorios de Ingeniería Química, y era conducido a través de mangueras de silicona a una unidad de mezcla de gases para obtener la concentración adecuada de CO₂ en el aire de acuerdo al tipo de células estudiadas y posteriormente a una unidad de humidificación antes de su ingreso al proceso. El suministro de CO₂ fue realizado empleando una bala de gas grado industrial; las presiones de salida del CO₂ y del aire se ajustaron a 8 psi para permitir el mezclado. Finalmente se ajustó el flujo del CO₂, empleando un rotámetro AALBORG Instruments 112-02 de 0 a 150 mm previamente calibrado para CO₂ y un rotámetro Dwyer instruments VFB de 4 L para aire (Anexo E). La concentración de CO₂ utilizada fue de 5 % (v/v) en aire teniendo en cuenta que a mayor concentración de CO₂ mejora la velocidad de crecimiento de las células. Según la literatura, en los cultivos FA crecidos a nivel de biorreactor se han usado concentraciones de CO₂ en aire entre 1 y 5 % (Tabla 1-3).

Adicionalmente, se usó alrededor del reactor una cabina externa de acrílico (48 x 50 x 51 cm), la parte frontal tenía una compuerta de 20 x 20 cm. La cabina tenía acopladas un juego de 8 lámparas fluorescentes Sylvania Daylight F48T12/D 39 W (3 a cada lado y 2 en la parte posterior), cada una con su interruptor, un par de ventiladores para evitar un calentamiento incontrolado del biorreactor al permitir que constantemente aire ambiente entrara a la cabina, y espejos para optimizar la iluminación sobre el medio de cultivo. La irradiancia utilizada sobre el cultivo fue aproximadamente de 250 $\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con luz continua. Este valor fue mayor al utilizado en los cultivos en matraz (100 $\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) debido a la gran área de la sección transversal del vaso y al continuo incremento de la densidad del cultivo, lo cual podría afectar el suministro adecuado de luz

durante el ciclo de crecimiento. Según la literatura este valor está entre el rango de luz utilizado ($120\text{-}300\ \mu\text{moles fotones m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) para el crecimiento de células FA en biorreactor de tanque agitado (Tabla 1-3).

Se realizaron ensayos de crecimiento en el fotobiorreactor con los tres tipos de células en suspensión de *Bouteloua gracilis*, heterotróficas, fotomixotróficas y fotoautotróficas. Cada tres o cinco días se hacía el seguimiento al medio de cultivo, retirando del reactor 10 mL del mismo. Para todos los ensayos, la unidad se cargó inicialmente con 2 L de medio de cultivo que fue esterilizado en su interior en una etapa previa. Uno de los problemas más difíciles de superar fue el de la contaminación, por lo cual fue necesario hacer muchos ensayos para lograr un crecimiento exitoso de las células a la escala de biorreactor. Se decidió cambiar los empaques en el reactor, aumentar el tiempo de esterilización del medio, acoplar un filtro de $0,22\ \mu\text{m}$ para la salida de los gases y extremar las medidas de manipulación durante la inoculación y la toma de las muestras.

4.2.2 Preparación de los inóculos de células en suspensión H, FM y FA de *Bouteloua gracilis* usados en el sistema de biorreacción

Los inóculos usados en el sistema de biorreacción correspondieron a las células heterotróficas, fotomixotróficas y fotoautotróficas producidas en el laboratorio según el protocolo descrito en el capítulo anterior. Los diferentes tipos de células se mantuvieron mediante subcultivos y continuamente había un suministro adecuado de células en la etapa de crecimiento exponencial, que sirvió para el inicio del cultivo en el biorreactor.

Para preparar el inóculo, se recolectaron las células en la cámara de flujo laminar a partir de los cultivos conservados en los matraces de 125 mL, utilizando un sistema de filtración estéril, la filtración de las células se hizo durante 10 segundos aproximadamente. El material se reunió en un recipiente estéril, y se registró el peso fresco total que correspondía a la masa de inóculo.

4.2.3 Operación del sistema de biorreacción para el crecimiento de células en suspensión H, FM y FA de *Bouteloua gracilis*

Dos días antes de la siembra, se realizó el lavado de todas las partes que componían el sistema de biorreacción y se hizo el montaje del equipo. El día previo al ensayo, se preparó el medio de cultivo de acuerdo al tipo de células y se colocó dentro del recipiente de vidrio

del reactor de tanque agitado. Luego se esterilizó, todo el sistema usando una autoclave automática en donde se mantuvo la temperatura a 121 °C por mínimo 40 minutos, no se observaron pérdidas de volumen por evaporación del medio.

Después de la etapa de esterilización todo el sistema se trasladó a la cámara de flujo laminar. Cuando el sistema se enfrió por completo, se adicionaron los reguladores de crecimiento en las mismas concentraciones usadas para el mantenimiento de los cultivos a nivel de matraz: 2,4-D (1 mg/L); BA (2 mg/L) y adenina (40 mg/L). No se adicionó ningún tipo de antibiótico y/o antimicótico, ya que se observó, en ensayos preliminares, que afectaban negativamente el desarrollo del cultivo. Inmediatamente se preparó el inóculo como se describió anteriormente y se procedió a introducirlo dentro del reactor. Para ello, se abrió el puerto más grande de la tapa del biorreactor y se adicionaron las células, previamente pesadas, con ayuda de una espátula estéril.

A continuación, se realizaron las conexiones necesarias en el sistema de biorreacción para iniciar el cultivo. La agitación y el flujo de aire debían iniciarse rápidamente. Para todos los ensayos el flujo volumétrico fue de aproximadamente 0,5 vvm y la velocidad de agitación se mantuvo en aproximadamente 100 rpm durante la duración de cada uno de los cultivos. Cuando el aire y/o la mezcla aire más 5 % CO₂ son suministrados al biorreactor, pueden presentarse inconvenientes respecto a la manera de evacuarlos, puesto que la unidad cuenta únicamente con una salida, y ésta a su vez está afectada por la caída de presión a través de un filtro de 0,22 µm, esto ocasiona problemas de incremento de la presión en el sistema. Para superar estos inconvenientes, fue necesario cambiar el filtro por lo menos una vez durante el cultivo para evitar que se taponara y añadir otras salidas para facilitar la evacuación del aire que estaba presente en exceso.

Las siguientes variables fueron consideradas en el ensayo heterotrófico:

- a) Volumen de medio: 2 L
- b) El inóculo correspondió a 29 g de PF células crecidas previamente en matraz.
- c) Medio: 8,86 g L⁻¹ de medio MS con 3 % de sacarosa, 2,4-D (1 mg L⁻¹), BA (2 mg L⁻¹) y adenina (40 mg L⁻¹)
- d) Filtros usados para el aire: 0,22 µm.
- e) pH del medio antes de las adiciones de reguladores de crecimiento: 5,60
- f) pH del medio después de las adiciones: aproximadamente 6,06.
- g) Flujo de Aire: 0,5 vvm.

- h) Concentración de CO₂ en aire: ambiente (0,035 %)
- i) Irradiancia: 250 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Las siguientes variables fueron consideradas en el ensayo fotomixotrófico:

- a) Volumen del medio 2 L
- b) El inóculo correspondió a 22 g de PF de células fotomixotróficas crecidas previamente en matraz.
- c) Medio: 8,86 g L⁻¹ de medio MS con 0,1 % de sacarosa, 2,4-D (1 mg L⁻¹), BA (2 mg L⁻¹) y adenina (40 mg L⁻¹)
- d) Filtros usados para el aire: 0,22 μm .
- e) pH del medio antes de las adiciones de reguladores de crecimiento: 5,60
- f) pH del medio después de las adiciones: aproximadamente 6,22
- g) Flujo de Aire: 0,5 vvm
- h) Concentración de CO₂ en aire: ambiente (5 %)
- i) Irradiancia: 250 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

Las siguientes variables fueron consideradas en el ensayo fotoautotrófico:

- a) Volumen del medio: 2 L
- b) El inóculo correspondiente a 25 g de células obtenidas a partir de un ensayo previo en biorreactor de células fotomixotróficas cultivadas durante 15 días.
- c) Medio: 8,86 g L⁻¹ de medio MS sin de sacarosa, 2,4-D (1 mg L⁻¹), BA (2 mg L⁻¹) y adenina (40 mg L⁻¹)
- d) Filtros usados para el aire: 0,22 μm .
- e) pH del medio antes de las adiciones de reguladores de crecimiento: 5,60
- f) pH del medio después de las adiciones: aproximadamente 6,20
- g) Flujo de Aire: 0,5 vvm
- h) Concentración de CO₂ en aire: ambiente (5 %)
- i) Irradiancia: 250 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

4.2.4 Seguimiento del cultivo de las células en suspensión H, FM y FA de *Bouteloua gracilis* en el reactor

La temperatura del medio, y el funcionamiento de las lámparas fluorescentes y el flujo constante del aire o de la mezcla CO₂-aire se monitorearon diariamente. De otra parte, se

realizó una evaluación visual de posibles contaminaciones y del crecimiento relativo de las células vegetales y de su viabilidad por la pérdida de clorofila de las células. Cada 2-5 días, se tomaba una muestra del medio de cultivo para determinar la cinética de crecimiento de las células, la concentración de clorofila y la disminución de algunos de los nutrientes del medio de cultivo, principalmente iones.

4.2.5 Desmonte del sistema de biorreacción empleado para el crecimiento de células heterotróficas, fotoautotróficas y fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis*

El ensayo se dió por terminado dependiendo del tipo de cultivo: células heterotróficas 13 días, células fotomixotróficas 38 días y células fotoautotróficas 26 días. En ese momento, se finalizó la agitación y el suministro de aire y se procedió a abrir el reactor en la cámara de flujo laminar. Se recolectaron las células obtenidas, se registró el peso final y se guardaron en un recipiente estéril.

Posteriormente, una parte de las células obtenidas se enjuagó con agua estéril sobre un colador de plástico para retirar el medio adherido a ellas, se enjuagaron varias veces con agua destilada. Luego se secaron ligeramente con papel absorbente, se tomó una muestra para medir su humedad y el resto de las células se llevó a un proceso de liofilización que mantuviera sus propiedades para los análisis posteriores, de determinación de carbohidratos estructurales y de lignina.

4.3 Resultados y análisis

4.3.1 Crecimiento de las células heterotróficas en suspensión de *Bouteloua gracilis*

Respecto al incremento de la biomasa se tiene que la masa del inóculo inicial fue de 29 gramos y el peso de las células al finalizar el cultivo fue de 184,96 g, por lo que el índice de crecimiento fue de:

$$IC = \frac{(184,96 - 29)}{29} = 5,38$$

Este valor de 5,38 fue aproximadamente tres veces inferior al obtenido para las células heterotróficas cultivadas en matraces de 25 mL. Esto es debido a que el cultivo necesita ser adaptado previamente en biorreactor. Cuando se cultivan células vegetales en suspensión a nivel de biorreactor se presentan ciertas limitaciones, principalmente asociadas a problemas de transferencia de masa (oxígeno, CO₂, nutrientes) y homogeneidad de las células del cultivo. Estos inconvenientes podrían conducir a la generación de estrés y en algunos casos a la lisis celular generando la pérdida del cultivo. Sin embargo, aunque el cultivo a nivel de biorreactor de las células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* logró crecer, en los primeros días del cultivo el crecimiento fue muy lento y posteriormente aumentó hasta una biomasa final de 184,96 g, que es inferior a la esperada teniendo en cuenta el crecimiento en matraz.

Para efectuar la medida indirecta de la biomasa en el biorreactor, se realizó la correlación entre la biomasa y la conductividad para las células heterotróficas de *Bouteloua gracilis*. Se relacionó la conductividad con el incremento en la biomasa. Estas variables fueron: el índice de crecimiento (IC_t), y el porcentaje de la conductividad Inicial (% de K₀*), que corresponde a la relación entre la conductividad en un tiempo t y la conductividad inicial. La correlación entre estas variables se presenta en la Figura F-1. Estos datos fueron tomados de subcultivos rutinarios que se realizaron a las células heterotróficas y fotomixotróficas a nivel de matraz.

En la Tabla 4-1, se presentan los resultados correspondientes al cálculo indirecto de la biomasa en el reactor, de acuerdo con la correlación obtenida entre esta variable y el comportamiento de la conductividad eléctrica para los cultivos realizados en matraz (Anexo-F).

Tabla 4-1 Cálculo de la biomasa en el reactor al final del cultivo de células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* de acuerdo con la conductividad en el biorreactor.

Valor inicial de la variable	Valor final de la variable	IC	Biomasa final según IC	Biomasa real obtenida	% Error
K ₀ = 5,91 mS/cm	K = 3,51mS/cm	5,38	185,08 g	184,96 g	0,06

La correlación de los datos obtenidos de la biomasa fresca es muy buena con respecto a la disminución en la conductividad eléctrica del medio, por lo que se presenta la cinética del cultivo en PF y PS con respecto a esta medición indirecta. En este caso la biomasa real obtenida es similar a la biomasa determinada indirectamente. En el anexo D se presentan las tablas con el registro de los datos de los cultivos en biorreactor y su correspondiente análisis estadístico. En la Tabla D-1 y Figura 4-1 se presenta la cinética obtenida para el crecimiento del cultivo heterotrófico en biorreactor. El crecimiento de las células heterotróficas cultivadas, en peso fresco, se ajustó a un modelo de crecimiento exponencial hasta el día 12 del cultivo, la velocidad de crecimiento fue de $0,1077 \text{ d}^{-1}$ al que corresponde un tiempo de duplicación de 6,43 días en peso fresco. Este valor es 1,62 veces mayor al de las células heterotróficas cultivadas en matraz. En términos de peso seco el tiempo de duplicación fue de 4,59 días y la velocidad de crecimiento de $0,151 \text{ d}^{-1}$.

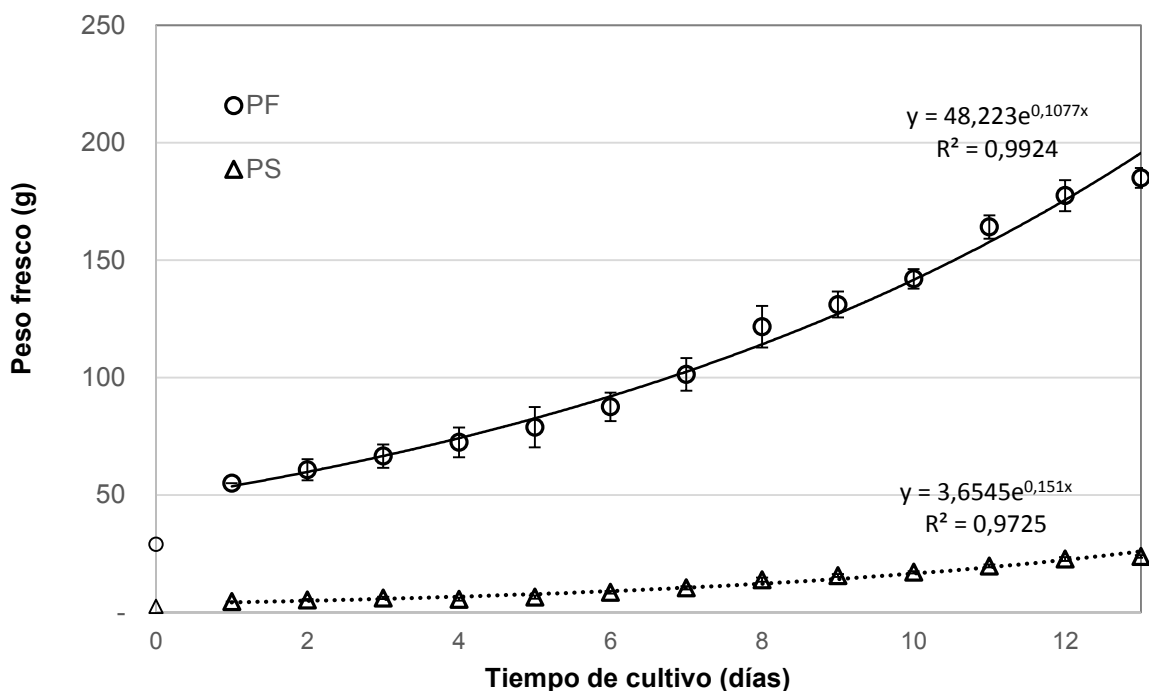


Figura 4-1 Cinética de crecimiento de células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* en peso fresco (PF) y peso seco (PS).

A partir del día 12 de cultivo, se observa que el peso seco comienza a estabilizarse en un valor constante (Tabla D-4), sin embargo el PF sigue aumentando. Es posible que el cultivo empezó a entrar en la fase estacionaria y hubo un aumento en el tamaño de los agregados celulares y disminución de la densidad celular, reflejando así un incremento en el contenido de agua de las células desde el día 12 del cultivo. La disminución de la densidad celular causó que las células se separaran rápidamente del medio por flotación, esta observación concuerda con lo que reportan otros autores cuando el cultivo alcanza la fase estacionaria la cual se caracteriza por la formación de un anillo de células sobre la pared y el eje del impulsor justo sobre el nivel del medio (Treat *et al.*, 1989).

Los resultados correspondientes al comportamiento en la conductividad del medio de cultivo se presentan en la Tabla D-7 y la Figura 4-2, en donde se puede observar que durante los 13 días que duró el cultivo se consumieron los nutrientes del medio hasta que la conductividad disminuyó a un valor de $3,5 \text{ mS cm}^{-1}$ aproximadamente. La velocidad en la disminución de sales del medio aumentó a partir del día 5 de cultivo, lo cual concuerda con el incremento en la velocidad de acumulación de biomasa de las células clorofílicas a partir de ese mismo tiempo de cultivo. Se observa también que el consumo de sales fue incompleto, ya que la conductividad final fue el 60 % del valor inicial.

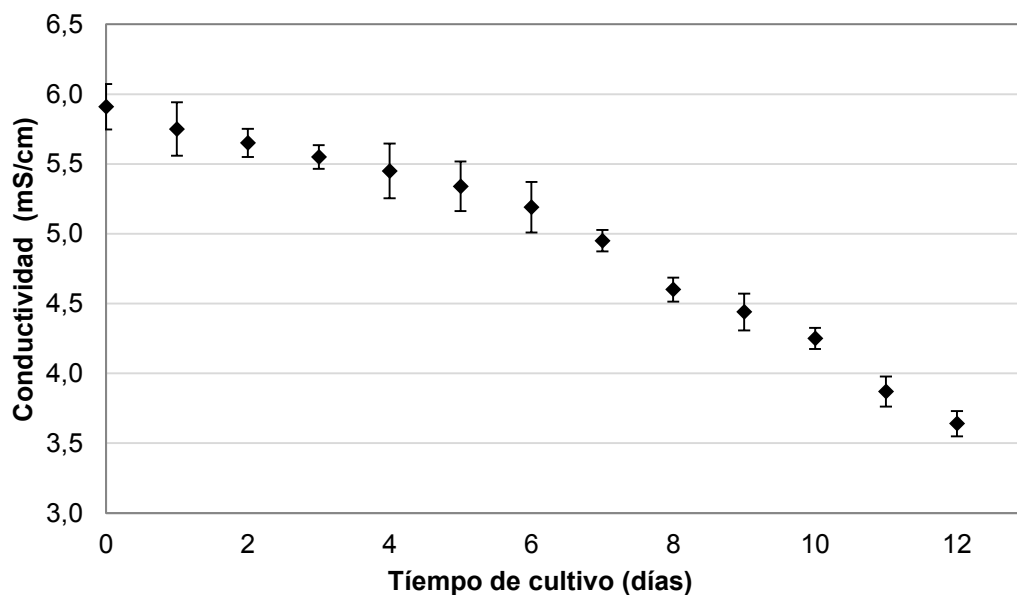


Figura 4-2 Comportamiento de la conductividad del medio, a lo largo de 13 d, para el cultivo de células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* en el sistema de biorreacción.

El comportamiento del pH se presenta en la Tabla D-10 y la Figura 4-3. El pH inicia en un valor de 6,20 debido a la adición que se hizo al medio de cultivo de los reguladores de crecimiento, estas sustancias son de carácter básico porque están diluidas en una solución de KOH. El valor mínimo del pH (4,97) se observa al día 5 del cultivo, este valor podría coincidir con el tiempo en el que el cultivo empieza a multiplicarse, a partir de este día el pH empieza de nuevo a incrementarse y se estabiliza hasta alcanzar un valor de 5,72.

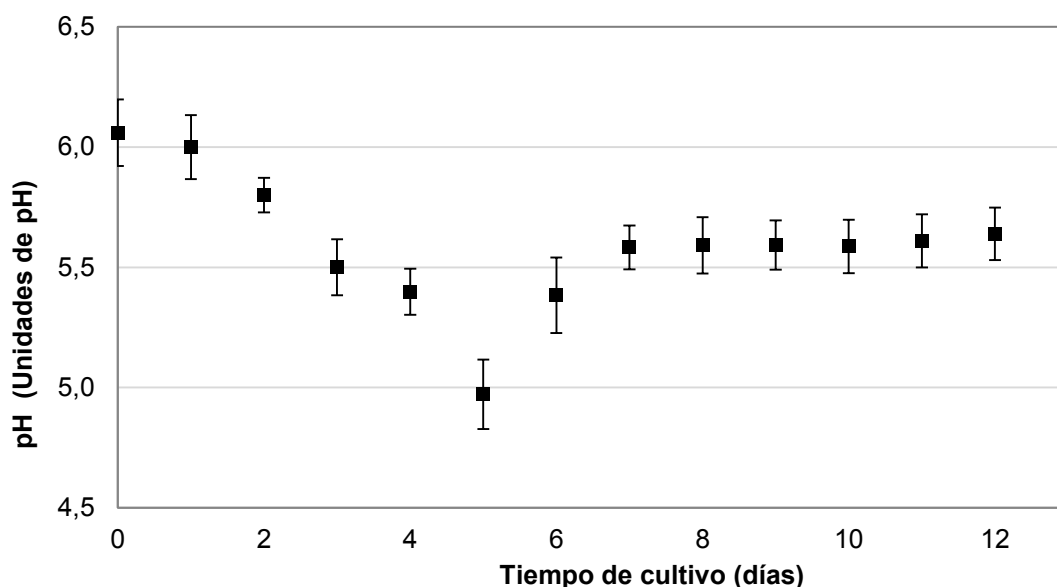


Figura 4-3 Comportamiento del pH del medio, para los 13 días de cultivo de células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* en el sistema de biorreacción.

En la Tabla D-13 y la Figura 4-4 se observa el comportamiento del oxígeno disuelto para el cultivo de la células heterotróficas de *Bouteloua gracilis*. La concentración de oxígeno disuelto disminuyó constantemente durante los primeros 5 días del crecimiento heterotrófico de las células clorofilicas, hasta una concentración final de 60 % del valor inicial. Se nota que a partir del día 5 la concentración de oxígeno disuelto (OD), permanece prácticamente constante durante el crecimiento exponencial de las células heterotróficas de *Bouteloua gracilis*.

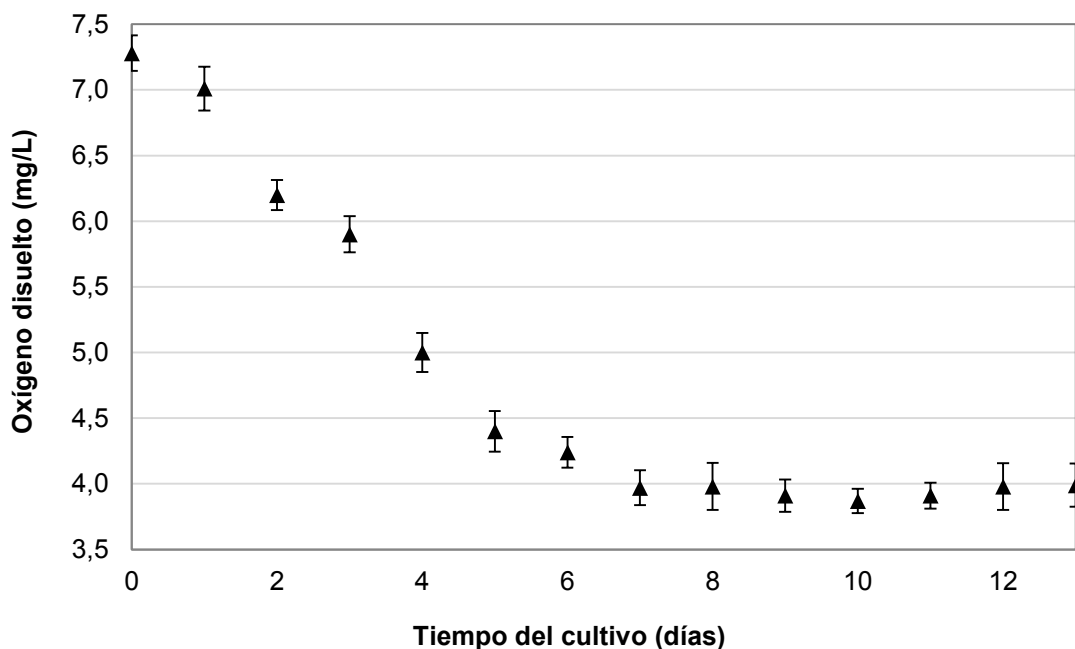


Figura 4-4 Comportamiento del oxígeno disuelto del medio, a lo largo de 13 días, para el cultivo de células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* en el sistema de biorreacción.

4.3.2 Crecimiento de las células fotomixotróficas en suspensión de *Bouteloua gracilis*.

Respecto al incremento de la biomasa se tiene que la masa inicial fue de 22 g y el peso de las células al finalizar el cultivo fue de 73,38 g, por lo que el índice de crecimiento fue de:

$$IC = \frac{(73,38 - 22)}{22} = 2,34$$

Para efectuar la medida indirecta de la biomasa en el biorreactor, se utilizó la correlación entre la biomasa y la conductividad para las células fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis* (Figura F-1).

En la Tabla 4-2, se presentan los resultados correspondientes al cálculo indirecto de la biomasa en el biorreactor, de acuerdo con la correlación obtenida entre esta variable y el comportamiento de la conductividad eléctrica para los cultivos realizados en matraz.

Tabla 4-2 Cálculo de la biomasa en el reactor al final del cultivo de células fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis* de acuerdo con la conductividad en el biorreactor.

Valor inicial de la variable	Valor final de la variable	IC	Biomasa final según IC	Biomasa real obtenida	% Error
$K_0 = 6,63 \text{ mS/cm}$	$K = 5,53 \text{ mS/cm}$	2,34	77,81 g	73,38g	6,02%

La correlación de los datos obtenidos de la biomasa fresca es aceptable con respecto a la disminución en la conductividad eléctrica del medio, por lo que se presenta la cinética del cultivo en PF y PS con respecto a esta medición indirecta. En este caso, el error entre la biomasa determinada indirectamente y la biomasa real fue de 6,02 %.

En las Tablas D-16 y D-19 y la Figura 4-5 se muestra el crecimiento FM de *Bouteloua gracilis*, después de ajustar los datos a un modelo exponencial se obtuvieron tiempos de duplicación de 16,8 días en PF y 14,38 días en PS en medio conteniendo 0,1 % de sacarosa y una composición de gas de 5 % de CO_2 en aire. A partir del día 28 las células comienzan a entrar en la fase estacionaria, el peso seco de las células se mantiene relativamente constante en 5,7 g, mientras que el peso fresco sigue aumentando después del día 28, esto concuerda con las observaciones hechas para el cultivo heterotrófico en biorreactor donde las células, cuando entran en la fase estacionaria de crecimiento, incrementan su humedad.

Debido a la unión competitiva del oxígeno y el dióxido de carbono por la ribulosa 1,5-bis-fosfato carboxilasa/ oxigenasa (Rubisco), la fase gaseosa se vuelve crítica en la determinación de si las condiciones son favorables para la fijación de CO_2 por las células FM (Treat *et al.*, 1989). Este fenómeno llamado fotorrespiración, termina liberando CO_2 y disipando energía y teniendo en cuenta que la concentración de O_2 en la atmósfera es 6000 veces mayor que la de CO_2 , se favorece la fotorrespiración. No obstante, incluso con la mayor concentración de oxígeno presente, la enzima es capaz de secuestrar 3-4 moléculas de dióxido de carbono por cada una de oxígeno. La ineficiencia de la RuBisCo la convierte, en condiciones normales, en el factor limitante de la fotosíntesis. Por lo tanto la modificación en la concentración de oxígeno en la corriente gaseosa es comúnmente usada para intentar aumentar la fotosíntesis neta, mediante la reducción de la unión competitiva del oxígeno por Rubisco (Treat *et al.*, 1989).

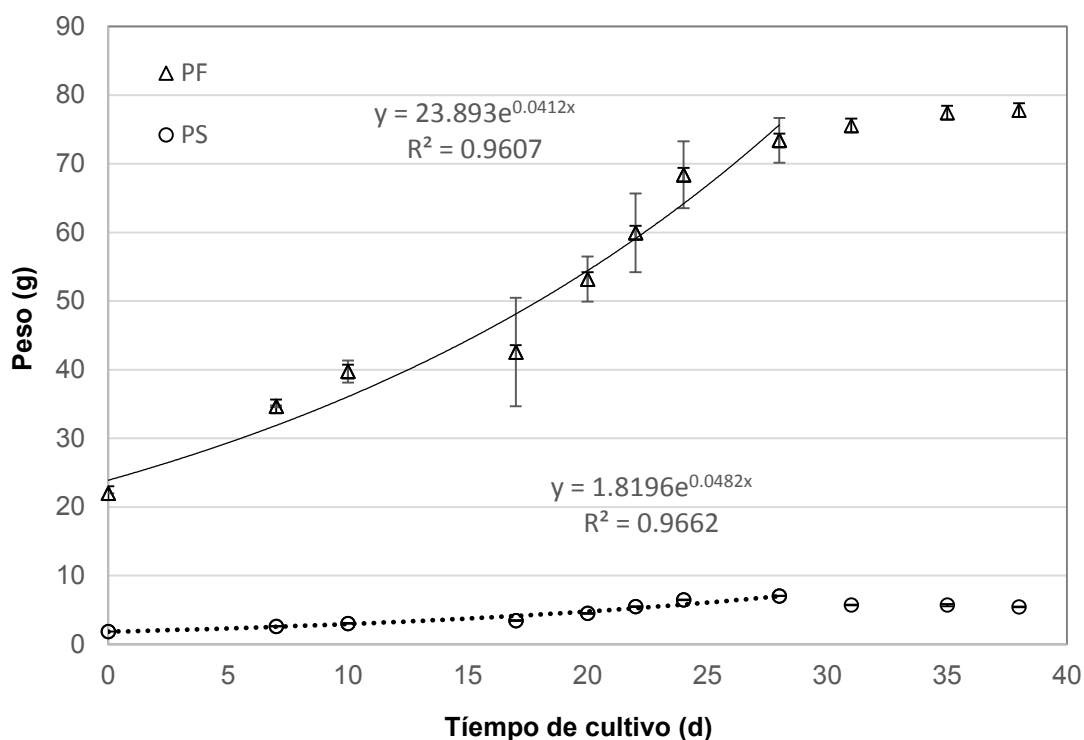


Figura 4-5 Cinética de crecimiento de células fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis* en peso fresco (PF) y peso seco (PS).

En la Tabla D-28 y la Figura 4-6, se presenta el comportamiento de la conductividad del medio de cultivo, en donde se puede observar que durante los 38 días que dura el cultivo se consumen constantemente los nutrientes del medio hasta caer a un valor de 5,53 mS cm^{-1} aproximadamente. A partir del día 10 del cultivo se observa la máxima velocidad de consumo de sales en el medio de cultivo, lo cual concuerda con la mayor velocidad de crecimiento celular, a partir del día 24 la conductividad permanece prácticamente constante, lo que indica que las células entraron a la fase estacionaria, donde la tasa de crecimiento de las células fotomixotróficas disminuye.

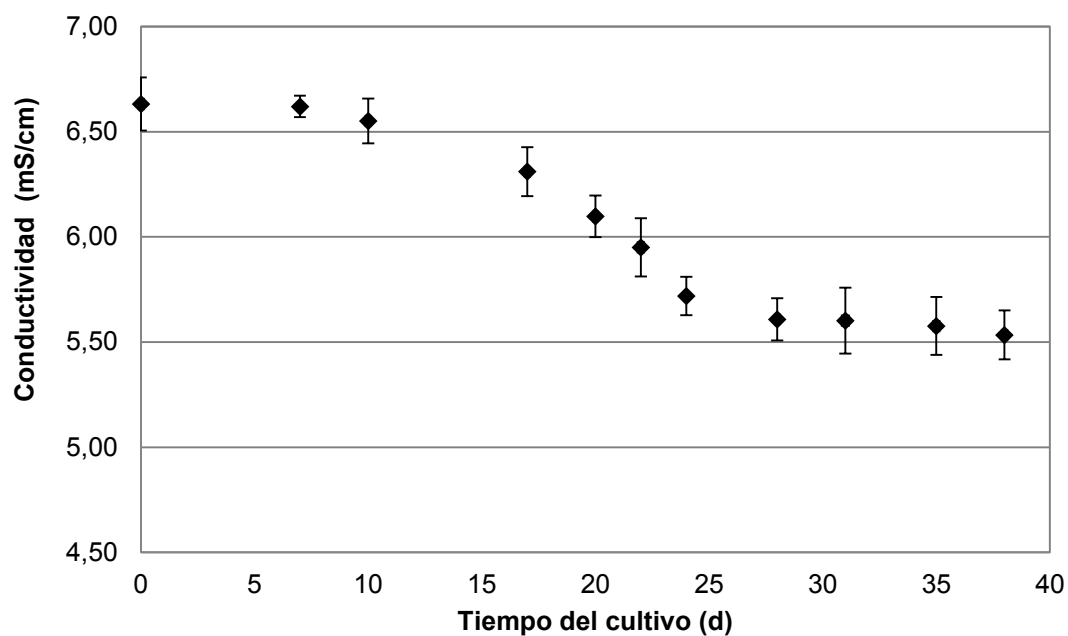


Figura 4-6 Comportamiento de la conductividad, a lo largo de 38 días, para el cultivo de células fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis* en el sistema de biorreacción.

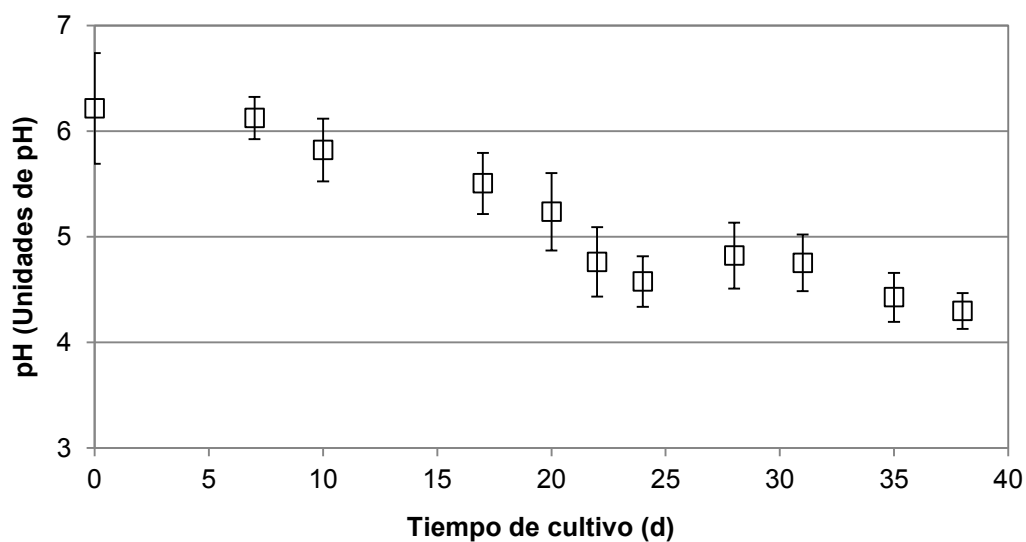


Figura 4-7 Comportamiento del pH del medio, para los 38 días de cultivo de células fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis* en el sistema de biorreacción.

Como respuesta al suministro de aire enriquecido con 5 % de CO₂, el pH de la suspensión decreció de 6,22 (día 0) a 4,58 (día 20) y permaneció relativamente estable para el resto del ciclo de crecimiento (Figura 4-7 y Tabla D-22). A partir del día 10 se nota una disminución del pH hasta el día 24 del cultivo cuando empieza a estabilizarse, esta disminución en el pH al día 10 concuerda con la mayor velocidad de crecimiento del cultivo, hasta el día 24, unos días antes de que las células comiencen la fase estacionaria.

En la Figura 4-8 y la Tabla D- 26 se observa el comportamiento del oxígeno disuelto del medio para el cultivo de la células fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis*. La concentración de oxígeno disuelto disminuyó constantemente durante el crecimiento fotomixotrófico de las células de *Bouteloua gracilis*, hasta que su concentración final fue de 73,38 % del valor inicial. La mayor velocidad de consumo de OD se presentó a partir del día 10 del cultivo lo que concuerda con la máxima pendiente de crecimiento de las células fotomixotróficas. Se observa que a partir del día 24, la concentración de OD permanece prácticamente constante. Se ha reportado que durante la fase estacionaria se incrementa el OD, lo que se podría atribuir a varios procesos celulares, incluyendo la reducción en la demanda de oxígeno y la producción de oxígeno neto que es liberado al medio, a partir de la fotosíntesis (Treat *et al.*, 1990).

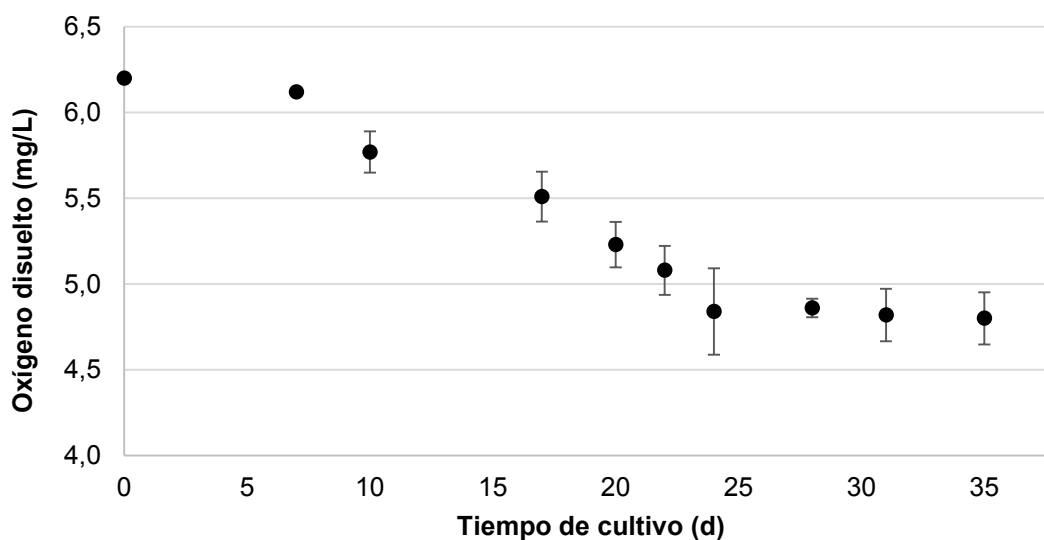


Figura 4-8 Comportamiento del oxígeno disuelto, a lo largo de 38 días para el cultivo de células fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis* en sistema de biorreacción

De acuerdo a Spilatro y Anderson (1988), tras el agotamiento de los azúcares exógenos del medio, *Glycine max* exhibió un incremento en la evolución de oxígeno fotosintético y la acumulación de clorofila, ambas características del crecimiento fotoautotrófico. Durante la fase exponencial, y en presencia de azúcares exógenos, las células exhibieron crecimiento FM, y es posible obtener biomasa adicional por la manipulación de la fase gaseosa. Aunque el CO₂ es importante, el oxígeno puede también contribuir a un crecimiento adecuado, aún para fotoautótrofos. Dependiendo de si los azúcares exógenos, tales como la sacarosa, están presentes, las líneas celulares fotosintéticas han demostrado que pueden cambiar fácilmente entre crecimiento fotomixotrófico y fotoautotrófico.

La transferencia del material celular dentro del medio fresco del biorreactor estuvo acompañada por una pérdida significativa de clorofila durante las dos primeras semanas del ciclo de crecimiento (Figura 4-9 y Tabla D-31), el descenso fue de 76 %. En los días siguientes, se restauró el nivel de clorofila por el incremento en la formación de pigmentos, hasta alcanzar un valor de 422 µg g⁻¹ PF para clorofila total y 142 µg g⁻¹ PF para carotenoides al final del cultivo, momento en el cual la relación de clorofila a/b fue de 1,8. Después de iniciado el subcultivo se observó un decrecimiento en la clorofila seguido por un incremento de la misma a medida que se incrementaba la biomasa. El contenido de sacarosa en el medio de cultivo fue muy bajo (0,1%) por lo que es posible que esta concentración no afectara la acumulación de pigmentos. La acumulación de clorofila en el biorreactor fue similar a la obtenida en los cultivos a nivel de matraz lo que sugiere que las condiciones del reactor (nutrientes, velocidades de agitación, gases disueltos y penetración de la luz) pueden ser optimizados para la acumulación de clorofila. A partir del día 28 del cultivo las concentraciones de clorofila (*a*, *b* y total) y de carotenoides permanecen prácticamente constantes lo cual concuerda con el estado estacionario del cultivo.

El patrón característico del consumo de algunos constituyentes del medio Murashige & Skoog durante esta cinética se presenta en la Figura 4-10 y la Tabla D-40. El fosfato inorgánico fue consumido muy rápidamente, y al final del tiempo de cultivo no había presencia de este nutriente. Se observó un consumo incompleto de nitrato (80 %) y sulfato (77 %) al final del cultivo. En cambio el cloruro fue consumido lentamente por las células (30 %).

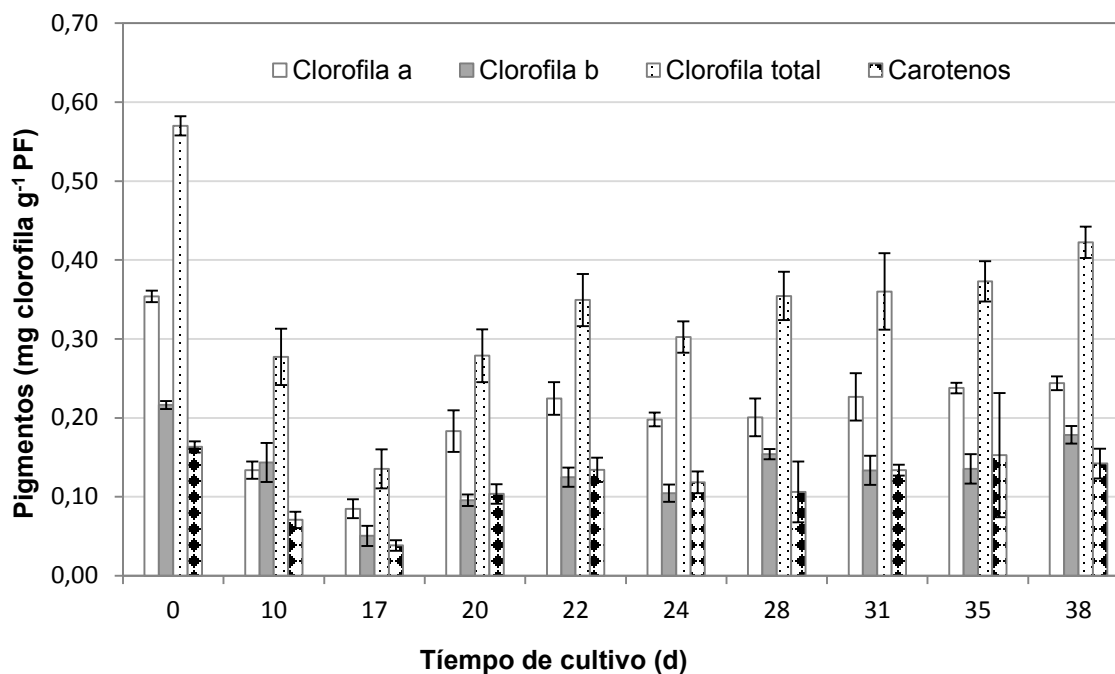


Figura 4-9 Perfil de pigmentos durante el crecimiento fotomixotrófico de *Bouteloua gracilis* en biorreactor.

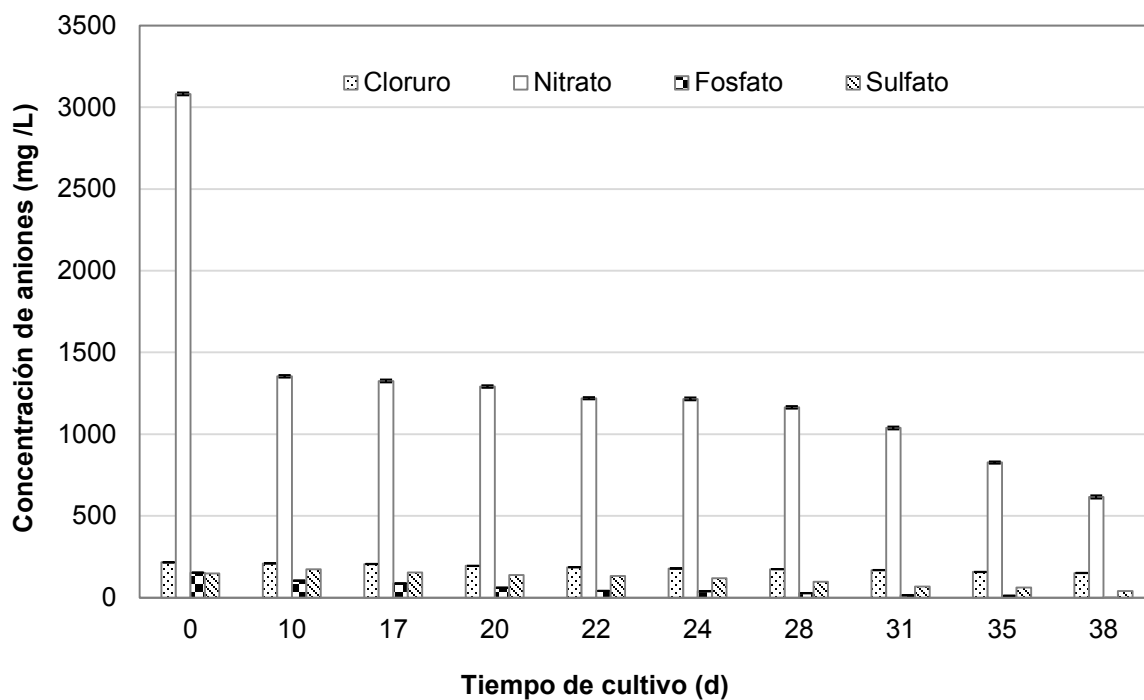


Figura 4-10 Cambio en la concentración de aniones en el medio (NO_3^-), fosfato (PO_4^{3-}) y sulfato (SO_4^{2-}) durante un ciclo de crecimiento de 38 d para los cultivos fotomixotróficos de *Bouteloua gracilis* a nivel de biorreactor.

4.3.3 Crecimiento de las células fotoautotróficas en suspensión de *Bouteloua gracilis*.

Respecto al incremento de la biomasa de las células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* se tiene que el peso fresco del inóculo fue de 25 g y el peso fresco de las células al finalizar el cultivo fue de 50,99 g, por lo que el índice de crecimiento fue de:

$$IC = \frac{(50,99 - 25)}{25} = 2,04$$

En este caso se tiene un índice de crecimiento cuatro veces menor al obtenido para las células fotoautotróficas cultivadas en matraces de 25 mL. Esto es debido a que el cultivo necesita ser adaptado previamente en biorreactor. Y por razones de tiempo y recursos no fue posible realizar más ensayos de adaptación de estas células en el tiempo. Sin embargo, se logró el crecimiento del cultivo fotoautotrófico en estas condiciones. Esta observación concuerda con los resultados de Fischer *et al.* (1994) quien indicó que el material celular usado como inóculo fue adaptado a condiciones estándares para que las células fueran capaces de crecer en un reactor de 20 L.

En la Tabla 4-3, se presentan los resultados correspondientes al cálculo indirecto de la biomasa en el reactor, de acuerdo con la correlación obtenida entre esta variable y el comportamiento de la conductividad eléctrica para los cultivos realizados en matraz (Figura 3-21).

Tabla 4-3 Cálculo de la biomasa en el reactor al final del cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* de acuerdo con la conductividad en el biorreactor.

Valor inicial de la variable	Valor final de la variable	IC	Biomasa final según IC	Biomasa real obtenida	% Error
K ₀ = 6,60 mS/cm	K = 6,17 mS/cm	2,04	53, 96 g	50,99 g	5, 81 %

Se presenta la cinética del cultivo en PF y PS con respecto a la medición indirecta de la biomasa. En este caso el error entre la biomasa real y la medida indirectamente fue de 5,81 %. En la Figura 4-11 y las Tablas D-49 y D-52 se presenta la cinética obtenida para el crecimiento del cultivo fotoautotrófico en biorreactor.

La máxima densidad celular, en peso seco, alcanzó los 5,4 g, (Figura 4-11), valor menor al reportado para cultivos fotoautotróficos de *Glycine max* a nivel de biorreactor de 6 g L⁻¹ en peso seco (Treat *et al.*, 1990). Se han alcanzado densidades por encima de 20 g/L en peso seco para suspensiones vegetales no fotosintéticas (Treat *et al.*, 1990). Las bajas densidades observadas para el cultivo fotosintético de *Bouteloua gracilis* puede ser función de la penetración reducida de luz a altas densidades celulares, disminución de un nutriente crítico, concentraciones no optimizadas de CO₂ y de O₂ en la corriente gaseosa, limitaciones de transferencia de masa, o restricciones físicas no reconocidas en el biorreactor. Wilson *et al.* (1978) encontró que, a densidades por arriba de 20 g L⁻¹ en base seca en un biorreactor tipo “airlift”, las burbujas de aire no dieron un mezclado satisfactorio por las regiones estáticas que se forman, sugiriendo que este tipo de reactor no es conveniente para el cultivo de células vegetales a altas densidades.

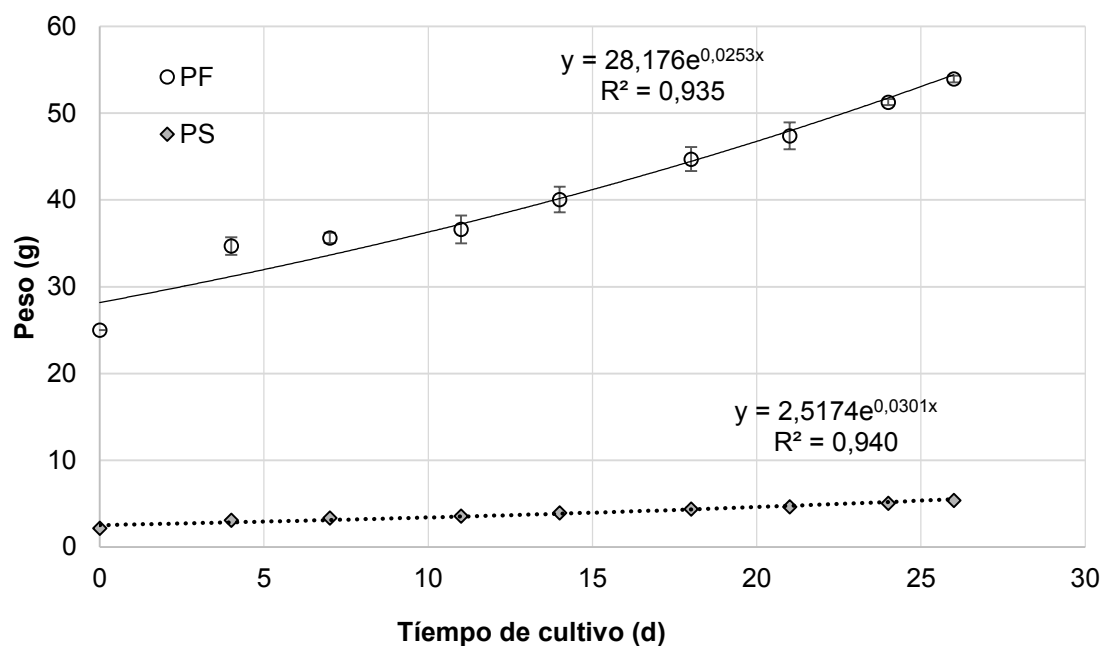


Figura 4-11 Cinética de crecimiento de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en peso fresco (PF) y peso seco (PS).

Las células fotoautotróficas cultivadas en biorreactor se ajustaron a un modelo de crecimiento exponencial (Figura 4-15), la velocidad de crecimiento fue de 0,0253 d⁻¹ y un tiempo de duplicación de 27,4 días en peso fresco. Este valor es 2,5 veces mayor al de las células fotoautotróficas cultivadas en matraz. En términos de peso seco la velocidad de crecimiento fue de 0,0301 d⁻¹ y un tiempo de duplicación de 23 días. Se observa también que las células aún no han alcanzado la fase estacionaria, esto concuerda con

observaciones hechas por Beck y Renner (1990) quienes diferenciaron las siguientes etapas de un cultivo discontinuo fotoautotrófico de *Chenopodium rubrum*: (a) fase de pre-división (1 a 2 días después de la inoculación); (b) fase de división (días 3 a 25); (c) fase de transición (acumulación de materia seca, entre los días 26 a 32 del cultivo); (d) fase estacionaria (días 32 a 60) y (e) senescencia y muerte.

La deposición de células en las paredes del biorreactor por encima del nivel del medio y que muchas veces excede el 30 % de la biomasa total, representa un problema significativo en el cultivo de células vegetales en biorreactor. La deposición de células se hizo especialmente problemática cuando las células se acercaron a la fase estacionaria, cuando el volumen de la célula se expande. La separación de células del medio resultó en una ligera formación de espuma y la pegajosidad natural de las células es debida posiblemente al aumento de polisacáridos extracelulares (ECP) (Treat *et al.*, 1989).

En la Figura 4-12 y la Tabla D-55 se muestra el descenso en la conductividad eléctrica que muestra el consumo parcial de las sales del medio. La reducción de la conductividad eléctrica de 6,69 a 6,17 mS cm⁻¹ indicó un consumo incompleto de los compuestos iónicos (Figura 4-1). EL consumo de sales disminuyó lenta y constantemente durante el cultivo fotoautotrófico de *Bouteloua gracilis*, lo cual concuerda con el incremento lento de la biomasa mostrada en la curva de crecimiento mostrada (Figura 4-11).

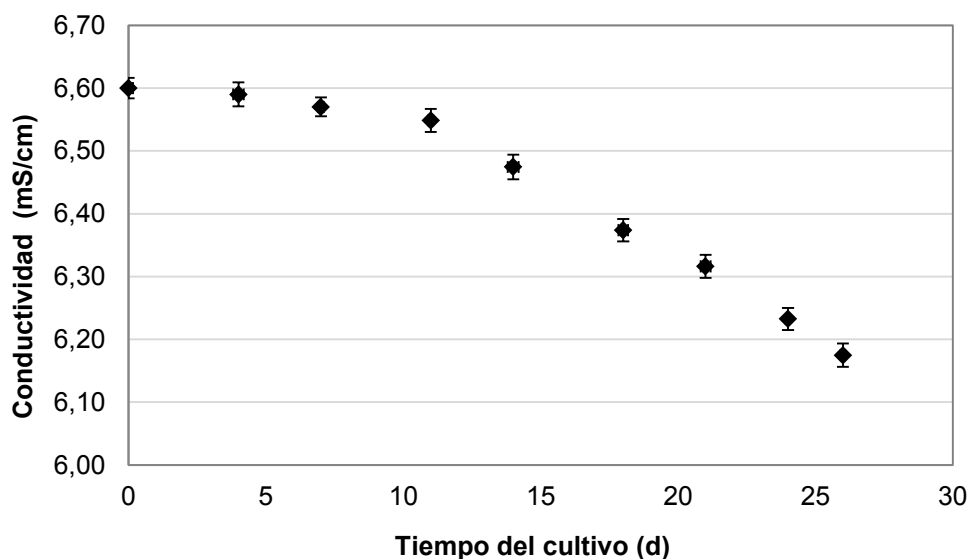


Figura 4-12 Comportamiento de la conductividad del medio, a lo largo de 26 días, para el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en el sistema de biorreacción.

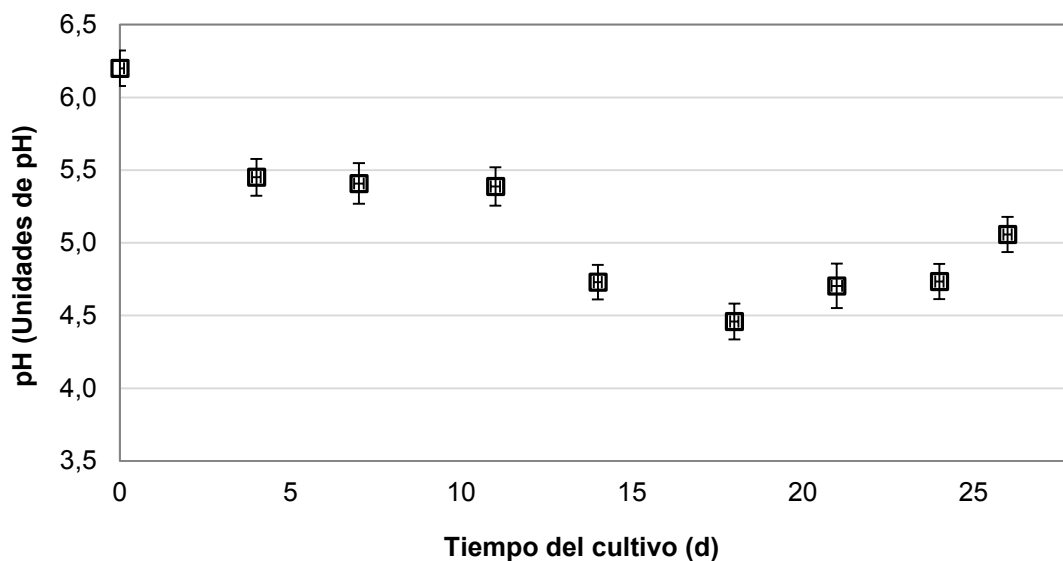


Figura 4-13 Comportamiento del pH del medio, para los 26 días de cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en el sistema de biorreacción.

El pH del cultivo disminuyó desde un valor de 6,20 a 4,46 durante las tres semanas y luego se incrementó a un valor de 5,06 hasta el final del experimento el día 26 (Figura 4-13 y Tabla D-58). El pH inicia en un valor de 6,20 debido a la adición que se hizo al medio de cultivo de los reguladores de crecimiento. Se observa que el pH del medio comienza a disminuir a partir desde el primer día del cultivo, lo cual concuerda con el comienzo de la fase exponencial donde se empieza a incrementar la biomasa celular, es decir con la recuperación y crecimiento del cultivo de *Bouteloua gracilis*. Típicamente, la capacidad *buffer* del medio de cultivos vegetales es muy baja, ya que la concentración usual de fosfato está entre 1 mM y 5 mM. La curva en forma de U observada para los cultivos de *Bouteloua gracilis* en biorreactor fue también típica de los cultivos H y FM. La rápida disminución del pH fue causada en parte por el consumo de iones de amonio ocasionando que las células bombearan iones hidrógeno al medio (Treat *et al.*, 1989).

El aumento del pH después del día 18 puede reflejar la transición de la utilización de amonio a nitrato. Cuando las células vegetales son cultivadas con NH_4^+ como única fuente de nitrógeno, el pH del medio decrece a medida que el amonio es utilizado (Treat *et al.*, 1989). En contraste el pH aumenta cuando el NO_3^- es la única fuente de nitrógeno.

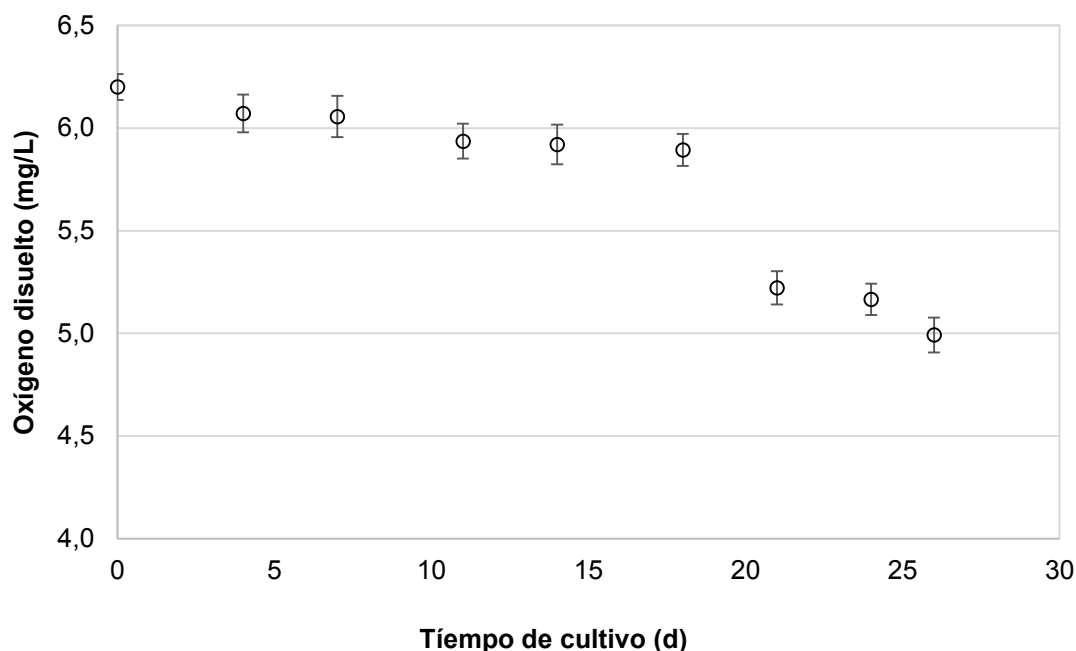


Figura 4-14 Comportamiento del oxígeno disuelto del medio, a lo largo de 26 días, para el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en el sistema de biorreacción.

En la Figura 4-14 y la Tabla D-61 se observa el comportamiento del oxígeno disuelto del medio para el cultivo de la células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis*. Se observa que el valor de oxígeno disuelto se mantiene en porcentajes cercanos al de saturación las primeras dos semanas del cultivo. A partir del día 12 aumenta la velocidad de consumo de OD por parte de las células, esta etapa del cultivo puede coincidir con un aumento en la pendiente de crecimiento del cultivo fotoautotrófico de *Bouteloua gracilis*. Los valores de OD disminuyen solamente hasta el 80 % del OD inicial, estos valores de OD son altos, lo cual sugiere que las células producen oxígeno debido al proceso de fotosíntesis.

Para optimizar el consumo de nutrientes por las células y el mezclado del medio, los cultivos en suspensión deben estar constituidos idealmente por células aisladas. El tamaño de los agregados celulares (Figura 4-17) de las células cultivadas en biorreactor se incrementa con el tiempo. Las células cultivadas comienzan a formar grupos más grandes (1-3 mm) al final de la fase exponencial cuando las células comienzan a adherirse. Otro factor que puede influir en la formación de conglomerados celulares fue que los agregados fueron arrastrados y se incrustaron alrededor de las sondas y los baffles. La tendencia de

los agregados celulares a incrementar en tamaño durante el cultivo fue típica para diferentes tipos de impulsores (Treat *et al.*, 1992).

El uso del biorreactor de tanque agitado para el cultivo de células vegetales ha estado limitado a velocidades de agitación de 100 rpm o menos, debido a la sensibilidad de las suspensiones celulares al esfuerzo de corte. Las células cultivadas en biorreactores a menudo se rompen o se dañan por las fuerzas de cizallamiento causadas por la aireación, agitación y bombeo (Treat *et al.* 1990). Tanaka *et al.* (1981) demostró que las células cultivadas en reactores de tanque agitado con baffles se volvieron más resistentes al estrés hidrodinámico o a las fuerzas mecánicas. Scragg *et al.* (1988) desarrolló una línea celular de *Catharanthus roseus* tolerante a velocidades de agitación de 1000 rpm con muy buena tasa de crecimiento en el intervalo de 150-200 rpm. Ellos concluyeron que la tolerancia al estrés hidrodinámico y mecánico no es una característica fija, sino que se desarrolla durante la adaptación del cultivo, lo que sugiere que se pueden seleccionar las células tolerantes al esfuerzo cortante. En otro trabajo, Tanaka *et al.* (1988) mostraron que las células cultivadas bajo condiciones severas de estrés hidrodinámico incrementaron los niveles de hemicelulosa y celulosa. Este estudio sugirió que la pared celular en las suspensiones cultivadas bajo altas condiciones de estrés podría ser físicamente más fuerte que las cultivadas bajo menores condiciones de estrés. Treat *et al.* (1990) encontró que en el tiempo las líneas celulares de *Glycine max* desarrollaron un incremento en la tolerancia al esfuerzo cortante en matraz y que estos cultivos parecieron ser más tolerantes a altas velocidades de agitación en el biorreactor. Ellos también cultivaron células de *Glycine max* en matraces de 250 mL acoplados con 3 baffles en agitadores orbitales a velocidades de 200 rpm y estas células mostraron tasas de crecimiento 10 % más altas que líneas no adaptadas previamente.

Los datos sugieren que las suspensiones de *Bouteloua gracilis* heterotróficas, fotomixotróficas y fotoautotróficas destinadas a nivel de biorreactor pueden ser mejoradas adaptándolas previamente en matraz, incrementando la velocidad de agitación en el tiempo, para seleccionar líneas celulares con altas tasas de crecimiento y tolerantes al estrés hidrodinámico. Posiblemente, en este caso, las células necesitaban una adaptación

previa a nivel de biorreactor, ya que las velocidades de crecimiento son mucho menores que a nivel de matraz.

El perfil de pigmentos se presenta en la Figura 4-15 y la Tabla D-64. La concentración total de carotenoides alcanza un valor máximo de $236 \mu\text{g}$ carotenoides g^{-1} PF, el día 18 y posteriormente los valores tienen a ser iguales al valor inicial. El contenido de clorofila total (clorofila *a+b*) comenzó a declinar inmediatamente después de la inoculación. Al día 7 estaba presente el 67,8 % de la concentración inicial de $422 \mu\text{g}/\text{mg}$ PF. Posteriormente la formación de clorofila se incrementó, alcanzando un valor de $603 \mu\text{g}$ clorofila g^{-1} PF el día 18 de cultivo. La relación de clorofila *a* y *b* se mantuvo en un valor cercano 2,0 los días 18 y 21 del cultivo. Es posible que el día 18 concuerde con la mitad del crecimiento exponencial del cultivo fotoautotrófico de *Bouteloua gracilis* y a partir de ese día las concentraciones de pigmentos tienden a disminuir a los valores iniciales del pigmentos celulares, lo cual podría coincidir con el incremento en la pendiente del crecimiento celular.

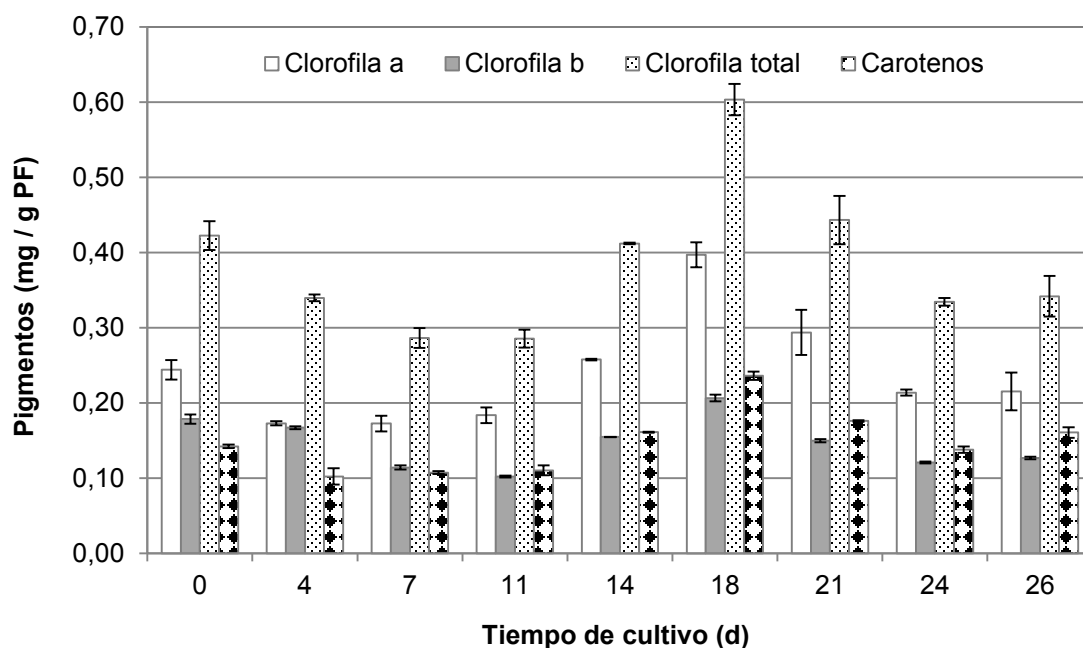


Figura 4-15 Perfil de pigmentos para el cultivo fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor.

El patrón característico de consumo de algunos constituyentes del medio Murashige & Skoog se presenta en la Figura 4-16 y Tabla D-73. Se observó una disminución lenta pero constante de los iones presentes en el cultivo y un consumo incompleto de nitrato (62 %), fosfato (70 %) y sulfato (71 %) al final del cultivo. Estos valores concuerdan con los altos valores de conductividad reportados durante el crecimiento de las células fotoautotróficas y con la baja velocidad de crecimiento celular. El cloruro fue consumido en menor cantidad por las células (38 %). Se observa un aumento en la pendiente de consumo de nitrato a partir del día 7 del cultivo, este valor concuerda con el aumento en la disminución en la conductividad eléctrica del medio.

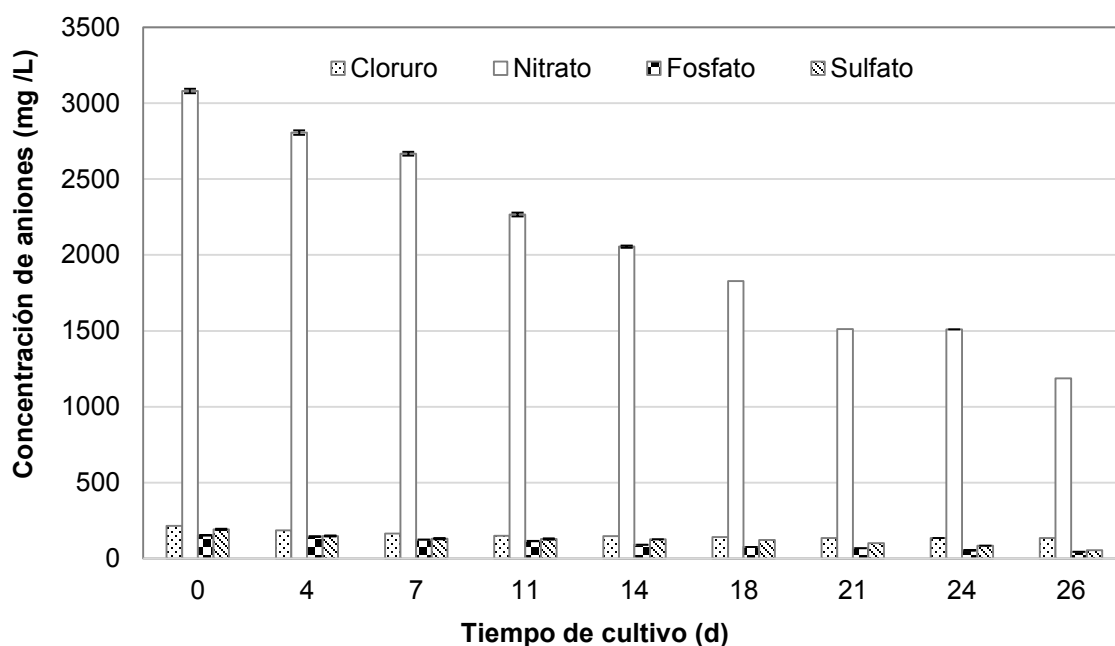


Figura 4-16 Cambio en la concentración de aniones en el medio (NO_3^-), fosfato (PO_4^{3-}) y sulfato (SO_4^{2-}) durante un ciclo de crecimiento de 3 d para los cultivos fotoautotróficos de *Bouteloua gracilis* a nivel de biorreactor.

Debido a la gran sección del área transversal del reactor y la densidad de las células en continuo crecimiento es difícil asegurar un suministro suficiente de la luz durante un ciclo de crecimiento. Peel (1982) utilizó un turbidostato para el crecimiento de células fotoautotróficas de *Asparagus officinalis* y encontró tasas de crecimiento más altas para densidades de cultivo bajas ($1,8 \text{ g L}^{-1}$ PS, $\mu = 0,36 \text{ d}^{-1}$) en comparación con cultivos de densidad alta ($4,8 \text{ g L}^{-1}$, $\mu = 0,12 \text{ d}^{-1}$), lo cual, en efecto, fue causado por una mejor utilización de la luz. Por esta razón, Fischer *et al.* (1995) decidió hacer la corrida del reactor

a una fuerte iluminación (PAR 420 $\mu\text{moles fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y densidad celular reducida. Las condiciones de CO_2 y suministro de luz hicieron posible el incremento de la biomasa a 2,95 g L^{-1} en 18 d, lo cual correspondió a un incremento relativo de 1870 %.

Al inicio del cultivo se observaron con frecuencia células individuales, grupos de células pequeñas y pocos agregados, mientras que en las fases de crecimiento posteriores aumentaron significativamente el número y el tamaño de los agregados celulares.



Figura 4-17 Fotos del crecimiento fotoautotrófico en biorreactor al día 20 del cultivo.

4.4 Conclusiones

Según la información presentada los fotobiorreactores de tanque agitado son convenientes para el crecimiento de células vegetales en suspensión de *Bouteloua gracilis*. Los datos obtenidos demuestran por primera vez, que el crecimiento de los cultivos en suspensión heterotróficos, fotomixotróficos y fotoautotróficos de *Bouteloua gracilis* en un sistema de biorreacción con un volumen de trabajo de 2 L es posible, obteniéndose tasas de crecimiento bajas a estas condiciones en comparación con las obtenidas en cultivos en matraz. Para los cultivos heterotróficos se obtuvo una tasa de crecimiento baja ($\mu = 0,1077 \text{ d}^{-1}$) comparada con la tasa de crecimiento a nivel de matraz ($\mu = 0,380 \text{ d}^{-1}$). Para los cultivos

fotomixotróficos se obtuvo una tasa de crecimiento aún menor ($\mu = 0,0412 \text{ d}^{-1}$) y para las células fotoautotróficas la tasa de crecimiento fue de ($0,0253 \text{ d}^{-1}$) comparada con la tasa de crecimiento a nivel de matraz ($\mu = 0,0744 \text{ d}^{-1}$). Esto es de esperarse debido a que en los cultivos en biorreactor pueden presentarse limitaciones relacionadas con problemas de transferencia de masa y particularmente, los cultivos de células vegetales que crecen en biorreactores de tanque agitado pueden ser sensibles al estrés hidrodinámico.

Los valores de los pigmentos intracelulares clorofilas ($603 \mu\text{g g}^{-1} \text{ PF}$) y carotenoides ($320 \mu\text{g g}^{-1} \text{ PF}$) acumulados en los cultivos fotoautotróficos a nivel de biorreactor, fueron comparables a los establecidos en matraz, por lo que el cambio de escala no afectó el potencial de las células de sintetizar clorofila ni carotenoides.

Para determinar de manera indirecta el crecimiento de las células heterotróficas, fotomixotróficas y fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* a nivel de biorreactor, se pueden establecer relaciones con la conductividad eléctrica del medio de cultivo, obteniéndose buenos índices de correlación.

Es necesario asegurar un suministro adecuado de luz ($250 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) para el crecimiento de las suspensiones celulares fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis*, ya que al aumentar la densidad del cultivo se hace más difícil la disponibilidad de luz para todas las células. La mezcla de 5 % de CO_2 en aire fue conveniente para el crecimiento de la línea celular fotoautotrófica, aunque las células se ven forzadas a crecer bajo una alta presión parcial de oxígeno y por lo tanto no se pueden excluir efectos negativos sobre el fenómeno de la fotosíntesis.

4.5 Recomendaciones

El uso de sistemas de biorreacción para la producción de biomasa fotoautotrófica requerirá mejorar la productividad de los cultivos fotoautotróficos mediante la optimización del medio de cultivo y de las condiciones ambientales, teniendo en cuenta las concentraciones de reguladores de crecimiento, nutrientes, condiciones de estrés hidrodinámico, pH del medio, niveles de oxígeno y dióxido de carbono, además de las condiciones de temperatura y luz

Los resultados son prometedores y deben hacerse más estudios donde se adapten estas células a crecimiento en biorreactor. Se recomienda adaptar la línea celular FA de *Bouteloua gracilis* para lograr mejores tasas de crecimiento en biorreactor y que sean

comparables o mejores que las tasas de crecimiento logradas a nivel de matraz. Sería conveniente seleccionar células resistentes a altas velocidades de agitación a nivel de matraz, o cultivar las células rutinariamente en biorreactor.

Se recomienda diseñar un medio de cultivo específico para las células FA, ya que los resultados encontrados demuestran que uno de los nutrientes que se consume más rápidamente es el fosfato, mientras que el cloruro, el nitrato y el sulfato aún están presentes al final del cultivo.

5 CARACTERIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS ESTRUCTURALES EN LAS CÉLULAS FOTOAUTOTRÓFICAS DE *Bouteloua gracilis*

Se obtuvo una suspensión celular fotoautotrófica a partir de la adaptación de células altamente clorofílicas de *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. ex Steud, cultivadas en medio MPC el cual contenía medio MS suplementado con 2,4-D (1 mg L^{-1}), BA (2 mg L^{-1}) y adenina (40 mg L^{-1}). Se determinaron los contenidos de celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas de las células heterotróficas (H), fotomixotróficas (FM) y fotoautotróficas (FA) obtenidas a partir del cultivo en biorreactor, mediante las metodologías adaptadas del Laboratorio Nacional de Energías Renovables “NREL” por sus iniciales en inglés. La caracterización de la lignina ácido insoluble y las fracciones de carbohidratos estructurales, arrojaron contenidos de lignina en un rango de 10,78 a 14,34%, celulosa de 8,84 a 11,12%, hemicelulosa de 4,66 a 7,17% y cenizas de 4,46 a 9,13%, para los tres tipos de células obtenidas, registrándose el mayor contenido de lignina para la célula tipo heterotrófica (H), los contenidos de celulosa, hemicelulosa y cenizas fueron estadísticamente iguales para los tres tipos de células.

Palabras clave: hidrólisis, celulosa, hemicelulosa, lignina.

5.1 Introducción

Las células vegetales presentan, externamente a la membrana plasmática, una pared celular muy gruesa compuesta básicamente de lignina y carbohidratos estructurales, los cuales se dividen en tres grupos: celulosa, hemicelulosa y pectina; las células vegetales también están compuestas por carbohidratos no estructurales, lípidos, proteínas, ceras, clorofilas, almidón (Sluiter *et al.*, 2008), sales minerales (Cosgrove, 1997) y componentes menores, los cuales incluyen extraíbles y cenizas (principalmente metales) que aunque se presentan en baja concentración, desempeñan funciones fisiológicas de vital importancia (Priensen, 2010). La pared celular es una estructura dinámica, que no sólo es esencial para el mantenimiento de la forma y la rigidez, sino que también juega un papel muy importante en varias funciones fisiológicas tales como el crecimiento, la comunicación intercelular, la defensa contra el ataque de patógenos, la resistencia mecánica y la interacción con el medio ambiente (Fry, 1995; Cosgrove, 1997). Existen diferencias significativas en la composición de las paredes celulares de los pastos y las dicotiledóneas. Aunque la arquitectura es similar, porque están formadas de una red de fibras de celulosa rodeadas por una matriz de polisacáridos no celulósicos, difieren considerablemente en los tipos, la concentración y el entrecruzamiento de estos polisacáridos, la cantidad de proteína y los compuestos fenólicos (Carpita, 1996). La pared celular comprende varias capas que van desarrollándose conforme el grado de diferenciación y la etapa de desarrollo de la célula vegetal: lámina media, pared celular primaria y pared celular secundaria (Figura 5-1).

Los cultivos de suspensiones celulares se han usado ampliamente para estudiar la composición y la estructura de los polisacáridos de la pared celular (Stevenson *et al.*, 1986; Kakegawa *et al.*, 2000; Jia *et al.*, 2003). Las células cultivadas también han mostrado ser un material conveniente para descubrir polisacáridos diversos e inusuales (Sims *et al.*, 1996) y para caracterizar bioquímicamente mutaciones genéticas que alteran su biosíntesis (Pauly *et al.* 2001).

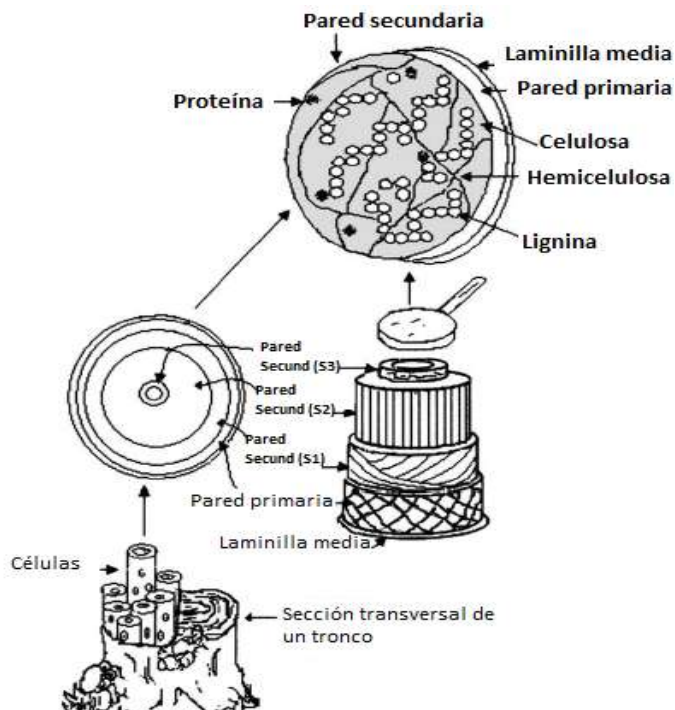


Figura 5-1 Estructura vegetal y composición de los residuos lignocelulósicos.
(Sánchez., 2008, modificado)

La composición de la pared celular varía de acuerdo a la especie y al tipo de planta (Sarkar *et al.*, 2009), el tipo de célula y la posición dentro de la planta, el estado de desarrollo y su historia de respuesta a estrés (Doblin *et al.*, 2010), esta variabilidad en la composición de las paredes celulares refleja un cierto grado de plasticidad respecto a la estructura de la pared y su composición.

Los cultivos celulares están compuestos principalmente por células indiferenciadas de manera que no presentan paredes secundarias y en muchos casos no lignifican. Sin embargo, ciertos cultivos celulares como los derivados de *zinnia* (Miloni *et al.*, 2001), *picea* (Kärkönen *et al.*, 2002) y tabaco (Blee *et al.*, 2001) presentan paredes celulares secundarias y algunos de ellos si han mostrado cierto grado de lignificación.

Los cultivos en células *in vitro* tienen paredes celulares compuestas principalmente de pared celular primaria (Sims *et al.* 2000), lo que hace posible el estudio de la composición y modificación de los polisacáridos constituyentes, obteniendo resultados muy semejantes a los reportados para plantas completas (Günter y Ovod, 2007). Diversos estudios

realizados muestran los efectos de distintas etapas del ciclo celular en un cultivo sincronizado sobre la composición de la pared celular (Amino *et al.*, 1984), la porosidad de la pared en distintas especies de células en suspensión (Titel *et al.*, 1997) y cambios en la adhesión intracelular como consecuencia de las diferencias composicionales en ésta (Leboeuf *et al.*, 2004).

Para estudiar la pared celular se han utilizado diversos métodos químicos con la finalidad de fraccionar e identificar sus componentes. Adicionalmente, la microscopia ha sido durante mucho tiempo una herramienta útil que ha permitido conocer más a fondo la microestructura de la pared celular, mientras que el análisis de espectroscopía FTIR ha sido utilizado ampliamente para hacer análisis cualitativos de la composición de azúcares estructurales de la biomasa vegetal.

En este capítulo se llevó a cabo un análisis químico de la pared de las células de *Bouteloua gracilis*, utilizando el método de determinación de carbohidratos estructurales y lignina en biomasa (Sluiter *et al.*, 2011), para establecer el contenido de polisacáridos y lignina de la pared celular, así mismo se utilizó el análisis de espectroscopía de reflectancia total atenuada ATR-FTIR para hacer un análisis de los carbohidratos estructurales presentes en estas células vegetales.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Caracterización

Las células vegetales H, FM y FA, obtenidas a partir del cultivo en biorreactor (tamaño de partícula de las agrupaciones celulares ~0,5 mm) se secaron por medio de liofilización. Las células se congelaron a -70 °C durante 24 horas y se liofilizaron en un equipo Labconco (FreeZone® 2.5) a una presión de 50 mbar y una temperatura de -50°C, esta operación se llevó a cabo en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. Después del proceso de secado se determinó la humedad de las células vegetales utilizando una balanza de humedad Mettler Toledo HB43-S Halogen Classic Plus a 100° C encontrándose un valor entre 2,88 y 5,36%. Con este material se procedió a realizar la siguiente caracterización.

5.2.2 Componentes extraíbles o extractivos

Previo al análisis de determinación de lignina y carbohidratos estructurales es necesario remover el material extractivo de la biomasa, para prevenir que este tipo de material pueda interferir con los siguientes pasos analíticos. El procedimiento que se realiza incluye dos pasos de extracción para remover tanto el material soluble en agua como el soluble en etanol. Los materiales solubles en agua pueden incluir material inorgánico, azúcares no estructurales y material nitrogenado, entre otros. El material soluble en etanol incluye clorofilas, ceras u otros componentes menores (Sluiter *et al.*, 2008).

Para su cuantificación es necesario realizar una extracción tipo Soxhlet a las células primero con agua y posteriormente con etanol, para así cumplir con la especificación del protocolo de la NREL, el cual requiere que la biomasa a caracterizar esté libre de extractivos para el análisis posterior de lignina y carbohidratos estructurales.

El procedimiento consiste en adicionar de 2 a 10 g de muestra de material seco (humedad <10%), con un tamaño de partícula de máximo 2 mm en un dedal de extracción; previamente se debe secar un balón esmerilado de 250 mL a 105 ± 5 °C por un tiempo mínimo de 12 horas, transcurrido este tiempo se permite que el balón alcance la temperatura ambiente en un desecador para registrar el peso del balón vacío. La primera etapa de extracción consiste en analizar los extractivos en agua, para ello se deben agregar 190 ± 5 mL de agua grado HPLC al balón esmerilado previamente tarado y se procede a realizar el montaje de la extracción Soxhlet. La extracción de la muestra colocada en el dedal se realiza por un tiempo de 12 horas, al final de este tiempo se deja enfriar el balón y se retira para evaporar el solvente utilizado y concentrar los “extractivos”, una vez se alcance el peso constante se registra este valor. El segundo paso de extracción consiste en colocar otro balón esmerilado esta vez con 190 ± 5 mL de etanol, para volver a someter a la muestra a reflujo constante durante 16 horas. La determinación de los extractivos en etanol se realiza de la misma manera que los extractivos en agua. Una vez finalizada la extracción se retira el dedal del sistema de extracción, se lavan los sólidos con 100 mL de etanol fresco sobre un papel filtro en un embudo Büchner y se secan para la posterior determinación de lignina y carbohidratos estructurales.

Sin embargo, esta determinación no se pudo hacer a las células obtenidas, ya que se obtuvo muy poca cantidad de biomasa celular seca después del proceso de liofilización y no quedaba suficiente cantidad de biomasa para la determinación posterior de celulosa, hemicelulosa y lignina si se realizaba la caracterización de extractivos.

5.2.2.1 Lignina

La cuantificación de la lignina y los carbohidratos estructurales se determinó empleando la metodología ajustada con base en protocolos de la NREL (Sluiter *et al.*, 2011), la cual consistió en colocar 0,3 g de células liofilizadas en un tubo de ensayo, se agregó a esta muestra 3 mL de una solución de H₂SO₄ al 72% v/v, este conjunto se llevó a un baño termostático por 1 hora a 30 °C, con agitaciones cada 15 minutos. Una vez finalizado el tiempo se transfirió el contenido a un Erlenmeyer y se adicionaron 84 mL de agua destilada, el Erlenmeyer se llevó a una autoclave a 121° C por una hora, se dejó enfriar y se transfirió cuantitativamente el contenido total del Erlenmeyer a un balón donde se aforó la solución a 100 mL. Previamente se calcinaron filtros de crisoles Gosh a 600 °C por 2 horas, se colocaron en un desecador hasta temperatura ambiente, se registró el peso de los mismos y se utilizaron para filtrar al vacío la solución aforada previamente. De este proceso se obtuvieron dos fracciones una líquida y una sólida, a la fracción líquida se le realizó la determinación de carbohidratos estructurales y la fracción sólida se colocó por 16 horas en un horno a 105 ± 5° C, después de pasado este tiempo se dejaron enfriar los filtros en desecador, se registró el peso y se llevaron nuevamente a una mufla a 600° C por dos horas, para registrar este nuevo peso como cenizas y por diferencia de pesos entre el embudo+lignina+cenizas, embudo+cenizas y embudo tarado, se calculó el contenido de lignina.

5.2.2.2 Cenizas

El contenido de cenizas en el material se determinó siguiendo la norma “Determinación de cenizas en biomasa” recomendado también por la NREL (Sluiter *et al.*, 2008). El procedimiento consiste en calcar crisoles en una mufla a 600 °C por 2 horas, pasar a desecador, dejar enfriar y registrar el peso de los crisoles. Posteriormente pesar ~0,5 g de células liofilizadas en los crisoles y llevarlos de nuevo a la mufla a 600 °C por 3 horas, pasar a desecador y dejar enfriar para registrar el peso. Finalmente por diferencia de pesos se puede obtener el contenido de cenizas en las células.

5.2.2.3 Carbohidratos estructurales

Los carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa) se cuantificaron por cromatografía líquida de alta eficiencia “HPLC” por sus iniciales en inglés; de la fracción líquida obtenida en el proceso descrito para la determinación de lignina (numeral 5.2.2.2). Se emplearon como patrones azúcares, reactivos grado analítico marca Sigma-Aldrich® entre ellos: glucosa y xilosa, monómeros representativos de los polisacáridos estructurales que conforman la biomasa. Se utilizó un detector de índice de refracción, una columna Aminex HPX-87H marca Biorad, temperatura de la columna 65 °C, fase móvil: solución de ácido sulfúrico 0.0005 M a un flujo de 0.6 mL min⁻¹ (Sluiter *et al.*, 2008). Los tiempos de retención para los azúcares detectados en las células se observan en la tabla 5-1. Las curvas de calibración y los cromatogramas obtenidos se presentan en el Anexo G.

Tabla 5-1 Azúcares estructurales y tiempo de retención detectados en las células vegetales

Azúcar	Tiempo de retención (min)
Glucosa	9,01
Xilosa	9,54

5.2.3 Análisis FTIR

A las células heterotrófica, fotomixotróficas y fotoautotróficas crecidas en biorreactor se les realizó análisis de espectroscopía de reflectancia total atenuada, en un espectrofotómetro FTIR Agilent Cary 6:30, detector ATR de diamante, resolución de 4 cm⁻¹ y 100 scan, rango 400 a 4000 cm⁻¹, ubicado en la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Las muestras fueron diluidas a 1% en KBr grado espectroscópico. Las muestras se secaron a 50°C durante 48 horas antes del análisis.

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Caracterización de las células de *Bouteloua gracilis* obtenidas en biorreactor

En la Tabla 5-2 se presenta la composición encontrada para las células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis*. Se realizó un análisis de varianza para la composición de las células heterotróficas, fotomixotróficas y fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* cultivadas en biorreactor y una prueba de múltiples rangos por el método 95,0 % LSD, encontrándose que para celulosa, hemicelulosa y cenizas el valor P de la razón F es mayor o igual que 0,05, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los diferentes tipos de células. Para el caso de lignina si existen diferencias estadísticamente significativas entre la media correspondiente a las células fotomixotróficas y las medias de los otros dos tipos de células.

Tabla 5-2 Composición de las células de *Bouteloua gracilis*.

Componente	Porcentaje en base seca (%)		
	Células H	Células FM	Células FA
Lignina	14,34 ^b ± 0,64	10,78 ^a ± 0,56	13,22 ^b ± 0,43
Celulosa	11,12 ^a ± 0,29	11,46 ^a ± 3,62	8,84 ^a ± 0,60
Hemicelulosa	4,66 ^a ± 0,46	5,88 ^a ± 1,16	7,17 ^a ± 1,49
Cenizas	4,46 ^a ± 0,032	6,76 ^a ± 2,99	9,13 ^a ± 0,96

Nota: Las medias seguidas por distintas letras son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) entre diferentes tipos de células. Los experimentos fueron llevados a cabo dos veces.

Como se mencionó en la metodología, no fue posible realizar la determinación de extractivos de las células, debido a la poca cantidad de biomasa seca de la que se disponía. Las células H, FM y FA de *Bouteloua gracilis* presentaron un contenido de lignina relativamente bajo (14,3, 10,8 y 13,2%) para los tres tipos de células cultivadas a nivel de biorreactor. La cantidad de celulosa para los tres tipos de células también fue baja (11,1, 11,5 y 8,8%). En cuanto al contenido de hemicelulosa (4,7, 5,8 y 7,2%) fueron valores menores a los reportados para la fracción de celulosa. Para el caso de las cenizas, los valores fueron 4,46, 6,76 y 9,13 % para los tres tipos de células.

La biomasa que se caracterizó en cuanto a su contenido de lignina y carbohidratos estructurales debió prepararse previamente a los procedimientos analíticos descritos en las metodologías anteriores de los protocolos adaptados de la NRLE, según Sluiter y Sluiter (2011), si las muestras presentan un tamaño de partícula mayor a 2 mm estas se deben moler antes de realizar el análisis de composición, ya que en esta técnica para los métodos posteriores (especialmente para la hidrólisis) el tamaño de partícula fue optimizado para valores ≤ 2 mm. Las células que se caracterizaron en este trabajo tenían un tamaño menor al definido por el método ($\sim 0,5$ mm), lo cual, según el protocolo, puede resultar en una tendencia a la pérdida del contenido de carbohidratos y consecuentemente a una alta concentración de lignina, debido a la excesiva degradación de los polisacáridos estructurales. Es posible que la baja cantidad de celulosa y hemicelulosa, reportadas, se deba a este problema en el momento de hidrolizar los azúcares poliméricos a monoméricos. Adicionalmente, como no se utilizó el material libre de extractivos, los compuestos relacionados con el material nitrogenado que podrían contener las células (principalmente proteínas y ácidos nucleicos), así como la clorofila presente, pudieron precipitar durante el paso de la filtración del hidrolizado ácido, incrementando aún más el valor reportado para la lignina (Sluiter & Sluiter, 2011), a su vez los valores analíticos encontrados para estas células debían corregirse si se hubiera determinado el contenido de extractivos, ya que el análisis de la determinación de lignina y carbohidratos se realiza sobre la base de un material libre de extractivos. Si adicionalmente, el material analizado presenta altos contenidos de proteínas, ácidos nucleicos y clorofilas, la hidrólisis posiblemente no ocurrió completamente, por lo tanto los valores reportados para la celulosa y hemicelulosa fueron menores.

Cabe destacar que esta técnica se optimizó para tuzas de maíz (residuos del cultivo de maíz, de importancia en Estados Unidos) y tiene adaptaciones para materiales tipo maderables o herbáceos, las células que conforman este tipo de materiales corresponden a células que biológicamente son diferenciadas y presentan cierto grado de madurez en su pared celular (fracciones de lignina, celulosa y hemicelulosa establecidas), mientras que las células analizadas en este trabajo eran células relativamente jóvenes y sin un grado aparente de diferenciación.

En el caso del análisis de las cenizas, es importante resaltar que la técnica NREL se desarrolló originalmente para materiales muy homogéneos como las maderas, donde se realizaba un tamizado para analizar la biomasa a un tamaño de partícula específico (mallas

de tamices entre 20-80). Sin embargo, en materias primas tipo herbáceas, después del tamizado la fracción de los finos (malla <80) frecuentemente contenía un porcentaje de materiales inorgánicos altamente desproporcionado si se comparaba con la muestra global. La remoción de estos finos podría causar un cambio global en la composición. En tales casos no es recomendable el proceso de tamizado, para garantizar la integridad de la muestra (Sluiter y Sluiter, 2011). Sin embargo, en este trabajo este análisis no se puede sustentar sin tener un conocimiento certero del contenido total correspondiente al material inorgánico de las células a nivel de biorreactor. Inclusive la técnica recomienda realizar el tamizado para remover la porción de los finos porque estos contienen la mayor cantidad de cenizas de la muestra y si este valor aún es muy alto en la biomasa sometida al proceso de extracción, puede interferir posteriormente en la hidrólisis, se recomienda que muestras con contenidos superiores al 10% de cenizas no se analicen con esta técnica, porque estos minerales pueden interferir alterando la concentración del ácido y catalizando reacciones laterales indeseadas. Como se observa en la tabla 5-2, los tres tipos de células analizadas presentaron porcentajes de cenizas relativamente altos, FA (9,13%), H (4,46%) y FM (6,76%), sin diferencias estadísticas entre ellas.

Los componentes inorgánicos o sustancias minerales dependen de las condiciones del suelo de cultivo y de factores intrínsecos de las plantas (Angles *et al.*, 1997; Angelova *et al.*, 2004). En la planta varían dependiendo de la especie, de la edad y de la parte estudiada (Angles *et al.*, 1997; Rodríguez, 2006; Priense, 2010). En plantas herbáceas como *B. gracilis* analizada en este estudio puede esperarse un contenido relativamente alto de cenizas. Por ejemplo en el pasto elefante se reportan cenizas en dos partes de la planta, en su médula ($11,3 \pm 0,1$) y en la corteza $5,6 \pm 0,2$ % (Priensen, 2010). Sin embargo, como en este estudio las células se cultivaron en medio MS en el cual se varió la concentración de aproximadamente catorce sales diferentes, era de esperarse un valor relativamente alto en el contenido de cenizas y por tal motivo puede haber interferencias con la técnica analítica. Adicionalmente, se recomienda realizar un análisis de metales posteriormente para verificar la influencia de los mismos en la caracterización de lignina.

Al analizar células mediante esta técnica, y debido al tamaño de partícula tan pequeño que tienen, puede resultar en una degradación de los carbohidratos estructurales, contribuyendo a la sobreproducción de productos de degradación de azúcares, y complicar la medida de lignina soluble en ácido (Sluiter *et al.*, 2013).

El mecanismo de reacción de la hidrólisis de los polisacáridos a monosacáridos en medios catalizados por ácidos procede por la ruptura del enlace en el que participa el oxígeno exocíclico, con la formación del ión carbonilo cíclico. En el caso de la hidrólisis, la formación de ión carbonilo se complica por los enlaces intermoleculares de las cadenas de celulosa (los que confieren cristalinidad a la estructura polimérica). Esto hace que la hidrólisis de las zonas amorfas de la celulosa transcurra más rápido que en las zonas cristalinas. De la misma forma, las hemicelulosas son hidrolizadas más fácilmente que la celulosa (Yoon *et al.*, 2014).

De esta forma se pueden escoger las condiciones de operación, de forma que se ataque a la hemicelulosa (condiciones suaves) o a las dos fracciones (condiciones severas). Se distinguen así tres formas de actuar, según el fin que se persiga. En el caso del método utilizado para la determinación de la celulosa, hemicelulosa y lignina, se realizó la solubilización global de todos los polisacáridos, utilizando ácidos concentrados y temperaturas reducidas (20-50°C), condiciones lo suficientemente severas para provocar la hidrólisis total de la celulosa y la hemicelulosa, dejando la lignina en estado sólido (Yoon *et al.*, 2014).

La hemicelulosa y celulosa, dos de los tres principales componentes de la biomasa, son polímeros a base de carbohidratos que se pueden dividir en azúcares de peso molecular bajo por hidrólisis usando un catalizador ácido. La descomposición de los fragmentos C6 conduce a la formación de 5-hidroximetil-2-furaldehído como el producto intermedio que posteriormente se re-hidrata para dar ácido levulínico y ácido fórmico como los productos finales. Además, otros constituyentes de la hemicelulosa pueden generar productos secundarios como el ácido acético y ácido galacturónico. La lignina, el tercer componente principal de la biomasa lignocelulósica, es una matriz polimérica con varios fenoles sustituidos presentes durante la hidrólisis ácida; varios componentes derivados de la lignina pueden formarse, aumentando la complejidad el producto. Las huminas (o pseudo-ligninas) se forman por condensación de la lignina y furanos a partir de monosacáridos en condiciones de reacción ácida (Yoon *et al.*, 2014). El esquema de reacción simplificado está dado en la figura 5-2.

La hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa siguen procesos análogos, aunque la celulosa necesita condiciones más severas. El objetivo del tratamiento con ácidos diluidos es la

solubilización de las hemicelulosas, dejando intactas las fracciones de celulosa y lignina. La biomasa molida (tamaño de partícula aproximado de 0,5 mm) se somete al proceso de hidrólisis con ácidos diluidos, generando una corriente que contiene una fracción sólida, mayormente compuesta de celulosa y lignina, y una líquida que contiene productos de la depolimerización del xilano presente en la hemicelulosa. La hemicelulosa de pastos está compuesta principalmente por xilosa (60 %), considerables cantidades de arabinosa y galactosa y pequeñas cantidades de glucosa y manosa. En este estudio solo se midió glucosa y xilosa lo cual explicaría las bajas concentraciones de hemicelulosa reportadas.

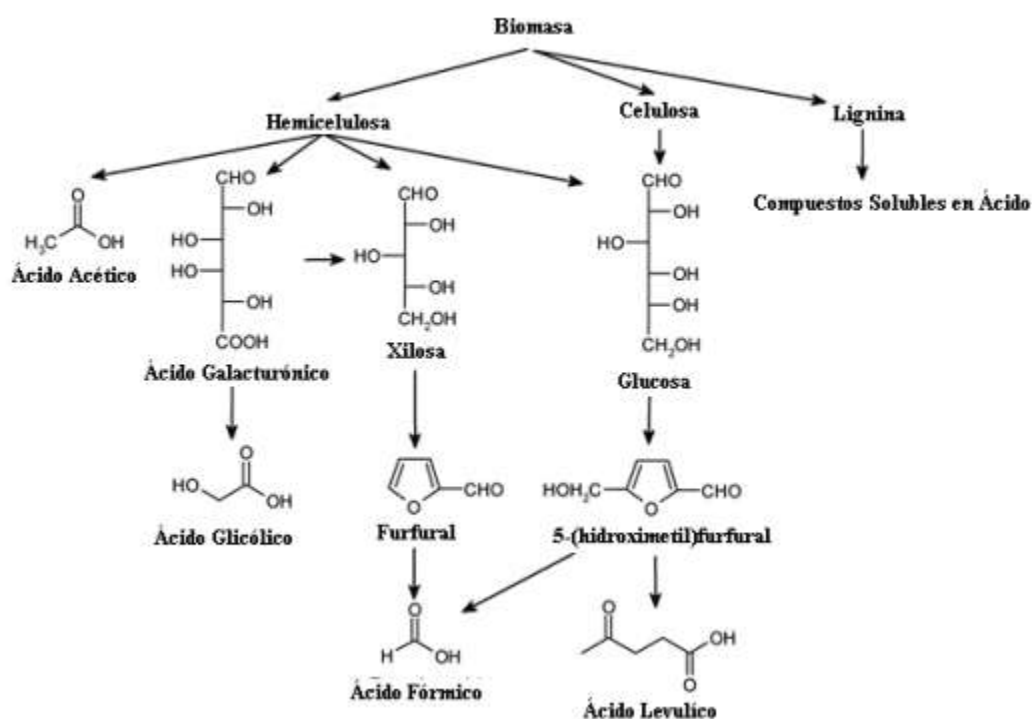


Figura 5-2 Productos de degradación de la biomasa. Fuente: Oliva-Domínguez (2013)

Por esta razón, en condiciones favorables para la hidrólisis de un material lignocelulósico se obtienen jarabes de hemicelulosa que contienen pentosas (xilosa y arabinosa) y hexosas (principalmente glucosa y manosa), además de presentar una concentración de 3 a 10 g L⁻¹ de ácido acético, pequeñas concentraciones de furanos (furfural e hidroximetil furfural) y fenólicos derivados de la hidrólisis parcial de lignina (Yoon *et al.*, 2014).

Los ácidos concentrados llegan a atacar los puentes de hidrógeno existentes entre las cadenas de celulosa, destruyendo su cristalinidad; con ellos se puede formar el ión carbonilo intermedio de la etapa de hidrólisis y ésta transcurre a temperatura moderada (20-50°C). Con esto se reduce la reacción de degradación, lo que permite rendimientos aceptables de glucosa en tiempos relativamente cortos (20-60 min) (Yoon *et al.*, 2014).

Gill y Burke (2002) reportaron la caracterización de las raíces de *Bouteloua gracilis*, en cuanto al contenido de lignina 14,6%, celulosa de 26,6 % por el método de Van Soest (1991), carbono 48,3 y nitrógeno 0,8 %. Brandt *et al.* (2009) realizó la caracterización de tallos y hojas de *Bouteloua gracilis* de dos orígenes diferentes (Minnesota y Nuevo México). En cuanto a solubles celulares reportó 19,9 y 17,7 %, hemicelulosa 41,9 y 34,5 %, celulosa 30,1 y 42,2 % y porcentajes de lignina 8,6 y 6,2%, respectivamente. Los contenidos de porcentaje de C fueron de 45,4 y 43,2, porcentaje de N correspondientes a 1,04 y 0,35 y relaciones C: N de 43,6 y 125 para los pastos originarios de Minnesota y Nuevo México, respectivamente.

Los resultados mostraron que la cantidad de lignina en las suspensiones celulares es distinta al contenido presente en las raíces, tallos y hojas. Sin embargo, para los resultados obtenidos la lignina no es significativamente menor en las suspensiones celulares, al compararlas con el contenido de raíces, tallos y hojas, a pesar que según la literatura, las células en suspensión sólo presentan pared celular primaria.

Treat *et al.* (1990) reportó la composición en base seca de células fotoautotróficas de *Glycine max*. El contenido de lignina en las células fue bajo (7,98%). La holocelulosa estuvo compuesta de α -celulosa (20,74%) y hemicelulosa (23,03%) y se obtuvo 51,75% de masa celular como lignina Klason y holocelulosa. Otros componentes fueron almidón (6,8%), proteína (14,5%), y ácidos nucleicos (6,5%). Los altos contenidos de proteína y DNA-RNA son típicos de células jóvenes que crecen rápidamente, Xu *et al.* (2011) reportó que la composición en base seca del residuo agrícola de la soya fue 24,99% de celulosa, 11,91% de hemicelulosa y 17,64% de lignina, lo cual demuestra que el 54,54% de la biomasa del residuo correspondió a lignina y azúcares estructurales. Esto revela que las células vegetales tienen menor contenido de lignina, probablemente porque no se alcanza a desarrollar completamente la pared celular secundaria.

Se ha dicho con frecuencia que la lignina se forma en tejidos que han dejado de crecer y que, por lo tanto, la lignina no se considera como un constituyente esencial de las paredes celulares primarias de los tejidos en crecimiento (Carpita y Gibeaut, 1996, Liyama *et al.* 1993). Sin embargo, se ha demostrado que la lignina no está restringida a los tejidos vasculares, sino que es un constituyente común de las paredes celulares primarias de las células, capaces de experimentar división y elongación, por lo que las células en cultivo deben presentar mecanismos para atenuar y controlar la rigidez que confiere la lignina a las paredes celulares primarias. Uno de estos mecanismos puede ser un control estricto del grado de polimerización (Devillard y Walter, 2014).

En la Figura 5-3 se presentan fotografías de células fotomixotróficas secadas en estufa a 100 °C, obtenidas a partir de los cultivos en suspensión de *Bouteloua gracilis*, donde se observa la estructura de la superficie celular.

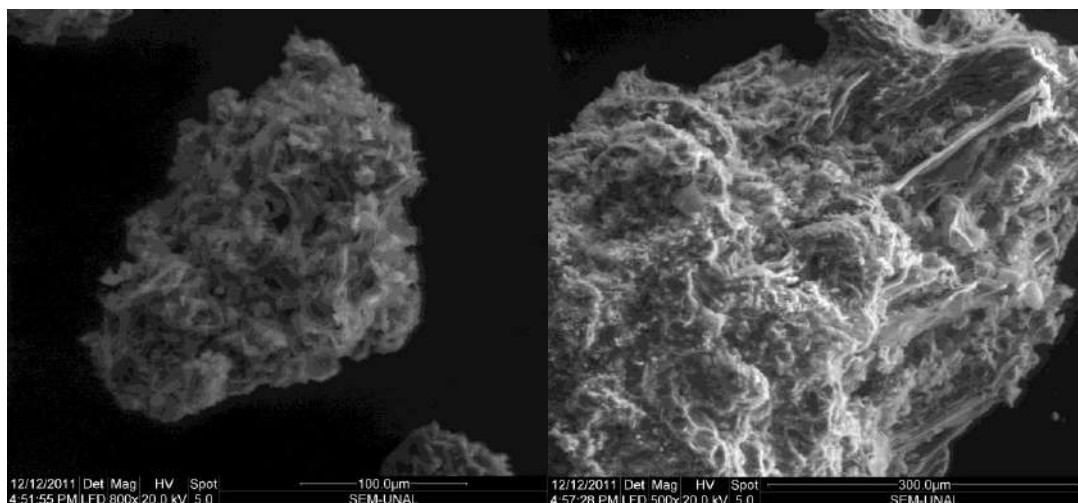


Figura 5-3 Microscopía electrónica de células fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis*

5.3.2 Análisis FTIR

La espectroscopía infrarroja es frecuentemente usada para investigar la estructura de los constituyentes y los cambios químicos en los materiales lignocelulósicos. El espectro FTIR entre los 1200 y 800 cm^{-1} proporciona información acerca de los principales polisacáridos presentes. La espectroscopía FTIR es una herramienta para una rápida caracterización de los materiales lignocelulósicos, ya que se necesitan pequeñas cantidades y una mínima preparación de la muestra. Esta técnica ha sido usada para la caracterización de

materiales lignocelulósicos y para la identificación de cambios debidos a la aplicación de tratamientos químicos y diferentes condiciones ambientales.

Pandey *et al.* (1999) reportaron las posiciones específicas de las bandas para cada uno de los constituyentes en su estudio sobre la estructura química de la madera. *Bouteloua gracilis*, siendo una especie de pasto, tiene dos tipos de lignina, lignina guayacil (G) y siringil (S). En la tabla 5-3 se muestra un resumen de las posiciones específicas de las bandas para cada uno de los componentes de la pared celular.

Tabla 5-3 Resumen de bandas obtenidas por espectroscopia FT-MIR para los principales componentes de la pared celular

Componente de la pared celular	Longitud de onda cm^{-1}
Proteína	1550, 1650
Pectinas	952, 1014, 1097, 1104, 1146, 1243
Pectinas de-esterificadas (ácido carboxílico).	1420, 1600–1630
Ácido urónico esterificado	1740
Pectina acetil éster	1017, 1047, 1100
Lignina	1510, 1530–1540, 1595
Lignina siringil	1330
Lignina guaiacil	1270
Compuestos fenólicos	1430
Anillos fenólicos	1515, 1630
Ésteres fenólicos	1720
Celulosa	900, 990, 1040, 1060, 1109, 1160, 1320, 1367
xiloglucano	1041, 1078, 1120, 1317, 1371
Arabinogalactano	1043, 1078, 1139
Glicerolípidos y ceras hidrocarbonadas	1470, 2850, 2920
Ceras o suberinas como compuestos alifáticos	1318, 1372, 1734–1745

Fuente: Largo-Gosens *et al.* (2014).

Los espectros de los tres tipos de células en suspensión, cultivadas en biorreactor, son mostrados en las Figura 5-4, 5-5 y 5-6. A continuación se presenta un análisis cualitativo de las composición de las células H, FM y FA de *Bouteloua gracilis*.

Al realizar la comparación de los espectros obtenidos para las células H, FM y FA, se observa la banda a 3280 cm^{-1} en las tres muestras. Las bandas entre $3400\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ pueden ser atribuidas a las vibraciones de alargamiento simétrico de los grupos hidroxilos (O-H) y de los grupos N-H en proteínas (Murdock y Wetzel, 2014). Los grupos O-H pueden incluir agua absorbida, enlaces O-H de los anillos fenólicos (Pandey y Nagveni, 2007) y enlaces O-H encontrados en celulosa, hemicelulosa y ácidos carboxílicos en extractivos (Ibrahim *et al.*, 2010).

La banda a 2923 cm^{-1} corresponde a la vibración del enlace C-H en grupos CH_2 , puede corresponder a la presencia de ceras o lípidos presentes en la biomasa vegetal. Esta banda está presente en los tres tipos de células y presenta una mayor altura en las células FM de *Bouteloua gracilis*.

La banda de absorción a 2854 cm^{-1} puede estar relacionada con la presencia de grupos metil (CH_2) y metileno (CH_3) en ácidos grasos (Murdock y Wetzel, 2014) presentes en las células de *Bouteloua gracilis*. También puede estar relacionada con las vibraciones del enlace C-H que corresponden a las fracciones alifáticas en celulosa y hemicelulosa (Ibrahim *et al.*, 2010).

La banda de absorción a 1731 cm^{-1} en los espectros de los tres tipos de células es indicativo de la presencia de ésteres fenólicos (C=O) (Agarwal *et al.*, 2003) y a 1540 cm^{-1} puede ser indicio de la presencia de proteína debido al enlace (C=O) que se encuentra también en el grupo amida, adicionalmente puede deberse a alargamientos (C=C) de compuestos olefínicos y aromáticos y a las vibraciones del anillo aromático en lignina (Ibrahim *et al.*, 2010; Murdock y Wetzel, 2014).

La banda de 1635 cm^{-1} pertenece a la lignina (Largo-Gosens *et al.*, 2014) y corresponde a la tensión del doble enlace C=C conjugado con el anillo en alcoholes coniferílico y sinapílico. Sin embargo, su cercanía a 1630 cm^{-1} podría indicar también la presencia de

agua por la absorción atribuida a las vibraciones de alargamiento simétrico de los grupos hidroxilos (O-H) (Murdock y Wetzel, 2014).

Se observan en los tres espectros las bandas cercanas a 1330 cm^{-1} y 1270 cm^{-1} , correspondientes a la vibración del anillo aromático, usualmente sirven de bandas referencia en estudios de lignina (Bujanovic *et al.*, 2005). La banda a $1343\text{-}1347\text{ cm}^{-1}$ debida al estiramiento del anillo aromático asimétrico (unidades guayacilo), indica el contenido de lignina tipo G y la banda a $1235\text{-}1242\text{ cm}^{-1}$ corresponde al estiramiento del anillo aromático simétrico (unidades siringilo) indica el contenido de lignina tipo S (Largo-Gosens *et al.*, 2014).

En el espectro de las células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* se observan tres picos a 1448 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} y 1312 cm^{-1} que no están en los espectros de los otros dos cultivos; estos picos son característicos del grupo carboxílico C-O, y probablemente de la celulosa. En los tres espectros se ven bandas de absorción a 924 cm^{-1} , 829 , 864 y 869 cm^{-1} las cuales pueden también estar relacionadas con la presencia de pectinas, celulosas o hemicelulosas (Kauráková *et al.*, 2000).

Las bandas a 1160 , 1108 , 1070 , 895 , y 811 cm^{-1} , pueden ser atribuidas a la absorbancia de arabinoglucaronoxilanos y galactoglucomananos los cuales son componentes de la hemicelulosa (Kauráková *et al.*, 2000). Las bandas características de la celulosa son 1161 , 1112 , 1060 , 1031 , 982 y 989 cm^{-1} , valores muy similares a los reportados para hemicelulosa. Estas bandas pueden atribuirse a hemicelulosa y celulosa, considerando que la absorbancia de la tensión C-OH y C-O-C (enlaces glucosídicos presentes en celulosa y xilanos) tiene una desviación de $\pm 10\text{ cm}^{-1}$, para los diferentes polisacáridos debido al efecto de los grupos adyacentes a éstos (Kauráková *et al.*, 2000).

También se observa en los tres espectros una banda a $1090\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$ que puede corresponder a la vibración simétrica del enlace P-O que es característica de la presencia de ácidos nucleicos (Murdock y Wetzel, 2014).

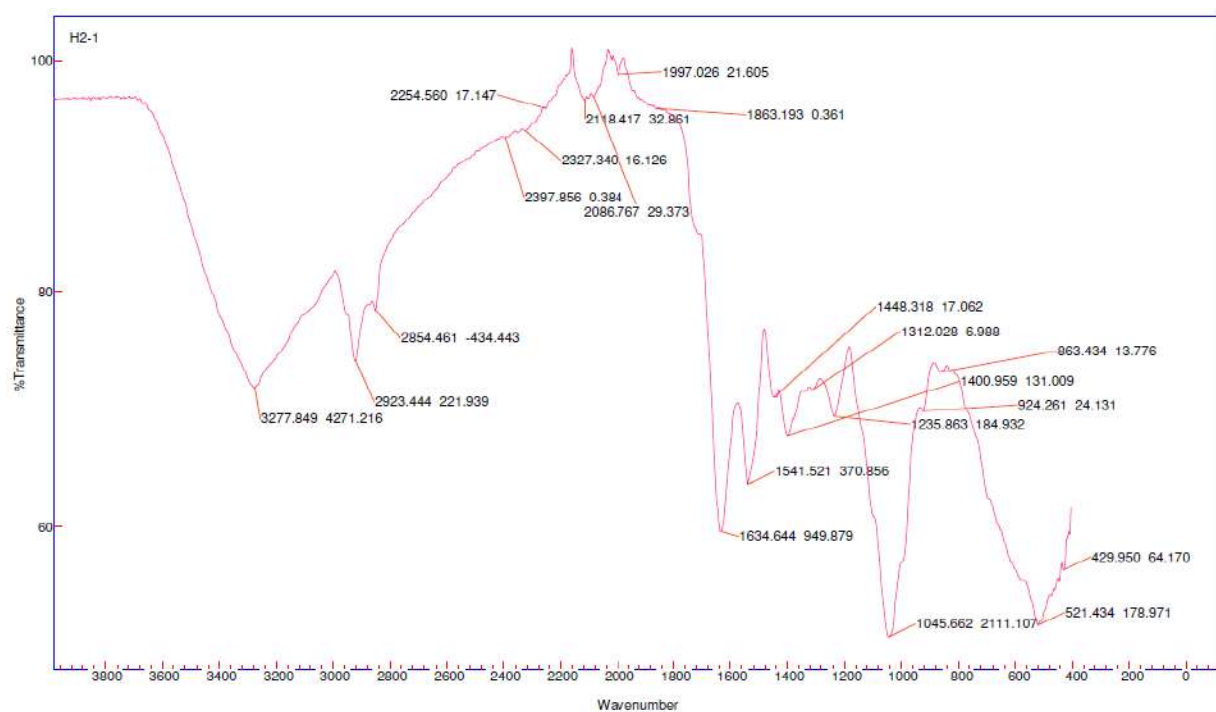


Figura 5-4 FTIR de las células heterotróficas cultivadas a nivel de biorreactor.

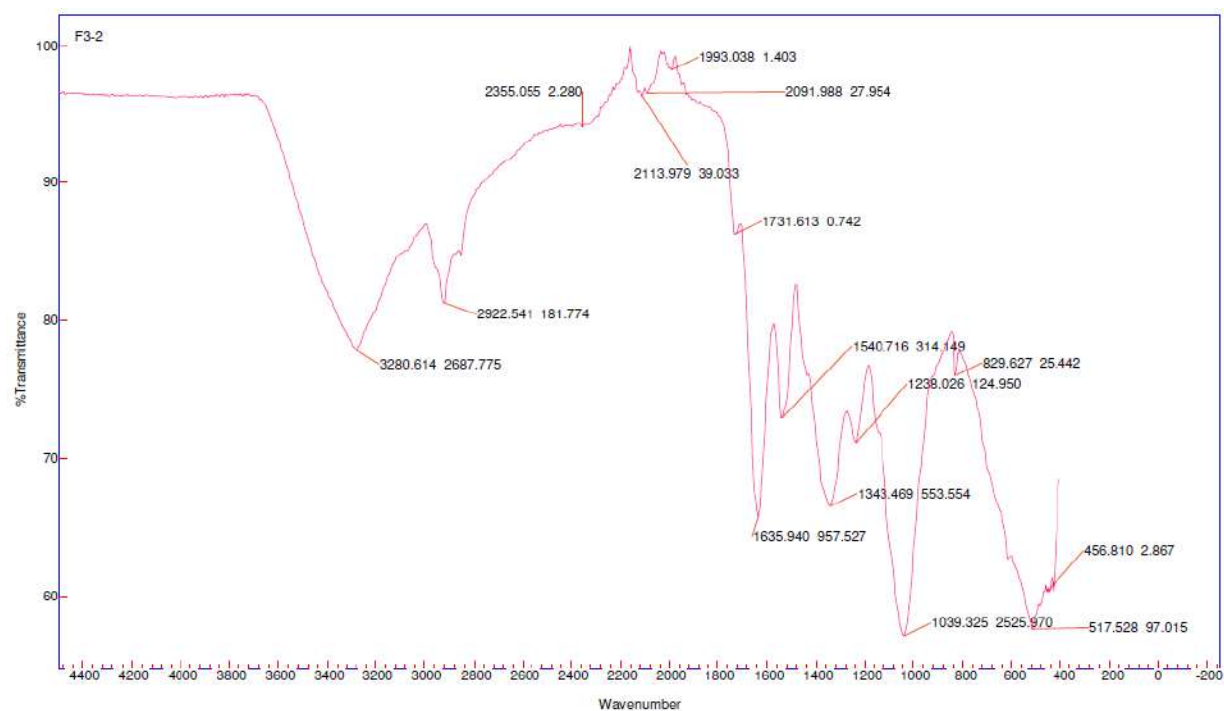


Figura 5-5 FTIR de las células fotomixotróficas cultivadas a nivel de biorreactor.

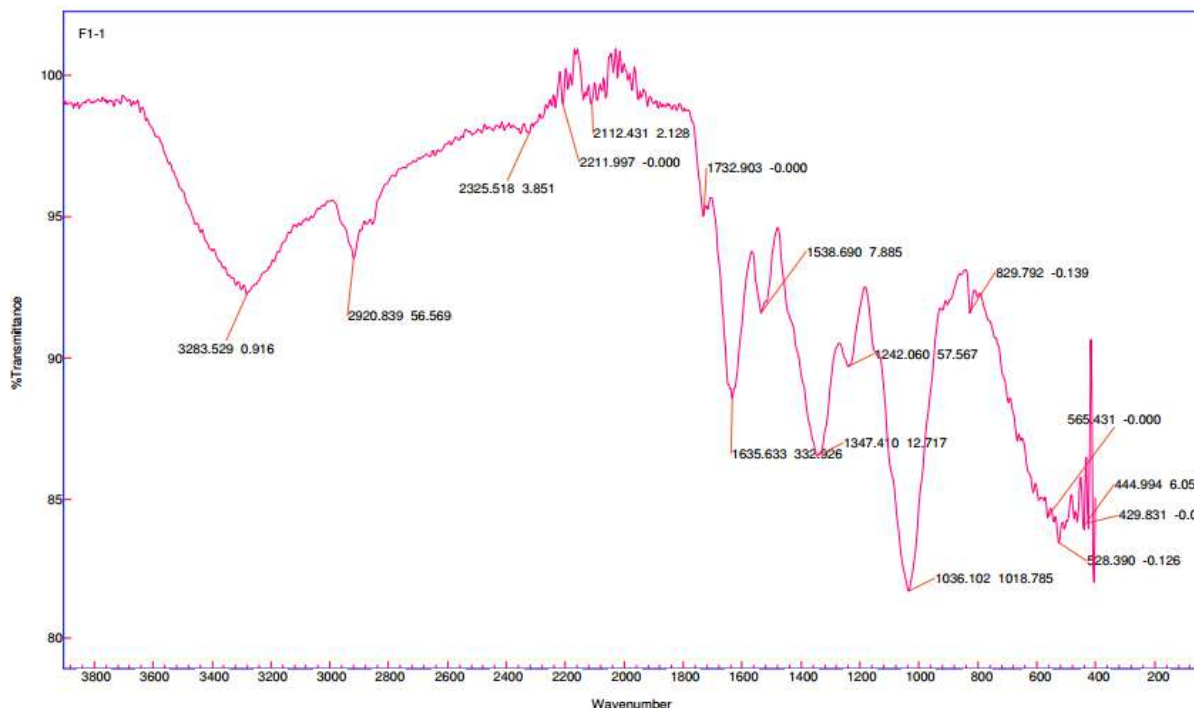


Figura 5-6 FTIR de las células fotoautotróficas cultivadas a nivel de biorreactor.

La espectroscopía infrarroja tiene el potencial de producir datos cualitativos y cuantitativos usando muestras con una mínima preparación y de forma rápida. En la literatura se han obtenido correlaciones lineales con altos coeficientes de regresión para estimar el contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa en varias matrices vegetales, usando las bandas características de lignina y carbohidratos en el espectro FTIR como referencia (Adapa *et al.*, 2011).

5.4 Conclusiones

Las células H, FM y FA de *Bouteloua gracilis* presentaron un contenido de lignina relativamente bajo (14,3, 10,8 y 13,2%) para los tres tipos de células cultivadas a nivel de biorreactor. La cantidad de celulosa para los tres tipos de células también fue baja (11,1, 11,5 y 8,8%). En cuanto al contenido de hemicelulosa (4,7, 5,8 y 7,2%) fueron valores menores a los reportados para la fracción de celulosa. Para el caso de las cenizas, los valores fueron 4,46, 6,76 y 9,13 % para los tres tipos de células.

Se obtuvo un valor bajo de celulosa y hemicelulosa, posiblemente debido a la degradación de los azúcares por el tamaño de partícula (<0,5 mm) usado en la técnica de la NREL. Posiblemente una parte de los monosacáridos fueron convertidos a productos de degradación, como por ejemplo, ácidos orgánicos y no pudieron ser cuantificados como hexosas o pentosas por HPLC.

La técnica de FTIR es una herramienta para una rápida caracterización de los materiales lignocelulósicos, en cuanto a la identificación de grupos funcionales relacionados con las estructuras de celulosa, hemicelulosa, lignina, proteínas y ácidos nucleicos, entre otros que conforman la estructura química de las células de *Bouteloua gracilis*.

5.5 Recomendaciones

Se requiere la identificación y cuantificación de los productos de degradación de los monosacáridos para comprobar que el método de la NREL degradó los azúcares estructurales que constituyen la matriz lignocelulósica de las células de *Bouteloua gracilis*.

También sería importante realizar un análisis elemental de carbono y nitrógeno para complementar los datos obtenidos por el método de determinación de carbohidratos estructurales y lignina, así como realizar un procedimiento de cuantificación de extractivos, proteína, ácidos nucleicos y grupos acetilo según el procedimiento de la NREL.

Realizar pruebas de hidrólisis enzimática a la biomasa cultivada en biorreactor para comprobar si puede ser un sustrato más fácilmente hidrolizable y convertible a azúcares fermentables y descartar que sea un material recalcitrante a la acción de las enzimas celulolíticas.

6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

Los resultados obtenidos en cuanto a eficiencia de formación de callo morfogénico y habilidad de regeneración entre las cinco variedades probadas de *Lolium multiflorum* Lam, presentados en el capítulo 2, indicaron que las diferencias en las respuestas fueron debidas a la influencia de los genotipos y a las distintas combinaciones de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo. No hubo diferencias en la eficiencia de formación de callo morfogénico a partir de las condiciones de luz u oscuridad.

En este estudio las variedades 'Magnun' (65 %) y 'Maximus' (55 a 58 %) mostraron los más altos porcentajes de eficiencia de generación de callo morfogénico. 'Tetragold' (34 %) y Hércules (35%) tuvieron una respuesta similar y la variedad que presentó la menor eficiencia de generación de callos fue 'Bargala' (6 %).

Se encontró que la combinación de diferentes concentraciones de 2,4-D, BA y adenina fue adecuada para la inducción de callo morfogénico en todos los genotipos de *Lolium multiflorum* Lam. Las formulaciones que contenían 2 mg L⁻¹ de 2,4-D más 4 mg L⁻¹ de BA y 40 u 80 mg L⁻¹ de adenina parecieron ser adecuadas para la formación de callos organogénicos y embriogénicos en las variedades 'Magnun' y 'Maximus' y fueron también convenientes para las otras variedades probadas, exceptuando la variedad 'Bargala', donde con estos medios se obtuvieron las respuestas más bajas de formación de callos morfogénicos. Para la variedad 'Tetragold' con cualquiera de las combinaciones de reguladores de crecimiento se obtuvieron buenos resultados y finalmente, para la variedad

'Hércules' se encontró que adicionalmente a la combinación mencionada, los medios con 1 a 2 mg L⁻¹ de 2,4-D más 3 a 4 mg L⁻¹ de BA y 40 a 80 mg L⁻¹ de adenina dieron como resultado callos morfogénicos con eficiencias estadísticamente iguales.

En cuanto a la habilidad de regeneración de plantas, la variedad 'Magnun' y el medio que contenía 2 mg L⁻¹ de 2,4-D más 4 mg L⁻¹ de BA y 40 mg L⁻¹ de adenina resultaron en el mayor número de plantas regeneradas por g de callo de fresco (48,71). Con la variedad 'Tetragold' y esta misma concentración de reguladores de crecimiento se obtuvieron 5,80 plantas por g de callo fresco. En contraste, la variedad 'Bargala' cultivada en este medio no regeneró ninguna planta, teniendo en cuenta que con esta combinación de reguladores de crecimiento se había obtenido una de las más bajas eficiencias de generación de callo morfogénico.

Se demostró, que los ápices de vástago de plantas germinadas *in vitro* son útiles para cultivo de tejidos de *Lolium multiflorum* Lam, ya que se alcanzaron altas eficiencias de formación de callo embriogénico y regeneración de plantas.

Los experimentos presentados en el capítulo 3 demostraron por primera vez que las células cultivadas en suspensión de *Bouteloua gracilis* pueden crecer fotoautotróficamente por un periodo mayor a 4 años. El crecimiento fue dependiente de la luz (100 μ moles fotones m⁻² s⁻¹) y de la concentración de CO₂ (0,5 a 3 % v/v) en el medio ambiente del cultivo. La línea celular fue iniciada de una suspensión heterotrófica clorofílica que se subcultivó fotomixotróficamente disminuyendo paulatinamente la sacarosa en el medio (desde 0,1 % hasta 0 %) con 3 % de CO₂ en aire. Cuando se alcanzó un crecimiento estable del cultivo, después de 2 años de adaptación, el tiempo de duplicación fue de 9,39 días y la tasa de crecimiento (μ) de 0,074 d⁻¹. Los niveles de clorofila total se incrementaron desde el primer subcultivo fotomixotrófico (0,1 % de sacarosa en el medio y 3 % de CO₂) de 138 μ g g⁻¹ PF a valores de 489 μ g g⁻¹ PF, cuando el cultivo fotoautotrófico fue establecido.

La suspensión celular fotoautotrófica, presenta una mayor concentración de pigmentos que las suspensiones celulares heterotróficas y fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis*. Se observó una mayor concentración intracelular de clorofila total (489 μ g g⁻¹ PF) a la mitad del cultivo (día 14), posteriormente el contenido de clorofila total disminuyó a valores iguales a la concentración inicial del cultivo, y esto posiblemente podría estar relacionado al agotamiento de algunos nutrientes en el medio.

Al comparar el crecimiento de las células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* a diferentes niveles de CO₂ se demostró que al incrementar la concentración de CO₂ de 0,5 a 3 %, la velocidad de crecimiento de las células aumenta dos veces. Adicionalmente, se encontró que la acumulación de pigmentos en las células también aumenta cuando se incrementa la concentración de CO₂.

Para determinar de manera indirecta el crecimiento de las suspensiones celulares H, FM y FA de *Bouteloua gracilis*, se pueden establecer relaciones con la conductividad del medio de cultivo, obteniéndose buenos coeficientes de correlación. Adicionalmente los cultivos heterotróficos, fotomixotróficos y fotoautotróficos pueden ser monitoreados mediante el registro de la disminución del pH, el comportamiento del oxígeno disuelto, y el consumo de iones en el medio ya que estas variables están relacionadas con el crecimiento de las células en suspensión de *Bouteloua gracilis*.

Según la información presentada en el capítulo 4, los fotobiorreactores de tanque agitado son convenientes para el crecimiento de células vegetales en suspensión de *Bouteloua gracilis*. Los datos obtenidos demuestran por primera vez, que el crecimiento de los cultivos en suspensión heterotróficos, fotomixotróficos y fotoautotróficos de *Bouteloua gracilis* en un sistema de biorreacción con un volumen de trabajo de 2 L es posible, obteniéndose tasas de crecimiento bajas a estas condiciones en comparación con las obtenidas en cultivos en matraz. Para los cultivos heterotróficos se obtuvo una tasa de crecimiento menor ($\mu = 0,1077 \text{ d}^{-1}$) que la tasa de crecimiento a nivel de matraz ($\mu = 0,380 \text{ d}^{-1}$). Para los cultivos fotomixotróficos se obtuvo una tasa de crecimiento aún menor ($\mu = 0,0412 \text{ d}^{-1}$) y para las células fotoautotróficas la tasa de crecimiento fue de ($0,0253 \text{ d}^{-1}$) comparada con la tasa de crecimiento a nivel de matraz ($\mu = 0,0744 \text{ d}^{-1}$). Esto es de esperarse debido a que en los cultivos en biorreactor pueden presentarse limitaciones relacionadas con problemas de transferencia de masa y particularmente, los cultivos de células vegetales que crecen en biorreactores de tanque agitado pueden ser sensibles al estrés hidrodinámico.

Los valores de los pigmentos intracelulares clorofilas ($603 \mu\text{g g}^{-1} \text{ PF}$) y carotenoides ($320 \mu\text{g g}^{-1} \text{ PF}$) acumulados en los cultivos fotoautotróficos a nivel de biorreactor, fueron comparables a los establecidos en matraz, por lo que el cambio de escala no afectó el potencial de las células de sintetizar clorofila ni carotenoides.

Para determinar de manera indirecta el crecimiento de las células heterotróficas, fotomixotróficas y fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* a nivel de biorreactor, se pueden establecer relaciones con la conductividad eléctrica del medio de cultivo, obteniéndose buenos índices de correlación.

Es necesario asegurar un suministro adecuado de luz ($250 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) para el crecimiento de las suspensiones celulares fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* a nivel de biorreactor, ya que al aumentar la densidad del cultivo se hace más difícil la disponibilidad de luz para todas las células. La mezcla de 5 % de CO_2 en aire fue conveniente para el crecimiento de la línea celular fotoautotrófica, aunque las células se ven forzadas a crecer bajo una alta presión parcial de oxígeno y por lo tanto no se pueden excluir efectos negativos sobre el fenómeno de la fotosíntesis.

Las células H, FM y FA de *Bouteloua gracilis* presentaron un contenido de lignina relativamente bajo (10,8 a 14,3%), para los tres tipos de células cultivadas a nivel de biorreactor. La cantidad de celulosa para los tres tipos de células, también fue baja (8,8 a 11,5 %). En cuanto al contenido de hemicelulosa, los valores son menores a los reportados para celulosa (4,66 a 7,17 %). Para el caso de las cenizas, los valores oscilaron entre 4,6 y 9,1 %.

Se obtuvo un valor bajo de celulosa y hemicelulosa, posiblemente debido a la degradación de los azúcares por el tamaño de partícula ($<0,5 \text{ mm}$) usado en la técnica de la NREL. Probablemente una parte de los monosacáridos fueron convertidos a productos de degradación, como por ejemplo, ácidos orgánicos y no pudieron ser cuantificados como hexosas o pentosas por HPLC.

La técnica de FTIR es una herramienta para una rápida caracterización de los materiales lignocelulósicos, en cuanto a la identificación de grupos funcionales relacionados con las estructuras de celulosa, hemicelulosa, lignina, proteínas, ácidos nucleicos, entre otros presentes en la biomasa celular de *Bouteloua gracilis*.

6.2 Recomendaciones

Aunque 2,4-D ha sido la auxina más utilizada en cultivo de tejidos de cereales y pastos, y en el sistema de regeneración de *Lolium multiflorum* Lam dió buenos resultados en combinación con citocininas, es conveniente evaluar otras auxinas como por ejemplo Picloram y Dicamba las cuales, según la literatura, pueden ser más efectivas para la inducción de respuestas morfogénicas en algunos pastos.

Comprobar el carácter embriogénico de los callos obtenidos en el capítulo 2 mediante análisis histológico de los mismos y observación con microscopio óptico. Adicionalmente, sería conveniente realizar observaciones y fotografías con microscopía electrónica de barrido para diferenciar los callos morfogénicos producidos a partir de las 5 variedades de *Lolium multiflorum* Lam.

En cuanto al establecimiento de la línea celular fotoautotrófica de *Bouteloua gracilis*, se recomienda trabajar con fuentes de carbono diferentes a la sacarosa, como por ejemplo glucosa y almidón, las cuales han demostrado ser convenientes para mejorar la acumulación de pigmentos fotosintéticos. Basados en este conocimiento se propone evaluar el efecto de otros carbohidratos sobre el desarrollo de los cloroplastos y células fotomixotróficas con una atmósfera enriquecida con CO₂, previo al desarrollo de una línea celular fotoautotrófica.

Evaluar el efecto de otros tipos de auxinas y citocininas, y su concentración en el medio sobre el crecimiento y la acumulación de clorofila por parte de las células heterotróficas, fotomixotróficas y fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* también sería importante.

Sería conveniente evaluar el consumo de iones amonio y otros cationes presentes en el medio de cultivo para correlacionar estos datos con el comportamiento del pH y la disminución de la conductividad eléctrica en los tres tipos de cultivos celulares de *Bouteloua gracilis*.

El método de cultivo propuesto para células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* es fácil de usar y permite una presión parcial constante de CO₂ en el sistema cerrado del cultivo. Sin embargo, para próximos trabajos, se recomienda monitorear la concentración de CO₂ durante el cultivo para asegurar que permanezca constante y si no es así cambiar la solución buffer K₂CO₃/KHCO₃ para que el crecimiento continúe en las mismas condiciones.

Evaluar la posibilidad de adaptar la línea celular fotoautotrófica de *Bouteloua gracilis* a condiciones de CO₂ ambientales (0,035 %) a nivel de matraz.

Caracterizar las células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en cuanto a sus respuestas fisiológicas, como por ejemplo tasas fotosintéticas, evolución de oxígeno, determinación del punto de compensación, actividades de las enzimas principales involucradas en el proceso de fotosíntesis (Rubisco y PEP carboxilasa) y análisis de la ultraestructura de los cloroplastos.

El uso de sistemas de biorreacción para la producción de biomasa fotoautotrófica requerirá mejorar la productividad de los cultivos fotoautotróficos mediante la optimización del medio de cultivo y de las condiciones ambientales, teniendo en cuenta las concentraciones de reguladores de crecimiento, nutrientes, condiciones de estrés hidrodinámico, pH del medio, niveles de oxígeno y dióxido de carbono, además de las condiciones de temperatura y luz

Los resultados son prometedores y deben hacerse más estudios donde se adapten estas células a crecimiento en biorreactor. Se recomienda adaptar la línea celular FA de *Bouteloua gracilis* para lograr mejores tasas de crecimiento en biorreactor y que sean comparables o mejores que las tasas de crecimiento logradas a nivel de matraz. Sería conveniente seleccionar células resistentes a altas velocidades de agitación a nivel de matraz, o cultivar las células rutinariamente en biorreactor.

Se recomienda diseñar un medio de cultivo específico para las células FA, ya que los resultados encontrados demuestran que uno de los nutrientes que se consume más rápidamente es el fosfato, mientras que el cloruro, el nitrato y el sulfato aún están presentes al final del cultivo.

Se requiere la identificación y cuantificación de los productos de degradación de los monosacáridos para comprobar que el método de la NREL degradó los azúcares estructurales que constituyen la matriz lignocelulósica de las células de *Bouteloua gracilis*.

También sería importante realizar un análisis elemental de carbono y nitrógeno para complementar los datos obtenidos por el método de determinación de carbohidratos estructurales y lignina, así como realizar un procedimiento de cuantificación de extractivos, proteína, ácidos nucleicos y grupos acetilo según el procedimiento de la NREL.

Realizar pruebas de hidrólisis enzimática a la biomasa cultivada en biorreactor para comprobar si puede ser un sustrato más fácilmente hidrolizable y convertible a azúcares fermentables y descartar que sea un material recalcitrante a la acción de las enzimas celulolíticas.

7 BIBLIOGRAFÍA

Adapa, P K, L G Schonenau, T Canam, T Dumonceaux (2011) Quantitative analysis of lignocellulosic components of non-treated and steam exploded barley, canola, oat and wheat straw using Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural Science and Technology B1*: 177-188.

Aguado-Santacruz G A, J L Cabrera-Ponce, E Ramírez-Chávez, C G León-Ramírez, Q Rascón-Cruz, L Herrera-Estrella, V Olalde-Portugal (2001) Establishment, characterization and plant regeneration from highly chlorophyllous embryogenic cell cultures of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. Ex Steud. *Plant Cell Reports* 20:131-136.

Aguado-Santacruz G A, Velázquez-Ordinola A, Moreno-Gómez B, Gómez-Torres L M, Díaz-Espino L F, Vázquez F P G (2011) Development of long-term and reliable *in vitro* plant regeneration systems for elite malting barley varieties: Optimizing media formulation and explant selection. *African Journal of Biotechnology* 10:19522-33.

Ahloowalia B (1989) Cereals forage grasses: *In*: Handbook of Plant Cell Culture: Crop Species. P V Ammirato, D A Evans, W R Sharp, Y Yamada (eds). McMillan Publishers Co. New York, U.S. pp: 159-159.

Amino S, Y Takeuchi, A Komamine (1984) Changes in cell wall constituents during the cell cycle in a synchronous culture of *Catharanthus roseus*. *Physiologia Plantarum* 60:326-332.

Anandarajah K., G. Mahendrapurumal, M. Sommerfeld, Q. Hu (2012) Characterization of microalga *Nannochloropsis* sp. mutants for improved production of biofuels. *Applied Energy* 96:371-377.

Angelova V, R Ivanova, V Delibaltova, K Ivanov (2004). Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). *Industrial Crops and Products*. 19: 197-205.

Angles M N, J Reguant, J M Martinez, X Farriol, D Montane, J Salvado (1997) Influence of the ash fraction on the mass balance during the summative analysis of high-ash content lignocellulose. *Bioresource Technology*. 59: 185-193.

Atsumi S., W. Higashide, J. C. Liao (2009) Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. *Nature Biotechnology* 27:1177-1180.

Agarwal U P, I Weinstock, R H Atalla (2003) FT-Raman spectroscopy for direct measurement of lignin concentrations in kraft pulps. *Tappi Journal* 2:22-26.

Barampuram S, Chung B, Lee S, An B, Lee E, Cho, J Y (2009) Development of an embryogenic callus induction method for centipede grass (*Eremochloa ophiuroides* Munro) and subsequent plant regeneration. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 45:155-161.

Barz W, H Herzbeck, W Husemann (1990) Alkaloids and lipids of heterotrophic, photomixotrophic and photoautotrophic cell suspension cultures of *Peganum harmala*. *Planta Medica* 40:137-148.

Bhaskaran S., R. H. Smith (1990) Regeneration in cereal tissue culture: a review. *Crop Science* 30:1328-1337.

Bhaskaran S., R. H. Smith, R. J. Newton (1985) Physiological changes in cultured sorghum cells in response to induced water stress. I. Free proline. *Plant Physiology* 79:266-269.

Beck E, U Renner (1989) Ammonium triggers uptake of NO_3^- by *Chenopodium rubrum* suspension culture cells and remobilization of their vacuolar nitrate pool. *Plant and Cell Physiology* 30:487-495.

Bender L, A. Kumar, K H Neumann (1985) On the Photosynthetic system and assimilate metabolism of *Daucus* and *Arachis* cell cultures: *In: Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*. K H Neumann, W Barz, E Reingard (eds). Heidelberg Springer Verlag. Berlín. pp:24-42.

Bergmann L (1967) Growth of green suspension cultures of *Nicotiana Tabacum* Var. "Samsun" With CO_2 as carbon source. *Planta* 74:243-249.

Bettany AJE, Dalton SJ, Timms E, Manderyck B, Dhanoa MS, Morris P (2003) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Festuca arundinacea* (Schreb.) and *Lolium multiflorum* (Lam.). *Plant Cell Reports* 21:437-444.

Bhaskaran S, R H Smith (1990) Regeneration in cereal tissue culture: a review. *Crop Science* 30: 1328-1337.

Bhaskaran S, R H Smith, R J Newton (1985) Physiological changes in cultured sorghum cells in response to induced water stress. I. Free proline. *Plant Physiology* 79: 266-269.

Blair L C, C J Chastain, J M Widholm (1988) Initiation and characterization of a cotton (*Gossypium hirsutum* L.) photoautotrophic cell suspension culture. *Plant Cell Reports* 7:266-269.

Blee K A, E R Wheatley, V A Bonham, G P Mitchell, D Robertson, A R Slabas, M M Burrell, P Wojtaszek, G P Bolwell (2001) Proteomics analysis reveals a novel set of cell wall proteins in a transformed tobacco cell culture that synthesizes secondary walls as determined by biochemical and morphological parameters. *Planta* 212:404-415.

Bohnert H J, B Shen (1999) Transformation and compatible solutes. *Scientia Horticulturae* 78:237-260.

Bosworth S C (2015) Perennial Grass Biomass Production and Utilization: *In: Bioenergy*, Anju Dahiya (ed) Academic Press. Boston, US. pp:73-87

Brandt L A, C Bohnet, J Y King (2009) Photochemically induced carbon dioxide production as a mechanism for carbon loss from plant litter in arid ecosystems. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 114:1-13.

Bressan R A, A K Handa, S Handa, P S Hasegawa (1982) Growth and water relations of cultured tomato cells after adjustment to low external water potentials. *Plant Physiology* 70:1303-1309.

Brouquisse R, P Weigel, D Rhodes, CF Yocum, A D Hanson (1989) Evidence for a ferredoxine-dependent choline monooxygenase from spinach chloroplast stroma. *Plant Physiology* 90:322-329.

Bujanovic B, R S Reiner, S A Ralph, U P Agarwal, R H Atalla. (2005) Structural changes of residual lignin of softwood and hardwood kraft pulp upon oxidative treatment with polyoxometalates: *In: Proceedings of the 2005 TAPPI Engineering, Pulping and Environmental Conference* Philadelphia. GA; TAPPI press. U.S. 13 p.

Campbell W H, P Ziegler, E Beck (1984) Development of nitrogen assimilation enzymes during photoautotrophic growth of *Chenopodium rubrum* suspension cultures. *Plant Physiology* 74:947-950.

Carlozzi P. (2008) Closed photobioreactor assessments to grow, intensively, light dependent microorganisms: a twenty-year Italian outdoor investigation. *The Open Biotechnology Journal* 2:63-72

Carriere F, G Gil, P Tapie, P Chagvardieff (1989) Biotransformation of geraniol by photoautotrophic, photomixotrophic and heterotrophic plant cell suspensions. *Phytochemistry* 28:1087-1090.

Carpita N C (1996) Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 445-476.

Cazalé A, M Rouet-Mayer, H Barbier-Brygoo, Y Mathieu, C Laurière (1998) Oxidative burst and hypoosmotic stress in tobacco cell suspensions. *Plant Physiology* 116:659-669.

Chaumont D, C Gudin (1985) Transition from photomixotrophic to photoautotrophic growth of *Asparagus Officinalis* in suspension culture. *Biomass* 8:41-58.

Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25:294-306.

Chenna-Reddy S, S J Allyson, et al. (2005). Efficient *in vitro* regeneration system from seed derived callus of perennial (*Lolium perenne*) and annual Ryegrass (*Lolium multiflorum*). *In: Molecular Breeding for The Genetic Improvement of Forage Crops and Turf: Proceedings of the 4th International Symposium on The Molecular Breeding of Forage and Turf, a Satellite Workshop of the XXth International Grassland Congress, July 2005, Aberystwyth, Wales, p. 235.*

Cosgrove D J (1997) Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13:171-201.

Creemers-Molenaar J, L J Beerepoot (1992) In vitro culture and micropropagation of ryegrass (*Lolium* spp.). In: *High-Tech and Micropropagation III*. Y P S Bajaj (ed). Springer Berlin Heidelberg. pp. 549-575.

Cunningham Jr F X y E Gantt (1998) Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual review of plant biology* 49: 557-583.

Dale P J (1980) Embryoids from cultured immature embryos of *Lolium multiflorum*. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie* 100:73-77.

Dalton C C (1980) Photoautotrophy of spinach cells in continuous culture: photosynthetic development and sustained photoautotrophic growth. *Journal of Experimental Botany* 31:791-804.

Dalton S J (1988) Plant regeneration from gel suspension protoplasts of *Festuca arundinacea* Schreb., *Lolium perenne* L. and *L. multiflorum* Lam. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 12:137-40.

Dalton S J, Bettany AJE, Timms E, Morris P (1999) Co-transformed, diploid *Lolium perenne* (perennial ryegrass), *Lolium multiflorum* (Italian ryegrass) and *Lolium temulentum* (darnel) plants produced by microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports* 18:721-726.

Desai S. H., S. Atsumi (2013) Photosynthetic approaches to chemical biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 24:1031-1036.

Devillard C, C Walter (2014) Formation of plant tracheary elements in vitro – a review. *New Zealand Journal of Forestry Science* 44:1-14.

Dexter J., P. C. Fu (2009) Metabolic engineering of cyanobacteria for ethanol production. *Energy and Environmental Science* 2:857-864.

Doblin M S, F Pettolino, A Bacic (2010) Evans review: plant cell walls: the skeleton of the plant world. *Functional Plant Biology*, 37(5), 357-381.

Ducat D. C., P. A. Silver (2012) Improving carbon fixation pathways. *Current Opinion in Chemical Biology* 16:337-344.

Ebel J, A Mithofer (1998) Early events in elicitation of plant defense. *Planta* 206:335-348.

Eibl R, Eibl D (2009) Plant Cell-Based Bioprocessing. In: *Cell and Tissue Reaction Engineering Principles and Practice*. R Eibl, D Eibl, R Pörtner, G Catapano, P Czermak (Eds). Springer Berlin Heidelberg. Pp: 315-356.

Fischer U, U J Santore, W Hüsemann, W Barz, A W Alfermann (1994) Semicontinuous cultivation of photoautotrophic cell suspension cultures in a 20 L airlift-reactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 38:123-134.

Fischer U, W Alfermann (1995) Cultivation of photoautotrophic plant cell suspensions in the bioreactor: influence of culture conditions. *Journal of Biotechnology* 41:19-28.

Fry S C (1995) Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46:497-520.

Fuentes G., C. Talavera, Y. Desjardins, J. M. Santamaría (2006) Protocol to achieve photoautotrophic coconut plants cultured *in vitro* with improved performance *ex vitro*: *In: Methods in Molecular Biology*. V. M. Loyola-Vargas, F. Vasquez-Flota (eds). Humana Press. New Jersey, USA. pp:131-144.

Gao Q., W. Wang, H. Zhao, X. Lu (2012) Effects of fatty acid activation on photosynthetic production of fatty acid-based biofuels in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biotechnology for Biofuels* 5:17.

García-Valenzuela X, E García-Moya, Q Rascón-Cruz, L Herrera-Estrella, G A Aguado-Santacruz (2005) Chlorophyll accumulation is enhanced by osmotic stress in graminaceous chlorophyll cells. *Journal of Plant Physiology* 162:650-661.

Genkov T., M. Meyer, H. Griffiths, R. J. Spreitzer (2010) Functional hybrid rubisco enzymes with plant small subunits and algal large subunits: engineered *rbcS* cDNA for expression in *Chlamydomonas*. *Journal of Biological Chemistry* 285:19833-19841.

Gill R y I Burke (2002) Influence of soil depth on the decomposition of *Bouteloua gracilis* roots in the shortgrass steppe. *Plant and Soil* 241:233-242.

Goldstein C S, J M Widholm (1990) Photosynthetic characterization of photoautotrophic cells cultured in a minimal medium. *Plant Physiology* 94:1641-1646.

Godoy-Hernández G y F A Vásquez-Flota (2012) Growth Measurements: Estimation of cell division and cell expansion: *In: Plant Cell Culture Protocols*. V M Loyola-Vargas y N Ochoa-Alejo (eds). Humana Press. New Jersey, U.S. pp:41-48

Gonçalves A R, E Esposito, P Benar (1998) Evaluation of *Panus tigrinus* in the delignification of sugarcane bagasse by FTIR-PCA and pulp properties. *Journal of Biotechnology* 66:177-185.

Gray B. N., B. A. Ahner, M. R. Hanson (2009) High-level bacterial cellulase accumulation in chloroplast-transformed tobacco mediated by downstream box fusions. *Biotechnology and Bioengineering* 102:1045-1054

Günter E A, Y S Ovodov (2005) Effect of calcium, phosphate and nitrogen on cell growth and biosynthesis of cell wall polysaccharides by *Silene vulgaris* cell culture. *Journal of Biotechnology* 117:385-393.

Günter E A, Y S Ovodov (2007) Polysaccharides of cell cultures of *Silene vulgaris*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 43:84-90.

Hallenbeck P C. (2012) The Future of Biofuels *In: Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production*. Hallenbeck P C (ed) Springer. US. pp:261-268

Hagimori M, T Matsumoto, Y Obi (1982) Studies on the production of *Digitalis Cardenolides* by plant tissue culture. II. Effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis Purpurea* L. grown in liquid media. *Plant Physiology* 69:653-656.

Hampp, C, A Ritcher, S Osorio, G Zelling A K Shina, A Jammer, A R Fernie, B Grimm, T Roitsch (2012) Establishment of a photoautotrophic cell suspension culture of *Arabidopsis thaliana* for photosynthetic, metabolic, and signalling studies. *Molecular Plant* 5: 524- 527.

Harun R, M Danquah (2010) Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochemistry* 46:304-309.

Hawkins H J, S H Lips (1997) Cell suspension cultures of *Solanum tuberosum* L. as a model system for N and salinity response effect of salinity on NO₃⁻ uptake and PM-ATPase activity. *Journal of Plant Physiology* 150:103-109.

Hayashi, H A, L Mustardy, P Deshnum, M Ida, N Murata (1997) Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the codA gene for choline oxydase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant Journal* 12:133-142.

Heldt H W, F Heldt (1997) Plant biochemistry and molecular biology.

Horn M E, J H Sherrard, J M Widholm (1983) Photoautotrophic growth of soybean cells in suspension culture. *Plant Physiology* 72:426-429.

Horn M E, J M Widholm (1994) Photoautotrophic growth of soybean cells in suspension culture.III. Characterization of carbon fixation products under high and low CO₂ levels. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39:239-244.

Hüsemann W (1981) Growth characteristics of hormone and vitamin independent photoautotrophic cell suspension cultures from *Chenopodium Rubrum*. *Protoplasma* 109:415-431.

Hüsemann W (1982) Photoautotrophic Growth of cell suspension cultures from *Chenopodium Rubrum* in an airlift fermenter. *Protoplasma* 113:214-220.

Hüsemann W (1983) Continuous culture growth of photoautotrophic cell suspensions from *Chenopodium Rubrum*. *Plant Cell Reports* 2:59-62.

Hüsemann W (1984) Photoautotrophic cell cultures. In: *Laboratory Procedures and Their Applications*. I K VASIL (ed). Academic Press. pp: 182-191,

Hüsemann W, W Barz (1977) Photoautotrophic growth and photosynthesis in cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Physiologia Plantarum* 40:77-81.

Hüsemann W, R Callies, D Leibfritz (1992) External pH modifies the intracellular pH and the mode of photosynthetic CO₂ assimilation in photoautotrophic cell suspension cultures of *Chenopodium Rubrum* L. *Botanica Acta* 105:116-120.

Hüsemann W, A Plohr, W Barz (1979) Photosynthetic characteristics of photomixotrophic and photoautotrophic cell suspension cultures of *Chenopodium Rubrum*. Protoplasma 100:101-112.

Igbavboa U, H J Sieweke, E Leistner, I Rower, W Hüsemann, W Barz (1985) Alternative formation of anthraquinones and lipoquinones in heterotrophic and photoautotrophic cell suspension cultures of *Morinda lucida* Benth. Planta 166:537-544.

Ikemeyer D, W Barz (1989) Comparison of secondary product accumulation in photoautotrophic, photomixotrophic and heterotrophic tabacum cell suspension cultures. Plant Cell Reports 8:479-482.

Jia Z, Q Qin, AG Darvill, WS York (2003) Structure of the xyloglucan produced by suspension-cultured tomato cells. Carbohydrate Research 338:1197-1208.

Jiménez Francisco B (2013) Fisiología comparada de una línea celular clorofílica y una mutante amarilla del zacate *Bouteloua gracilis* (Kunth) Lag. ex Griffiths en condiciones de estrés osmótico. México.

John R P, G S Anisha, K M Nampoothiri, A Pandey (2011) Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. Bioresource Technology 102:186-193.

Joyard J, E Teyssier, C Miège, D Berny-Seigneurin, E Maréchal, M A Block, A Dorne, N Rolland, G Ajlani, R Douce (1998). The biochemical machinery of plastid envelope membranes. Plant Physiology 118:715-723.

Kato A, Y Shimizu, S Noguchi (1975) Effect of initial kLa on the growth of tobacco cells in batch culture. Journal of Fermentation Technology. 53: 744-751.

Kärkönen A, S Koutaniemi S, M Mustonen, K Syrjänen, G Brunow, I Kilpeläinen, T H Teeri, L K Simola (2002) Lignification related enzymes in *Picea abies* suspension cultures. Physiol Plant 114:343-353.

Kauráková M, P Capek, V Sasinkova, N Wellner, A Ebringerova (2000) FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. Carbohydrate polymers 43:195-203.

Kevács G, M László, G Rajkai, B Barnabás (1995) Monitoring of haploid maize cell suspension culture conditions in bioreactors. Plant cell, tissue and organ culture 43:123-126.

Kieran P M, MacLoughlin P F, Malone D M (1997) Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. Journal of Biotechnology 59:39-52

Kozai, T, C Kubota (2005) concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages *in*: Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system. T Kozai, F Afreen, S M A Zobayed (eds). Springer Netherlands. pp. 7-18.

Kumlehn, J J and W Nitzsche (1996) Plant regeneration from ryegrass ovules cultivated on endosperm-derived feeder cells. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 44:235-241.

Largo-Gosens, A., Hernández-Altamirano, M., García-Calvo, L., Alonso-Simón, A., Álvarez, J., & Acebes, J. L. (2014) Fourier transform mid infrared spectroscopy applications for monitoring the structural plasticity of plant cell walls. *Frontiers in plant science*, 5:303.

Lan E I, J C Liao (2011) Metabolic engineering of cyanobacteria for 1-butanol production from carbon dioxide. *Metabolic Engineering* 13:353–363.

Lange, B M, T Rujan, W Martin, R Croteau (2000) Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97:13172-13177.

LaRosa P C, P M Hasegawa, R A Bressan (1984) Photoautotrophic potato cells: transition from heterotrophic to autotrophic growth. *Physiol Plantarum* 61:279-286.

Lavergne D, A Nato, J M Dupuis, M Peán, P Chagvardieff (1992) Evidence for the expression of morphological and biochemical characteristics of C3-photosynthesis in chlorophyllous callus cultures of *Zea Mays*. *Physiologia Plantarum* 84:292-300.

Leboeuf E. S Thoiron, M Lahaye (2004) Physico-chemical characteristics of cell walls from *arabidopsis thaliana* microcalli showing different adhesion strengths. *Journal of Experimental Botany* 55:2087-2097.

Lee K-W, G-J Choi, K-Y Kim, H C Ji, H S Park, S H Yoon, S-H Lee (2009) High frequency plant regeneration from mature seed-derived callus of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) cultivars. *African Journal of Biotechnology* 8(24):6828-6833.

Lee K-W, G-J Choi, K-Y Kim, S H Yoon, H C Ji, H S Park, Y C Lim, S-H Lee (2010) Genotypic variation of Agrobacterium-mediated transformation of Italian ryegrass. *Electronic Journal of Biotechnology* 13:1-10.

Lei A, H Chen, G Shen, Z Hu, L Chen, J Wang (2012) Expression of fatty acid synthesis genes and fatty acid accumulation in *Haematococcus pluvialis* under different stressors. *Biotechnology for Biofuels* 5:18.

Leleu O, C Vuylsteker (2004) Unusual regulatory nitrate reductase activity in cotyledons of *Brassica napus* seedlings: enhancement of nitrate reductase activity by ammonium supply. *Journal of Experimental Botany* 55:815-823.

Leonardi, A, S Heimovaara-Dijkstra, M Wang (1995) Differential involvement of abscisic acid in dehydration and osmotic stress in rice cell suspension. *Physiologia Plantarum* 93:31-37.

Lerner H R (1985) Adaptation to salinity at the plant cell level. *Plant Soil* 89:3-14.

Leelavathi S, N Gupta, S Maiti, A Ghosh, V Reddy (2003) Overproduction of an alkali- and thermo-stable xylanase in tobacco chloroplasts and efficient recovery of the enzyme. *Molecular Breeding* 11:59–67.

Lichtenthaler H K y C Buschmann (2001) Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy Current Protocols in Food Analytical Chemistry F4.3:1–8.

Lindberg P, S Park, A Melis (2010) Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism. Metabolic Engineering 12:70–79.

Linsmaier E M, F Skoog (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 18:100-127.

Liu P, Z W Zhang, J G Yuan, J B Xi, X L Du, Z Y Yang. (2006) Callus induction and plant regeneration in eleven perennial ryegrass cultivars. Biotechnol. & Biotechnol. Eq. 20:30-32.

Liu M, Yang J, Lu S, Guo Z, Lin X, Wu H (2008) Somatic embryogenesis and plant regeneration in centipedegrass (*Eremochloa ophiuroides* [Munro] Hack.). *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 44:100-104.

Liu W, M Zheng, C Konzak (2002) Improving green plant production via isolated microspore culture in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Reports, 20: 821-824.

Liu X Y, S Fallon, J Sheng, R Curtiss (2011) CO₂ -limitation-inducible green recovery of fatty acids from cyanobacterial biomass. 108:6905–6908.

Liyama K, TBT Lam, P J Meikle, K Ng, D Rhodes, B AStone (1993) Cell wall biosynthesis and its regulation. *In: Forage Cell Wall Structure and Digestibility.* H Jung, D Buxton, R Hatfield, J Ralph (eds). American Society of Agronomy, Madison, WI. pp: 621-683.

Lozovaya, V V, X. Luo, J M Widholm (1996) Rapid recovery of photosynthetic cell suspension cultures following heterotrophic bleaching. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 32: 295-298.

Luo X, J M Widholm (1997) Cryopreservation of the SB-M photosynthetic soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] suspension culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 33: 297-300.

Makowska K, S Oleszczuk (2014). Albinism in barley androgenesis. *Plant cell reports* 33: 385-392.

Malik K A (1996) A convenient method for maintaining *Chloroflexus* for long time periods as slow growing liquid cultures. *Journal of Microbiological Methods* 27:151-155.

Manfredini R, L G Saporiti, V Cavallera (1982) Technological approach to industrial fermentation: limiting factors and practical solutions. *La Chimica E l'Industria* 64:325-334.

Marin E, L Nussaume, A Quesada, M Gonneau, B Sota, P Hugueney, A Frey, A Marion-Poll (1996) Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana*

plumbaginifolia, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. EMBO Journal 15:2331-2342.

McDonald K A, J P Jackman (1989) Bioreactor studies of growth and nutrient utilization in alfalfa suspension cultures. Plant Cell Reports 8:455-458.

Milioni D, P E Sado, N J Stacey, C Domingo, K Roberts, M C McCann (2001) Differential expression of cell-wall-related genes during the formation of tracheary elements in the *Zinnia mesophyll* cell system. Plant Mol Biol 47:221-238.

Mohanty B, J S Fletcher (1978) Influence of Ammonium on the Growth and Development of Suspension Cultures of Paul's Scarlet Rose. Physiologia Plantarum 42:221-225.

Mohanty B, J S Fletcher (1980) Ammonium influence on nitrogen assimilating enzymes and protein accumulation in suspension cultures of Paul's scarlet rose. Physiologia Plantarum 48:453-459.

Mühlbach, H P (1998) Use of plant cell cultures in biotechnology. Annu. Rev. Biotechnol. 4:113-176.

Murashige T, F A Skoog (1962) Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.

Nagai T, C Nakamura, T Nagayoshi, H Ono (1989) 2,4-D-sustained photomixotrophic growth of a chlorophyllous cell suspension culture of *Nicotiana tabacum*. Plant Cell Physiology 30:17-23.

Nishio, J N (2000) Why are higher plants green? Evolution of the higher plant photosynthetic pigment complement. Plant, Cell and Environment, 23: 539-548.

Nitsch J. P., C. Nitsch (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science* 163:85-87.

Noctor G, C H Foyer (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annual Review of Plant Physiology. Plant Molecular Biology 49:249-279.

Oliva-Domínguez J M (2003) Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre " *Kluyveromyces marxianus*". CIEMAT.

Orozco S F, S R Hoyos SR, Z M A Arias ZMA (2002) Cultivo de células vegetales en biorreactores: un sistema potencial para la producción de metabolitos secundarios. Rev Fac Nal Agr Medellin 5: 1473-1495

Orthen B, M Popp, W Barz (2000) Cyclitol accumulation in suspended cells and intact plants of *Cicer arietinum* L. Journal of Plant Physiology 156:40-45.

Paek K Y, D Chakrabarty, E J Hahn (2005) Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 3:287-300.

Pandey K K (1999) A study of chemical structure of softwood and hardwood. Journal of Applied Polymer Science 71:1969-1975

Pandey K.K, H Nagveni (2007) Rapid characterisation of brown and white rot degraded chir pine and rubberwood by FTIR spectroscopy. *European Journal of Wood and Wood Products* 65:477-481.

Parajuli, R, T Dalgaard, U Jørgensen, A P S Adamsen, M T Knudsen, M Birkved, M, J K Schjørring (2015) Biorefining in the prevailing energy and materials crisis: a review of sustainable pathways for biorefinery value chains and sustainability assessment methodologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 43: 244-263.

Pauly M, S Eberhard, P Albersheim, A Darvill, WS York (2001) Effects of the mur 1 mutation on xyloglucans produced by suspension-cultured *Arabidopsis thaliana* cells. *Planta* 214:67–74.

Pavlova M, E Kordyum (1996) Somatic embryogenesis in *Lolium multiflorum* suspension culture. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 65:43-5.

Peel E (1982) Photoautotrophic growth of suspension cultures of *Asparagus officinalis* L. cells in turbidostats. *Plant Science Letters* 24:147-155.

Pépin M F, J Archambault, C Chavarie, F Cormier (1995) Growth kinetics of *Vitis vinifera* cell suspension cultures: I. Shake flask cultures. *Biotechnology and bioengineering* 47: 131-138.

Peters W, B Fuchtbauer, E Beck (1995) Nitrate reductase activity is endogenously induced by zeatin riboside in habituated suspension cultured *Chenopodium rubrum* cells. *Journal of Plant Physiology* 147:401-407.

Porra, R J (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research* 73: 149-156.

Prinsen P (2010). Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas. Trabajo final de Máster en Estudios Avanzados en Química. Universidad de Sevilla. España.

Pulz, O (2001) Photobiorreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57:287-293.

Ramachandra R S, G A Ravishankar (2002) Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20:101-153.

Ran Y, Ramage C, Felitti S, Emmerling M, Chalmers J, Cummings N, et al (2007) Ryegrasses. *In: Transgenic Crops VI*. Pua EC, Davey MR, eds. Berlin Heidelberg. P: 373-95.

Rebeille F, P Gans, P Chagvardieff, M Pean, P Tapie, P Thibault (1988) Mass spectrometric determination of the inorganic carbon species assimilated by photoautotrophic cells of *Euphorbia characias* L. *Journal of Biological Chemistry* 263:12373-12377.

Reil G, R G Berger (1996) Elicitation of volatile compounds in photomixotrophic cell culture of *Petroselinum crispum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 46:131-136.

Rey P, F Eymery, G Peltier, A Silvy (1989) Establishment and characterization of photoautotrophic protoplast-derived cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Cell Reports* 8:234-237.

Rhodes D, A D Hanson (1993) Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual Review of Plant Physiol. Plant Molecular Biology*. 44:357-384.

Robertson A J, M Ishikawa, L V Gusta (1995) The effect of prolonged abscisic acid treatment on the growth, infreezing tolerance and protein patterns of *Bromus inermis* (Leyss) cell suspensions cultured at either 3° or 25°C. *Journal of Plant Physiology* 145:137-142.

Robinson S P, G P Jones (1986) Accumulation of glycinebetaine provides osmotic adjustment during salt stress. *Australian Journal of Plant Physiology* 13:659-668.

Rodríguez I (2006) Caracterización química de fibras de plantas herbáceas utilizadas para la fabricación de pastas de papel de alta calidad. Memoria presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas por la Universidad de Sevilla. España.

Roitsch T, A K Sinha (2002) Application of photoautotrophic suspension cultures in plant science. *Photosynthetica* 40:481-492.

Sakamoto A, A Murata, N Murata (1998) Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. *Plant Molecular Biology* 38:1011-1019.

Sanchez de Jiménez E., M. Vargas, R. Aguilar, F. Jiménez (1988) Age-dependent responsiveness to cell differentiation stimulus in maize callus culture. *Plant Physiology and Biochemistry* 26:723-732.

Sanchez C., (2008) Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27: 185-194.

Santos-Díaz M, N Ochoa-Alejo (1994) PEG-tolerant cell clones of chili pepper: growth, osmotic potentials and solute accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 37:1-8.

Sarkar P, E Bosneaga, M Auer (2009) Plant cell walls throughout evolution: towards a molecular understanding of their design principles. *Journal of Experimental Botany* 60(13), 3615-3635.

Sato F. (2013) Characterization of plant functions using cultured plant cells, and biotechnological applications. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 1:1-9.

Scragg A H, E J Allan, F Leckie (1988) Effect of shear on the viability of plant cell suspensions. *Enzyme Microbiology Technology* 10:316-367.

Seo M., T. Koshiba (2002) Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* 7:41-48.

Sims IM, SLA Munro, G Currie, D Craik, A Bacic (1996) Structural characterisation of xyloglucan secreted by suspension-cultured cells of *Nicotiana plumbaginifolia*. Carbohydrate Research 293:147–172.

Sims I M, K Middleton, A G Lane, S Cairns, A Bacic (2000) Characterization of extracellular polysaccharides from suspension cultures of members of the Poaceae. Planta 210:261–268.

Singh N D, H Daniell (2010) Chloroplast genetic engineering: A novel technology for agricultural biotechnology and bio-pharmaceutical Industry. *In*: The Chloroplast. C. A. Rebeiz, C. Benning, H. J. Bohnert, H. Daniell, J. K. Hooper, H. K. Lichtenthaler, A. Portis, B. C. Tripathy (eds). Springer. Dordrecht, The Netherlands. pp:263-284.

Sivakumar G, J Xu, R W Thompson, Y Yang, P Randol-Smith, P J Weathers (2012) Integrated green algal technology for bioremediation and biofuel. Bioresource Technology 107:1-9.

Sluiter A, B Hames, R Ruiz, C Scarlata, J Sluiter, D Templeton, D Crocker (2006). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. National Renewable Energy Laboratory. <http://devafdc.nrel.gov/pdfs/9572.pdf> www1.eere.energy.gov/biomass/analytical_procedures.html# LAP-002.

Sluiter A, R Hames, R Ruiz, C Scarlata, J Sluiter, D Templeton (2008) Determination of ash in biomass. National Renewable Energy Laboratory. U.S. Department of Energy.

Sluiter A, R Ruiz, C Scarlata, J Sluiter, D Templeton (2008). Determination of Extractives in Biomass. National Renewable Energy Laboratory. U.S. Department of Energy

Sluiter A, B Hames, R Ruiz, C Scarlata, J Sluiter, D Templeton, D Crocker (2011) Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. National Renewable Energy Laboratory. U.S. Department of Energy.

Sluiter J, A Sluiter, (2011) Summative Mass Closure. National Renewable Energy Laboratory. U.S. Department of Energy.

Sluiter A, J Sluiter, E Wolfrum (2013). Methods for biomass compositional analysis.

Smetanska I (2008) Production of secondary metabolites using plant cell cultures: *In*: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. U. Stahl, U. E. B. Donalies, E. Nevoigt (eds). Springer Berlin Heidelberg. Berlin. Germany. pp:187-228.

Solís C, E Sánchez de Jiménez, V M Loyola-Vargas, A Cáramez, B Lotina-Hennsen (1989) The biogenesis of chloroplasts in tissue cultures of a C3 and C4 plant. Plant Cell Physiology 30:609-616.

Spilantro S R, Anderson J M (1988) Carbohydrate metabolism and activity of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase in photosynthetic Ssybean (*Glycine max*, Merr.) Suspension Cells. Plant Physiology 88:862-868

Srivastava N, R Rawat, H Singh Oberoi, P W Ramteke (2015) A review on fuel ethanol production from Lignocellulosic biomass. *International Journal of Green Energy* 12: 949-960.

Stevenson T T, M McNeil, A G Darvill, P Albersheim (1986) Structure of plant cell walls. XVIII An analysis of the extracellular polysaccharides of suspension cultured sycamore cells. *Plant Physiology* 80:1012–1019.

Stocker S, M C Guitton, A Barth, H P Muhlbach (1993) Photosynthetically active suspension cultures of potato spindle tuber viroid infected tomato cells as tools for studying viroid - host cell interaction. *Plant Cell Reports* 12:597-602.

Takahashi W, T Komatsu, M Fujimori, T Takamizo (2004) Screening of regenerable genotypes of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam). *Plant Production Science* 7:55-61.

Takayama S (2014). Bioreactors for plant cell tissue and organ cultures. *In: Fermentation and Biochemical Engineering Handbook*. H Vogel y Todaro (eds). Noyes Publications, Westwood, New Jersey, USA. pp: 46-70.

Tan X M, L Yao, Q Q Gao, W H Wang, F X Qi, X F Lu (2011) Photosynthesis driven conversion of carbon dioxide to fatty alcohols and hydrocarbons in cyanobacteria. *Metabolic Engineering* 13:169–176

Tanaka, H (1981) Technological problems in cultivation of plant cells at high density *Biotechnology Bioengineering* 23:1203-1218.

Tanaka H, H Semba H, T Jitsufuchi, H Harada (1988) The effects of physical stress on plant cells in suspension cultures. *Biotechnology Letters* 10, 485-490

Taya M, M Hegglin, J E Prenosil, J R Bourne (1989) On-line monitoring of cell growth in plant tissue cultures by conductometry. *Enzyme and microbial technology*, 11(3), 170-176.

Taya M, M Miya-Oka, Y Toyo-Oka, M Kino-Oka, S Tone, K On (1995) Growth characteristics of liverwort cells, *Marchantia paleacea* Var. *Diptera*, in a photoautotrophic suspension culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80:580-585.

Tholalakabavi A, J J Zwiazek, T A Thorpe (1994) Effect of mannitol and glucose induced osmotic stress on growth, water relations and solute composition of cell suspension cultures of poplar (*Populus deltoides* var. *occidentalis*) in relation to anthocyanin accumulation. *In vitro cellular & developmental biology- Plant* 30:164-170.

Tholalakabavi A, J J Zwiazek, T A Thorpe (1997) Osmotically-stressed poplar cell cultures: anthocyanin accumulation, deaminase activity, and solute composition. *Journal of Plant Physiology* 151:489-496.

Thomas T D, Yoichiro H (2011) Optimizing embryo and shoot tip derived callus production and high frequency plant regeneration in the model grass *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* 145:924-30.

Titel C, H Woehkecke, I Afifi, R Ehwald (1997) Dynamics of limiting cell wall porosity in plant suspension cultures. *Planta* 2013:320-326.

López-Torres A M, J C Quintero-Díaz, L Atehortua-Garcés (2008). Determinación de la velocidad específica de consumo de oxígeno en microorganismos incluyendo el tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno Determination of the specific oxygen uptake. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia* 43: 33-41.

Tripathi U, R Sarada, G A Ravishankar (2001) A culture method for microalgal forms using two-tier vessel providing carbon-dioxide environment studies on growth and carotenoid production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17:325-329.

Treat W J, C R Engler, E J Soltes (1989) Culture of Photomixotrophic Soybean and Pine in a Modified Fermentor Using a Novel Impeller. *Biotechnology and Bioengineering* 34:1191-1202

Treat W J, J Castillon, E J Soltes (1990) Photobioreactor culture of photosynthetic soybean cells. Growth and biomass characteristics. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 24/25:497-510.

Tyler R T, W G W Kurz, B D Panchuk (1986) Photoautotrophic cell suspension cultures of periwinkle *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: transition from heterotrophic to photoautotrophic growth. *Plant Cell Reports* 5:195-198.

Ugwu C U, H Aoyagi, H Uchiyama. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource technology*, 99: 4021-4028.

Umeda M, C Hara, Y Matsubayashi, H Li, Q Liu, F Tadokoro, S Aotsuka, H Uchimiya (1994) Expressed sequence tags from cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.) under stressed conditions: analysis of transcripts of genes engaged in ATP-generating pathways. *Plant Molecular Biology* 25:469-478.

Vargas-Suarez M, A Rincón-Guzman, C Mujica-Jiménez, R A Muñoz-Clares, E Sanchez de Jiménez (1996) Influence of carbon source and CO₂ enrichment on biochemical parameters associated with photomixotrophia in maize callus cultures. *Plant Physiology* 149:585-591.

Verástegi-Peña Y M (1999) Expresión diferencial de mRNAs de células de chile (*Capsicum annuum* L.) tolerantes a polietilenglicol (PEG). Tesis de Maestría en Ciencias. Departamento de Ingeniería Genética. CINVESTAV-Unidad Irapuato. Irapuato, Gto. 132 p.

Van Soest P V, J B Robertson, y B A Lewis (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of dairy science* 74: 3583-3597.

Wang B, C Q Lan, M Horsman (2012) Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnology advances* 30: 904-912.

Warburg O, A W Geissler, S Lorenz (1962) Neue Methode zur Bestimmung der Kohlensäuredrucke über Bicarbonat-Carbonatgemischen. *In: Weiterentwicklung der zellphysiologischen Methoden.* O. Warburg (ed). Thieme, Stuttgart. pp. 578-581.

Weigel P, E A Weretilnyk, A D Hanson (1986) Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts. *Plant Physiology* 82:753-759.

Widholm J M (1992) Properties and uses of photoautotrophic plant cell cultures: *In: International Review of Cytology*. K W Jeon Friedlander (eds). Academic Press. San Diego, US. pp:109-175.

Wink M, T Hartmann (1980) Production of quinolizidine alkaloids by photomixotrophic cell suspension cultures: biochemical and biogenetic aspects. *Planta Medica* 40:149-155.

Wright K M, C V Givan (1988) Regulation of non-autotrophic carbon dioxide assimilation by ammonia in cultured cells of *Acer pseudoplatanus* L. *Plant Science* 58:151-158.

Xu C, L C Blair, S M D Rogers (1988) Characteristics of five new photoautotrophic suspension cultures including two *Amaranthus* species and a cotton strain growing on ambient CO₂ levels. *Plant Physiology* 88:1297-1302.

Xu Z, Q. Wang, J ZhaoHua, X Yang, Y Ji (2006) Enzymatic hydrolysis of pretreated soybean Straw. *Biomass and Bioenergy* 31:162-167.

Yamada Y (1985) Photosynthetic potential of plant cell cultures: *In: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. A. Fiechter (ed). Springer. Berlin / Heidelberg. pp: 89-98.

Yamada Y, K Imaizumi K, F Sato, T Yasuda (1981) Photoautotrophic and photomixotrophic culture of green tobacco cells in a jar-fermenter. *Plant & Cell Physiology* 22:917-922.

Yamada Y, F Sato (1978) the photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. *Plant & Cell Physiology* 19:691-699.

Ye X, Z Y Wang, X Wu, I Potrykus, Spangenberg (1997) Transgenic Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. *Plant Cell Reports* 16: 379-84.

Yen H W, I C Hu, C Y Chen, J S Chang (2014) Design of photobioreactors for algal cultivation. *In: Biofuels from Algae*. Pandey A, D J Lee, Y Chisti, C R Soccol (eds.). Newnes, Elsevier, Amsterdam. pp 23-45.

Yoon, S Y, S. H. Han, S. J. Shin (2014) The effect of hemicelluloses and lignin on acid hydrolysis of cellulose. *Energy* 77:19-24.

Yu L. X, B N Gray, C J Rutzke, L P Walker, D B Wilson, M R Hanson (2007) Expression of thermostable microbial cellulases in the chloroplasts of nicotine-free tobacco. *Journal of Biotechnology* 131:362–369.

Velicky, I y S M Martin (1970) A fermenter for plant cell suspension cultures. *Canadian Journal of Microbial.* 16: 223-226.

Wagner F, H Vogelmann (1977) Cultivation of plant tissue cultures in bioreactors and formation of secondary metabolites. *In: Plant Tissue Culture and its Biotechnological Applications*. W Barz, E Reinhard y M H Zenk (Eds). Springer Verlag, Berlin. Pp:85-94.

Whitaker J T y C Y Lee (1995) Recent Advances in Chemistry of Enzymatic Browning. *In: Enzymatic Browning and its Prevention*. Lee C Y y JR Whitaker (Eds.). American Chemical Society, Washington, DC. pp: 1-7.

Wilson G. (1978) Frontiers of Plant Tissue Culture, T A Thorpe (ed). The International Ass. Plant Tissue Culture, University of Alberta, Canada, p. 169.

Yoon S-Y, S-H Han, S-J Shin (2014) The effect of hemicelluloses and lignin on acid hydrolysis of cellulose, *Energy* 77:19-24.

Zhang QX, Sun Y, Hu HK, Chen B, Hong CT, Guo HP, et al (2012) Micropropagation and plant regeneration from embryogenic callus of *Miscanthus sinensis*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. 48:50-7.

Ziegler P, R Scheibe (1989) Greening and growth of suspension-cultured cells of *Chenopodium rubrum* under conditions of heterotrophic and autotrophic nutrition. *Plant, Cell and Environ.* 12:725-735.

Zittelli, G C, N Biondi, L Rodolfi, M R Tredici (2013). Photobioreactors for mass production of microalgae. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, Second Edition, 225-266.

A. Anexo: Composición del medio Murashige & Skoog

La concentración del medio Murashige & Skoog se presenta a continuación:

Tabla A-1 Composición del medio Murashige & Skoog

Componente	(mg/L)
Inorgánicos	
Nitrato de amonio	1650,0
Ácido bórico	6,2
Cloruro de calcio anhidro	332,2
Cloruro de cobalto • 6H ₂ O	0,025
Sulfato cúprico • 5H ₂ O	0,025
Na ₂ -EDTA	37,26
Sulfato ferroso • 7H ₂ O	27,8
Sulfato de magnesio	180,7
Sulfato de manganeso • H ₂ O	16,9
Molibdato de sodio • 2H ₂ O	0,25
Yoduro de potasio	0,83
Nitrato de potasio	1900,0
Fosfato monobásico de Potasio	170,0
Sulfato de zinc • 7H ₂ O	8,6
Orgánicos	
Glicina (base libre)	2,0
Mioinositol	100,0
Ácido nicotínico (ácido libre)	0,5
Piridoxina • HCl	0,5
Tiamina • HCl	0,1

Murashige y Skoog (1962).

B. Anexo: Análisis estadístico del capítulo 2

Tabla B-1 Análisis de varianza para eficiencia de formación de callo primario (%) a partir de *Lolium multiflorum* LAM. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente		Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F *	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES	A:Medio	4020,35	5	804,07	1,12	0,3514
	B:Variedad	5984,93	4	1496,23	2,08	0,0837
	C:Condición	286,163	1	286,163	0,40	0,5289
RESIDUOS		208039	289	719,857		
TOTAL (CORREGIDO)		218330	299			

*Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de % Inducción de callo primario en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que ningún valor-P es menor que 0.01, ninguno de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre % Inducción de callo primario con un 99.0% de nivel de confianza.

Tabla B-2 Análisis de varianza para la eficiencia de formación de callo morfogénico (%) a partir de *Lolium multiflorum* LAM. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente		Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F *	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES	A:Medio	11552,0	5	2310,4	10,21	0,0000
	B:Variedad	25116,7	4	6279,17	27,75	0,0000
	C:Condición	33,3333	1	33,3333	0,15	0,7014
RESIDUOS		65398	289	226,291		
TOTAL (CORREGIDO)		102100	299			

*Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de % callo embriogénico en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores P son menores que 0.01, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre % callo embriogénico con un 99.0% de nivel de confianza.

Tabla B-3 Pruebas de múltiple rangos para eficiencia de inducción de callo embriogénico (%) variedad Magnun. Método: 99.0 porcentaje LSD.

Medio	Casos	Media	Grupos Homogéneos
MPC	10	28,0	X
D3BA	10	32,0	XX
D4B80A	10	32,0	XX
MPC80	10	41,0	XX
2D4BA	10	49,0	X
2D4B80A	10	65,0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
2D4B80A - 2D4BA	*	16,0	12,4917
2D4B80A - D3BA	*	33,0	12,4917
2D4B80A - D4B80A	*	33,0	12,4917
2D4B80A - MPC80	*	24,0	12,4917
2D4B80A - MPC	*	37,0	12,4917
2D4BA - D3BA	*	17,0	12,4917
2D4BA - D4B80A	*	17,0	12,4917
2D4BA - MPC80		8,0	12,4917
2D4BA - MPC	*	21,0	12,4917
D3BA - D4B80A		0,0	12,4917
D3BA - MPC80		-9,0	12,4917
D3BA - MPC		4,0	12,4917
D4B80A - MPC80		-9,0	12,4917
D4B80A - MPC		4,0	12,4917
MPC80 - MPC	*	13,0	12,4917

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Se muestran las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 9 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 99.0% de confianza. Se han identificado 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en

columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado para discriminar entre las medias fue el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 1.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla B-4 Pruebas de múltiple rangos para eficiencia de inducción de callo embriogénico (%) variedad Bargala. Método: 99.0 porcentaje LSD.

Medio	Casos	Media	Grupos Homogéneos
MPC80	10	6,0	X
2D4BA	10	6,0	X
2D4B80A	10	7,0	X
D4B80A	10	19,0	XX
MPC	10	22,0	X
D3BA	10	30,0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
2D4B80A - 2D4BA		1,0	13,5365
2D4B80A - D3BA	*	-23,0	13,5365
2D4B80A - D4B80A		-12,0	13,5365
2D4B80A - MPC80		1,0	13,5365
2D4B80A - MPC	*	-15,0	13,5365
2D4BA - D3BA	*	-24,0	13,5365
2D4BA - D4B80A		-13,0	13,5365
2D4BA - MPC80		0,0	13,5365
2D4BA - MPC	*	-16,0	13,5365
D3BA - D4B80A		11,0	13,5365
D3BA - MPC80	*	24,0	13,5365
D3BA - MPC		8,0	13,5365
D4B80A - MPC80		13,0	13,5365
D4B80A - MPC		-3,0	13,5365
MPC80 - MPC	*	-16,0	13,5365

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Se muestran las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 6 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 99.0% de confianza. Se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado para discriminar entre las

medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 1.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla B-5 Pruebas de Múltiple Rangos para eficiencia de inducción de callo embriogénico (%) variedad Tetragold. Método: 99.0 porcentaje LSD.

Medio	Casos	Media	Grupos Homogéneos
MPC	10	29,0	X
2D4BA	10	33,0	X
D4B80A	10	34,0	X
MP80	10	34,0	X
D3BA	10	36,0	X
2D4B80A	10	37,0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
2D4B80A - 2D4BA		4,0	13,624
2D4B80A - D3BA		1,0	13,624
2D4B80A - D4B80A		3,0	13,624
2D4B80A - MP80		3,0	13,624
2D4B80A - MPC		8,0	13,624
2D4BA - D3BA		-3,0	13,624
2D4BA - D4B80A		-1,0	13,624
2D4BA - MP80		-1,0	13,624
2D4BA - MPC		4,0	13,624
D3BA - D4B80A		2,0	13,624
D3BA - MP80		2,0	13,624
D3BA - MPC		7,0	13,624
D4B80A - MP80		0,0	13,624
D4B80A - MPC		5,0	13,624
MP80 - MPC		5,0	13,624

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Se muestran las diferencias estimadas entre cada par de medias. No hay diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 99.0% de confianza. Se ha identificado un grupo homogéneo, según la alineación de las X's en columna. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 1.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla B-6 Pruebas de Múltiple Rangos para eficiencia de inducción de callo embriogénico (%) variedad Hércules. Método: 99.0 porcentaje LSD.

Medio	Casos	Media	Grupos Homogéneos
MP80	10	10,0	X
MPC	10	11,0	X
D3BA	10	35,0	X
2D4BA	10	35,0	X
2D4B80A	10	37,0	X
D4B80A	10	38,0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
2D4B80A - 2D4BA		2,0	12,9585
2D4B80A - D3BA		2,0	12,9585
2D4B80A - D4B80A		-1,0	12,9585
2D4B80A - MP80	*	27,0	12,9585
2D4B80A - MPC	*	26,0	12,9585
2D4BA - D3BA		0,0	12,9585
2D4BA - D4B80A		-3,0	12,9585
2D4BA - MP80	*	25,0	12,9585
2D4BA - MPC	*	24,0	12,9585
D3BA - D4B80A		-3,0	12,9585
D3BA - MP80	*	25,0	12,9585
D3BA - MPC	*	24,0	12,9585
D4B80A - MP80	*	28,0	12,9585
D4B80A - MPC	*	27,0	12,9585
MP80 - MPC		-1,0	12,9585

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Se muestran las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 8 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 99.0% de confianza. Se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 1.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla B-7 Pruebas de Múltiple Rangos para eficiencia de inducción de callo embriogénico (%) variedad Maximus. Método: 99.0 porcentaje LSD.

Medio	Casos	Media	Grupos Homogéneos
D3BA	10	20,0	X
MPC	10	26,0	X
MP80	10	28,0	X
D4B80A	10	37,0	XX
2D4BA	10	55,0	XX
2D4B80A	10	58,0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
2D4B80A - 2D4BA		3,0	19,2399
2D4B80A - D3BA	*	38,0	19,2399
2D4B80A - D4B80A	*	21,0	19,2399
2D4B80A - MP80	*	30,0	19,2399
2D4B80A - MPC	*	32,0	19,2399
2D4BA - D3BA	*	35,0	19,2399
2D4BA - D4B80A		18,0	19,2399
2D4BA - MP80	*	27,0	19,2399
2D4BA - MPC	*	29,0	19,2399
D3BA - D4B80A		-17,0	19,2399
D3BA - MP80		-8,0	19,2399
D3BA - MPC		-6,0	19,2399
D4B80A - MP80		9,0	19,2399
D4B80A - MPC		11,0	19,2399
MP80 - MPC		2,0	19,2399

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Se muestran las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 7 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 99.0% de confianza. Se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 1.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla B-8 Análisis de varianza para regeneración de plantas *in vitro* a partir de *Lolium multiflorum* LAM. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente		Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F*	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES	A:Medio	2018,69	2	1009,34	229,38	0,0000
	B:Variedad	1447,69	1	1447,69	329,00	0,0000
INTERACCIONES: AB		4735,91	2	2367,96	538,13	0,0000
RESIDUOS		105,608	24	4,40032		
TOTAL (CORREGIDO)		8307,89	29			

*Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de regeneración de plantas *in vitro* en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la regeneración de plantas *in vitro* con un 95,0 % de nivel de confianza.

Tabla B-9 Pruebas de múltiple rangos para plantas regeneradas variedad 'Bargala' por medio. Método: 95,0 porcentaje LSD.

Medio	Casos	Media	Grupos Homogéneos
2D4BA	5	0	X
D3BA	5	9,68	X
MPC	5	17,42	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
2D4BA - D3BA	*	-9,68	0,882373
2D4BA - MPC	*	-17,42	0,882373
D3BA - MPC	*	-7,74	0,882373

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0 % de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3

grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0 % al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla B-10 Pruebas de múltiples rangos para plantas regeneradas variedad 'Magnun' por medio. Método: 95,0 porcentaje LSD.

Medio	Casos	Media	Grupos Homogéneos
D3BA	5	0	X
MPC	5	20,072	X
2D4BA	5	48,71	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
2D4BA - D3BA	*	48,71	3,99165
2D4BA - MPC	*	28,638	3,99165
D3BA - MPC	*	-20,072	3,99165

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Se muestran las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0 % de confianza. Se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0 % al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

C. Anexo: Análisis estadístico del capítulo 3

Tabla C-1 Cinética de crecimiento para el cultivo heterotrófico de células de *Bouteloua gracilis* en matraz, en condiciones de luz y oscuridad.

Condición	Tiempo (d)	Réplicas peso fresco (g)					Promedio	Desviación Estándar
		R1	R2	R3	R4	R5		
Luz	0	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400 ^a	0,000
	3	1,479	1,618	1,385	1,475	1,643	1,520 ^b	0,108
	6	3,932	3,003	4,618	4,408	4,679	4,128 ^c	0,694
	9	6,526	5,666	5,494	6,845	6,308	6,168 ^d	0,573
	12	6,36	7,613	7,300	8,328	6,862	7,293 ^e	0,747
Oscuridad	0	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400 ^f	0,000
	3	1,215	1,154	0,937	1,119	1,203	1,126 ^g	0,112
	6	2,535	2,113	2,954	3,200	3,057	2,772 ^h	0,444
	9	5,729	5,285	5,597	5,445	3,791	5,169 ⁱ	0,788
	12	6,682	7,003	7,440	6,712	6,712	6,712 ^j	0,324

Nota: las medias seguidas por distintas letras son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) entre tiempos. Los experimentos fueron llevados a cabo al menos 5 veces.

Tabla C-2 Análisis de varianza para la cinética de crecimiento del cultivo heterotrófico de *Bouteloua gracilis* en matraz, condiciones de luz y oscuridad. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente		Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F*	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES	A:Tiempo (días)	312,987	4	78,247	260,64	0,0000
	B:Condición	5,54245	1	5,542	18,46	0,0001
RESIDUOS		13,2093	44	0,300		
TOTAL (CORREGIDO)		331,739	49			

*Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual. ($P \leq 0,05$)

Tabla C-3 Pruebas de Múltiple Rangos para la cinética de crecimiento en condición de luz (Método 95,0 % LSD de Fischer).

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	5	0,400	X
3	5	1,520	X
6	5	4,128	X
9	5	6,168	X
12	5	7,293	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 3	*	-1,120	0,693
0 - 6	*	-3,728	0,693
0 - 9	*	-5,768	0,693
0 - 12	*	-6,893	0,693
3 - 6	*	-2,608	0,693
3 - 9	*	-4,648	0,693
3 - 12	*	-5,773	0,693
6 - 9	*	-2,040	0,693
6 - 12	*	-3,165	0,693
9 - 12	*	-1,125	0,693

* indica una diferencia significativa.

Tabla C-4. Pruebas de Múltiple Rangos para la cinética de crecimiento en condición de oscuridad (Método 95,0 % LSD de Fischer).

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	5	0,400	X
3	5	1,126	X
6	5	2,772	X
9	5	5,167	X
12	5	6,712	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 3	*	-0,726	0,654
0 - 6	*	-2,372	0,654
0 - 9	*	-4,769	0,654
0 - 12	*	-6,312	0,654
3 - 6	*	-1,646	0,654
3 - 9	*	-4,044	0,654
3 - 12	*	-5,587	0,654
6 - 9	*	-2,398	0,654
6 - 12	*	-3,940	0,654
9 - 12	*	-1,543	0,654

* indica una diferencia significativa.

Tabla C-5 Comportamiento del pH para el cultivo heterotrófico de células de *Bouteloua gracilis* en matraz, en condiciones de luz y oscuridad.

Condición	Tiempo (d)	pH (unidades de pH)					Promedio	Desviación Estándar
		R1	R2	R3	R4	R5		
Luz	0	6,12	6,24	6,09	6,11	6,02	6,12 ^c	0,08
	3	5,26	5,31	5,15	5,16	5,54	5,29 ^a	0,16
	6	5,74	6,06	5,54	5,6	5,66	5,72 ^b	0,20
	9	5,81	5,88	6,00	5,84	5,89	5,90 ^b	0,07
	12	6,16	6,01	6,10	6,10	5,94	6,04 ^c	0,09
Oscuridad	0	6,31	6,24	6,09	6,11	6,02	6,12 ⁱ	0,12
	3	4,98	5,09	5,04	5,15	4,94	5,06 ^f	0,08
	6	4,18	4,25	4,28	4,43	4,31	4,32 ^e	0,09
	9	5,37	5,45	5,41	5,36	5,31	5,38 ^g	0,05
	12	5,6	5,69	5,63	5,67	5,89	5,72 ^h	0,11

Nota: las medias seguidas por distintas letras son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) entre tiempos. Los experimentos fueron llevados a cabo al menos 5 veces.

Tabla C-6 Análisis de varianza para el comportamiento del pH del cultivo heterotrófico de células de *Bouteloua gracilis* en matraz, en condiciones de luz y oscuridad. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente		Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F*	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES	A:Condición	3,125	1	3,125	37,86	0,0000
	B:Tiempo (días)	9,074	4	2,269	27,49	0,0000
RESIDUOS		3,631	44	0,083		
TOTAL (CORREGIDO)		15,831	49			

*Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual. ($P \leq 0,05$)

Tabla C-7 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento del pH en condición de luz (Método 95,0 % LSD de Fischer).

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
3	5	5,284	X
6	5	5,72	X
9	5	5,884	X
12	5	6,062	X
0	5	6,116	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 3	*	0,832	0,173
0 - 6	*	0,396	0,173
0 - 9	*	0,232	0,173
0 - 12		0,054	0,173
3 - 6	*	-0,436	0,173
3 - 9	*	-0,600	0,173
3 - 12	*	-0,778	0,173
6 - 9		-0,164	0,173
6 - 12	*	-0,342	0,173
9 - 12	*	-0,178	0,173

* indica una diferencia significativa.

Tabla C-8. Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento del pH en condición de luz. Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
6	5	4,290	X
3	5	5,040	X
9	5	5,380	X
12	5	5,696	X
0	5	6,160	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 3	*	1,120	0,124
0 - 6	*	1,870	0,124
0 - 9	*	0,780	0,124
0 - 12	*	0,464	0,124
3 - 6	*	0,750	0,124
3 - 9	*	-0,340	0,124
3 - 12	*	-0,656	0,124
6 - 9	*	-1,090	0,124
6 - 12	*	-1,406	0,124
9 - 12	*	-0,316	0,124

* indica una diferencia significativa.

Tabla C-9 Comportamiento del Oxígeno Disuelto de las células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* en matraz en condiciones de luz y oscuridad.

Tiempo (d)	Condiciones de Luz			Condiciones de Oscuridad		
	PF (g)	OD (mg L ⁻¹)	mg OD • g ⁻¹ PF	PF (g)	OD (mg L ⁻¹)	mg OD • g ⁻¹ PF
0	0,400±0,000	4,24±0,00 ^d	0,265±0,000	0,400±0,000	3,95±0,00 ^c	0,198±0,000
3	1,520±0,108	2,94±0,46 ^c	0,049±0,011	1,067±0,030	2,72±0,51 ^b	0,063±0,012
6	4,128±0,694	1,72±0,51 ^a	0,011±0,005	2,199±0,165	2,29±0,28 ^a	0,026±0,004
9	6,168±0,573	1,64±0,22 ^a	0,007±0,001	3,114±0,505	2,90±0,30 ^b	0,024±0,007
12	7,293±0,747	2,34±0,52 ^b	0,008±0,002	3,226±0,407	2,81±0,11 ^b	0,022±0,003

Nota: las medias seguidas por distintas letras son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) entre tiempos. Los experimentos fueron llevados a cabo al menos 5 veces.

Tabla C-10 Análisis de varianza para el comportamiento del Oxígeno Disuelto de las células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* en matraz en condiciones de luz y oscuridad. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente		Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F*	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES	A:Condición	1,591	1	1,591	7,80	0,0077
	B:Tiempo (días)	26,301	4	6,575	32,22	0,0000
RESIDUOS		8,978	44	0,204		
TOTAL (CORREGIDO)		36,870	49			

* Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual. ($P \leq 0,05$)

Tabla C11 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento del Oxígeno Disuelto en condición de luz. Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
9	5	1,642	X
6	5	1,720	X
12	5	2,340	X
3	5	2,944	X
0	5	4,240	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 3	*	1,296	0,525
0 - 6	*	2,520	0,525
0 - 9	*	2,598	0,525
0 - 12	*	1,900	0,525
3 - 6	*	1,224	0,525
3 - 9	*	1,302	0,525
3 - 12	*	0,604	0,525
6 - 9		0,078	0,525
6 - 12	*	-0,620	0,525
9 - 12	*	-0,698	0,525

* indica una diferencia significativa.

Tabla C12 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento del Oxígeno Disuelto en condición de oscuridad. Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
6	5	2,292	X	0 – 3	*	1,228	0,390
3	5	2,722	X	0 – 6	*	1,658	0,390
12	5	2,806	X	0 – 9	*	1,050	0,390
9	5	2,900	X	0 – 12	*	1,144	0,390
0	5	3,950	X	3 – 6	*	0,430	0,390
				3 – 9		-0,178	0,390
				3 – 12		-0,084	0,390
				6 – 9	*	-0,608	0,390
				6 – 12	*	-0,514	0,390
				9 – 12		0,094	0,390

* indica una diferencia significativa.

Tabla C-13 Perfil de pigmentos para las células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* en matraz en condiciones de luz y oscuridad.

Condición	Tiempo (d)	Clorofila a (mg clorofila/ g PF)	Clorofila b (mg clorofila/ g PF)	Clorofila Total (mg clorofila/ g PF)	Carotenoides (mg clorofila/ g PF)
Luz	0	0,144 ± 0,020 ^{ab}	0,055 ± 0,008 ^{ab}	0,200 ± 0,027 ^{ab}	0,073 ± 0,011 ^{ab}
	3	0,118 ± 0,029 ^a	0,045 ± 0,009 ^a	0,163 ± 0,038 ^a	0,067 ± 0,011 ^a
	6	0,194 ± 0,027 ^c	0,084 ± 0,015 ^c	0,278 ± 0,042 ^c	0,109 ± 0,013 ^c
	9	0,158 ± 0,036 ^b	0,064 ± 0,015 ^b	0,222 ± 0,051 ^b	0,086 ± 0,013 ^b
	12	0,126 ± 0,019 ^{ab}	0,054 ± 0,012 ^{ab}	0,180 ± 0,030 ^{ab}	0,071 ± 0,005 ^a
Condición	Tiempo (d)	Clorofila a (mg clorofila/ g PF)	Clorofila b (mg clorofila/ g PF)	Clorofila Total (mg clorofila/ g PF)	Carotenoides (mg clorofila/ g PF)
Oscuridad	0	0,013 ± 0,002 ^c	0,013 ± 0,004 ^b	0,026 ± 0,006 ^b	0,016 ± 0,003 ^c
	3	0,004 ± 0,001 ^b	0,004 ± 0,001 ^a	0,008 ± 0,002 ^a	0,011 ± 0,002 ^b
	6	0,003 ± 0,001 ^{ab}	0,003 ± 0,002 ^a	0,006 ± 0,003 ^a	0,006 ± 0,002 ^a
	9	0,002 ± 0,001 ^a	0,002 ± 0,001 ^a	0,004 ± 0,003 ^a	0,007 ± 0,002 ^a
	12	0,003 ± 0,001 ^{ab}	0,005 ± 0,002 ^a	0,007 ± 0,003 ^a	0,007 ± 0,002 ^a

Tabla C-14 Análisis de varianza para el comportamiento de clorofila *a*, de las células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* en matraz en condiciones de luz y oscuridad. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Condición	0,257	1	0,257	466,93	0,0000
B:Tiempo (días)	0,009	4	0,002	3,98	0,0076
RESIDUOS	0,024	44	0,001		
TOTAL (CORREGIDO)	0,290	49			

* Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual. ($P \leq 0,05$)

Tabla C-15 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento de clorofila *a* en condición de luz. Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
3	5	0,118	X
12	5	0,126	XX
0	5	0,144	XX
9	5	0,158	X
6	5	0,194	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 – 3		0,026	0,035
0 – 6	*	-0,050	0,035
0 – 9		-0,014	0,035
0 – 12		0,018	0,035
3 – 6	*	-0,076	0,035
3 – 9	*	-0,040	0,035
3 – 12		-0,008	0,035
6 – 9	*	0,036	0,035
6 – 12	*	0,068	0,035
9 – 12		0,032	0,035

* indica una diferencia significativa.

Tabla C-16 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento de clorofila *a* en condición de oscuridad Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
9	5	0,0018	X
6	5	0,0025	XX
12	5	0,0026	XX
3	5	0,0040	X
0	5	0,0130	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 – 3		0,026	0,035
0 – 6	*	-0,050	0,035
0 – 9		-0,014	0,035
0 – 12		0,018	0,035
3 – 6	*	-0,076	0,035
3 – 9	*	-0,040	0,035
3 – 12		-0,008	0,035
6 – 9	*	0,036	0,035
6 – 12	*	0,068	0,035
9 – 12		0,032	0,035

* indica una diferencia significativa.

Tabla C-17 Análisis de varianza para el comportamiento de clorofila *b*, de las células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* en matraz en condiciones de luz y oscuridad. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Condición	0,038	1	0,038	289,84	0,0000
B:Tiempo (días)	0,002	4	0,000	3,78	0,0100
RESIDUOS	0,006	44	0,000		
TOTAL (CORREGIDO)	0,045	49			

* Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual. ($P \leq 0,05$)

Tabla C-18 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento de clorofila *b* en condición de luz. Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
3	5	0,0450	X
12	5	0,0537	XX
0	5	0,0554	XX
9	5	0,0640	X
6	5	0,0836	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 3		0,010	0,016
0 - 6	*	-0,028	0,016
0 - 9		-0,009	0,016
0 - 12		0,002	0,016
3 - 6	*	-0,039	0,016
3 - 9	*	-0,019	0,016
3 - 12		-0,009	0,016
6 - 9	*	0,020	0,016
6 - 12	*	0,030	0,016
9 - 12		0,010	0,016

* indica una diferencia significativa.

Tabla C-19 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento de clorofila *b* en condición de luz. Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
9	5	0,0022	X
6	5	0,0035	X
3	5	0,0044	X
12	5	0,0045	X
0	5	0,0127	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 3	*	0,008	0,003
0 - 6	*	0,009	0,003
0 - 9	*	0,011	0,003
0 - 12	*	0,008	0,003
3 - 6		0,001	0,003
3 - 9		0,002	0,003
3 - 12		0,000	0,003
6 - 9		0,001	0,003
6 - 12		-0,001	0,003
9 - 12		-0,002	0,003

* indica una diferencia significativa.

Tabla C-20 Análisis de varianza para el comportamiento de clorofila total, de las células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* en matraz en condiciones de luz y oscuridad. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Condición	0,492	1	0,492	414,510	0,0000
B:Tiempo (días)	0,019	4	0,005	3,970	0,0077
RESIDUOS	0,052	44	0,001		
TOTAL (CORREGIDO)	0,563	49			

* Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual. ($P \leq 0,05$)

Tabla C-21 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento de clorofila *total* en condición de luz. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
3	5	0,1634	X	0 – 3		0,036	0,051
12	5	0,1797	XX	0 – 6	*	-0,078	0,051
0	5	0,1995	XX	0 – 9		-0,023	0,051
9	5	0,2224	X	0 – 12		0,020	0,051
6	5	0,2777	X	3 – 6	*	-0,114	0,051
				3 – 9	*	-0,059	0,051
				3 – 12		-0,016	0,051
				6 – 9	*	0,055	0,051
				6 – 12	*	0,098	0,051
				9 – 12		0,043	0,051

* indica una diferencia significativa.

Tabla C-22 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento de clorofila *total* en condición de oscuridad. Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
9	5	0,0040	X	0 – 3	*	0,017	0,005
6	5	0,0060	X	0 – 6	*	0,020	0,005
12	5	0,0071	X	0 – 9	*	0,022	0,005
3	5	0,0084	X	0 – 12	*	0,019	0,005
0	5	0,0257	X	3 – 6		0,002	0,005
				3 – 9		0,004	0,005
				3 – 12		0,001	0,005
				6 – 9		0,002	0,005
				6 – 12		-0,001	0,005
				9 – 12		-0,003	0,005

* indica una diferencia significativa.

Tabla C-23 Análisis de varianza para el comportamiento de carotenoides, de las células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* en matraz en condiciones de luz y oscuridad. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Condición	0,065	1	0,065	457,230	0,065
B:Tiempo (días)	0,002	4	0,001	4,250	0,002
RESIDUOS	0,006	44	0,000		0,006
TOTAL (CORREGIDO)	0,073	49			0,073

* Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla C-24. Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento de carotenoides en condición de luz. Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
3	5	0,067	X
12	5	0,071	X
0	5	0,073	XX
9	5	0,086	X
6	5	0,109	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 – 3		0,007	0,014
0 – 6	*	-0,036	0,014
0 – 9		-0,013	0,014
0 – 12		0,003	0,014
3 – 6	*	-0,042	0,014
3 – 9	*	-0,020	0,014
3 – 12		-0,004	0,014
6 – 9	*	0,023	0,014
6 – 12	*	0,038	0,014
9 – 12	*	0,016	0,014

* indica una diferencia significativa.

Tabla C-25. Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento de carotenoides en condición de oscuridad. Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
6	5	0,0063	X
12	5	0,0071	X
9	5	0,0071	X
3	5	0,0105	X
0	5	0,0156	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 – 3		0,007	0,014
0 – 6	*	-0,036	0,014
0 – 9		-0,013	0,014
0 – 12		0,003	0,014
3 – 6	*	-0,042	0,014
3 – 9	*	-0,020	0,014
3 – 12		-0,004	0,014
6 – 9	*	0,023	0,014
6 – 12	*	0,038	0,014
9 – 12	*	0,016	0,014

* indica una diferencia significativa.

Tabla C-26 Cinética de crecimiento para el cultivo FM de células de *Bouteloua gracilis* en matraz, con diferentes concentraciones de sacarosa en el medio y 3 % de CO₂.

Tiempo (d)	Tratamientos con 3 % de CO ₂			Controles sin CO ₂		
	PF (g)			PF (g)		
	0,25 % sacarosa	0,1 % sacarosa	0,05 % sacarosa	0,25 % sacarosa	0,1 % sacarosa	0,05 % sacarosa
0	0,400±0,000 ^a	0,400±0,000 ^a	0,400±0,000 ^a	0,400±0,000 ^a	0,400±0,000 ^a	0,400±0,000 ^a
7	1,105±0,021 ^b	1,004±0,009 ^b	0,947±0,040 ^b	0,982±0,069 ^b	1,004±0,005 ^b	0,849±0,082 ^b
11	1,112±0,062 ^b	0,952±0,050 ^b	0,895±0,050 ^b	1,175±0,072 ^c	0,999±0,068 ^b	0,778±0,089 ^b

Tabla C-27 Análisis de varianza para la cinética de crecimiento del cultivo FM de *Bouteloua gracilis* en matraz, con diferentes concentraciones de sacarosa en el medio y 3% de CO₂. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente		Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES	A:% CO ₂	0,0095	1	0,0095	3,19	0,0807
	B:% Sacarosa	0,2242	2	0,1121	37,8	0,0000
	C:Tiempo (días)	4,2930	2	2,1460	723,71	0,0000
INTERACCIONES	AB	0,0237	2	0,0118	3,99	0,0252
	AC	0,0163	2	0,0082	2,75	0,0742
	BC	0,1688	4	0,0422	14,23	0,0000
RESIDUOS		0,1364	46	0,0030		
TOTAL (CORREGIDO)		4,9230	59			

* Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla C-28 Pruebas de Múltiple Rangos para la cinética de crecimiento FM (control con 0,05% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0	3	0,400	X	0 - 7	*	-0,449	0,141
11	4	0,778	X	0 - 11	*	-0,378	0,132
7	3	0,849	X	7 - 11		0,071	0,132

Tabla C-29 Pruebas de Múltiple Rangos para la cinética de crecimiento FM (control con 0,1% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0	3	0,400	X	0 - 7	*	-0,604	0,086
11	4	0,999	X	0 - 11	*	-0,599	0,081
7	3	1,004	X	7-11		0,006	0,081

Tabla C-30 Pruebas de Múltiple Rangos para la cinética de crecimiento FM (control con 0,25% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0	3	0,400	X	0 – 7	*	-0,582	0,115
7	3	0,982	X	0 – 11	*	-0,775	0,108
11	4	1,175	X	7-11	*	-0,193	0,108

Tabla C-31 Pruebas de Múltiple Rangos para la cinética de crecimiento FM (3% CO₂ con 0,05% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0	3	0,400	X	0 – 7	*	-0,4300	0,0889
11	3	0,895	X	0 – 11	*	-0,5467	0,0831
7	4	0,947	X	7 – 11		-0,1168	0,0831

Tabla C-32 Pruebas de Múltiple Rangos para la cinética de crecimiento FM (3% CO₂ con 0,1% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0	3	0,400	X	0 – 7	*	-0,5467	0,07561
11	4	0,952	X	0 – 11	*	-0,4952	0,07073
7	3	1,004	X	7 – 11		0,05142	0,07073

Tabla C-33 Pruebas de Múltiple Rangos para la cinética de crecimiento FM (3% CO₂ con 0,25% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0	3	0,400	X	0 – 7	*	-0,705	0,082
7	3	1,105	X	0 – 11	*	-0,712	0,076
11	4	1,112	X	7 – 11		-0,007	0,076

Tabla C-34 Comportamiento pH para cultivo FM de células de *Bouteloua gracilis* en matraz.

Tiempo (d)	Tratamientos con 3 % de CO ₂			Controles sin CO ₂		
	pH			pH		
	0,25 % sacarosa	0,1 % sacarosa	0,05 % sacarosa	0,25 % sacarosa	0,1 % sacarosa	0,05 % sacarosa
0	6,067 ^a ±0,045	6,067 ^a ±0,045	6,067 ^a ±0,045	6,067 ^a ±0,045	6,067 ^a ±0,045	6,067 ^b ±0,045
7	4,953 ^b ±0,137	5,393 ^b ±0,362	5,708 ^b ±0,040	4,883 ^b ±0,247	5,337 ^b ±0,042	5,700 ^a ±0,410
11	5,638 ^b ±0,206	5,530 ^b ±0,287	5,835 ^b ±0,018	5,713 ^c ±0,137	5,200 ^b ±0,123	6,088 ^b ±0,166

Tabla C-35 Análisis de varianza del comportamiento del pH del cultivo FM de *Bouteloua gracilis* en matraz, con diferentes concentraciones de sacarosa en el medio y 3% de CO₂. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:% CO ₂	0,005802	1	0,005802	0,09	0,7630
B:% sacarosa	1,227	2	0,6134	9,71	0,0002
C:Tiempo (días)	5,3	2	2,65	41,97	0,0000
RESIDUOS	3,41	54	0,06315		
TOTAL (CORREGIDO)	9,943	59			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla C-36 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento del pH (control con 0,05% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0	3	0,400	X	0 - 7	*	-0,449	0,141
11	4	0,778	X	0 - 11	*	-0,378	0,132
7	3	0,849	X	7 - 11		0,071	0,132

Tabla C-37 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento del pH (control con 0,1% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0	3	0,400	X	0 - 7	*	-0,604	0,086
11	4	0,999	X	0 - 11	*	-0,599	0,081
7	3	1,004	X	7-11		0,006	0,081

Tabla C-38 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento del pH (control con 0,25% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0	3	0,400	X	0 - 7	*	-0,582	0,115
7	3	0,982	X	0 - 11	*	-0,775	0,108
11	4	1,175	X	7-11	*	-0,193	0,108

Tabla C-39 Pruebas de Múltiple Rangos el comportamiento del pH (3% CO₂ con 0,05% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0	3	0,400	X	0 - 7	*	-0,4300	0,0889
11	3	0,895	X	0 - 11	*	-0,5467	0,0831
7	4	0,947	X	7 - 11		-0,1168	0,0831

Tabla C-40 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento del pH (3% CO₂ con 0,1% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0	3	0,400	X	0 - 7	*	-0,5467	0,07561
11	4	0,952	X	0 - 11	*	-0,4952	0,07073
7	3	1,004	X	7 - 11		0,05142	0,07073

Tabla C-41 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento del pH (3% CO₂ con 0,25% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0	3	0,400	X	0 - 7	*	-0,705	0,082
7	3	1,105	X	0 - 11	*	-0,712	0,076
11	4	1,112	X	7 - 11		-0,007	0,076

Tabla C-42 Concentraciones de Oxígeno Disuelto (OD) durante el crecimiento del cultivo FM de células de *Bouteloua gracilis* en matraz.

Tiempo (d)	Tratamientos con 3 % de CO ₂			Controles sin CO ₂		
	OD (mg/L)			OD (mg/L)		
	0,25 % sacarosa	0,1 % sacarosa	0,05 % sacarosa	0,25 % sacarosa	0,1 % sacarosa	0,05 % sacarosa
0	5,60 ^a ±0,36	5,60 ^a ±0,36	5,60 ^a ±0,36	5,60 ^a ±0,36	5,60 ^a ±0,36	5,60 ^a ±0,36
7	5,76 ^b ±0,31	5,87 ^b ±0,11	5,62 ^b ±0,40	4,66 ^b ±0,09	5,55 ^b ±0,39	5,56 ^b ±0,14
11	5,54 ^b ±0,37	5,69 ^b ±0,18	5,49 ^b ±0,24	5,53 ^c ±0,28	5,31 ^b ±0,20	5,62 ^b ±0,17

Tabla C-43 Análisis de varianza del comportamiento del OD durante el cultivo FM de *Bouteloua gracilis* en matraz, con diferentes concentraciones de sacarosa en el medio y 3% de CO₂. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente		Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES	A:% CO ₂	0,4969	1	0,4969	5,02	0,0293
	B:% Sacarosa	0,2209	2	0,1104	1,11	0,3354
	C:Tiempo (días)	0,08835	2	0,04417	0,45	0,6426
RESIDUOS		5,349	54	0,09906		
TOTAL (CORREGIDO)		6,155	59			

* Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla C-44 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento del OD (control con 0,05% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0	3	0,400	X	0 - 7	*	-0,449	0,141
11	4	0,778	X	0 - 11	*	-0,378	0,132
7	3	0,849	X	7 - 11		0,071	0,132

Tabla C-45 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento del OD (control con 0,1% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0	3	0,400	X	0 - 7	*	-0,604	0,086
11	4	0,999	X	0 - 11	*	-0,599	0,081
7	3	1,004	X	7-11		0,006	0,081

Tabla C-46 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento del OD (control con 0,25% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	0,400	X
7	3	0,982	X
11	4	1,175	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,582	0,115
0 - 11	*	-0,775	0,108
7-11	*	-0,193	0,108

Tabla C-47 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento del pH (3% CO₂ con 0,05% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	0,400	X
11	3	0,895	X
7	4	0,947	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,4300	0,0889
0 - 11	*	-0,5467	0,0831
7 - 11		-0,1168	0,0831

Tabla C-48 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento del pH (3% CO₂ con 0,1% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	0,400	X
11	4	0,952	X
7	3	1,004	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,5467	0,07561
0 - 11	*	-0,4952	0,07073
7 - 11		0,05142	0,07073

Tabla C-49 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento del pH (3% CO₂ con 0,25% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	0,400	X
7	3	1,105	X
11	4	1,112	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,705	0,082
0 - 11	*	-0,712	0,076
7 - 11		-0,007	0,076

Tabla C-50 Perfil de pigmentos para el cultivo FM de células de *Bouteloua gracilis* en matraz, tratamiento y control.

Tiempo (d)	Tratamientos con 3 % de CO ₂ y 0,25 % azúcar				Controles sin CO ₂ y 0,25 % azúcar			
	Clorofila a (mg g ⁻¹ PF)	Clorofila b (mg g ⁻¹ PF)	Clorofila total (mg g ⁻¹ PF)	Carotenoides (mg g ⁻¹ PF)	Clorofila a (mg g ⁻¹ PF)	Clorofila b (mg g ⁻¹ PF)	Clorofila total (mg g ⁻¹ PF)	Carotenoides (mg g ⁻¹ PF)
0	0,040 ^a ± 0,008	0,033 ^a ± 0,007	0,073 ^a ± 0,013	0,046 ^a ± 0,006	0,040 ^a ± 0,008	0,033 ^a ± 0,007	0,073 ^a ± 0,013	0,046 ^a ± 0,006
7	0,058 ^b ± 0,020	0,050 ^b ± 0,009	0,107 ^b ± 0,011	0,047 ^b ± 0,019	0,082 ^b ± 0,031	0,038 ^b ± 0,021	0,119 ^b ± 0,052	0,049 ^b ± 0,006
11	0,091 ^b ± 0,020	0,042 ^b ± 0,013	0,133 ^b ± 0,032	0,053 ^b ± 0,009	0,109 ^c ± 0,024	0,044 ^c ± 0,010	0,154 ^c ± 0,034	0,060 ^c ± 0,013
Tiempo (d)	Tratamientos con 3 % de CO ₂ y 0,1 % azúcar				Controles sin CO ₂ y 0,1 % azúcar			
	Clorofila a (mg g ⁻¹ PF)	Clorofila b (mg g ⁻¹ PF)	Clorofila total (mg g ⁻¹ PF)	Carotenoides (mg g ⁻¹ PF)	Clorofila a (mg g ⁻¹ PF)	Clorofila b (mg g ⁻¹ PF)	Clorofila Total (mg g ⁻¹ PF)	Carotenoides (mg g ⁻¹ PF)
0	0,020 ^a ± 0,001	0,011 ^a ± 0,000	0,031 ^a ± 0,001	0,019 ^a ± 0,004	0,020 ^a ± 0,001	0,011 ^a ± 0,000	0,031 ^a ± 0,001	0,019 ^a ± 0,004
7	0,089 ^b ± 0,023	0,049 ^b ± 0,008	0,138 ^b ± 0,018	0,068 ^b ± 0,019	0,082 ^b ± 0,011	0,050 ^b ± 0,019	0,132 ^b ± 0,023	0,072 ^b ± 0,012
11	0,061 ^b ± 0,008	0,028 ^b ± 0,009	0,088 ^b ± 0,028	0,052 ^b ± 0,015	0,042 ^b ± 0,008	0,023 ^b ± 0,009	0,065 ^b ± 0,016	0,040 ^b ± 0,010
Tiempo (d)	Tratamientos con 3 % de CO ₂ y 0,05 % azúcar				Controles sin CO ₂ y 0,05 % azúcar			
	Clorofila a (mg g ⁻¹ PF)	Clorofila b (mg g ⁻¹ PF)	Clorofila total (mg g ⁻¹ PF)	Carotenoides (mg g ⁻¹ PF)	Clorofila a (mg g ⁻¹ PF)	Clorofila b (mg g ⁻¹ PF)	Clorofila Total (mg g ⁻¹ PF)	Carotenoides (mg g ⁻¹ PF)
0	0,014 ^a ± 0,002	0,017 ^a ± 0,003	0,031 ^a ± 0,005	0,032 ^a ± 0,018	0,014 ^a ± 0,002	0,017 ^a ± 0,003	0,031 ^a ± 0,005	0,032 ^a ± 0,018
7	0,068 ^b ± 0,020	0,029 ^b ± 0,009	0,097 ^b ± 0,029	0,053 ^b ± 0,020	0,057 ^b ± 0,041	0,026 ^b ± 0,015	0,083 ^b ± 0,056	0,045 ^b ± 0,019
11	0,073 ^b ± 0,023	0,033 ^b ± 0,009	0,106 ^b ± 0,032	0,048 ^b ± 0,013	0,045 ^b ± 0,011	0,024 ^b ± 0,008	0,069 ^b ± 0,017	0,049 ^b ± 0,005

Tabla C-51 Análisis de varianza del perfil de clorofila *a* durante el cultivo FM de *Bouteloua gracilis* en matraz, con diferentes concentraciones de sacarosa en el medio y 3% de CO₂. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:% CO ₂	0,0001584	1	0,0001584	0,33	0,5671
B:% Sacarosa	0,007627	2	0,003813	7,98	0,0009
C:Tiempo (días)	0,02723	2	0,01361	28,49	0,0000
RESIDUOS	0,02581	54	0,0004779		
TOTAL (CORREGIDO)	0,06082	59			

* Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla C-52 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila *a* (control con 0,05% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	0,400	X
11	4	0,778	X
7	3	0,849	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,449	0,141
0 - 11	*	-0,378	0,132
7 - 11		0,071	0,132

Tabla C-53 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila *a* (control con 0,1% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	0,400	X
11	4	0,999	X
7	3	1,004	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,604	0,086
0 - 11	*	-0,599	0,081
7-11		0,006	0,081

Tabla C-54 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila *a* (control con 0,25% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	0,400	X
7	3	0,982	X
11	4	1,175	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,582	0,115
0 - 11	*	-0,775	0,108
7-11	*	-0,193	0,108

Tabla C-55 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila *a* (3% CO₂ con 0,05% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0	3	0,400	X	0 - 7	*	-0,4300	0,0889
11	3	0,895	X	0 - 11	*	-0,5467	0,0831
7	4	0,947	X	7 - 11		-0,1168	0,0831

Tabla C-56 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila *a* (3% CO₂ con 0,1% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0	3	0,400	X	0 - 7	*	-0,5467	0,07561
11	4	0,952	X	0 - 11	*	-0,4952	0,07073
7	3	1,004	X	7 - 11		0,05142	0,07073

Tabla C-57 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila *a* (3% CO₂ con 0,25% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0	3	0,400	X	0 - 7	*	-0,705	0,082
7	3	1,105	X	0 - 11	*	-0,712	0,076
11	4	1,112	X	7 - 11		-0,007	0,076

Tabla C-58 Análisis de varianza del perfil de clorofila *b* durante el cultivo FM de *Bouteloua gracilis* en matraz, con diferentes concentraciones de sacarosa en el medio y 3% de CO₂. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:% CO ₂	0,0001137	1	0,0001137	0,92	0,3414
B:% Sacarosa	0,00263	2	0,001315	10,66	0,0001
C:Tiempo (días)	0,003595	2	0,001798	14,57	0,0000
RESIDUOS	0,006664	54	0,0001234		
TOTAL (CORREGIDO)	0,013	59			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla C-59 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila *b* (control con 0,05% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	0,400	X
11	4	0,778	X
7	3	0,849	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,449	0,141
0 - 11	*	-0,378	0,132
7 - 11		0,071	0,132

Tabla C-60 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila *b* (control con 0,1% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	0,400	X
11	4	0,999	X
7	3	1,004	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,604	0,086
0 - 11	*	-0,599	0,081
7-11		0,006	0,081

Tabla C-61 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila *b* (control con 0,25% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	0,400	X
7	3	0,982	X
11	4	1,175	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,582	0,115
0 - 11	*	-0,775	0,108
7-11	*	-0,193	0,108

Tabla C-62 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila *b* (3% CO₂ con 0,05% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	0,400	X
11	3	0,895	X
7	4	0,947	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,4300	0,0889
0 - 11	*	-0,5467	0,0831
7 - 11		-0,1168	0,0831

Tabla C-63 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila *b* (3% CO₂ con 0,1% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	0,400	X
11	4	0,952	X
7	3	1,004	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,5467	0,07561
0 - 11	*	-0,4952	0,07073
7 - 11		0,05142	0,07073

Tabla C-64 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila *b* (3% CO₂ con 0,25% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	0,400	X
7	3	1,105	X
11	4	1,112	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,705	0,082
0 - 11	*	-0,712	0,076
7 - 11		-0,007	0,076

Tabla C-65 Análisis de varianza del perfil de clorofila total durante el cultivo FM de *Bouteloua gracilis* en matraz, con diferentes concentraciones de sacarosa en el medio y 3% de CO₂. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:% CO ₂	0,0005448	1	0,0005448	0,61	0,4390
B:% Sacarosa	0,01923	2	0,009613	10,72	0,0001
C:Tiempo (días)	0,04913	2	0,02457	27,41	0,0000
RESIDUOS	0,0484	54	0,0008964		
TOTAL (CORREGIDO)	0,1173	59			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla C-66 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila total (control con 0,05% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	0,400	X
11	4	0,778	X
7	3	0,849	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,449	0,141
0 - 11	*	-0,378	0,132
7 - 11		0,071	0,132

Tabla C-67 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila total (control con 0,1% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	0,400	X
11	4	0,999	X
7	3	1,004	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,604	0,086
0 - 11	*	-0,599	0,081
7-11		0,006	0,081

Tabla C-68 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila total (control con 0,25% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	0,400	X
7	3	0,982	X
11	4	1,175	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,582	0,115
0 - 11	*	-0,775	0,108
7-11	*	-0,193	0,108

Tabla C-69 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila total (3% CO₂ con 0,05% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	0,400	X
11	3	0,895	X
7	4	0,947	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,4300	0,0889
0 - 11	*	-0,5467	0,0831
7 - 11		-0,1168	0,0831

Tabla C-70 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila total (3% CO₂ con 0,1% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	0,400	X
11	4	0,952	X
7	3	1,004	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,5467	0,07561
0 - 11	*	-0,4952	0,07073
7 - 11		0,05142	0,07073

Tabla C-71 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila total (3% CO₂ con 0,25% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0	3	0,400	X	0 - 7	*	-0,705	0,082
7	3	1,105	X	0 - 11	*	-0,712	0,076
11	4	1,112	X	7 - 11		-0,007	0,076

Tabla C-72 Análisis de varianza del perfil de carotenoides durante el cultivo FM de *Bouteloua gracilis* en matraz, con diferentes concentraciones de sacarosa en el medio y 3% de CO₂. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:% CO ₂	0,00001127	1	0,00001127	0,05	0,8182
B:% azúcar	0,0005734	2	0,0002867	1,36	0,2659
C:Tiempo (días)	0,005526	2	0,002763	13,08	0,0000
RESIDUOS	0,01141	54	0,0002112		
TOTAL (CORREGIDO)	0,01752	59			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla C-73 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila total (control con 0,05% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0	3	0,400	X	0 - 7	*	-0,449	0,141
11	4	0,778	X	0 - 11	*	-0,378	0,132
7	3	0,849	X	7 - 11		0,071	0,132

Tabla C-74 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila total (control con 0,1% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0	3	0,400	X	0 - 7	*	-0,604	0,086
11	4	0,999	X	0 - 11	*	-0,599	0,081
7	3	1,004	X	7-11		0,006	0,081

Tabla C-75 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila total (control con 0,25% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	0,400	X
7	3	0,982	X
11	4	1,175	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,582	0,115
0 - 11	*	-0,775	0,108
7-11	*	-0,193	0,108

Tabla C-76 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila total (3% CO₂ con 0,05% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	0,400	X
11	3	0,895	X
7	4	0,947	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,4300	0,0889
0 - 11	*	-0,5467	0,0831
7 - 11		-0,1168	0,0831

Tabla C-77 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila total (3% CO₂ con 0,1 % de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	0,400	X
11	4	0,952	X
7	3	1,004	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,5467	0,07561
0 - 11	*	-0,4952	0,07073
7 - 11		0,05142	0,07073

Tabla C-78 Pruebas de Múltiple Rangos para el perfil de clorofila total (3% CO₂ con 0,25% de sacarosa). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	0,400	X
7	3	1,105	X
11	4	1,112	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,705	0,082
0 - 11	*	-0,712	0,076
7 - 11		-0,007	0,076

Tabla C-79 Cinética de crecimiento del cultivo FA de células de *Bouteloua gracilis* a diferentes concentraciones de CO₂ en el medio ambiente de cultivo.

Crecimiento fotoautotrófico con 0,5 %							
Tiempo (d)	Peso Fresco (g)					Promedio	Desviación estándar
	R1	R2	R3	R4	R5		
0	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500 ^a	0,000
7	0,567	0,600	0,633	0,651	0,571	0,605 ^a	0,037
14	0,818	0,796	0,849	0,907	0,696	0,813 ^b	0,078
21	0,981	0,877	1,276	0,970	0,786	0,978 ^c	0,184
28	1,487	1,759	1,501	1,385	1,446	1,516 ^d	0,143
Crecimiento fotoautotrófico con 1,0 %							
Tiempo (d)	Peso Fresco (g)					Promedio	Desviación estándar
	R1	R2	R3	R4	R5		
0	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500 ^a	0,000
7	0,612	0,693	0,531	0,571	0,735	0,628 ^b	0,084
14	0,731	0,697	0,789	0,747	0,688	0,730 ^c	0,041
21	0,965	0,919	1,053	0,906	0,955	0,959 ^d	0,058
28	1,725	1,633	1,717	1,871	1,726	1,734 ^e	0,086
Crecimiento fotoautotrófico con 2,0 %							
Tiempo (d)	Peso Fresco (g)					Promedio	Desviación estándar
	R1	R2	R3	R4	R5		
0	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500 ^a	0,000
7	0,724	0,632	0,837	0,793	0,616	0,720 ^{ab}	0,097
14	0,907	0,912	1,002	0,907	0,832	0,912 ^b	0,070
21	1,840	1,647	2,410	1,890	1,477	1,853 ^c	0,352
28	3,323	3,070	3,664	3,489	3,019	3,313 ^d	0,274
Crecimiento fotoautotrófico con 3,0 %							
Tiempo (d)	Peso Fresco (g)					Promedio	Desviación estándar
	R1	R2	R3	R4	R5		
0	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500 ^a	0,000
7	0,878	0,803	0,88	0,839	0,639	0,808 ^b	0,100
14	1,381	1,451	1,467	1,58	1,468	1,469 ^c	0,071
21	2,317	1,789	2,35	2,519	2,185	2,232 ^d	0,275
28	4,474	4,223	3,572	3,988	4,070	4,065 ^e	0,332

Tabla C-80 Análisis de varianza para la cinética de crecimiento del cultivo FA de *Bouteloua gracilis* en matraz, con diferentes concentraciones de CO₂. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente		Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES	A:% CO ₂	15,31	3	5,103	26,94	0,0000
	B:Tiempo	59,84	4	14,96	78,96	0,0000
RESIDUOS		17,43	92	0,1895		
TOTAL (CORREGIDO)		92,58	99			

* Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla C-81 Pruebas de Múltiple Rangos para la cinética de crecimiento del cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (3% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos
0	5	0,500	X
7	5	0,808	X
14	5	1,469	X
21	5	2,232	X
28	5	4,065	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,308	0,264
0 - 14	*	-0,969	0,264
0 - 21	*	-1,732	0,264
0 - 28	*	-3,565	0,264
7 - 14	*	-0,662	0,264
7 - 21	*	-1,424	0,264
7 - 28	*	-3,258	0,264
14 - 21	*	-0,763	0,264
14 - 28	*	-2,596	0,264
21 - 28	*	-1,833	0,264

Tabla C-82 Pruebas de Múltiple Rangos para la cinética de crecimiento del cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (2% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos
0	5	0,500	X
7	5	0,720	XX
14	5	0,912	X
21	5	1,853	X
28	5	3,313	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7		-0,220	0,272
0 - 14	*	-0,412	0,272
0 - 21	*	-1,353	0,272
0 - 28	*	-2,813	0,272
7 - 14		-0,192	0,272
7 - 21	*	-1,132	0,272
7 - 28	*	-2,593	0,272
14 - 21	*	-0,941	0,272
14 - 28	*	-2,401	0,272
21 - 28	*	-1,460	0,272

Tabla C-83 Pruebas de Múltiple Rangos para la cinética de crecimiento del cultivo
FA de *Bouteloua gracilis* (1 % de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos
0	5	0,500	X
7	5	0,628	X
14	5	0,730	X
21	5	0,960	X
28	5	1,734	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,128	0,082
0 - 14	*	-0,230	0,082
0 - 21	*	-0,460	0,082
0 - 28	*	-1,234	0,082
7 - 14	*	-0,102	0,082
7 - 21	*	-0,331	0,082
7 - 28	*	-1,106	0,082
14 - 21	*	-0,229	0,082
14 - 28	*	-1,004	0,082
21 - 28	*	-0,775	0,082

Tabla C-84 Pruebas de Múltiple Rangos para la cinética de crecimiento del cultivo
FA de *Bouteloua gracilis*. (0,5 % de CO₂) Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos
0	5	0,500	X
7	5	0,604	X
14	5	0,813	X
21	5	0,978	X
28	5	1,516	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7		-0,104	0,147
0 - 14	*	-0,313	0,147
0 - 21	*	-0,478	0,147
0 - 28	*	-1,016	0,147
7 - 14	*	-0,209	0,147
7 - 21	*	-0,374	0,147
7 - 28	*	-0,911	0,147
14 - 21	*	-0,165	0,147
14 - 28	*	-0,702	0,147
21 - 28	*	-0,538	0,147

Tabla C-85 Concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo fotoautotrófico de células de *Bouteloua gracilis* en matraz (3 % CO₂).

Tiempo (d)	Oxígeno Disuelto (mg/L)					Promedio	Desviación estándar
	R1	R2	R3	R4	R5		
0	5,87	5,87	5,87	5,87	5,87	5,87 ^d	0,000
7	4,1	4,05	4,07	4,36	4,16	4,15 ^c	0,126
14	3,56	3,66	3,74	3,35	3,6	3,58 ^b	0,148
21	3,28	3,29	3,24	3,48	3,33	3,32 ^a	0,094
28	3,45	3,59	3,84	3,34	3,56	3,56 ^b	0,187

Tabla C-86 Análisis de varianza para el comportamiento de OD para el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* en matraz (3 % CO₂). Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	21,51	4	5,377	332,94	0,0000
Intra grupos	0,323	20	0,01615		
Total (Corr.)	21,83	24			

Tabla C-87 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento de OD de las células FA de *Bouteloua gracilis*. (3% de CO₂) Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos
21	5	3,324	X
28	5	3,556	X
14	5	3,582	X
7	5	4,148	X
0	5	5,870	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	1,722	0,168
0 - 14	*	2,288	0,168
0 - 21	*	2,546	0,168
0 - 28	*	2,314	0,168
7 - 14	*	0,566	0,168
7 - 21	*	0,824	0,168
7 - 28	*	0,592	0,168
14 - 21	*	0,258	0,168
14 - 28		0,026	0,168
21 - 28	*	-0,232	0,168

Tabla C-88 Comportamiento de la conductividad para la suspensión celular FA de *Bouteloua gracilis*.

Tiempo (d)	Conductividad eléctrica (mS/cm)					Promedio	Desviación estándar
	R1	R2	R3	R4	R5		
0	5,93	5,93	5,93	5,93	5,93	5,93 ^e	0,00
7	5,49	5,57	5,67	5,82	5,43	5,60 ^d	0,15
14	5,40	5,19	5,34	5,30	5,31	5,31 ^c	0,08
21	4,73	5,17	4,50	4,78	4,80	4,80 ^b	0,24
28	2,50	2,50	2,60	2,58	2,45	2,53 ^a	0,06

Tabla C-89 Análisis de varianza para el comportamiento la conductividad eléctrica para el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* en matraz (3 % CO₂). Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	35,74	4	8,935	342,90	0,0000
Intra grupos	0,5211	20	0,02606		
Total (Corr.)	36,26	24			

Tabla C-90 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento de la conductividad eléctrica de las células FA de *Bouteloua gracilis*. (3% de CO₂) Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos
28	5	2,526	X
21	5	4,796	X
14	5	5,308	X
7	5	5,596	X
0	5	5,842	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	0,246	0,213
0 - 14	*	0,534	0,213
0 - 21	*	1,046	0,213
0 - 28	*	3,316	0,213
7 - 14	*	0,288	0,213
7 - 21	*	0,8	0,213
7 - 28	*	3,07	0,213
14 - 21	*	0,512	0,213
14 - 28	*	2,782	0,213
21 - 28	*	2,27	0,213

Tabla C-91 Comportamiento del pH para cultivos en suspensión FA para diferentes concentraciones de CO₂ en el ambiente de cultivo.

Células fotoautotróficas (0,5 % de CO₂)							
Tiempo (d)	pH (Unidades de pH)					Promedio	Desviación estándar
	R1	R2	R3	R4	R5		
0	5,881	5,975	5,984	5,857	5,897	5,919 ^d	0,057
7	4,968	4,935	4,837	4,969	4,979	4,938 ^c	0,059
14	4,732	4,600	4,898	4,735	4,599	4,713 ^b	0,123
21	3,856	3,595	3,883	3,848	3,908	3,818 ^a	0,127
28	3,988	3,957	3,923	3,868	3,936	3,934 ^a	0,045
Células fotoautotróficas (1,0 % de CO₂)							
Tiempo (d)	pH (Unidades de pH)					Promedio	Desviación estándar
	R1	R2	R3	R4	R5		
0	5,881	5,975	5,984	5,857	5,897	5,919 ^d	0,057
7	5,762	5,603	5,598	5,631	5,281	5,575 ^c	0,177
14	5,177	5,394	5,251	5,297	5,288	5,281 ^b	0,079
21	3,996	3,900	3,599	3,696	3,798	3,798 ^a	0,158
28	3,983	3,957	3,832	3,927	3,839	3,908 ^a	0,069
Células fotoautotróficas (2,0 % de CO₂)							
Tiempo (d)	pH (Unidades de pH)					Promedio	Desviación estándar
	R1	R2	R3	R4	R5		
0	5,881	5,975	5,984	5,857	5,897	5,919 ^d	0,057
7	4,768	4,935	4,837	4,969	4,854	4,873 ^c	0,080
14	4,762	4,603	4,598	4,631	4,623	4,643 ^b	0,068
21	3,812	3,952	3,794	3,830	3,994	3,876 ^a	0,090
28	3,966	3,954	3,859	3,856	3,915	3,910 ^a	0,052
Células fotoautotróficas (3,0 % de CO₂)							
Tiempo (d)	pH (Unidades de pH)					Promedio	Desviación estándar
	R1	R2	R3	R4	R5		
0	5,616	5,616	5,616	5,616	5,616	5,616 ^d	0
7	3,768	3,935	4,237	3,969	3,985	3,979 ^b	0,168
14	3,762	3,603	3,598	3,631	3,655	3,650 ^a	0,067
21	3,564	3,37	3,587	3,586	3,581	3,538 ^a	0,094
28	4,883	4,571	4,230	4,267	4,477	4,486 ^c	0,264

Tabla C-92 Análisis de varianza para el comportamiento del pH para el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* en matraz, con diferentes concentraciones de CO₂. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:% CO ₂	5,324	3	1,775	14,96	0,0000
B:Tiempo	52,1	4	13,03	109,79	0,0000
RESIDUOS	10,92	92	0,1186		
TOTAL (CORREGIDO)	68,34	99			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla C-93 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento del pH del cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (3% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos
21	5	3,538	X
14	5	3,650	X
7	5	3,979	X
28	5	4,486	X
0	5	5,616	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	1,637	0,197
0 - 14	*	1,966	0,197
0 - 21	*	2,078	0,197
0 - 28	*	1,130	0,197
7 - 14	*	0,329	0,197
7 - 21	*	0,441	0,197
7 - 28	*	-0,507	0,197
14 - 21		0,112	0,197
14 - 28	*	-0,836	0,197
21 - 28	*	-0,948	0,197

Tabla C-94 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento del pH del cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (2% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
21	5	3,876	X
28	5	3,910	X
14	5	4,643	X
7	5	4,873	X
0	5	5,919	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	1,046	0,094
0 - 14	*	1,275	0,094
0 - 21	*	2,042	0,094
0 - 28	*	2,009	0,094
7 - 14	*	0,229	0,094
7 - 21	*	0,996	0,094
7 - 28	*	0,963	0,094
14 - 21	*	0,767	0,094
14 - 28	*	0,733	0,094
21 - 28		-0,034	0,094

Tabla C-95 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento del pH del cultivo
FA de *Bouteloua gracilis* (1% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
21	5	3,798	X
28	5	3,908	X
14	5	5,281	X
7	5	5,575	X
0	5	5,919	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	0,344	0,157
0 - 14	*	0,637	0,157
0 - 21	*	2,121	0,157
0 - 28	*	2,011	0,157
7 - 14	*	0,294	0,157
7 - 21	*	1,777	0,157
7 - 28	*	1,667	0,157
14 - 21	*	1,484	0,157
14 - 28	*	1,374	0,157
21 - 28		-0,110	0,157

Tabla C-96 Pruebas de Múltiple Rangos para el comportamiento del pH del cultivo
FA de *Bouteloua gracilis* (0,5 % de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
21	5	3,818	X
28	5	3,934	X
14	5	4,713	X
7	5	4,938	X
0	5	5,919	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	0,981	0,118
0 - 14	*	1,206	0,118
0 - 21	*	2,101	0,118
0 - 28	*	1,984	0,118
7 - 14	*	0,225	0,118
7 - 21	*	1,120	0,118
7 - 28	*	1,003	0,118
14 - 21	*	0,895	0,118
14 - 28	*	0,778	0,118
21 - 28		-0,116	0,118

Tabla C-97 Perfil de pigmentos para el cultivo FA de células de *Bouteloua gracilis* en matraz, a diferentes concentraciones de CO₂

Células fotoautotróficas (0,5 % de CO₂)				
Día	Clorofila a (mg clorofila/g PF)	Clorofila b (mg clorofila/g PF)	Clorofila Total (mg clorofila/g PF)	Carotenoides (mg clorofila/g PF)
0	0,250 ^c ±0,000	0,130 ^c ±0,000	0,380 ^e ±0,000	0,200 ^a ±0,000
7	0,071 ^a ±0,011	0,033 ^a ±0,019	0,103 ^a ±0,009	0,054 ^a ±0,014
14	0,101 ^a ±0,026	0,044 ^{ab} ±0,014	0,144 ^b ±0,017	0,075 ^a ±0,010
21	0,153 ^b ±0,043	0,070 ^{ab} ±0,036	0,223 ^c ±0,028	0,125 ^b ±0,038
28	0,178 ^b ±0,032	0,081 ^b ±0,048	0,259 ^d ±0,024	0,153 ^b ±0,032
Células fotoautotróficas (1,0 % de CO₂)				
Día	Clorofila a (mg clorofila/g PF)	Clorofila b (mg clorofila/g PF)	Clorofila Total (mg clorofila/g PF)	Carotenoides (mg clorofila/g PF)
0	0,250 ^d ±0,000	0,130 ^b ±0,000	0,380 ^c ±0,000	0,200 ^a ±0,000
7	0,143 ^a ±0,028	0,124 ^b ±0,004	0,268 ^a ±0,026	0,096 ^a ±0,023
14	0,201 ^{bc} ±0,043	0,177 ^c ±0,016	0,378 ^c ±0,049	0,138 ^b ±0,020
21	0,230 ^{cd} ±0,025	0,086 ^a ±0,018	0,316 ^b ±0,028	0,149 ^b ±0,021
28	0,190 ^b ±0,028	0,121 ^b ±0,029	0,311 ^{ab} ±0,050	0,135 ^b ±0,013
Células fotoautotróficas (2,0 % de CO₂)				
Día	Clorofila a (mg clorofila/g PF)	Clorofila b (mg clorofila/g PF)	Clorofila Total (mg clorofila/g PF)	Carotenoides (mg clorofila/g PF)
0	0,250 ^b ±0,000	0,130 ^a ±0,000	0,380 ^b ±0,000	0,073 ^c ±0,000
7	0,197 ^a ±0,024	0,303 ^b ±0,019	0,500 ^c ±0,025	0,103 ^a ±0,018
14	0,290 ^c ±0,016	0,445 ^c ±0,030	0,735 ^d ±0,031	0,155 ^b ±0,023
21	0,284 ^c ±0,030	0,117 ^a ±0,037	0,401 ^b ±0,050	0,183 ^{ac} ±0,028
28	0,189 ^a ±0,028	0,103 ^a ±0,021	0,292 ^a ±0,017	0,156 ^b ±0,026
Células fotoautotróficas (3,0 % de CO₂)				
Día	Clorofila a (mg clorofila/g PF)	Clorofila b (mg clorofila/g PF)	Clorofila Total (mg clorofila/g PF)	Carotenoides (mg clorofila/g PF)
0	0,250 ^a ± 0,000	0,130 ^{ab} ± 0,000	0,380 ^a ± 0,000	0,200 ^b ± 0,000
7	0,242 ^a ± 0,020	0,099 ^a ± 0,016	0,341 ^a ± 0,034	0,163 ^a ± 0,014
14	0,344 ^c ± 0,056	0,144 ^b ± 0,026	0,489 ^b ± 0,070	0,228 ^b ± 0,033
21	0,317 ^{bc} ± 0,060	0,122 ^{ab} ± 0,049	0,402 ^a ± 0,042	0,206 ^b ± 0,035
28	0,275 ^{ab} ± 0,037	0,131 ^{ab} ± 0,038	0,407 ^a ± 0,070	0,195 ^{ab} ± 0,032

Tabla C- 98 Análisis de varianza para clorofila *a* en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* en matraz, con diferentes concentraciones de CO₂. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:% CO ₂	0,2484	3	0,0828	40,85	0,0000
B:Tiempo	0,1021	4	0,02552	12,59	0,0000
RESIDUOS	0,1865	92	0,002027		
TOTAL (CORREGIDO)	0,537	99			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla C-99 Pruebas de Múltiple Rangos para clorofila *a* en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (3% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo	Casos	Media	Grupos
7	5	0,242	X
0	5	0,250	X
28	5	0,276	XX
21	5	0,316	XX
14	5	0,344	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7		0,008	0,054
0 - 14	*	-0,094	0,054
0 - 21	*	-0,066	0,054
0 - 28		-0,026	0,054
7 - 14	*	-0,102	0,054
7 - 21	*	-0,074	0,054
7 - 28		-0,033	0,054
14 - 21		0,028	0,054
14 - 28	*	0,069	0,054
21 - 28		0,041	0,054

Tabla C-100 Pruebas de Múltiple Rangos para clorofila *a* en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (2% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo	Casos	Media	Grupos
28	5	0,190	X
7	5	0,197	X
0	5	0,250	X
21	5	0,284	X
14	5	0,290	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	0,053	0,030
0 - 14	*	-0,040	0,030
0 - 21	*	-0,034	0,030
0 - 28	*	0,061	0,030
7 - 14	*	-0,093	0,030
7 - 21	*	-0,087	0,030
7 - 28		0,008	0,030
14 - 21		0,006	0,030
14 - 28	*	0,101	0,030
21 - 28	*	0,095	0,030

Tabla C-101 Pruebas de Múltiple Rangos para clorofila *a* en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (1% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo	Casos	Media	Grupos
7	5	0,144	X
28	5	0,190	X
14	5	0,201	XX
21	5	0,230	XX
0	5	0,250	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	0,107	0,038
0 - 14	*	0,049	0,038
0 - 21		0,020	0,038
0 - 28	*	0,060	0,038
7 - 14	*	-0,058	0,038
7 - 21	*	-0,086	0,038
7 - 28	*	-0,047	0,038
14 - 21		-0,028	0,038
14 - 28		0,011	0,038
21 - 28	*	0,040	0,038

Tabla C-102 Pruebas de Múltiple Rangos para clorofila *a* en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (0,5% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo	Casos	Media	Grupos
7	5	0,071	X
14	5	0,101	X
21	5	0,153	X
28	5	0,178	X
0	5	0,250	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	0,179	0,036
0 - 14	*	0,149	0,036
0 - 21	*	0,097	0,036
0 - 28	*	0,072	0,036
7 - 14		-0,030	0,036
7 - 21	*	-0,083	0,036
7 - 28	*	-0,107	0,036
14 - 21	*	-0,053	0,036
14 - 28	*	-0,077	0,036
21 - 28		-0,024	0,036

Tabla C- 103 Análisis de varianza para clorofila *b* en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* en matraz, con diferentes concentraciones de CO₂. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:% CO ₂	0,2824	3	0,09412	20,30	0,0000
B:Tiempo	0,1314	4	0,03285	7,09	0,0001
RESIDUOS	0,4266	92	0,004637		
TOTAL (CORREGIDO)	0,8404	99			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla C-104 Pruebas de Múltiple Rangos para clorofila *b* en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (3% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
7	5	0,099	X
21	5	0,123	XX
0	5	0,130	XX
28	5	0,131	XX
14	5	0,144	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7		0,031	0,041
0 - 14		-0,014	0,041
0 - 21		0,008	0,041
0 - 28		-0,001	0,041
7 - 14	*	-0,045	0,041
7 - 21		-0,024	0,041
7 - 28		-0,032	0,041
14 - 21		0,022	0,041
14 - 28		0,013	0,041
21 - 28		-0,009	0,041

Tabla C-105 Pruebas de Múltiple Rangos para clorofila *b* en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (2% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
28	5	0,103	X
21	5	0,117	X
0	5	0,130	X
7	5	0,303	X
14	5	0,445	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,173	0,033
0 - 14	*	-0,315	0,033
0 - 21		0,013	0,033
0 - 28		0,027	0,033
7 - 14	*	-0,142	0,033
7 - 21	*	0,185	0,033
7 - 28	*	0,200	0,033
14 - 21	*	0,327	0,033
14 - 28	*	0,342	0,033
21 - 28		0,015	0,033

Tabla C-106 Pruebas de Múltiple Rangos para clorofila *b* en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (1% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
21	5	0,086	X
28	5	0,121	X
7	5	0,124	X
0	5	0,130	X
14	5	0,177	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7		0,006	0,022
0 - 14	*	-0,047	0,022
0 - 21	*	0,044	0,022
0 - 28		0,009	0,022
7 - 14	*	-0,053	0,022
7 - 21	*	0,039	0,022
7 - 28		0,003	0,022
14 - 21	*	0,091	0,022
14 - 28	*	0,056	0,022
21 - 28	*	-0,035	0,022

Tabla C-107 Pruebas de Múltiple Rangos para clorofila *b* en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (0,5% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
7	5	0,033	X
14	5	0,044	XX
21	5	0,070	XX
28	5	0,081	X
0	5	0,130	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	0,097	0,038
0 - 14	*	0,086	0,038
0 - 21	*	0,060	0,038
0 - 28	*	0,049	0,038
7 - 14		-0,011	0,038
7 - 21		-0,037	0,038
7 - 28	*	-0,049	0,038
14 - 21		-0,026	0,038
14 - 28		-0,037	0,038
21 - 28		-0,012	0,038

Tabla C-108 Análisis de varianza para clorofila total en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* en matraz, con diferentes concentraciones de CO₂. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:% CO ₂	0,8006	3	0,2669	31,51	0,0000
B:Tiempo	0,2356	4	0,05891	6,96	0,0001
RESIDUOS	0,7792	92	0,008469		
TOTAL (CORREGIDO)	1,815	99			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla C-109 Pruebas de Múltiple Rangos para clorofila total en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (3% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
7	5	0,341	X
0	5	0,380	X
21	5	0,403	X
28	5	0,407	X
14	5	0,489	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7		0,039	0,067
0 - 14	*	-0,109	0,067
0 - 21		-0,022	0,067
0 - 28		-0,027	0,067
7 - 14	*	-0,147	0,067
7 - 21		-0,061	0,067
7 - 28		-0,065	0,067
14 - 21	*	0,086	0,067
14 - 28	*	0,082	0,067
21 - 28		-0,004	0,067

Tabla C-110 Pruebas de Múltiple Rangos para clorofila total en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (2% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
28	5	0,292	X
0	5	0,380	X
21	5	0,401	X
7	5	0,500	X
14	5	0,735	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	-0,120	0,040
0 - 14	*	-0,355	0,040
0 - 21		-0,021	0,040
0 - 28	*	0,088	0,040
7 - 14	*	-0,235	0,040
7 - 21	*	0,099	0,040
7 - 28	*	0,208	0,040
14 - 21	*	0,334	0,040
14 - 28	*	0,443	0,040
21 - 28	*	0,109	0,040

Tabla C-111 Pruebas de Múltiple Rangos para clorofila total en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (1% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
7	5	0,268	X
28	5	0,311	XX
21	5	0,316	X
14	5	0,378	X
0	5	0,380	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	0,112	0,047
0 - 14		0,002	0,047
0 - 21	*	0,064	0,047
0 - 28	*	0,069	0,047
7 - 14	*	-0,111	0,047
7 - 21	*	-0,048	0,047
7 - 28		-0,043	0,047
14 - 21	*	0,063	0,047
14 - 28	*	0,067	0,047
21 - 28		0,005	0,047

Tabla C-112 Pruebas de Múltiple Rangos para clorofila total en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (0,5% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
7	5	0,103	X
14	5	0,145	X
21	5	0,223	X
28	5	0,259	X
0	5	0,380	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	0,277	0,024
0 - 14	*	0,236	0,024
0 - 21	*	0,157	0,024
0 - 28	*	0,121	0,024
7 - 14	*	-0,041	0,024
7 - 21	*	-0,120	0,024
7 - 28	*	-0,156	0,024
14 - 21	*	-0,079	0,024
14 - 28	*	-0,115	0,024
21 - 28	*	-0,036	0,024

Tabla C-113 Análisis de varianza para carotenoides en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* en matraz, con diferentes concentraciones de CO₂. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:% CO ₂	0,1545	3	0,05149	56,17	0,0000
B:Tiempo	0,0482	4	0,01205	13,14	0,0000
RESIDUOS	0,08433	92	0,0009167		
TOTAL (CORREGIDO)	0,287	99			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla C-114 Pruebas de Múltiple Rangos para carotenoides en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (3% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
7	5	0,163	X
28	5	0,195	XX
0	5	0,200	X
21	5	0,206	X
14	5	0,228	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	0,037	0,035
0 - 14		-0,028	0,035
0 - 21		-0,006	0,035
0 - 28		0,005	0,035
7 - 14	*	-0,065	0,035
7 - 21	*	-0,043	0,035
7 - 28		-0,032	0,035
14 - 21		0,022	0,035
14 - 28		0,033	0,035
21 - 28		0,011	0,035

Tabla C-115 Pruebas de Múltiple Rangos para carotenoides en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (2% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
7	5	0,103	X
14	5	0,155	X
28	5	0,156	X
21	5	0,183	XX
0	5	0,200	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	0,097	0,029
0 - 14	*	0,045	0,029
0 - 21		0,017	0,029
0 - 28	*	0,044	0,029
7 - 14	*	-0,051	0,029
7 - 21	*	-0,079	0,029
7 - 28	*	-0,053	0,029
14 - 21		-0,028	0,029
14 - 28		-0,002	0,029
21 - 28		0,026	0,029

Tabla C-116 Pruebas de Múltiple Rangos para carotenoides en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (1% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
0	5	0,073	X
7	5	0,096	X
28	5	0,135	X
14	5	0,138	X
21	5	0,149	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7		-0,023	0,023
0 - 14	*	-0,065	0,023
0 - 21	*	-0,076	0,023
0 - 28	*	-0,062	0,023
7 - 14	*	-0,042	0,023
7 - 21	*	-0,053	0,023
7 - 28	*	-0,040	0,023
14 - 21		-0,011	0,023
14 - 28		0,003	0,023
21 - 28		0,014	0,023

Tabla C-117 Pruebas de Múltiple Rangos para carotenoides en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (0,5% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
7	5	0,054	X
0	5	0,073	X
14	5	0,075	X
21	5	0,125	X
28	5	0,153	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7		0,019	0,029
0 - 14		-0,002	0,029
0 - 21	*	-0,052	0,029
0 - 28	*	-0,080	0,029
7 - 14		-0,022	0,029
7 - 21	*	-0,071	0,029
7 - 28	*	-0,100	0,029
14 - 21	*	-0,049	0,029
14 - 28	*	-0,078	0,029
21 - 28		-0,029	0,029

Tabla C-118 Consumo de aniones durante el ciclo de crecimiento del cultivo fotoautotrófico de *Bouteloua gracilis* en matraz a diferentes concentraciones de CO₂.

0,5 % de CO ₂					
Tiempo (d)	Fluoruro (mg/L)	Cloruro (mg/L)	Nitrato (mg/L)	Fosfato (mg/L)	Sulfato (mg/L)
0	2,110 ^a ±0,170	215,465 ^e ±1,193	3080,646 ^e ±8,706	152,894 ^e ±0,993	148,1950 ^e ±0,548
7	2,150 ^a ±0,051	188,087 ^d ±1,089	2560,847 ^d ±10,212	120,865 ^d ±0,728	130,569 ^d ±0,521
14	2,180 ^a ±0,121	157,130 ^c ±1,350	2012,130 ^c ±10,705	80,678 ^c ±2,286	116,063 ^c ±0,489
21	2,835 ^b ±0,167	136,563 ^b ±1,039	1392,913 ^b ±9,954	61,850 ^b ±1,251	68,885 ^b ±0,870
28	2,565 ^c ±0,064	103,028 ^a ±0,818	1063,538 ^a ±10,776	42,108 ^a ±1,114	55,543 ^a ±1,099
1,0 % de CO ₂					
Tiempo (d)	Fluoruro (mg/L)	Cloruro (mg/L)	Nitrato (mg/L)	Fosfato (mg/L)	Sulfato (mg/L)
0	2,110 ^b ±0,075	255,878 ^d ±1,810	3080,643 ^e ±12,774	152,894 ^d ±2,277	148,195 ^e ±1,434
7	2,089 ^b ±0,155	215,465 ^c ±2,657	2891,338 ^d ±12,565	112,456 ^c ±2,549	140,876 ^d ±2,274
14	1,506 ^a ±0,140	214,786 ^c ±2,556	2350,008 ^c ±10,725	82,265 ^b ±2,902	134,553 ^c ±2,270
21	1,960 ^b ±0,107	188,455 ^b ±1,253	1874,879 ^b ±11,012	81,540 ^b ±1,405	126,370 ^b ±0,506
28	2,800 ^c ±0,136	167,695 ^a ±2,096	553,3975 ^a ±12,941	0,000 ^a ±0,000	27,943 ^a ±0,598
2,0 % de CO ₂					
Tiempo (d)	Fluoruro (mg/L)	Cloruro (mg/L)	Nitrato (mg/L)	Fosfato (mg/L)	Sulfato (mg/L)
0	2,110 ^a ±0,131	215,465 ^b ±2,211	3080,642 ^e ±11,557	152,894 ^d ±1,939	148,195 ^e ±1,698
7	2,034 ^a ±0,246	200,340 ^a ±0,790	2989,567 ^d ±10,665	114,678 ^c ±2,084	130,456 ^d ±0,846
14	2,148 ^a ±0,150	218,130 ^c ±2,286	2288,848 ^c ±18,671	71,808 ^b ±1,562	116,890 ^c ±1,191
21	2,348 ^a ±0,103	215,278 ^b ±1,780	1992,120 ^b ±15,440	0,000 ^a ±0,000	23,095 ^b ±1,755
28	2,283 ^a ±0,134	199,840 ^a ±1,534	982,808 ^a ±13,497	0,000 ^a ±0,000	9,540 ^a ±0,469

Tabla C-118 Consumo de aniones durante el ciclo de crecimiento del cultivo fotoautotrófico de *Bouteloua gracilis* en matraz a diferentes concentraciones de CO₂. (Continuación).

3,0 % de CO ₂					
Tiempo (d)	Fluoruro (mg/L)	Cloruro (mg/L)	Nitrato (mg/L)	Fosfato (mg/L)	Sulfato (mg/L)
0	2,620 ^b ±0,029	252,225 ^d ±0,019	3091,88 ^e ±0,636	156,240 ^e ±0,928	179,677 ^e ±0,110
7	2,461 ^a ±0,030	212,429 ^c ±0,283	2622,57 ^d ±7,869	136,490 ^d ±2,776	146,257 ^d ±1,155
14	2,741 ^b ±0,013	212,122 ^c ±0,697	2200,429 ^c ±9,002	44,234 ^c ±0,480	137,843 ^c ±0,431
21	2,760 ^b ±0,174	184,827 ^b ±1,080	2000,225 ^b ±20,993	30,981 ^b ±1,241	97,472 ^b ±1,361
28	1,551 ^{ab} ±0,006	183,461 ^a ±0,588	1431,837 ^a ±8,694	6,280 ^a ±0,435	42,623 ^a ±0,565

Tabla C-119 Análisis de varianza para el consumo de fluoruro en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* en matraz, con diferentes concentraciones de CO₂. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:% CO ₂	1,854	3	0,6181	1,83	0,1479
B:Tiempo	1,348	4	0,3371	1,00	0,4141
RESIDUOS	31,14	92	0,3385		
TOTAL (CORREGIDO)	34,35	99			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla C-120 Pruebas de Múltiple Rangos para el consumo de fluoruro en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (3% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
28	5	1,551	X
7	5	2,460	X
0	5	2,620	X
14	5	2,741	X
21	5	2,760	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	0,160	0,106
0 - 14	*	-0,121	0,106
0 - 21	*	-0,140	0,106
0 - 28	*	1,069	0,106
7 - 14	*	-0,281	0,106
7 - 21	*	-0,300	0,106
7 - 28	*	0,909	0,106
14 - 21		-0,019	0,106
14 - 28	*	1,191	0,106
21 - 28	*	1,209	0,106

Tabla C-121 Pruebas de Múltiple Rangos para floururo en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (2% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
7	5	2,034	x
0	5	2,110	x
14	5	2,148	x
28	5	2,228	x
21	5	2,348	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7		0,076	1,319
0 - 14		-0,038	1,319
0 - 21		-0,238	1,319
0 - 28		-0,118	1,319
7 - 14		-0,114	1,319
7 - 21		-0,314	1,319
7 - 28		-0,194	1,319
14 - 21		-0,200	1,319
14 - 28		-0,080	1,319
21 - 28		0,120	1,319

Tabla C-122 Pruebas de Múltiple Rangos para fluoruro en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (1% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
14	5	1,506	x
21	5	1,960	x
7	5	2,089	x
0	5	2,110	x
28	5	2,800	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7		0,021	0,166
0 - 14	*	0,604	0,166
0 - 21		0,150	0,166
0 - 28	*	-0,690	0,166
7 - 14	*	0,583	0,166
7 - 21		0,129	0,166
7 - 28	*	-0,711	0,166
14 - 21	*	-0,454	0,166
14 - 28	*	-1,294	0,166
21 - 28	*	-0,840	0,166

Tabla C-123 Pruebas de Múltiple Rangos para fluoruro en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (0,5% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
0	5	2,110	x
7	5	2,140	x
14	5	2,180	x
28	5	2,565	x
21	5	2,835	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7		-0,030	0,165
0 - 14		-0,070	0,165
0 - 21	*	-0,725	0,165
0 - 28	*	-0,455	0,165
7 - 14		-0,040	0,165
7 - 21	*	-0,695	0,165
7 - 28	*	-0,425	0,165
14 - 21	*	-0,655	0,165
14 - 28	*	-0,385	0,165
21 - 28	*	0,270	0,165

Tabla C-124 Análisis de varianza para el consumo de cloruro en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* en matraz, con diferentes concentraciones de CO₂. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:% CO ₂	4,511E4	3	1,504E4	67,09	0,0000
B:Tiempo	5,714E4	4	1,429E4	63,74	0,0000
RESIDUOS	2,062E4	92	224,1		
TOTAL (CORREGIDO)	1,229E5	99			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla C-125 Pruebas de Múltiple Rangos para el consumo de cloruro en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (3% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
28	5	183,500	X
21	5	184,800	X
14	5	212,100	X
7	5	212,400	X
0	5	252,200	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	39,800	0,851
0 - 14	*	40,100	0,851
0 - 21	*	67,400	0,851
0 - 28	*	68,760	0,851
7 - 14		0,306	0,851
7 - 21	*	27,600	0,851
7 - 28	*	28,970	0,851
14 - 21	*	27,300	0,851
14 - 28	*	28,660	0,851
21 - 28	*	1,366	0,851

Tabla C-126 Pruebas de Múltiple Rangos para el consumo de cloruro en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (2% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
28	5	199,800	X
7	5	200,300	X
21	5	215,300	X
0	5	215,500	X
14	5	218,100	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	15,130	2,379
0 - 14	*	-2,665	2,379
0 - 21		0,187	2,379
0 - 28	*	15,630	2,379
7 - 14	*	-17,790	2,379
7 - 21	*	-14,940	2,379
7 - 28		0,500	2,379
14 - 21	*	2,852	2,379
14 - 28	*	18,290	2,379
21 - 28	*	15,440	2,379

Tabla C-127 Pruebas de Múltiple Rangos para el consumo de cloruro en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (1% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
28	5	167,700	X
21	5	188,500	X
14	5	214,800	X
7	5	215,500	X
0	5	255,900	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	40,410	2,819
0 - 14	*	41,090	2,819
0 - 21	*	67,420	2,819
0 - 28	*	88,180	2,819
7 - 14		0,679	2,819
7 - 21	*	27,010	2,819
7 - 28	*	47,770	2,819
14 - 21	*	26,330	2,819
14 - 28	*	47,090	2,819
21 - 28	*	20,760	2,819

Tabla C-128 Pruebas de Múltiple Rangos para el consumo de cloruro en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (0,5% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
28	5	103,000	X
21	5	136,600	X
14	5	157,100	X
7	5	188,100	X
0	5	215,500	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	27,380	1,467
0 - 14	*	58,330	1,467
0 - 21	*	78,900	1,467
0 - 28	*	112,400	1,467
7 - 14	*	30,960	1,467
7 - 21	*	51,520	1,467
7 - 28	*	85,060	1,467
14 - 21	*	20,570	1,467
14 - 28	*	54,100	1,467
21 - 28	*	33,530	1,467

Tabla C-129 Análisis de varianza para el consumo de fosfato en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* en matraz, con diferentes concentraciones de CO₂. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:% CO ₂	8599,	3	2866,	11,28	0,0000
B:Tiempo	2,634E5	4	6,584E4	259,15	0,0000
RESIDUOS	2,337E4	92	254,1		
TOTAL (CORREGIDO)	2,953E5	99			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla C-130 Pruebas de Múltiple Rangos para el consumo de fosfato en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (3% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
28	5	6,280	X
21	5	30,980	X
14	5	44,230	X
7	5	136,500	X
0	5	156,200	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	19,750	1,914
0 - 14	*	112,000	1,914
0 - 21	*	125,300	1,914
0 - 28	*	150,000	1,914
7 - 14	*	92,260	1,914
7 - 21	*	105,500	1,914
7 - 28	*	130,200	1,914
14 - 21	*	13,250	1,914
14 - 28	*	37,950	1,914
21 - 28	*	24,700	1,914

Tabla C-131 Pruebas de Múltiple Rangos para el consumo de fosfato en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (2% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
28	5	0,000	X
21	5	0,000	X
14	5	71,810	X
7	5	114,700	X
0	5	152,900	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	38,220	1,916
0 - 14	*	81,090	1,916
0 - 21	*	152,900	1,916
0 - 28	*	152,900	1,916
7 - 14	*	42,870	1,916
7 - 21	*	114,700	1,916
7 - 28	*	114,700	1,916
14 - 21	*	71,810	1,916
14 - 28	*	71,810	1,916
21 - 28		0,000	1,916

Tabla C-132 Pruebas de Múltiple Rangos para el consumo de fosfato en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (1% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
28	5	0,000	X
21	5	81,540	X
14	5	82,260	X
7	5	112,500	X
0	5	152,900	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	40,440	2,772
0 - 14	*	70,630	2,772
0 - 21	*	71,350	2,772
0 - 28	*	152,900	2,772
7 - 14	*	30,190	2,772
7 - 21	*	30,920	2,772
7 - 28	*	112,500	2,772
14 - 21		0,725	2,772
14 - 28	*	82,260	2,772
21 - 28	*	81,540	2,772

Tabla C-133 Pruebas de Múltiple Rangos para el consumo de fosfato en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (0,5% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
28	5	6,280	X
21	5	30,980	X
14	5	44,230	X
7	5	136,500	X
0	5	156,200	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	27,380	1,467
0 - 14	*	58,330	1,467
0 - 21	*	78,900	1,467
0 - 28	*	112,400	1,467
7 - 14	*	30,960	1,467
7 - 21	*	51,520	1,467
7 - 28	*	85,060	1,467
14 - 21	*	20,570	1,467
14 - 28	*	54,100	1,467
21 - 28	*	33,530	1,467

Tabla C-134 Análisis de varianza para el consumo de sulfato en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* en matraz, con diferentes concentraciones de CO₂. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:% CO ₂	1,822E4	3	6072	23,83	0,0000
B:Tiempo	1,962E5	4	4,905E4	192,53	0,0000
RESIDUOS	2,344E4	92	254,8		
TOTAL (CORREGIDO)	2,379E5	99			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla C-135 Pruebas de Múltiple Rangos para el consumo de sulfato en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (3% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
28	5	42,620	X
21	5	97,470	X
14	5	137,800	X
7	5	146,300	X
0	5	179,700	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	33,420	1,135
0 - 14	*	41,830	1,135
0 - 21	*	82,200	1,135
0 - 28	*	137,100	1,135
7 - 14	*	8,414	1,135
7 - 21	*	48,780	1,135
7 - 28	*	103,600	1,135
14 - 21	*	40,370	1,135
14 - 28	*	95,220	1,135
21 - 28	*	54,850	1,135

Tabla C-136 Pruebas de Múltiple Rangos para el consumo de sulfato en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (2% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
28	5	9,540	X
21	5	23,100	X
14	5	116,900	X
7	5	130,500	X
0	5	148,200	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	17,740	1,702
0 - 14	*	31,300	1,702
0 - 21	*	125,100	1,702
0 - 28	*	138,700	1,702
7 - 14	*	13,570	1,702
7 - 21	*	107,400	1,702
7 - 28	*	120,900	1,702
14 - 21	*	93,790	1,702
14 - 28	*	107,300	1,702
21 - 28	*	13,560	1,702

Tabla C-137 Pruebas de Múltiple Rangos para el consumo de sulfato en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (1% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
28	5	27,940	X
21	5	126,400	X
14	5	134,600	X
7	5	140,900	X
0	5	148,200	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	7,319	2,127
0 - 14	*	13,640	2,127
0 - 21	*	21,820	2,127
0 - 28	*	120,300	2,127
7 - 14	*	6,324	2,127
7 - 21	*	14,510	2,127
7 - 28	*	112,900	2,127
14 - 21	*	8,183	2,127
14 - 28	*	106,600	2,127
21 - 28	*	98,430	2,127

Tabla C-138 Pruebas de Múltiple Rangos para el consumo de sulfato en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (0,5% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
28	5	55,540	X
21	5	68,890	X
14	5	116,100	X
7	5	130,600	X
0	5	148,200	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	17,630	0,983
0 - 14	*	32,130	0,983
0 - 21	*	79,310	0,983
0 - 28	*	92,650	0,983
7 - 14	*	14,510	0,983
7 - 21	*	61,680	0,983
7 - 28	*	75,030	0,983
14 - 21	*	47,180	0,983
14 - 28	*	60,520	0,983
21 - 28	*	13,340	0,983

Tabla C-139 Análisis de varianza para el consumo de nitrato en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* en matraz, con diferentes concentraciones de CO₂. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:% CO ₂	1,034E6	3	3,445E5	10,12	0,0000
B:Tiempo	5,336E7	4	1,334E7	391,74	0,0000
RESIDUOS	3,133E6	92	3,405E4		
TOTAL (CORREGIDO)	5,752E7	99			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla C-140 Pruebas de Múltiple Rangos para el consumo de nitrato en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (3% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
28	5	1432	X
21	5	2000	X
14	5	2200	X
7	5	2623	X
0	5	3092	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	469,300	15,150
0 - 14	*	891,500	15,150
0 - 21	*	1092,000	15,150
0 - 28	*	1660,000	15,150
7 - 14	*	422,100	15,150
7 - 21	*	622,300	15,150
7 - 28	*	1191,000	15,150
14 - 21	*	200,200	15,150
14 - 28	*	768,600	15,150
21 - 28	*	568,400	15,150

Tabla C-141 Pruebas de Múltiple Rangos para el consumo de nitrato en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (2% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
28	5	982,800	X
21	5	1992,000	X
14	5	2289,000	X
7	5	2990,000	X
0	5	3081,000	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	91,070	18,810
0 - 14	*	791,800	18,810
0 - 21	*	1089,000	18,810
0 - 28	*	2098,000	18,810
7 - 14	*	700,700	18,810
7 - 21	*	997,400	18,810
7 - 28	*	2007,000	18,810
14 - 21	*	296,700	18,810
14 - 28	*	1306,000	18,810
21 - 28	*	1009,000	18,810

Tabla C-142 Pruebas de Múltiple Rangos para el consumo de nitrato en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (1% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
28	5	553,400	X
21	5	1875,000	X
14	5	2350,000	X
7	5	2891,000	X
0	5	3081,000	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	189,300	15,880
0 - 14	*	730,600	15,880
0 - 21	*	1206,000	15,880
0 - 28	*	2527,000	15,880
7 - 14	*	541,300	15,880
7 - 21	*	1016,000	15,880
7 - 28	*	2338,000	15,880
14 - 21	*	475,100	15,880
14 - 28	*	1797,000	15,880
21 - 28	*	1321,000	15,880

Tabla C-143 Pruebas de Múltiple Rangos para el consumo de nitrato en el cultivo FA de *Bouteloua gracilis* (0,5% de CO₂). Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos
28	5	1064,000	X
21	5	1393,000	X
14	5	2012,000	X
7	5	2561,000	X
0	5	3081,000	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 7	*	519,800	13,320
0 - 14	*	1069,000	13,320
0 - 21	*	1688,000	13,320
0 - 28	*	2017,000	13,320
7 - 14	*	548,700	13,320
7 - 21	*	1168,000	13,320
7 - 28	*	1497,000	13,320
14 - 21	*	619,200	13,320
14 - 28	*	948,600	13,320
21 - 28	*	329,400	13,320

D. Anexo: Análisis estadístico del capítulo 4

Tabla D-1 Cinética de crecimiento en peso fresco de células heterotróficas de *Bouteloua* cultivadas en biorreactor

Tiempo (d)	Peso fresco (g)			Promedio	Desviación Estándar
	R1	R2	R3		
0	29,00	29,00	29,00	29,00 ^a	0,00
1	56,23	58,89	50,09	55,07 ^b	4,51
2	66,45	58,78	57,11	60,78 ^{bc}	4,98
3	73,84	63,55	62,30	66,56 ^{cd}	6,33
4	77,98	76,84	62,51	72,45 ^{de}	8,62
5	75,95	74,77	85,81	78,84 ^{ef}	6,06
6	84,40	82,72	95,53	87,55 ^f	6,96
7	111,57	96,57	95,90	101,35 ^g	8,86
8	123,97	115,44	125,79	121,73 ^h	5,53
9	129,65	127,86	135,73	131,08 ^h	4,12
10	144,26	136,36	145,54	142,05 ⁱ	4,97
11	164,74	157,19	170,42	164,12 ^j	6,64
12	177,58	173,23	181,69	177,50 ^k	4,23
13	183,71	177,87	193,52	185,03 ^k	7,91

Tabla D-2 Análisis de varianza para el crecimiento de células heterotróficas en peso fresco de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	9,376E4	13	7212,	194,15	0,0000
Intra grupos	1040,	28	37,15		
Total (Corr.)	9,48E4	41			

Tabla D-3 Prueba de múltiples rangos para el crecimiento de células heterotróficas en peso fresco de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	29,0	X
1	3	55,07	X
2	3	60,78	XX
3	3	66,56	XX
4	3	72,45	XX
5	3	78,84	XX
6	3	87,55	X
7	3	101,3	X
8	3	121,7	X
9	3	131,1	X
10	3	142,1	X
11	3	164,1	X
12	3	177,5	X
13	3	185,0	X

Tabla D-4 Cinética de crecimiento en peso seco de células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* cultivadas en biorreactor

Tiempo (d)	Peso seco (g)			Promedio	Desviación Estándar
	R1	R2	R3		
0	2,24	2,24	2,24	2,24 ^a	0,00
1	4,85	4,13	4,63	4,54 ^b	0,37
2	5,14	5,00	5,81	5,32 ^b	0,44
3	5,88	5,77	6,84	6,16 ^{bc}	0,59
4	5,94	4,83	6,02	5,60 ^{cd}	0,67
5	6,16	7,07	6,26	6,49 ^d	0,50
6	8,07	9,33	8,24	8,55 ^e	0,68
7	9,92	9,85	11,46	10,41 ^f	0,91
8	13,20	14,38	14,17	13,92 ^g	0,63
9	15,27	16,21	15,49	15,66 ^h	0,49
10	16,42	17,53	17,37	17,11 ⁱ	0,60
11	18,93	20,53	19,84	19,77 ^j	0,80
12	22,13	23,21	22,68	22,67 ^k	0,54
13	22,93	24,95	23,69	23,86 ^l	1,02

Tabla D-5 Análisis de varianza para el crecimiento de células heterotróficas en peso seco de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2065,	13	158,8	401,95	0,0000
Intra grupos	11,07	28	0,3952		

Tabla D-6 Prueba de múltiples rangos para el crecimiento de células heterotróficas en peso seco de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	2,24	X
1	3	4,275	X
2	3	4,73	X
3	3	5,187	XX
4	3	5,848	XX
5	3	6,768	X
6	3	8,547	X
7	3	10,41	X
8	3	13,92	X
9	3	15,66	X
10	3	17,11	X
11	3	19,77	X
12	3	22,67	X
13	3	23,86	X

Tabla D-7 Comportamiento de la conductividad del medio para el cultivo de células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor.

Tiempo (d)	Conductividad eléctrica			Promedio	Desviación Estándar
	R1	R2	R3		
0	6,077	5,752	5,900	5,910 ⁱ	0,163
1	5,892	5,53222	5,826	5,750 ⁱ	0,191
2	5,711	5,534	5,705	5,650 ^{hi}	0,100
3	5,580	5,454	5,616	5,550 ^{hi}	0,085
4	5,507	5,231	5,612	5,450 ^h	0,197
5	5,543	5,266	5,211	5,340 ^g	0,178
6	5,393	5,133	5,044	5,190 ^{fg}	0,181
7	4,912	4,900	5,038	4,950 ^f	0,076
8	4,692	4,584	4,524	4,600 ^e	0,085
9	4,591	4,376	4,353	4,440 ^{de}	0,132
10	4,333	4,233	4,184	4,250 ^{cd}	0,076
11	3,970	3,884	3,756	3,870 ^{bc}	0,108
12	3,742	3,615	3,563	3,640 ^{ab}	0,090
13	3,634	3,537	3,359	3,510 ^a	0,139

Tabla D-8 Análisis de varianza de la conductividad del medio para el cultivo de células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	26,16	13	2,012	73,48	0,0000
Intra grupos	0,7668	28	0,02739		
Total (Corr.)	26,93	41			

Tabla D-9 Prueba de múltiples rangos para la conductividad del medio del cultivo de células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor.

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
13	3	3,418	X
12	3	3,611	XX
11	3	3,858	XX
10	3	4,107	XX
9	3	4,376	XX
8	3	4,495	X
7	3	4,877	X
6	3	5,146	XX
5	3	5,174	X
4	3	5,462	X
3	3	5,526	XX
2	3	5,606	XX
1	3	5,767	X
0	3	5,771	X

Tabla D-10 Comportamiento del pH del medio para el cultivo de células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor.

Tiempo (d)	Réplicas pH			Promedio	Desviación Estándar
	R1	R2	R3		
0	6,158	5,901	6,118	6,059 ^g	0,138
1	5,866	6,002	6,132	6,000 ^g	0,133
2	5,841	5,718	5,841	5,800 ^f	0,071
3	5,439	5,635	5,426	5,500 ^{bcd}	0,117
4	5,479	5,422	5,293	5,398 ^{bc}	0,095
5	5,002	4,816	5,099	4,972 ^a	0,144
6	5,321	5,268	5,563	5,384 ^b	0,157
7	5,531	5,530	5,688	5,583 ^{cde}	0,091
8	5,726	5,519	5,528	5,591 ^{cde}	0,117
9	5,566	5,705	5,505	5,592 ^{cde}	0,102
10	5,715	5,514	5,532	5,587 ^{cde}	0,111
11	5,737	5,535	5,558	5,610 ^{def}	0,110
12	5,764	5,562	5,590	5,639 ^{def}	0,109
13	5,838	5,673	5,634	5,715 ^{ef}	0,108

Tabla D-11 Análisis de varianza del pH del medio para el cultivo de células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2,754	13	0,2118	15,55	0,0000
Intra grupos	0,3814	28	0,01362		
Total (Corr.)	3,135	41			

Tabla D-12 Prueba de múltiples rangos para el pH del medio del cultivo de células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo (d)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
5	3	4,972	X
6	3	5,384	X
4	3	5,398	XX
3	3	5,5	XXX
7	3	5,583	XXX
10	3	5,587	XXX
8	3	5,591	XXX
9	3	5,592	XXX
11	3	5,61	XXX
12	3	5,639	XXX
13	3	5,715	XX
2	3	5,8	X
1	3	6,0	X
0	3	6,059	X

Tabla D-13 Comportamiento del oxígeno disuelto (OD) del medio para el cultivo de células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor.

Tiempo (d)	Réplicas OD (mg L ⁻¹)			Promedio	Desviación Estándar
	R1	R2	R3		
0	7,340	7,126	7,374	7,280 ^f	0,134
1	6,917	6,910	7,202	7,010 ^f	0,167
2	6,265	6,068	6,268	6,200 ^e	0,115
3	5,427	5,659	5,414	5,500 ^d	0,138
4	5,138	5,173	4,899	5,070 ^c	0,149
5	4,530	4,229	4,440	4,400 ^b	0,155
6	4,190	4,156	4,374	4,240 ^{ab}	0,117
7	3,898	3,889	4,123	3,970 ^{ab}	0,133
8	4,182	3,838	3,920	3,980 ^{ab}	0,179
9	3,905	4,035	3,789	3,910 ^{ab}	0,123
10	3,890	3,770	3,950	3,870 ^a	0,092
11	3,812	4,009	3,909	3,910 ^{ab}	0,099
12	5,764	5,562	5,590	5,639 ^{ab}	0,109
13	5,838	5,673	5,634	5,715 ^{ab}	0,108

Tabla D-14 Análisis de varianza para el OD del medio para el cultivo de células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	50,65	13	3,896	64,73	0,0000
Intra grupos	1,685	28	0,06019		
Total (Corr.)	52,33	41			

Tabla D-15 Prueba de múltiples rangos para el OD del medio del cultivo de células heterotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
10	3	3,844	X
8	3	3,888	XX
9	3	3,905	XX
13	3	3,931	XX
12	3	3,969	XX
11	3	3,983	XX
7	3	4,065	XX
6	3	4,143	XX
5	3	4,287	X
4	3	4,867	X
3	3	5,404	X
2	3	5,921	X
1	3	6,792	X
0	3	7,139	X

Tabla D-16 Cinética de crecimiento de células fotomixotróficas en peso fresco de *Bouteloua gracilis* en biorreactor

Tiempo (d)	Réplicas peso fresco (g)			Promedio	Desviación Estándar
	R1	R2	R3		
0	22,000	22,000	22,000	22,000 ^a	0,000
7	34,716	34,763	34,497	34,659 ^b	0,142
10	37,946	40,221	41,026	39,731 ^{bc}	1,597
17	34,195	43,632	49,862	42,563 ^c	7,888
20	50,159	52,739	56,668	53,189 ^d	3,278
22	59,258	66,001	54,579	59,946 ^d	5,742
24	65,288	73,990	65,847	68,375 ^e	4,871
28	73,302	76,714	70,173	73,396 ^{ef}	3,272
31	79,180	80,018	67,498	75,565 ^f	6,999
35	79,349	77,923	74,987	77,419 ^f	2,224
38	76,887	78,676	77,857	77,807 ^f	0,896

Tabla D-17 Análisis de varianza para la cinética de crecimiento del cultivo de células fotomixotróficas en peso fresco de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,154E4	10	1154,	64,21	0,0000
Intra grupos	395,3	22	17,97		
Total (Corr.)	1,193E4	32			

Tabla D-18 Prueba de múltiples rangos para la cinética de crecimiento del cultivo de células heterotróficas en peso fresco de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer.

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	22,0	X
7	3	34,66	X
10	3	39,73	XX
17	3	42,56	X
20	3	53,19	X
22	3	59,95	X
24	3	68,38	X
28	3	73,4	XX
31	3	75,57	X
35	3	77,42	X
38	3	77,81	X

Tabla D-19. Cinética de crecimiento de células fotomixotróficas en peso seco de *Bouteloua gracilis* en biorreactor

Tiempo (d)	Réplicas peso seco (g)			Promedio	Desviación Estándar
	R1	R2	R3		
0	1,863	1,863	1,863	1,863 ^a	0,000
7	2,620	2,623	2,603	2,615 ^b	0,011
10	3,049	3,025	3,035	3,036 ^c	0,012
17	3,451	3,463	3,457	3,457 ^d	0,006
20	4,509	4,510	4,463	4,494 ^e	0,027
22	5,504	5,411	5,499	5,471 ^f	0,052
24	6,494	6,423	6,509	6,476 ^l	0,046
28	7,035	7,022	7,082	7,046 ^l	0,031
31	5,728	5,681	5,787	5,732 ^g	0,053
35	5,844	5,739	5,523	5,702 ^g	0,164
38	5,382	5,507	5,450	5,446 ^f	0,063

Tabla D-20 Análisis de varianza para la cinética de crecimiento del cultivo de células fotomixotróficas en peso seco de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	85,85	10	8,585	2333,97	0,0000
Intra grupos	0,08092	22	0,003678		
Total (Corr.)	85,93	32			

Tabla D-21 Prueba de múltiples rangos para la cinética de crecimiento del cultivo de células fotomixotróficas en peso seco de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	1,863	X
7	3	2,615	X
10	3	3,036	X
17	3	3,457	X
20	3	4,494	X
38	3	5,447	X
22	3	5,471	X
35	3	5,702	X
31	3	5,732	X
24	3	6,476	X
28	3	7,046	X

Tabla D- 22 Comportamiento del pH del medio para el cultivo de células fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor.

Tiempo (d)	Réplicas pH			Promedio	Desviación Estándar
	R1	R2	R3		
0	5,892	5,933	6,819	6,215 ^f	0,524
7	6,004	6,013	6,355	6,124 ^f	0,200
10	5,649	5,649	6,163	5,820 ^{ef}	0,297
17	5,713	5,627	5,175	5,505 ^{de}	0,289
20	5,491	5,403	4,817	5,237 ^{cd}	0,366
22	4,572	4,572	5,143	4,762 ^{abc}	0,330
24	4,437	4,437	4,851	4,575 ^{ab}	0,239
28	4,642	4,642	5,183	4,822 ^{bc}	0,313
31	4,597	4,597	5,062	4,752 ^{abc}	0,268
35	4,561	4,561	4,160	4,427 ^{ab}	0,232
38	4,199	4,199	4,493	4,297 ^a	0,170

Tabla D-23 Análisis de varianza para el comportamiento del pH del medio para el cultivo de células fotomixotróficas *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	13,99	10	1,399	14,81	0,0000
Intra grupos	2,077	22	0,0944		
Total (Corr.)	16,06	32			

Tabla D-24 Prueba de múltiples rangos para el comportamiento del pH del medio para el cultivo de células fotomixotróficas *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
38	3	4,297	X
35	3	4,427	XX
24	3	4,575	XX
31	3	4,752	XXX
22	3	4,762	XXX
28	3	4,822	XX
20	3	5,237	XX
17	3	5,505	XX
10	3	5,82	XX
7	3	6,124	X
0	3	6,215	X

Tabla D-25 Comportamiento del OD del medio para el cultivo de células fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor.

Tiempo (d)	Réplicas pH			Promedio	Desviación Estándar
	R1	R2	R3		
0	6,353	6,158	6,134	6,215 ^f	0,120
7	6,285	6,064	6,011	6,120 ^f	0,146
10	5,922	5,679	5,709	5,770 ^e	0,133
17	5,542	5,633	5,354	5,510 ^d	0,142
20	5,342	5,407	4,941	5,230 ^c	0,252
22	5,049	5,049	5,143	5,080 ^{bc}	0,054
24	4,752	4,752	5,017	4,840 ^{ab}	0,153
28	4,844	4,716	5,020	4,860 ^{ab}	0,153
31	4,789	4,789	5,002	4,860 ^{ab}	0,123
35	4,864	4,864	4,672	4,800 ^a	0,111
38	4,828	4,828	5,194	4,950 ^{ab}	0,211

Tabla D-26 Análisis de varianza para el comportamiento del OD del medio para el cultivo de células fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	8,397	10	0,8397	35,67	0,0000
Intra grupos	0,5179	22	0,02354		
Total (Corr.)	8,914	32			

Tabla D-27 Prueba de múltiples rangos para el comportamiento del pH del medio para el cultivo de células fotomixotróficas *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
35	3	4,8	X
24	3	4,84	XX
28	3	4,86	XX
31	3	4,86	XX
38	3	4,95	XX
22	3	5,08	XX
20	3	5,23	X
17	3	5,51	X
10	3	5,77	X
7	3	6,12	X
0	3	6,215	X

Tabla D-28 Comportamiento de la conductividad del medio para el cultivo de células fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor.

Tiempo (d)	Conductividad ms cm ⁻¹			Promedio	Desviación Estándar
	R1	R2	R3		
0	6,651	6,672	6,615	6,646 ^e	0,029
7	6,569	6,671	6,620	6,620 ^e	0,051
10	6,665	6,531	6,455	6,550 ^e	0,106
17	6,257	6,443	6,230	6,310 ^d	0,116
20	6,024	6,210	6,057	6,097 ^c	0,099
22	5,870	5,870	6,110	5,950 ^c	0,139
24	5,665	5,665	5,824	5,718 ^b	0,092
28	5,515	5,595	5,714	5,608 ^{ab}	0,100
31	5,511	5,511	5,782	5,601 ^{ab}	0,157
35	5,574	5,564	5,591	5,569 ^{ab}	0,007
38	5,538	5,545	5,518	5,534 ^a	0,014

Tabla D-29 Análisis de varianza para el comportamiento de la conductividad del medio para el cultivo de células fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5,972	10	0,5972	62,89	0,0000
Intra grupos	0,2089	22	0,009496		
Total (Corr.)	6,181	32			

Tabla D-30 Prueba de múltiples rangos para el comportamiento de la conductividad del medio para el cultivo de células fotomixotróficas *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
38	3	5,534	X
35	3	5,576	XX
31	3	5,601	XX
28	3	5,608	XX
24	3	5,718	X
22	3	5,950	X
20	3	6,097	X
17	3	6,310	X
10	3	6,550	X
7	3	6,620	X
0	3	6,646	X

Tabla D-31 Perfil de pigmentos durante el crecimiento fotomixotrófico de *Bouteloua gracilis* en biorreactor

Células fotomixotróficas crecidas en biorreactor				
Día	Clorofila a (mg clorofila/g PF)	Clorofila b (mg clorofila/g PF)	Clorofila Total (mg clorofila/g PF)	Carotenoides (mg clorofila/g PF)
0	0,354±0,007 ^e	0,237 ^g ±0,005	0,570 ^f ±0,012	0,163 ^d ±0,007
10	0,134±0,011 ^b	0,143 ^{de} ±0,025	0,277 ^b ±0,036	0,071 ^{ab} ±0,010
17	0,085±0,012 ^a	0,051 ^a ±0,027	0,135 ^a ±0,039	0,038 ^a ±0,007
20	0,183±0,062 ^c	0,096 ^b ±0,017	0,279 ^b ±0,080	0,103 ^{bc} ±0,012
22	0,225±0,021 ^{cd}	0,125 ^{cd} ±0,012	0,349 ^{cd} ±0,033	0,134 ^{cd} ±0,016
24	0,198±0,009 ^{cd}	0,105 ^{bc} ±0,011	0,302 ^{bc} ±0,020	0,118 ^{bcd} ±0,014
28	0,201±0,040 ^{cd}	0,154 ^{ef} ±0,007	0,354 ^{cd} ±0,046	0,106 ^{bc} ±0,038
31	0,227±0,030 ^{cd}	0,133 ^{de} ±0,018	0,360 ^{cde} ±0,048	0,133 ^{cd} ±0,007
35	0,244±0,007 ^d	0,135 ^{de} ±0,019	0,373 ^{de} ±0,025	0,152 ^{cd} ±0,079
38	0,243±0,009 ^d	0,178 ^f ±0,011	0,422 ^e ±0,020	0,142 ^{cd} ±0,019

Tabla D.32 Análisis de varianza para clorofila *a* durante el cultivo de células fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,1364	9	0,01516	20,69	0,0000
Intra grupos	0,01465	20	0,0007326		
Total (Corr.)	0,1511	29			

Tabla D-33 Prueba de múltiples rangos para clorofila *a* durante el cultivo de células fotomixotróficas *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
17	3	0,084	X
10	3	0,133	X
20	3	0,183	X
24	3	0,197	XX
28	3	0,2	XX
22	3	0,224	XX
31	3	0,226	XX
35	3	0,237	X
38	3	0,243	X
0	3	0,353	X

Tabla D.34 Análisis de varianza para clorofila *b* durante el cultivo de células fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,06765	9	0,007517	26,61	0,0000
Intra grupos	0,005649	20	0,0002825		
Total (Corr.)	0,0733	29			

Tabla D-35 Prueba de múltiples rangos para clorofila *b* durante el cultivo de células fotomixotróficas *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
17	3	0,051	X
20	3	0,095	X
24	3	0,104	XX
22	3	0,124	XX
31	3	0,133	XX
35	3	0,135	XX
10	3	0,143	XX
28	3	0,153	XX
38	3	0,178	X
0	3	0,237	X

Tabla D-36 Análisis de varianza para clorofila total durante el cultivo de células fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,3379	9	0,03754	23,79	0,0000
Intra grupos	0,03156	20	0,001578		
Total (Corr.)	0,3695	29			

Tabla D-37 Prueba de múltiples rangos para clorofila total durante el cultivo de células fotomixotróficas *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
17	3	0,135	X
10	3	0,277	X
20	3	0,278	X
24	3	0,302	XX
22	3	0,349	XX
28	3	0,354	XX
31	3	0,36	XXX
35	3	0,373	XX
38	3	0,422	X
0	3	0,57	X

Tabla D-38 Análisis de varianza para carotenoides durante el cultivo de células fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,03961	9	0,004401	5,02	0,0013
Intra grupos	0,01752	20	0,000876		
Total (Corr.)	0,05713	29			

Tabla D-39 Prueba de múltiples rangos para carotenoides durante el cultivo de células fotomixotróficas *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
17	3	0,038	X
10	3	0,071	XX
20	3	0,103	XX
28	3	0,106	XX
24	3	0,118	XXX
31	3	0,133	XX
22	3	0,134	XX
38	3	0,142	XX
35	3	0,152	XX
0	3	0,163	X

Tabla D-40 Cambio en la concentración de aniones en el medio durante el crecimiento del cultivo fotomixotrófico de *Bouteloua gracilis* en biorreactor

Tiempo (d)	Cloruro (mg/L)	Nitrato (mg/L)	Fosfato (mg/L)	Sulfato (mg/L)
0	215,800 ⁱ ±1,193	3080,640±8,706	152,894 ⁱ ±1,193	148,190 ^j ±1,017
10	209,451 ^h ±1,195	1354,450±8,195	104,000 ^h ±1,195	137,190 ^h ±0,689
17	205,400 ^g ±1,089	1325,360 ^g ±9,089	87,000 ^g ±1,089	133,860 ^g ±1,304
20	194,530 ^f ±1,252	1291,425 ^f ±7,252	60,802 ^f ±1,252	127,980 ^f ±1,220
22	186,310 ^e ±1,189	1219,760 ^e ±6,189	40,770 ^e ±1,189	120,410 ^e ±1,677
24	178,190 ^d ±1,078	1215,710 ^e ±8,078	39,518 ^e ±1,078	108,270 ^e ±1,375
28	174,230 ^c ±1,078	1163,950 ^d ±7,078	27,496 ^d ±1,078	87,230 ^d ±1,729
31	174,230 ^c ±1,077	1038,380 ^c ±9,077	14,587 ^c ±1,077	58,950 ^c ±1,557
35	157,130 ^b ±1,311	826,840 ^b ±6,311	11,142 ^b ±1,311	53,300 ^b ±1,360
38	150,570 ^a ±1,036	615,985 ^a ±9,036	0,000 ^a ±0,000	33,800 ^a ±1,099

Tabla D-41 Análisis de varianza para cloruro durante el cultivo de células fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,288E4	9	1431,	1076,49	0,0000
Intra grupos	26,59	20	1,33		
Total (Corr.)	1,291E4	29			

Tabla D-42 Prueba de múltiples rangos para cloruro durante el cultivo de células fotomixotróficas *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
38	3	150,6	X
35	3	157,1	X
31	3	174,2	X
28	3	174,2	X
24	3	178,2	X
22	3	186,3	X
20	3	194,5	X
17	3	205,4	X
10	3	209,5	X
0	3	215,8	X

Tabla D-43 Análisis de varianza para nitrato durante el cultivo de células fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,189E7	9	1,322E6	20790,22	0,0000
Intra grupos	1271,	20	63,57		
Total (Corr.)	1,19E7	29			

Tabla D-44 Prueba de múltiples rangos para nitrato durante el cultivo de células fotomixotróficas *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
38	3	616,0	X
35	3	826,8	X
31	3	1038,	X
28	3	1164,	X
24	3	1216,	X
22	3	1220,	X
20	3	1291,	X
17	3	1325,	X
10	3	1354,	X
0	3	3081,	X

Tabla D-45 Análisis de varianza para fosfato durante el cultivo de células fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6,243E4	9	6936,	5675,13	0,0000
Intra grupos	24,44	20	1,222		
Total (Corr.)	6,245E4	29			

Tabla D-46 Prueba de múltiples rangos para fosfato durante el cultivo de células fotomixotróficas *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
38	3	0	X
35	3	11,14	X
31	3	14,59	X
28	3	27,5	X
24	3	39,52	X
22	3	40,77	X
20	3	60,8	X
17	3	87,0	X
10	3	104,0	X
0	3	152,9	X

Tabla D-47 Análisis de varianza para sulfato durante el cultivo de células fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4,357E4	9	4841,	2708,70	0,0000
Intra grupos	35,74	20	1,787		
Total (Corr.)	4,36E4	29			

Tabla D-48 Prueba de múltiples rangos para sulfato durante el cultivo de células fotomixotróficas *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
38	3	33,8	X
35	3	53,3	X
31	3	58,95	X
28	3	87,23	X
24	3	108,3	X
22	3	120,4	X
20	3	128,0	X
17	3	133,9	X
10	3	137,2	X
0	3	148,2	X

Tabla D-49 Cinética de crecimiento en peso fresco para el cultivo de células fotoautotrófica de *Bouteloua gracilis* en biorreactor

Tiempo (d)	Réplicas Peso fresco (g)			Promedio	Desviación Estándar
	R1	R2	R3		
0	25,000	25,000	25,000	25,00 ^a	0,00
4	33,796	35,797	34,472	34,69 ^b	1,02
7	35,476	35,104	36,269	35,62 ^{bc}	0,60
11	34,808	37,140	37,888	36,61 ^c	1,61
14	38,914	39,528	41,704	40,05 ^d	1,47
18	43,624	44,261	46,263	44,72 ^e	1,38
21	45,777	47,521	48,868	47,39 ^f	1,55
24	51,432	50,887	51,526	51,28 ^g	0,35
26	53,898	54,363	53,605	53,96 ^h	0,38

Tabla D-50 Análisis de varianza la cinética de crecimiento del cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2019,	8	252,4	212,65	0,0000
Intra grupos	21,37	18	1,187		
Total (Corr.)	2041,	26			

Tabla D-51 Prueba de múltiples rangos para la cinética de crecimiento del cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	25,0	X
4	3	34,69	X
7	3	35,62	XX
11	3	36,61	X
14	3	40,05	X
18	3	44,72	X
21	3	47,39	X
24	3	51,28	X
26	3	53,96	X

Tabla D-52 Cinética de crecimiento en peso seco para el cultivo de células fotoautotrófica de *Bouteloua gracilis* en biorreactor

Tiempo (d)	Réplicas peso seco (g)			Promedio	Desviación Estándar
	R1	R2	R3		
0	2,169	2,169	2,169	2,169 ^a	0,000
4	3,008	3,186	3,068	3,087 ^b	0,091
7	3,355	3,320	3,430	3,368 ^c	0,056
11	3,399	3,627	3,700	3,575 ^d	0,157
14	3,814	3,874	4,087	3,925 ^e	0,144
18	4,276	4,338	4,534	4,383 ^f	0,135
21	4,492	4,663	4,795	4,650 ^g	0,152
24	5,058	5,004	5,067	5,043 ^h	0,034
26	5,381	5,428	5,352	5,387 ⁱ	0,038

Tabla D-53 Análisis de varianza la cinética de crecimiento en peso seco del cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	25,0	8	3,125	279,97	0,0000
Intra grupos	0,2009	18	0,01116		
Total (Corr.)	25,2	26			

Tabla D-54 Prueba de múltiples rangos para la cinética de crecimiento en peso seco del cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	2,169	x
4	3	3,087	x
7	3	3,368	x
11	3	3,575	x
14	3	3,925	x
18	3	4,383	x
21	3	4,65	x
24	3	5,043	x
26	3	5,387	x

Tabla D-55 Comportamiento de la conductividad del medio para el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor

Tiempo (d)	Réplicas Conductividad eléctrica mS cm ⁻¹			Promedio	Desviación Estándar
	R1	R2	R3		
0	6,582	6,604	6,614	6,600 ^g	0,016
4	6,591	6,570	6,608	6,590 ^g	0,019
7	6,555	6,585	6,570	6,570 ^{fg}	0,015
11	6,570	6,541	6,535	6,549 ^f	0,018
14	6,481	6,490	6,452	6,474 ^e	0,020
18	6,380	6,388	6,354	6,374 ^d	0,018
21	6,334	6,317	6,298	6,316 ^c	0,018
24	6,212	6,245	6,240	6,232 ^b	0,018
26	6,159	6,170	6,195	6,175 ^a	0,019

Tabla D-56 Análisis de varianza de la conductividad del medio para el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,6289	8	0,07861	225,81	0,0000
Intra grupos	0,006267	18	0,0003481		
Total (Corr.)	0,6352	26			

Tabla D-57 Prueba de múltiples rangos para la conductividad del medio para el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
26	3	6,177	X
24	3	6,23	X
21	3	6,317	X
18	3	6,373	X
14	3	6,473	X
11	3	6,547	X
7	3	6,573	XX
4	3	6,59	X
0	3	6,597	X

Tabla D-58 Comportamiento del pH del medio para el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor

Tiempo (d)	Réplicas pH			Promedio	Desviación Estándar
	R1	R2	R3		
0	6,309	6,069	6,222	6,200 ^e	0,122
4	5,424	5,340	5,589	5,451 ^d	0,126
7	5,489	5,247	5,488	5,408 ^d	0,140
11	5,457	5,235	5,469	5,387 ^d	0,132
14	4,655	4,668	4,867	4,730 ^b	0,119
18	4,380	4,397	4,600	4,459 ^a	0,122
21	4,596	4,638	4,878	4,704 ^b	0,152
24	4,843	4,603	4,756	4,734 ^b	0,122
26	5,165	4,927	5,079	5,057 ^c	0,121

Tabla D-59 Análisis de varianza del pH del medio para el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7,027	8	0,8784	58,17	0,0000
Intra grupos	0,2869	19	0,0151		
Total (Corr.)	7,314	27			

Tabla D-60 Prueba de múltiples rangos para el pH del medio para el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
18	3	4,459	X
21	3	4,704	X
14	3	4,73	X
24	3	4,734	X
26	4	5,063	X
11	3	5,387	X
7	3	5,408	X
4	3	5,451	X
0	3	6,2	X

Tabla D-61 Comportamiento del OD del medio para el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor

Tiempo (d)	Réplicas OD (mg L ⁻¹)			Promedio	Desviación Estándar
	R1	R2	R3		
0	6,335	6,050	6,215	6,200c	0,143
4	5,916	6,047	6,247	6,070bc	0,167
7	6,009	5,808	6,004	5,940b	0,115
11	5,951	5,732	5,987	5,890 ^b	0,138
14	6,009	5,943	6,228	6,060 ^{bc}	0,149
18	5,881	5,788	6,090	5,920b	0,155
21	5,177	5,131	5,353	5,220a	0,117
24	5,318	5,130	5,062	5,170 ^a	0,133
26	5,146	4,794	5,030	4,990a	0,179

Tabla D-62 Análisis de varianza del OD del medio para el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5,03	8	0,6288	29,36	0,0000
Intra grupos	0,3855	18	0,02142		
Total (Corr.)	5,416	26			

Tabla D-63 Prueba de múltiples rangos para el OD del medio para el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
26	3	4,99	X
24	3	5,17	X
21	3	5,22	X
11	3	5,89	X
18	3	5,92	X
7	3	5,94	X
14	3	6,06	XX
4	3	6,073	XX
0	3	6,203	X

Tabla D-64 Perfil de pigmentos durante el crecimiento fotoautotrófico de *Bouteloua gracilis* en biorreactor

Células fotoautotróficas				
Día	Clorofila a (mg clorofila/g PF)	Clorofila b (mg clorofila/g PF)	Clorofila Total (mg clorofila/g PF)	Carotenoides (mg clorofila/g PF)
0	0,244 ^c ±0,013	0,179 ^g ±0,006	0,423 ^{cd} ±0,019	0,140 ^b ±0,002
4	0,173 ^a ±0,003	0,167 ^f ±0,002	0,340 ^b ±0,005	0,102 ^a ±0,011
7	0,173 ^a ±0,010	0,114 ^b ±0,003	0,287 ^a ±0,013	0,107 ^a ±0,002
11	0,183 ^a ±0,010	0,102 ^a ±0,001	0,285 ^a ±0,012	0,110 ^a ±0,007
14	0,258 ^c ±0,001	0,155 ^e ±0,000	0,413 ^c ±0,001	0,161 ^c ±0,001
18	0,397 ^e ±0,017	0,206 ^h ±0,004	0,603 ^e ±0,019	0,236 ^e ±0,006
21	0,294 ^d ±0,030	0,150 ^e ±0,002	0,444 ^d ±0,032	0,176 ^d ±0,001
24	0,214 ^b ±0,004	0,121 ^c ±0,001	0,335 ^b ±0,005	0,138 ^b ±0,004
26	0,215 ^b ±0,025	0,127 ^d ±0,002	0,342 ^b ±0,023	0,161 ^c ±0,007

Tabla D-65 Análisis de varianza para clorofila a durante el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,1241	8	0,01551	63,16	0,0000
Intra grupos	0,00442	18	0,0002456		
Total (Corr.)	0,1285	26			

Tabla D-66 Prueba de múltiples rangos para clorofila *a* durante el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
4	3	0,173	X
7	3	0,173	X
11	3	0,183	X
24	3	0,214	X
26	3	0,215	X
0	3	0,2443	X
14	3	0,258	X
21	3	0,2943	X
18	3	0,3967	X

Tabla D- 67 Análisis de varianza para clorofila *b* durante el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,02741	8	0,003427	393,70	0,0000
Intra grupos	0,0001567	18	0,000008704		
Total (Corr.)	0,02757	26			

Tabla D-68 Prueba de múltiples rangos para clorofila *b* durante el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer
Método: 95,0 porcentaje LSD

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
11	3	0,1023	X
7	3	0,114	X
24	3	0,121	X
26	3	0,127	X
21	3	0,15	X
14	3	0,155	X
4	3	0,167	X
0	3	0,179	X
18	3	0,206	X

Tabla D-69 Análisis de varianza para clorofila total durante el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,2373	8	0,02966	101,14	0,0000
Intra grupos	0,005279	18	0,0002933		
Total (Corr.)	0,2426	26			

Tabla D-70 Prueba de múltiples rangos para clorofila total durante el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer
Método: 95,0 porcentaje LSD

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
11	3	0,2853	X
7	3	0,287	X
24	3	0,3353	X
4	3	0,34	X
26	3	0,342	X
14	3	0,413	X
0	3	0,423	XX
21	3	0,444	X
18	3	0,603	X

Tabla D-71 Análisis de varianza para carotenoides durante el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,04273	8	0,005341	169,26	0,0000
Intra grupos	0,000568	18	0,00003156		
Total (Corr.)	0,0433	26			

Tabla D-72 Prueba de múltiples rangos para carotenoides durante el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
4	3	0,102	X
7	3	0,107	X
11	3	0,11	X
24	3	0,138	X
0	3	0,142	X
14	3	0,161	X
26	3	0,161	X
21	3	0,176	X
18	3	0,236	X

Tabla D-73 Cambio en la concentración de aniones en el medio durante el cultivo fotoautotrófico de *Bouteloua gracilis* a nivel de biorreactor

Tiempo (d)	Cloruro (mg/L)	Nitrato (mg/L)	Fosfato (mg/L)	Sulfato (mg/L)
0	215,878 ^f ±2,264	3080,65 ^h ±2,77	152,894 ⁱ ±2,808	192,023 ⁱ ±0,590
4	185,468 ^e ±1,386	2805,79 ^g ±5,15	145,030 ^h ±2,188	148,195 ^h ±1,963
7	163,898 ^d ±1,100	2667,33 ^f ±1,10	125,030 ^g ±2,645	130,800 ^g ±1,302
11	149,760 ^c ±2,103	2266,54 ^e ±4,47	115,345 ^f ±2,204	128,555 ^f ±0,912
14	147,574 ^c ±1,450	2055,04 ^d ±4,63	91,233 ^e ±2,092	126,460 ^e ±1,041
18	141,196 ^b ±2,669	1828,20 ^c ±5,24	76,670 ^d ±2,031	121,528 ^d ±1,352
21	135,036 ^a ±2,338	1511,48 ^b ±4,34	68,758 ^c ±1,785	102,005 ^c ±0,951
24	134,126 ^a ±2,465	1509,86 ^b ±4,89	54,678 ^b ±1,538	84,805 ^b ±1,377
26	133,944 ^a ±1,237	1186,44 ^a ±5,15	44,520 ^a ±2,052	54,110 ^a ±0,867

Tabla D.74 Análisis de varianza para cloruro durante el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,875E4	8	2343,	602,97	0,0000
Intra grupos	69,95	18	3,886		
Total (Corr.)	1,882E4	26			

Tabla D-75 Prueba de múltiples rangos para cloruro durante el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
26	3	133,9	X
24	3	134,1	X
21	3	135,0	X
18	3	141,2	X
14	3	147,6	X
11	3	149,8	X
7	3	163,9	X
4	3	185,5	X
0	3	215,9	X

Tabla D.76 Análisis de varianza para nitrato durante el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,024E7	8	1,28E6	66433,02	0,0000
Intra grupos	346,9	18	19,27		
Total (Corr.)	1,024E7	26			

Tabla D-77 Prueba de múltiples rangos para nitrato durante el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
26	3	1186,	X
24	3	1510,	X
21	3	1511,	X
18	3	1828,	X
14	3	2055,	X
11	3	2267,	X
7	3	2667,	X
4	3	2806,	X
0	3	3081,	X

Tabla D-78 Análisis de varianza para fosfato durante el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3,703E4	8	4628,	973,71	0,0000
Intra grupos	85,56	18	4,753		
Total (Corr.)	3,711E4	26			

Tabla D-79 Prueba de múltiples rangos para fosfato durante el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
26	3	44,52	X
24	3	54,68	X
21	3	68,76	X
18	3	76,67	X
14	3	91,23	X
11	3	115,3	X
7	3	125,0	X
4	3	145,0	X
0	3	152,9	X

Tabla D.80 Análisis de varianza para sulfato durante el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3,634E4	8	4542,	3098,90	0,0000
Intra grupos	26,38	18	1,466		
Total (Corr.)	3,636E4	26			

Tabla D-81 Prueba de múltiples rangos para sulfato durante el cultivo de células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* en biorreactor. Método 95,0 % LSD de Fischer

Tiempo (días)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
26	3	54,11	X
24	3	84,81	X
21	3	102,0	X
18	3	121,5	X
14	3	126,5	X
11	3	128,6	X
7	3	130,8	X
4	3	148,2	X
0	3	192,0	X

E. Anexo: Sistema de mezclado de los gases en el biorreactor

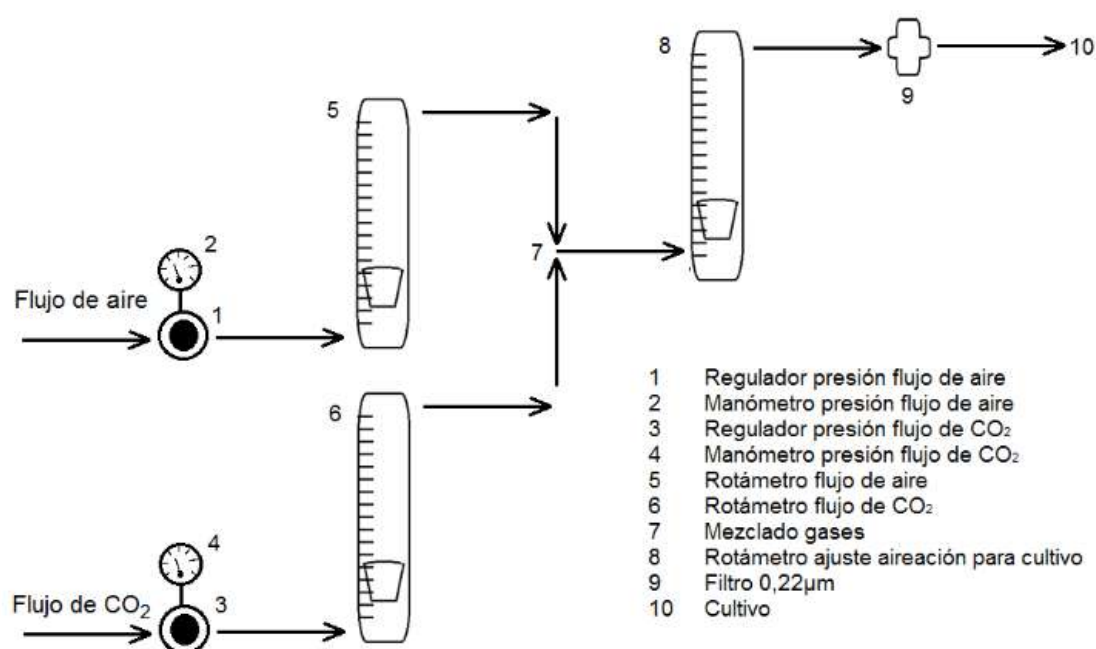


Figura E-1 Esquema de suministro aire enriquecido con CO₂ para cultivo de células fotomixotróficas y fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis*.

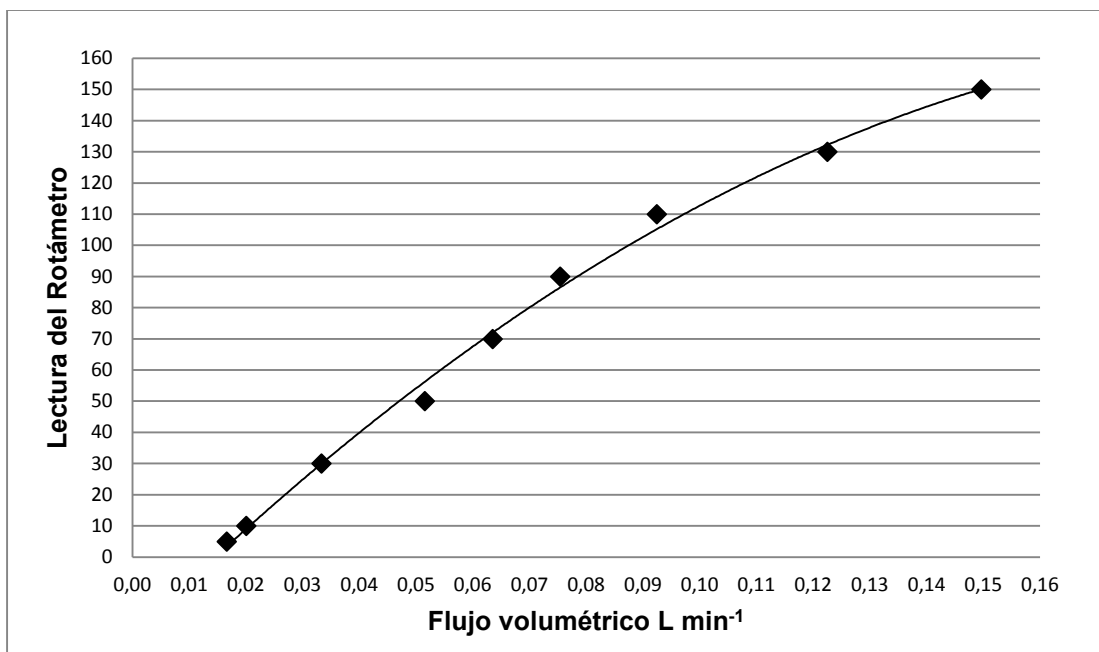


Figura E-2 Curva de calibración del rotámetro de CO₂

F. Anexo: Relación entre el IC* y el % K₀* para el cultivo de células heterotróficas y fotomixotróficas de *Bouteloua gracilis*

Esta relación fue calculada a partir de los datos de conductividad y peso fresco de los subcultivos rutinarios que se realizaron a las células heterotróficas y fotomixotróficas a nivel de matraz

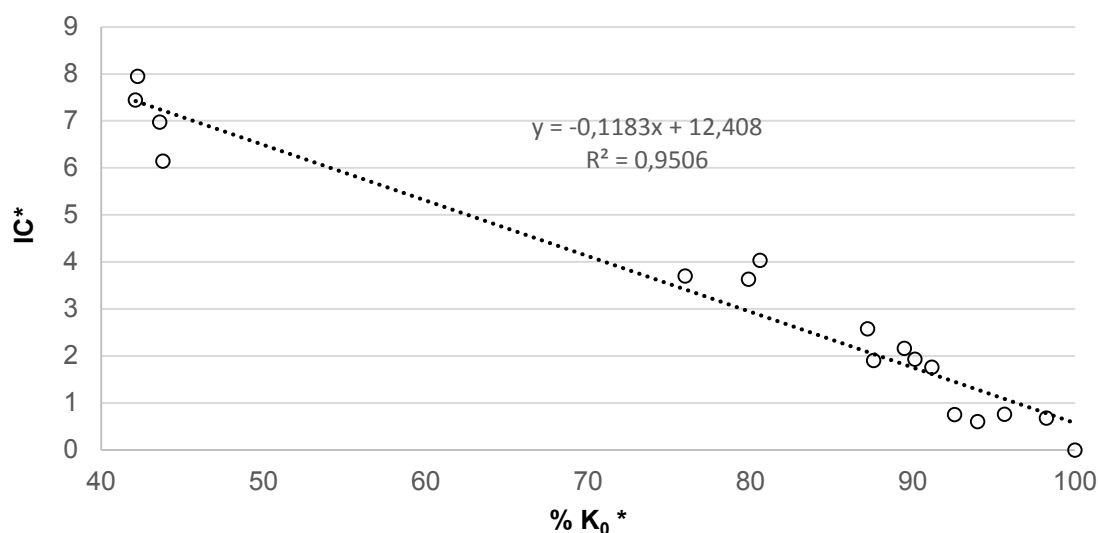


Figura F-1 Relación entre el IC* y % de K₀*, para el cultivo de células heterotróficas, de *Bouteloua gracilis* en matraz.

De la Figura F-1 se obtiene la siguiente relación:

$$IC_t = -0,12 * \left(\frac{K_t}{K_0}\right) * 100 + 12,41$$

Esta correlación es muy parecida a la obtenida para las células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis* (Figura 3-21). Para los datos experimentales obtenidos se tiene un coeficiente de correlación de 0,95. En este caso si se quisiera determinar la biomasa en un tiempo t, esta sería equivalente a:

$$x_t = (x_0 \times IC_t) + x_0$$

Este índice es usado para evaluar la generación de biomasa durante el tiempo de cultivo heterotrófico y fotomixotrófico. Los índices reportados en este trabajo son calculados con respecto a pesos frescos.

G. Anexo: Curva de calibración para la cuantificación de celulosa y hemicelulosa por HPLC

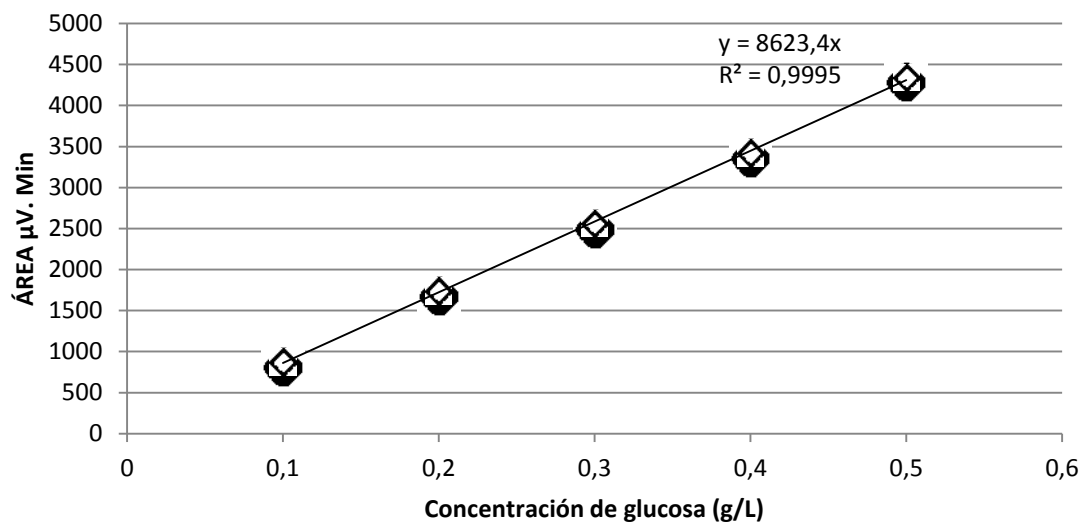


Figura G-1 Curva de calibración para el cálculo de celulosa

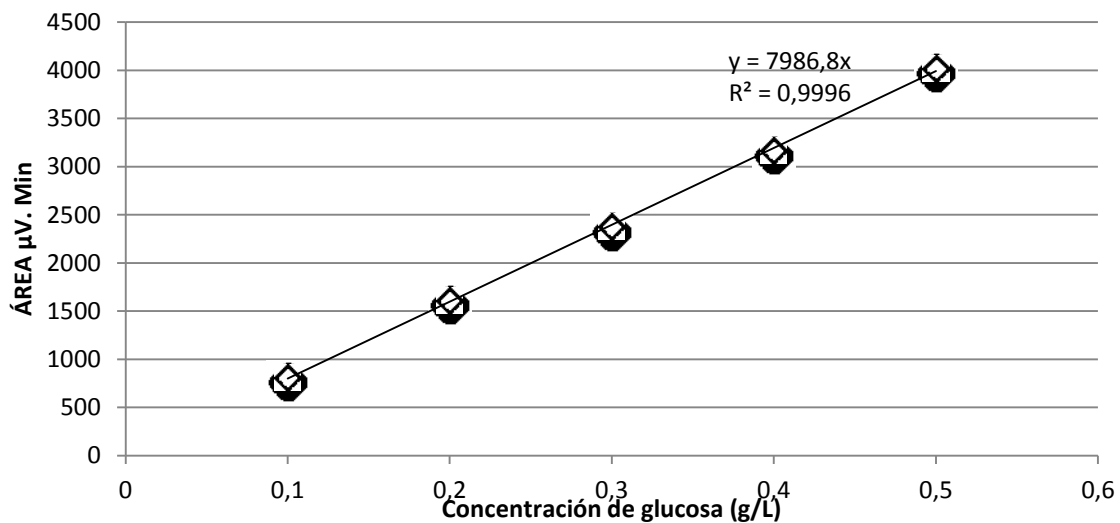
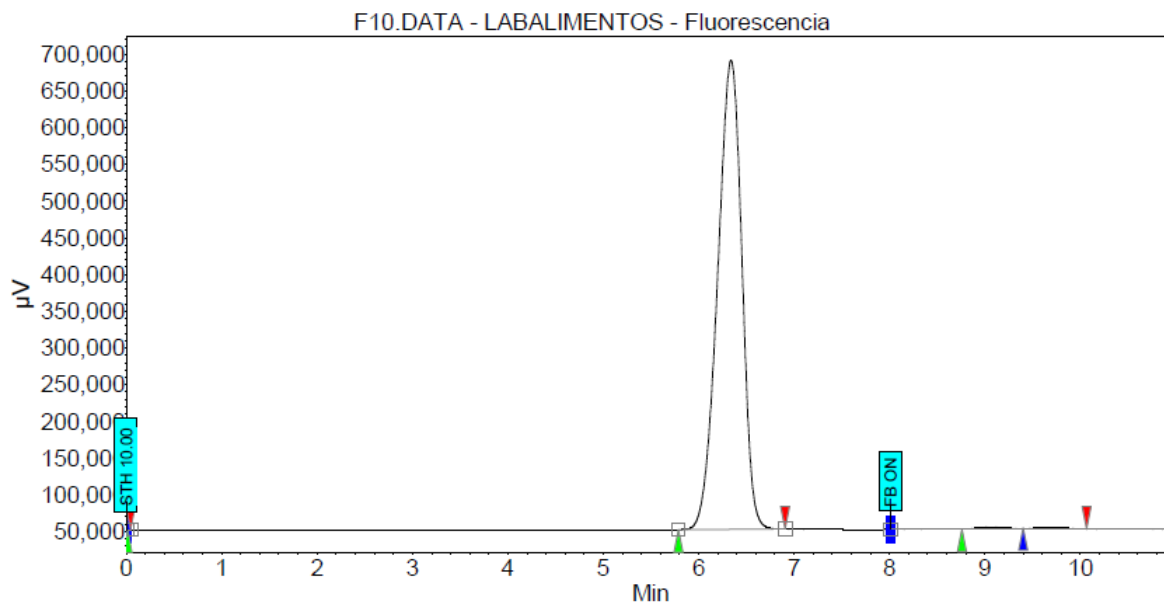


Figura G-2 Curva de calibración para el cálculo de hemicelulosa



Peak results :

Index	Name	Time [Min]	Quantity [% Area]	Height [μV]	Area [μV.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	0.03	0.00	11.6	0.2	0.000
2	UNKNOWN	6.34	98.58	638553.6	187829.8	98.575
3	UNKNOWN	9.06	0.75	3517.6	1429.5	0.750
4	UNKNOWN	9.68	0.67	2966.2	1284.8	0.674
Total			100.00	645049.1	190544.3	100.000

Figura G-3 Cromatograma para las células fotoautotróficas de *Bouteloua gracilis*.