

UCH-FC
MAG-EBE
R.586
C1

Estudio del Molibdeno (Mo) en la determinación
de la fijación de N_2 por la cianobacteria *Nostoc*
sp. mediante el ensayo de reducción de
acetileno-etileno



Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Magíster en Ciencias biológicas con Mención en Ecología y
Biología Evolutiva

Facultad De Ciencias

Por

Elizabeth Carolina Ríos Gutiérrez

Agosto, 2014

Director de Tesis MSc.: Irma del Carmen Vila Pinto

Co Director de Tesis Dr.: Jaime Pizarro Konczak

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata.

ELIZABETH CAROLINA RÍOS GUTIÉRREZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 26 de agosto 2013.

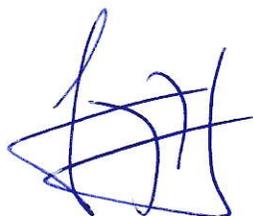
Director de Tesis:

MSc. Irma Vila Pinto



Co-Director de Tesis

Dr. Jaime Pizarro Konczack



Comisión de Evaluación de la Tesis

Prof. Vivian Montecino B.



Prof. Ximena Molina P.



A mi Madre

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mi tutora la Profesora Irma Vila por sus infinitas enseñanzas, apoyo y ayuda prestada durante toda mi estadía en su laboratorio. Agradecer también a mi cotutor el Dr. Jaime Pizarro K., por la entrega de conocimientos, correcciones al trabajo, y su apoyo incondicional para realizar esta tesis. No quisiera dejar de lado a todos mis compañeros del laboratorio de Limnología, y agradecerles por su amistad y constante ayuda, como también por las muchas conversaciones que fortalecieron lazos, así como conocimientos. A Martita por su amistad y buena voluntad para cada cosa que necesitaba. Quisiera también agradecer a José Manuel Riveros, por su incondicional y constante apoyo durante todo el proceso de realización de mi tesis, así como también, por su apoyo y compañía de cada día. También me gustaría dar las gracias a mis amigos y compañeros de universidad en Concepción, quienes siempre me han alentado y entregado buenos momentos y una grata amistad. Por último quisiera dar las gracias a mi familia, partiendo por mi padre, que si bien actualmente no está a mi lado, le debo todo lo que he logrado en mi vida. A mi madre y hermano, quienes por su incondicional apoyo, comprensión y amor, se han convertido en el pilar fundamental de mi formación, siendo absolutamente necesarios para llevar a cabo esta etapa de mi vida.

ÍNDICE DE MATERIAS

INDICE DE TABLAS	iv
INDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis.....	11
Objetivos.....	12
Objetivo General.....	12
Objetivos Específicos.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Colecta del material algal.....	13
Medio de cultivo.....	14
Mantenimiento cultivos axénicos.....	14
Crecimiento cultivos axénicos.....	15
Determinación de Cl “a”.....	16
Determinación de la tasa de fijación de N ₂	16
Análisis de datos.....	20
<i>Crecimiento cultivos axénicos y Cl “a”</i>	20
<i>Determinación de la tasa de fijación de N₂</i>	20

RESULTADOS	21
Crecimiento cultivos axénicos.....	21
Mediciones de Fijación de N ₂	22
Centro de Estudios en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CECTA) USACH.....	22
Instituto de Investigación Agropecuaria (INIA).....	23
Laboratorio de Síntesis y Reactividad (Universidad de Chile).....	24
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFÍA	34

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de concentraciones de Mo ($\mu\text{g/L}$) para distintos cuerpos de agua.....	9
Tabla 2. Valores de fijación de N_2 (en $\mu\text{m C}_2\text{H}_2$) para distintas especies de cianobacterias.....	13
Tabla 3. Valores de significancia (p) del Test de comparación multiple de Tukey para concentraciones de Cl "a" versus días de cultivo.....	22
Tabla 4. Valores de concentraciones de Mo y mediciones de etileno (C_2H_4) y acetileno (C_2H_2).....	27
Tabla 5. Valores de significancia (p) del Test de comparación multiple de Tukey para tasa de reducción de C_2H_2 versus concentraciones de Mo.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la fijación biológica de N_2 (FBN). Reducción de N_2 a NH_4^+	3
Figura 2. Esquema del heterocisto y los productos derivados de la FBN y de la fotosíntesis.....	5
Figura 3. Estructura del complejo enzimático formado por la proteína hierro (Fe) y la proteína hierro molibdeno (FeMo) en la nitrogenasa	7
Figura 4. Diagrama de los tratamientos realizados para la determinación de la actividad de la nitrogenasa	17
Figura 5. Esquema del procedimiento de medición de la reducción de C_2H_2 por cromatografía de gases (ensayo de reducción acetileno - etileno ARA “Acetylene Reduction Assay”).....	18
Figura 6. Ejemplo de cromatograma. Se detalla la detección de C_2H_4 y C_2H_2 , respectivamente, a través de la aparición de distintos picos de detección y sus áreas.....	19
Figura 7. Concentraciones (mg/L) promedio de Cl “a” al cabo de cinco días de cultivo.....	21
Figura 8. Cromatograma de concentraciones del gas C_2H_4 (ppm). Los bajos valores de área (resaltada en rojo) muestran la baja sensibilidad de detección de C_2H_4	23
Figura 9. Cromatograma de concentraciones del gas C_2H_4 (ppm). Área resaltada representa el solapamiento de detección para C_2H_2 y C_2H_4	24

Figura 10. Cromatograma de concentraciones del gas C ₂ H ₄ (ppm). Área resaltada representa la detección adecuada de C ₂ H ₄	25
Figura 11. Curva de calibración de concentraciones del gas C ₂ H ₄ (ppm), respecto a las áreas arrojadas por cromatografía de gases	26
Figura 12. Tasa de fijación de N ₂ (μmol C ₂ H ₂ /h) de cultivos de <i>Nostoc sp.</i> , a distintas concentraciones de Mo (0,1 ppm, 0,5 ppm y 3,0 ppm).....	28
Figura 13. ANOVA de las tasas de reducción de C ₂ H ₂ entre los distintos ensayos (concentraciones de Mo de 0,1 ppm, 0,5 ppm y 3,0 ppm).....	29

RESUMEN

La eutroficación de los sistemas acuáticos es un proceso que ocurre de manera natural y que se ve acelerado por intervenciones antrópicas. Los asentamientos humanos y las actividades agrícolas, ganaderas y de la minería, vierten una gran cantidad de nutrientes generando la eutroficación de estos sistemas. Como consecuencia, se producen los florecimientos algales o “blooms”, siendo unas de las más frecuentes en estos eventos las algas verde-azules o cianobacterias. Algunas de estas cumplen con la función de fijar N_2 , que en sistemas de agua dulce puede alcanzar hasta un 80% del total de N que ingresa al sistema. Un elemento indispensable para la fijación de N_2 por cianobacterias es el molibdeno (Mo), metal traza que forma parte del sitio activo de la nitrogenasa, enzima encargada de la reducción de N_2 a una forma asimilable por los organismos, como es el amonio (NH_4^+), proceso al cual se le denomina “Fijación biológica de Nitrógeno” (FBN). Este proceso puede ser medido experimentalmente a través del método de reducción de acetileno-etileno (ARA “Acetylene Reduction Assay”). Por lo anteriormente descrito, se cree que, al experimentar un aumento en sus concentraciones, el Mo estaría directamente relacionado con una mayor tasa de fijación de N_2 y actuaría a su vez como un intermediario en la eutroficación de los sistemas acuáticos. Para ello se evaluó la respuesta de la cianobacteria fijadora de N_2 *Nostoc sp.* a distintas concentraciones de Mo (0,1 ppm, 0,5 ppm y 3,0 ppm) en cultivos de laboratorio. Los resultados demostraron un aumento significativo de la fijación de N_2 a mayores concentraciones de Mo, sin embargo, se pudo observar una disminución paulatina de los valores de fijación hacia las concentraciones más altas del Mo, lo que sugeriría que si bien, el Mo ayuda a incrementar la fijación de N_2 , esta llega a un plató para los valores más altos de éste.

ABSTRACT

Eutrophication of aquatic systems is a process that occurs naturally and is accelerated by human actions. Human settlements and agriculture, livestock and mining, pour a lot of nutrients causing eutrophication of these systems. As a result algal blooms occur or "bloom" being one of the most prevalent these events blue-green algae or cyanobacteria. Some of these have the function of fixing N_2 than in freshwater systems can achieve up to 80% of the total N entering the system. An indispensable element of N_2 fixation by cyanobacteria is molybdenum (Mo), trace metal that is part of the active site of nitrogenase, the enzyme responsible for the reduction of N_2 to a form assimilable by organisms, such as ammonium (NH_4^+), a process which is called "Biological Nitrogen Fixation" (BNF). This process can be experimentally measured using the method of ethylene-acetylene reduction (ARA "Acetylene Reduction Assay"). As described above, it is believed that the experience increased their concentrations, the Mo would be directly related to increased N_2 fixation rate and in turn act as an intermediary in the eutrophication of aquatic systems. We evaluated the response of N_2 fixing cyanobacterium *Nostoc sp.* Mo different concentrations (0.1 ppm, 0.5 ppm and 3.0 ppm) in laboratory cultures. The results showed a significant increase in N_2 fixation to higher concentrations of Mo (3.0 ppm) however, it was observed a gradual decrease towards values securing higher concentrations of Mo, suggesting that although Mo helps increase N_2 fixation this reaches a plateau for higher values of it.

INTRODUCCIÓN

La eutroficación se relaciona con la pérdida de diversidad biológica y la disminución de los bienes y servicios de los ambientes acuáticos (Pardo y Vila, 2006), la cual puede ser definida como la suma de los efectos del crecimiento excesivo del fitoplancton, el cual conduce a un desequilibrio en la productividad primaria y secundaria, que a su vez tiene como consecuencia una tasa más rápida de sucesión, y la gradual degeneración de las funciones del sistema (Khan y Ansari, 2005). La principal causa de la eutroficación se debe a un enriquecimiento artificial de nutrientes de los sistemas acuáticos, principalmente por aportes de Nitrógeno (N) y Fósforo (P), los cuales pueden ser incorporados por fertilizantes provenientes de la actividad agrícola, la descarga de desechos de asentamientos humanos y la alta actividad minera, entre otros, lo que podría generar, por ejemplo, una aceleración de la desoxigenación en aguas profundas (Mainstone y Parr, 2002; Tong y col. 2003; Fang y col. 2004; Khan y Ansari, 2005). Otros factores, como la baja velocidad de la corriente, altas temperaturas, y una alta actividad microbiológica, pueden favorecer procesos de eutroficación más acelerados (Li y Liao, 2002). En consecuencia, esto genera cambios en las condiciones físico-químicas del agua, lo que puede causar, desde una sobresaturación a una escasez de oxígeno disuelto, afectando así la distribución y sobrevivencia de los organismos que habitan los sistemas naturales (Dell'Anno y col. 2002; Liu y Qiu, 2007). Junto a lo anterior, también se produce un aumento en la biomasa del fitoplancton, modificándose la estructura comunitaria asociada con el predominio de una o más especies (Smith, 2003). Este aumento en la biomasa fitoplanctónica, termina afectando la calidad del agua, ya que provoca una disminución en la transparencia de ésta, y por ende, una baja penetración de luz al sistema, lo que podría inhibir, e incluso detener, la fotosíntesis de las plantas sumergidas (Khan y Ansari, 2005).

Dentro de los nutrientes que afectan la eutroficación se encuentra el N, el cual es un elemento esencial para un gran número de procesos biológicos, ya que es primordial en la composición de proteínas, ácidos nucleicos, y otros componentes celulares, que lo convierten en una molécula necesaria para el crecimiento de todos los organismos (Raymond y col., 2004).

Una de las mayores reservas de nitrógeno molecular (N_2) se encuentra en la atmósfera, conformando cerca del 78% del total de gases presentes. La estructura química del N_2 , presenta un triple enlace que lo hace casi inerte en la troposfera, por lo que no puede ser utilizado por gran parte de los seres vivos. Sin embargo, la mayoría de las bacterias asimilan el N_2 en forma de amonio (NH_4^+) para su uso en las rutas biosintéticas. Éstas son parte de un grupo altamente especializado de organismos que pueden assimilar el N_2 , dentro de los cuales también se incluyen actinomicetos y cianobacterias (Halbleib y Ludden, 2000; Mayz-Figueroa, 2004). Las cianobacterias, consideradas bacterias fotosintéticas procariotas con clorofila "a" (Cl "a") y fotosistema II (Mazur-Marzec, 2006), presentan una amplia distribución y ocupan una gran diversidad de hábitats, que incluyen suelo y agua, tanto en regiones tropicales y templadas, como en climas extremos (Herrero y col. 2001). En los sistemas eutroficados, a consecuencia de las grandes cantidades de nutrientes incorporados, las cianobacterias pueden generar "*blooms*", es decir, aumentos masivos de su biomasa, con la eventual liberación de toxinas, que se pueden descomponer en gases nocivos para peces y bivalvos (Tilzer, 1987; Steinberg y Hartmann, 1988; Mur y col. 1999; Carmichael, 2001). No obstante lo anterior, existen algunas cianobacterias asociados a "*blooms*" en sistemas con bajas cargas de nutrientes, como sistemas oligotróficos y mesotróficos (Mez y col. 1997; Dokulil y Teubner, 2000; Jacquet y col. 2005).

En relación a la carga de nutrientes, y de acuerdo a la hipótesis de la relación entre recursos, Tilman (1981; 1982), señaló que la dominancia de cianobacterias sería atribuida a una baja proporción N:P (Smith 1983; Bulgakov y Levich, 1999), ya que se piensa que estos organismos serían mejores competidores de N que otros taxa del fitoplancton (Barica y col. 1980; Horne y Commins, 1987; Blomqvist y col. 1994). Sin embargo, Reynolds (1984), en una revisión que implicaba observaciones de campo en comunidades de diatomeas, enfatizó que la relación entre las algas dominantes y la proporción de recursos es mucho menos clara que la reportada por Tilman (1981; 1982). Por tanto, sea o no la dominancia de cianobacterias promovida por una baja proporción de estos nutrientes (N y P), sigue siendo poco claro el papel de esta proporción como un factor independiente que regule la composición del fitoplancton. Una posible explicación a esta hipótesis sería que las cianobacterias toleran bajas proporciones de carga de nutrientes, ya que algunos de éstas cumplen con la función de fijar de N_2 , pudiendo obtenerlo así, de manera independiente (Mague, 1977).

Para que el N_2 pueda ser utilizado en el crecimiento, éste primero debe pasar por una serie de reducciones hasta llegar a la forma de NH_4^+ (Figura 1). Este proceso, llevado a cabo por la enzima nitrogenasa, a través del cual las cianobacterias reducen el N_2 hasta una forma utilizable (por la mayoría de los microorganismos), es conocido como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) (Flett y col. 1980, Mayz-Figueroa, 2004).

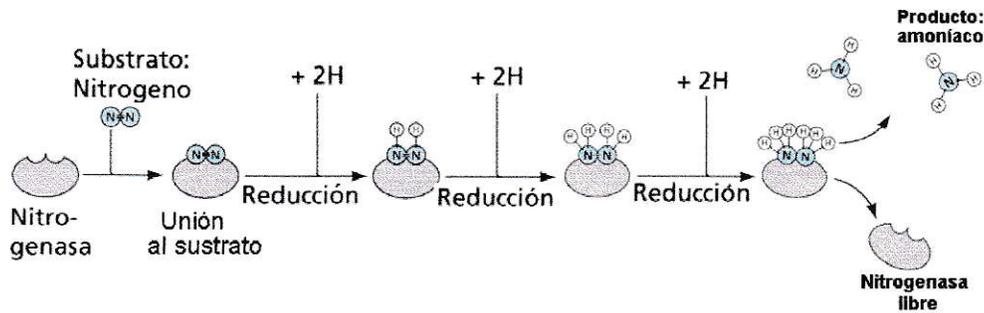


Figura 1. Esquema de la fijación biológica de N₂ (FBN). Reducción de N₂ a NH₄⁺.

La FBN es un proceso muy exigente en equivalentes de energía biológica, ya que requiere grandes cantidades de poder reductor, así como alta energía adenosín trifosfato (ATP) (Halbleib y Ludden, 2000), de ahí que su biosíntesis esté sometida a una estricta regulación (Sprenst y Sprenst, 1990), como se puede observar en la siguiente reacción:



Morfológicamente, las cianobacterias pueden abarcar desde formas unicelulares a formas filamentosas (Pearl, 2000). En el caso de las filamentosas, muchas presentan diferenciación celular (Mazur-Marzec, 2006), entre las que destacan células especializadas llamadas heterocistos (Nichols y Adams, 1982; Tandeau de Marsac, 1994). Es en el interior de estas células donde se lleva a cabo la FBN, la cual ocurre en ausencia de N combinado en el medio (e.g. NO₃⁻ y NH₄⁺), ya que las formas combinadas de éste, inhiben la formación de nueva nitrogenasa (Wolk y col. 1994; Mayz-Figueroa, 2004).

El heterocisto posee una serie de modificaciones encaminadas a proteger a la enzima nitrogenasa frente a la molécula de oxígeno (O₂), ya que ésta se inactiva irreversiblemente en presencia del mismo (Pienkos y col. 1983). Los heterocistos presentan conexiones intercelulares con las células vegetativas, y es a través de éstas, donde se realiza el

intercambio de los productos derivados de la fotosíntesis hacia los heterocistos, y los productos derivados de la fijación del N_2 hacia las células vegetativas (Figura 2) (Todar, 2004). De este modo, los procesos metabólicos de la fijación y fotosíntesis oxigénica, en principio, incompatibles, pueden ocurrir de manera simultánea, aunque, en células diferentes (Wolf y col. 1974; 1976).

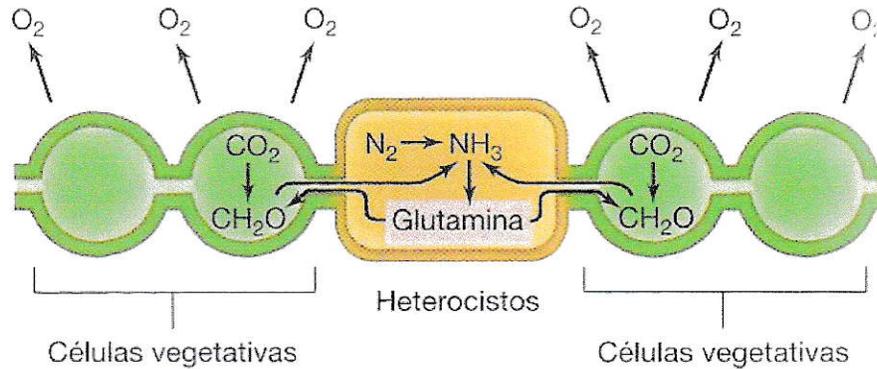


Figura 2. Esquema del heterocisto y los productos derivados de la FBN y de la fotosíntesis (Referencia: Pienkos y col. 1983).

La FBN puede generar un importante aporte de N a los sistemas lacustres, e impedir la limitación de éstos por N, ya que permite la continuidad de los procesos de fotosíntesis y biosíntesis, y por ende la productividad primaria, al suplir los suministros de N fijo cuando éstos se agotan, manteniendo así el control de la productividad primaria por limitación por P (Schindler, 1976; 1977; Howarth y col. 1988a; 1988b).

Es de enorme importancia para los sistemas naturales la FBN, ya que cumple un rol fundamental en el ciclo de N, como principal fuente de ingreso y reposición de éste a la biosfera (Howarth, 1988). Este proceso es esencial para la síntesis de muchos compuestos orgánicos (Cheng, 2008), ya que compensa las pérdidas de N generadas a través de la desnitrificación (Schindler, 1977; Dixon y Khan, 2004). Los valores de reposición de N producto de la FBN en ecosistemas acuáticos, varían notablemente, pudiendo contribuir

hasta con 82% de la entrada total de N en dichos sistemas (Howarth y col. 1988a; 1988b). En los lagos, estos valores FBN están fuertemente relacionados con el estado trófico de los mismos, tendiendo a ser mucho mayores en los eutróficos ($0,2 - 9,2 \text{ g N m}^{-2} \text{ año}^{-1}$), que en lagos mesotróficos u oligotróficos (generalmente $\ll 0,1 \text{ g N m}^{-2} \text{ año}^{-1}$) (Howarth y col. 1988).

Varios investigadores han demostrado que las tasas de FBN pueden aumentar con la adición de P a los sistemas, ya que se produce un aumento de la biomasa de cianobacterias, situación que ha sido demostrada en estudios de cultivos puros (Stewart y Alexander, 1971), en sistemas lacustres (Buljan, 1957; Carpenter 1971; Liao, 1977), y en aguas oceánicas (Mague y col. 1974). Por otra parte, Doremus (1982), ha propuesto que las tasas más bajas de FBN se encuentran en el mar, siendo las cianobacterias las principales fijadoras en este medio. Entre los organismos más estudiados y conocidos de los sistemas marinos, destaca la cianobacteria del género filamentosos (carente de heterocisto) *Trichodesmium*. Actualmente se sabe que, tanto bacterias como arqueobacterias, fijan activamente N_2 en el mar. En este sentido, la FBN es relevante, ya que se estima que aporta alrededor del 50% del N necesario para la producción primaria en las zonas oligotróficas. Al igual que las cianobacterias dulceacuícolas, la forma que tienen estos organismos marinos de fijar N_2 es a través de la enzima nitrogenasa, que tiene como cofactor al hierro (Fe), por lo que dicho metal, es considerado como uno de los principales limitantes de la FBN en el océano (Benavides y col. 2013), al ser parte esencial de la nitrogenasa. El complejo enzimático de la nitrogenasa, o también llamado molibdeno nitrogenasa, está compuesto por una subunidad grande y otra pequeña (Cole y col. 1986; Bishop y Joerger, 1990; Masepohl y col. 2002). En la subunidad mayor se encuentra el cofactor hierro-molibdeno (FeMo-co) y en la subunidad inferior, la proteína hierro (Foog y Wolf, 1954; Burris, 1991; Rees y Howard, 2000; Curatti y col. 2007) (Figura 3).

Existen diversos estudios que explican el comportamiento catalítico de la enzima nitrogenasa (Jeanfils y Tack, 1992; Seefeldt y col. 2004; Cao, 2005), sin embargo, el sitio definitivo obligatorio del N_2 en el cofactor FeMo, así como el mecanismo para su subsecuente reducción a NH_4^+ , son aún desconocidos (Bryhn, 2007).

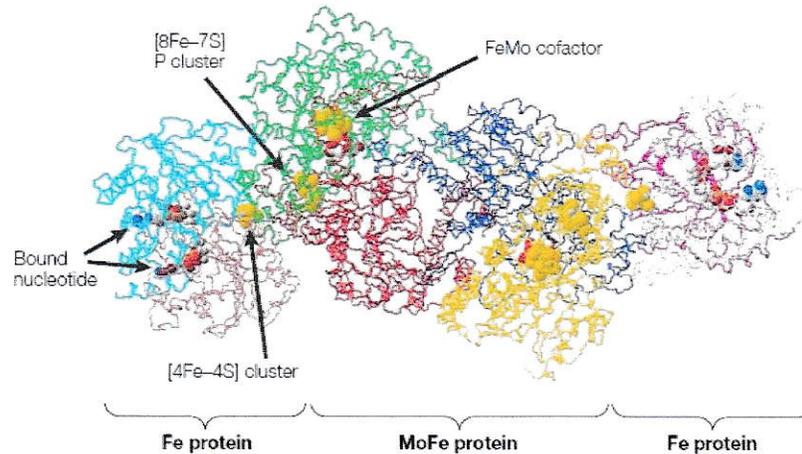


Figura 3. Estructura del complejo enzimático formado por la proteína hierro (Fe) y la proteína hierro molibdeno (FeMo) en la nitrogenasa (Referencia: Dixon y Khan, 2004).

Obligadamente, dentro del proceso de FBN la reducción del protón ocurre durante la catálisis de la nitrogenasa (Simpson y Burris, 1984), sin embargo, además de protones, la nitrogenasa puede reducir una serie de sustratos alternativos parecidos al N_2 (con doble o triple enlace en su estructura) como es el caso del acetileno (C_2H_2), el cual ha resultado ser un sustrato particularmente útil en la investigación del funcionamiento biológico de la nitrogenasa, ya que el producto de su reducción, el etileno (C_2H_4), es fácilmente cuantificado por cromatografía gaseosa (Burgess y Lowe, 1996).

Formando parte del FeMo-co se encuentra el Molibdeno (Mo), un constituyente esencial para la FBN, ya que, desde hace varias décadas se le conoce un importante rol fisiológico en

este proceso, consistente en asistir en la catálisis de transferencia de electrones (Bortels, 1930; Fogg y Wolfe, 1954; Pope y col. 1980). El Mo corresponde a un metal traza que se encuentra presente en la litósfera en niveles promedio de 2 a 3 mg/kg, sin embargo, dicha concentración puede aumentar a 300 mg/kg en lugares que contienen altas cantidades de materia orgánica (Fortescue, 1992; Reddy y col. 1997). Dicho metal traza cumple un importante papel en el crecimiento de plantas superiores y cianobacterias (Arnon y Stout, 1939; Bachman y Goldman, 1964), ya que es un componente central de varias de las enzimas esenciales del metabolismo del “nitrógeno bacterial” (Cole y col., 1993; Peters y col. 1997; Christiansen, 2001; Tezcan, 2005), entre las cuales se incluyen la enzima nitrato reductasa y la nitrogenasa (Brill y Shah, 1980; Spiro, 1985; Cole y col. 1986).

El requerimiento de Mo para la FBN llevada a cabo por cianobacterias, fue reconocido por primera vez por Bortels (1940), y corroborado por estudios posteriores, los cuales demostraron que el contenido de N, producto de la FBN de la cianobacteria *Anabaena cylindrica*, se correlacionaba positivamente con la concentración de Mo incorporado en sus medios de cultivo (Wolfe, 1954). Estudios realizados por Goldman (1960; 1963), han dejado de manifiesto la importancia del Mo como micronutriente limitante en lagos de Norte América y Nueva Zelandia. Respecto a esto, Hutchinson (1957) y Goldman (1960; 1964) sugirieron que las bajas concentraciones de Mo (inferior a 0,6 nM), podría ser un factor limitante en la FBN de los sistemas lacustres, ya que éste condicionaría la función de la nitrogenasa, generando un déficit en la disponibilidad de las formas reducidas de N, desacelerando así el crecimiento de las cianobacterias (Glass y col. 2010). Diversos estudios señalan que las concentraciones de Mo reportadas para un gran número de sistemas dulceacuícolas, varía ampliamente (Tabla 1), y aunque a menudo son bajas, pueden ser tan o más altas que las del agua de mar (Bradford y col, 1968; Manheim y Landergren, 1978; Collier, 1985; Howarth y col, 1988b; Marino y col, 1990). Dentro de las posibles fuentes de Mo estarían la meteorización y la lixiviación de rocas y suelos, ya que son consideradas,

entre otras, como las fuentes naturales principales de la mayoría de los elementos traza, a las cuales se sumarían incorporaciones producto de actividades humanas como la agricultura y la minería (Rizzo y col. 2010). En este sentido, se ha establecido que los efluentes de la actividad minera, como por ejemplo, los residuos industriales líquidos de los relaves de la minería del Cobre (Cu), podrían ser una de las causales del incremento de las concentraciones naturales de Mo en algunos sistemas acuáticos dulceacuícolas (Gaete y col. 2007).

Tabla 1. Valores de concentración de Mo ($\mu\text{g/L}$) para distintos cuerpos de agua.

Sistema	Concentración Mo ($\mu\text{g/L}$)	Fuente
Lago Castle	<0,1	Bachmann y Goldman, 1964
Río Americano	<0,67	
Río Napa	0,8	
Lagos Norteamericanos	0,42	Cole y col. 1993
Great Lakes	0,15 - 2,8	Rossmann y Barres, 1988
Aguas de áreas urbanas e industriales	70	Chappell, 1975
Lagos alpinos	0,4	Henry y Tundisi, 1982
Estanques poco profundos	12,0 - 14,0	
Lagos con influencia geotérmica	100	
Efluente minero	3900	Gaete y col. 2007

En su mayoría, los sistemas dulceacuícolas presentan valores naturales medios, relativamente bajos para Mo, sin embargo, algunos estudios han puesto en evidencia que los incrementos en las concentraciones de este metal traza en los sistemas acuáticos, pueden relacionarse con la llegada de efluentes de zonas urbanas, industriales y, particularmente los provenientes de actividades mineras asociadas a la yacimientos de Cu (Chappell, 1975; Gaete y col. 2007). En este sentido, en nuestro país los valores de Mo en los sistemas acuáticos se regulan de acuerdo a dos tipos de normas, las normas de calidad ambiental (secundarias), que definen valores máximos de determinadas sustancias y/o parámetros en los distintos sistemas naturales, con un objetivo de protección; y las normas de emisión, que

definen los valores máximos permitidos de descarga para ciertas sustancias y/o parámetros, con el objetivo de evitar la contaminación de las aguas a causa de descargas de residuos industriales. En este sentido, en la actualidad nuestro país sólo cuenta con un sistema natural con norma secundaria de calidad vigente que contempla al Mo dentro de sus valores de calidad ambiental, correspondiente a la cuenca del río Serrano (D.S. 75/2010, MINSEGPRES), donde se establece que los valores de este metal, no deben superar los 0,01 mg/L en el sistema para evitar el detrimento de su condición de calidad excepcional. Respecto a las normas de emisión, rige a nivel nacional, la norma de emisión para la regulación de contaminantes asociados a las descargas de residuos líquidos a aguas marinas y continentales (D.S. 90/2001, MINSEGPRES), la que establece un valor máximo de descarga para Mo equivalente a 1 mg/L, tanto para cuerpos fluviales como cuerpos lacustres artificiales, y un máximo de 0,07 mg/L de Mo para sistemas lacustres naturales. No obstante lo anterior, existe la norma de emisión específica para Mo y Sulfatos de efluentes descargados desde tranques de relaves al estero Carén (D.S. 80/2006, MINSEGPRES), que define valores más flexibles para la descarga de Mo respecto al D.S. 90/2001, que alcanzan los 1,60 mg/L de Mo.

Si bien, en nuestro país existe normativa ambiental que procura proteger los sistemas acuáticos dulceacuícolas a través del establecimiento de valores máximos de Mo, es necesario indicar que dicha normativa (D.S. 90/2001, MINSEGPRES), más allá de diferenciar a los sistemas acuáticos entre fluviales y lacustres, no considera las singularidades de cada sistema, teniendo en cuenta la amplia gama de sistemas de aguas continentales presentes en el territorio nacional, por lo que, el establecimiento de valores máximos de Mo que rigen a nivel nacional, no necesariamente van a permitir dar una adecuada protección a todos y cada uno de los sistemas, considerando sus particularidades, por lo que, es posible que aún cuando se encuentra regulada la descarga de Mo a las aguas superficiales del país, podrían darse condiciones de incrementos significativos en las

concentraciones naturales de Mo de ciertos sistemas respecto a sus valores naturales (aún cumpliéndose la norma), que pudiesen gatillar incrementos en las tasas de fijación de N₂ del fitoplancton, y consecuentes procesos de eutroficación, mediados por el incremento en las concentraciones de Mo.

En este sentido, el averiguar cómo afecta la incorporación de determinadas concentraciones de Mo a la FBN, podría permitir conocer e identificar valores de fijación de N₂ asociados a Mo, que potencialmente puedan ser usados como indicadores de posibles eventos de eutroficación.

Hipótesis

De los antecedentes antes mencionados, se esperaría que un incremento en la tasa de fijación de N₂ en los sistemas acuáticos, así como un aumento de cianobacterias, estén relacionados con la disponibilidad de Mo, pudiendo éste actuar como un intermediario en la eutroficación de sistemas acuáticos dulceacuícolas. Por lo anterior se propone la siguiente hipótesis:

La incorporación de distintas concentraciones de Mo en cultivos axénicos de la cianobacteria *Nostoc sp.*, incrementará la tasa de fijación de N₂ de estos organismos, dada su categoría de micronutriente esencial para la FBN.

Objetivos

Objetivo General

Cuantificar la fijación de N_2 en cultivos de cianobacteria *Nostoc sp.*, sometidos a diferentes concentraciones de Mo, mediante la medición de la actividad de la enzima nitrogenasa.

Objetivos Específicos:

1. Evaluar el crecimiento de *Nostoc sp.* bajo condiciones de cultivo a través de la medición de Cl "a".
2. Poner a punto el ensayo de reducción acetileno - etileno (ARA "Acetylene Reduction Assay").
3. Determinar la respuesta de la fijación de N_2 en cianobacterias, por medio de la actividad de la enzima nitrogenasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta del material algal

Para la colecta del material algal, se indagó acerca de cultivos axénicos disponibles en stock a nivel nacional de cianobacterias con heterocistos que cumplieran con la función de fijar N_2 , para poder ver el efecto de la adición de Mo en la tasa de fijación de estas algas y corroborar la importancia de éste en los valores de FBN. Era primordial que los cultivos fueran axénicos, es decir, que fueran de un sólo taxón de cianobacterias, para no tener factores que afectaran los resultados en las mediciones finales. Para esto se consultó, tanto en laboratorios como en universidades, siendo finalmente en el Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología de la Universidad de Talca donde se encontró cultivos axénicos disponibles de la cianobacteria *Nostoc sp.*, que además según Pereira y col. (2009) presentaba altos valores de fijación de N_2 en comparación con otras cianobacterias (Tabla 2). Una vez obtenido el cultivo, este fue trasladado en matraces Erlenmeyer provistos con medio de cultivo específico para esta alga.

Tabla 2. Valores de fijación de N_2 (en $\mu\text{m C}_2\text{H}_2$) para distintas especies de cianobacterias.

Especies	Fijación de nitrógeno $\mu\text{moles C}_2\text{H}_2 \text{ h}^{-1}$
<i>Nostoc commune</i>	4,54
<i>Anabaena fertilissima</i>	1,55
<i>Gloeotrichia natans</i>	0,85
<i>Nostoc ellipsoforum</i>	0,76
<i>Anabaena iyengaraii var tenuis</i>	0,66
<i>Nostoc linckia</i>	0,64

(Referencia: Pereira y col. 2009)



Medio de cultivo

Para poder mantener el cultivo de *Nostoc sp.*, bajo condiciones apropiadas, éste fue provisto de medio Watanabe (Watanabe, 1972), el cual se preparó en el laboratorio de Limnología de la Universidad de Chile, de acuerdo a la metodología descrita por Pereira y col. (2009). Una de las características de este medio de cultivo es la de carecer de cualquier tipo de fuente de N, permitiendo evitar así, la posible inhibición de la enzima nitrogenasa, y afectar los valores finales en la medición de la fijación de N₂. Los componentes y forma de preparación del medio Watanabe son los siguientes:

MEDIO WATANABE (pH = 5-6)

Reactivos	g/L
K ₂ HPO ₄	0,3
MgSO ₄	0,2
CaCl ₂ (2H ₂ O)	0,05 (0,0662)
*Tartrato férrico	1 mL (2-3 gotas)
**Solución A ₆	1 mL

***Preparación de solución stock de ácido tartárico (tartrato férrico)**

Para la preparación del stock del tartrato férrico se utilizaron 5 g de ácido tartárico y 5 g de tricloruro de hierro, los que fueron llevados a 1 L de agua bidestilada.

****Preparación de Solución stock de A₆ (no autoclavada)**

Reactivos	g/L
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ x 4H ₂ O	1,81
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,222
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,391
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,079
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,0415

Preparación de una solución stock de medio Watanabe 10 veces concentrado

Reactivos	g/L
K ₂ HPO ₄	3,0
MgSO ₄ x 7H ₂ O	2,0
CaCl ₂ (2H ₂ O)	0,5
Tartrato férrico	20 – 30 gotas
Solución A ₆	10 mL

La preparación de la solución stock de medio Watanabe se realizó de acuerdo a lo indicado por Watanabe (1972), detallado a continuación:

1. La solución stock se llevó a 1 L con agua destilada, para luego ser autoclavada durante 20 minutos a una temperatura de 120 °C y 1 atmósfera de presión.
2. Luego, para la preparación de 1 L de medio de cultivo Watanabe, se tomó 100 mL del medio Watanabe ya autoclavado (10 veces concentrado), y se completó con 900 mL de agua bidestilada. Esta preparación se graduó con KOH o HCl, hasta obtener un pH entre 5 a 6. Una vez diluida la mezcla, se volvió a autoclavar durante 20 minutos a 120°C y 1 atmosfera de presión.

Crecimiento cultivos axénicos

Una vez establecidas las condiciones de mantenimiento para el cultivo de *Nostoc sp.*, se procedió a incrementar su biomasa algal a través de la metodología propuesta por Pereira y col. (2009). Para esto, en una primera etapa, fue trasladado el contenido algal del matraz Erlenmeyer hacia un acuario recubierto de 3L de capacidad, provisto de medio líquido Watanabe. Ya trasladado el cultivo, éste fue mantenido bajo condiciones controladas de temperatura y luz. La temperatura se mantuvo entre un rango de 20 a 25°C. En el caso de la luz, el cultivo fue sometido a un fotoperiodo de 14 hrs de luz continua, por medio de una fuente lumínica cálida, cuya intensidad se calculó a través de la conversión de lux a watts,

determinando así una intensidad de 2000 lux de acuerdo a Allen (1956). Se midió constantemente la intensidad de la luz con un luxómetro. Luego del período de luz se dejaban por 10 hrs en oscuridad.

Determinación de Cl “a”

Para determinar el crecimiento de los cultivos axénicos, se utilizó la concentración del pigmento fotosintético Cl “a” ($\mu\text{g/L}$) como estimador de la biomasa algal y también para determinar el tiempo en que se debía realizar el recambio del medio de cultivo y así no contar con agentes externos que pudiesen generarse por la presencia de N en el medio y junto con esto iniciar la activación celular del alga, que consiste en la división celular de ésta. La concentración de este pigmento fotosintético se determinó mediante la filtración de una alícuota de 5 mL del cultivo concentrado, en filtros de fibra de vidrio ($0,70 \mu\text{m}$), mantenidos aproximadamente a $0 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas, en acetona al 90% hasta lograr la extracción de estos, para posteriormente leer en un espectrofotómetro UV visible Aquarius CE 7200. Las absorbancias a las distintas longitudes de onda fueron las: 750-664- 647-630-480. Todas éstas se corrigen por 750 nm ($A_x - A_{750}$), antes de ingresarlas a la fórmula empleada para estimar la concentración de Cl “a” (Jeffrey y Humphrey, 1975), que correspondió a la siguiente:

$$\text{CLOA } (\mu\text{g/L}) = (11,93 \times A_{664}) - (1,93 \times A_{647}) \times \text{vol. extracto (en ml)/vol. filtrado (en L)}.$$

Determinación de la tasa de fijación de N_2

La estimación de las tasas de fijación de N_2 se llevó a cabo de acuerdo a lo presentado por Hardy y col, (1973). Los ensayos se realizaron con los cultivos de las muestras de *Nostoc sp.*, obtenidas en la Universidad de Talca, y duplicadas en el laboratorio de Limnología de la Universidad de Chile. Para llevar a cabo la determinación de la tasa de fijación de N_2 ,



inicialmente se filtró la biomasa algal generada en los acuarios, retirando todo el medio de cultivo posible, para luego ser llevadas a una centrifuga Hettich modelo Rotofix 32, a bajas revoluciones (3000 rv/min), y sólo por 2 minutos, para no romper los filamentos, lo que fue corroborado haciendo ensayos preliminares y observando posteriormente el estado de éstos, bajo microscopio invertido Olympus modelo CK2, de tal forma de comprobar que no sufrieran daños. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se procedió a realizar el pesaje en “húmedo”, y así obtener una cantidad de biomasa similar de aproximadamente 25 mL para cada uno de los matraces de vidrio que serían sometidos a medición. Luego, y una vez transferida la cantidad de biomasa algal a los matraces, se les adicionó nuevo medio de cultivo Watanabe. Este procedimiento se realizó para seis muestras de cultivo, tres de las cuales contenían material algal con distintas concentraciones de Mo (0,1 ppm, 0,5 ppm y 3,0 ppm), y tres controles, de los cuales uno contenía sólo material algal, otro contenía material algal con C_2H_2 , y un tercero que contenía material algal con Mo (3,0 ppm), esto para eliminar cualquier otra fuente externa de C_2H_4 . Cada una de las seis muestras fue medida en un total de seis réplicas por tratamiento (Figura 4).

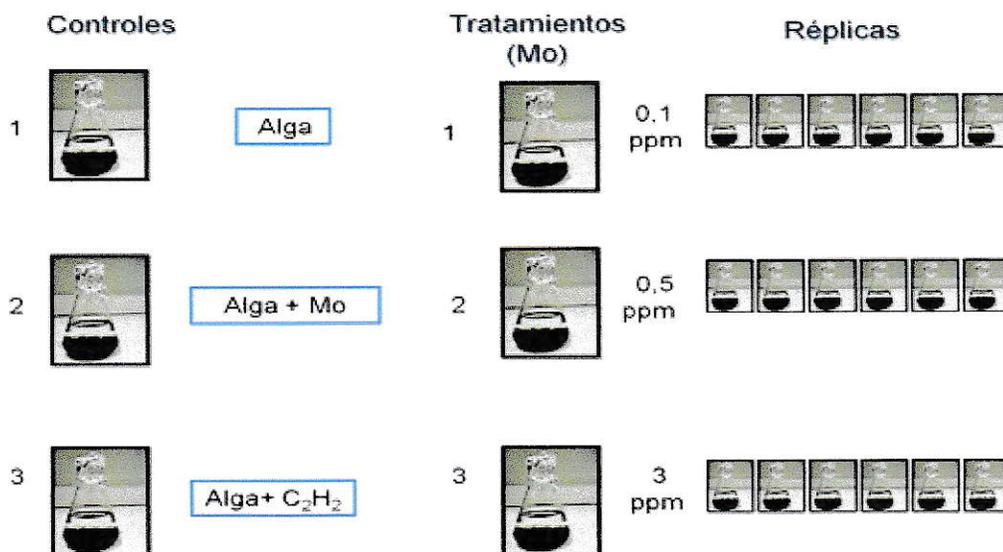


Figura 4. Diagrama de los tratamientos realizados para la determinación de la actividad de la nitrogenasa.

Posteriormente, se cerraron los matraces con tapones de goma asegurando un cierre completamente hermético. Luego, fueron extraídas con una jeringa, muestras de aire (*headspace*) equivalentes al 10% del volumen total del matraz (5 mL), el que era reemplazado por igual volumen de C_2H_2 . Realizado este procedimiento las muestras fueron depositadas en una caja sellada para mantenerlos en incubación por 1 hora a oscuridad. Una vez terminado el tiempo de incubación, se extraían 10 mL de la mezcla gaseosa y se transferían a tubos vacutainer, al vacío, de 10 mL de capacidad, previamente rotulados. Posteriormente, era extraído 1 mL de la mezcla gaseosa desde las muestras contenidas en los tubos vacutainer, de tal forma de poder realizar la medición de la reducción de acetileno (C_2H_2) en etileno (C_2H_4), a través de cromatografía de gases (Figura 5). Una vez realizadas las extracciones de la mezcla gaseosa (*headspace*) las muestras se destapaban inmediatamente, ya que estudios realizados por Hardy y col. (1973) demostraron que el C_2H_2 reprime el crecimiento de la biomasa. Es por este motivo que los ensayos se llevan a cabo en el menor tiempo posible.

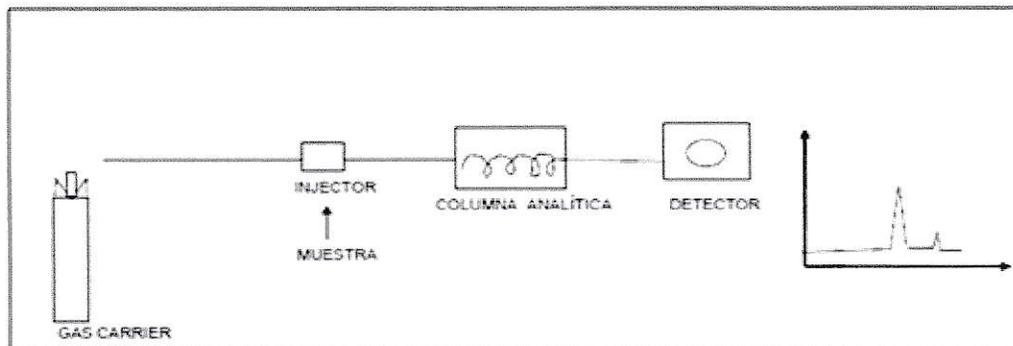


Figura 5. Esquema del procedimiento de medición de la reducción de C_2H_2 por cromatografía de gases (ensayo de reducción acetileno - etileno ARA "Acetylene Reduction Assay") (Referencia: Hardy y col. 1973).

Para determinar las concentraciones del C_2H_4 generado por la reducción de C_2H_2 llevada a cabo por *Nostoc sp.*, se utilizó una curva de calibración realizada con estándares de C_2H_4 , de concentraciones de 1 ppm, 3 ppm y 5 ppm. Una vez definidos los valores de concentración

de C_2H_4 a partir de los estándares, fue posible calcular los valores de C_2H_4 de los distintos cultivos en base a los resultados de la cromatografía (Figura 6).

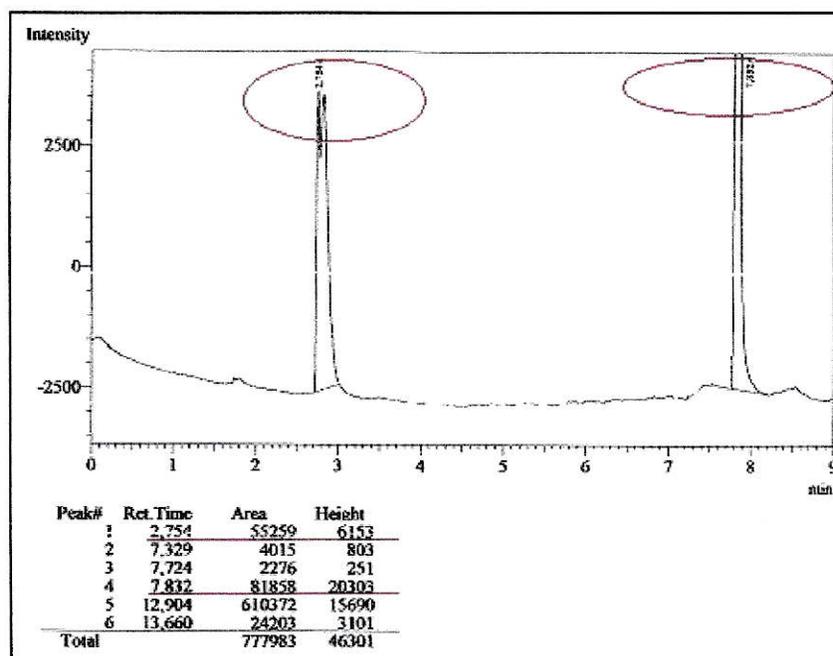


Figura 6. Ejemplo de cromatograma. Se detalla la detección de C_2H_4 y C_2H_2 , respectivamente, a través de la aparición de distintos picos de detección y sus áreas.

En la determinación de la fijación de N_2 a través del ensayo acetileno - etileno (ARA), se siguió el método de Pereira y col. (2009). Para esto, se realizaron mediciones en el Centro de Estudios en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CECTA) de la Universidad de Santiago de Chile (USACH), a través de un cromatógrafo de gas Perkin Elmer modelo Clarus 500, equipado con columna capilar sílice fundida equití™ - 5 Supelco, y gas carrier helio (He). Posteriormente se realizaron mediciones en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) del Ministerio de Agricultura, a través de un cromatógrafo Perkin Elmer Auto System XL, con columna empacada HayeSep D, y gas carrier nitrógeno (N), para hidrocarburos de 1 a 6 carbonos en su cadena y por último en el Laboratorio de Síntesis y Reactividad del Departamento de Química de la Universidad de Chile, a través de un

cromatógrafo Shimadzu GC-2014, con columna capilar Rt®-Alumina BOND /Na₂SO₄ (0.53 mm x 50 m), y gas carrier helio (He).

Análisis de datos

Crecimiento cultivos axénicos y Cl “a”

Para determinar la existencia de diferencias entre los valores de Cl “a”, respecto a los días de cultivo algal, fueron aplicados análisis de varianza de una vía (ANOVA), a través del software estadístico Statistica 7 (StatSoft, Inc.TM, Tulsa, OK, EUA). Posteriormente al ANOVA, se llevó a cabo un “postest” de comparación de medias de Tukey con el programa GraphPad Prism 5 (Software, Inc., San Diego, CA, EUA), de tal forma de poder definir cuáles muestras presentaban diferencias entre sí.

Determinación de la tasa de fijación de N₂

Las diferencias en la tasa de fijación de N₂ (reducción de C₂H₂) entre los distintos cultivos unialgales sometidos a diferentes concentraciones de Mo, se determinaron a través de un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con el software Statistica 7. Luego de realizar dicho test, se llevó a cabo un análisis posterior de comparación de Tukey, con el objetivo de definir entre cuáles muestras se presentaban las diferencias. Adicionalmente, fue realizado un test de comparación múltiple de Dunnett (postest), entre los resultados de los cultivos sometidos a distintas concentraciones de Mo, versus los valores de las muestras control. Tanto la prueba estadística de Tukey, como la de Dunnett, fueron realizadas con el software estadístico GraphPad Prism 5.

RESULTADOS

Crecimiento cultivos axénicos

A través de la medición de concentración de Cl “a”, se pudo determinar el crecimiento de los cultivos de la cianobacteria *Nostoc sp.* Con esto, fue posible establecer un tiempo óptimo para realizar el recambio del medio de cultivo, el cual se pudo determinar entre el tercer y cuarto día (Figura 7), a través de la comparación de los valores promedio de las concentraciones de Cl “a” de las muestras. Así, se pudo observar que las diferencias significativas entre los valores de concentración (análisis de varianza de una vía, ANOVA, $p < 0,0001$; “post hoc test” de comparación múltiple de Tukey), se lograron dentro de los primeros tres días de cultivo de las muestras, para luego alcanzarse la mantención de los valores de concentración entre los días tercero y cuarto, y finalmente, al quinto día, se pudo observar una disminución significativa de los valores de Cl “a” medidos, cercanos a los obtenidos el segundo día de ensayo (Tabla 3). Ya con la frecuencia óptima de recambio del medio de cultivo, fue posible mantener condiciones adecuadas para la conservación de la biomasa algal en condiciones de laboratorio.

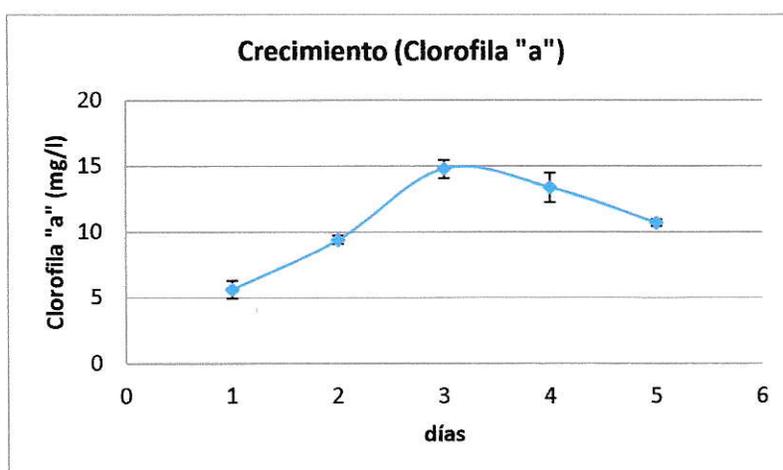


Figura 7. Concentraciones (mg/L) promedio de Cl “a” al cabo de cinco días de cultivo. Barras de error indican desviación estándar.

Tabla 3. Valores de significancia (p) del Test de comparación múltiple de Tukey para concentraciones de Cl “a” versus días de cultivo.

	día 1	día 2	día 3	día 4	día 5
día 1	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
día 2	p<0,05	-	p<0,05	p<0,05	p=0,211(n.s.)*
día 3	p<0,05	p<0,05	-	p=1,627(n.s.)*	p<0,05
día 4	p<0,05	p<0,05	P=0,1627(n.s.)*	-	p<0,05
día 5	p<0,05	p=0,211(n.s.)*	p<0,05	p<0,05	-

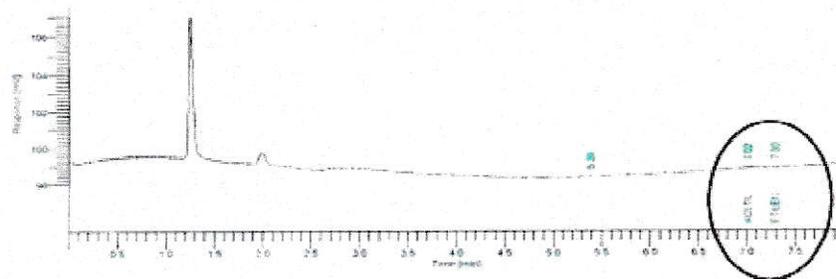
*n.s. = valores no significativos.

Nota: Software no arroja valores específicos de “p” en casos de significancia.

Mediciones de Fijación de N₂

A continuación se presentan los procedimientos realizados, en el CECTA, el INIA y el Laboratorio de Síntesis y Reactividad, para aplicar el método de reducción acetileno - etileno (ARA), necesario para medir la actividad de la enzima nitrogenasa de las muestras de cultivos unialgales de *Nostoc sp.*:

1) Centro de Estudios en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CECTA) Universidad de Santiago de Chile: Al seguir el método establecido por Pereira y col. (2009), se determinó que este centro de estudios no contaba con los equipos e instrumentos necesarios que requiere la técnica para la medición de la reducción de C₂H₂ a C₂H₄, en particular por la baja cantidad de biomasa de las muestras. En este sentido, se testaron diferentes volúmenes de biomasa algal, así como también diferentes concentraciones de Mo y C₂H₂, sin embargo, los resultados obtenidos para las muestras analizadas en este centro de estudios, permitieron establecer a través de los límites de detección del cromatógrafo de gas que no era lo suficientemente sensible para detectar las concentraciones de C₂H₄ formado por los cultivos algales, por lo que no fue posible lograr los resultados esperados (Figura 8).



Etileno

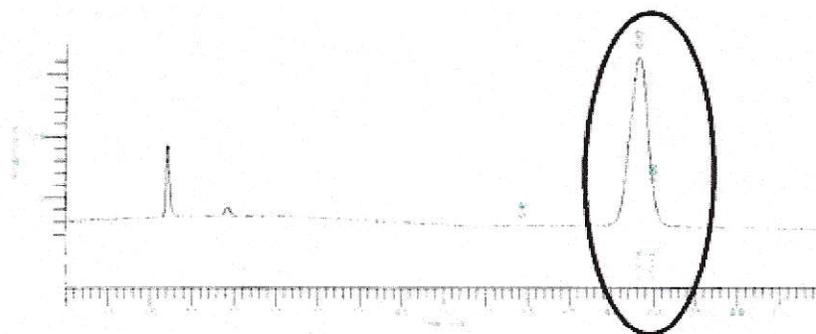
Peak #	Component Name	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Concentracion ppm
1		5.395	27.59	12.26	0.0000
2	acetileno	7.017	574.35	58.18	-4.3334
3	etileno	7.301	98.12	25.94	0.7727
			698.05	96.36	-3.5607

Missing Component Report
Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found

Figura 8. Cromatograma de concentraciones del gas C_2H_4 (ppm). Los bajos valores de área (resaltada en rojo) muestran la baja sensibilidad de detección de C_2H_4 .

2) Instituto de Investigación Agropecuaria (INIA): Al igual que en el CECTA, se iniciaron las mediciones según lo establecido por Pereira y col. (2009), sin embargo, dichas mediciones no arrojaron valores de C_2H_4 . Al igual que en los ensayos anteriores, se testearon diferentes volúmenes de biomasa algal, y distintas concentraciones de Mo y C_2H_2 , sin embargo, los resultados obtenidos permitieron establecer, a través de los límites de detección, que el cromatografo de gas, no fue lo suficientemente sensible para detectar las bajas cantidades de C_2H_4 obtenidas de los cultivos algales, ya que la columna empacada provocaba el enmascaramiento del C_2H_4 a causa de los altos valores (alta concentración) de C_2H_2 registrados. Esto último, debido a que este tipo de columna presenta una menor capacidad de separación de los compuestos por su menor longitud, y tanto el C_2H_2 , como el C_2H_4 , presentan tiempos de retención muy cercanos, además de una estequiometría y peso molecular similares. De manera adicional, el uso de N_2 como gas carrier, también afecta los resultados de las mediciones, ya que, al tener una menor altura de pico en los cromatogramas, produce una mayor interferencia en los picos de detección (Figura 9).



Etileno

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Concentration ppm
1		5.445	87.06	23.23	0.0001
2	acetileno	6.824	149501.80	11754.20	3.6704
3	Etileno	7.000	42336.36	-4.04	0.5899
			191925.20	11773.39	4.2605

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found

Figura 9. Cromatograma de concentraciones del gas C_2H_4 (ppm). Área resaltada representa el solapamiento de detección para C_2H_2 y C_2H_4 .

3) Laboratorio de Síntesis y Reactividad (Universidad de Chile): Luego de analizar y considerar los distintos inconvenientes de medición presentados en los otros centros de investigación, se determinó que el problema radicaba en la columna utilizada. Por este motivo se adquirió la columna específica para hidrocarburos de bajo peso molecular, Rt®-Alumina BOND /Na₂SO₄ (0.53mm x 50 m), la que gracias a su especificidad y mayor longitud, lograba una separación considerable de los picos del C_2H_2 y C_2H_4 , evitando los enmascaramientos del C_2H_4 , presentados en las otras columnas, aún cuando se trabajó con bajas cantidades de biomasa algal (Figura 10), lo que permitió obtener así, la efectividad en los resultados.

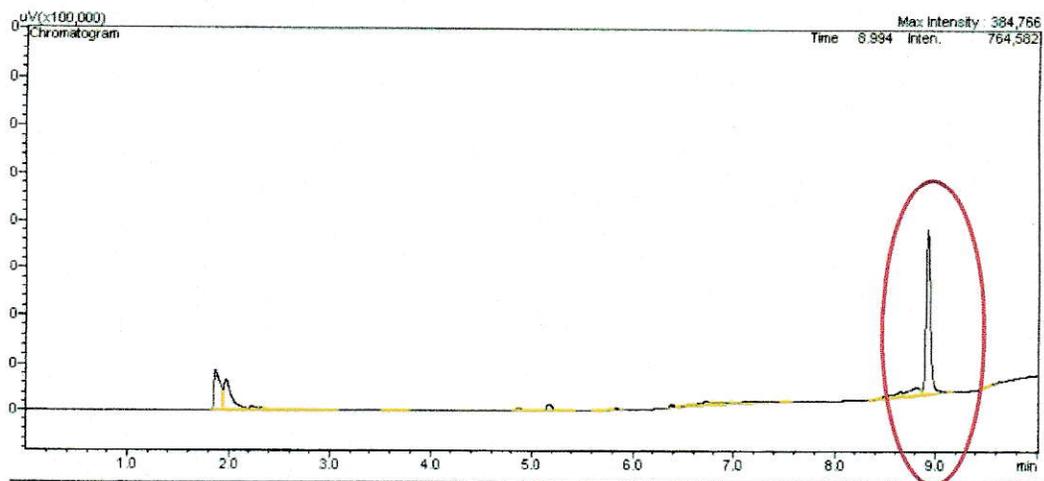


Figura 10. Cromatograma de concentraciones del gas C_2H_4 (ppm). Área resaltada representa la detección adecuada de C_2H_4 .

Es por lo anteriormente indicado, que tanto las mediciones llevadas a cabo en el CECTA, así como en el INIA, no entregaron resultados adecuados acorde a lo desarrollado por Pereira y col. (2009). En este sentido, la determinación del procedimiento adecuado, alcanzado en el Laboratorio de Síntesis y Reactividad del Departamento de Química de la Universidad de Chile, permitió obtener los resultados que se presentan en este trabajo.

Previo a la determinación de las tasas de la actividad de la nitrogenasa, a través de la reducción de C_2H_2 a C_2H_4 , se realizó una curva de calibración de concentraciones estándares de C_2H_4 , de concentraciones de 1 ppm, 3 ppm y 5 ppm (Figura 11).



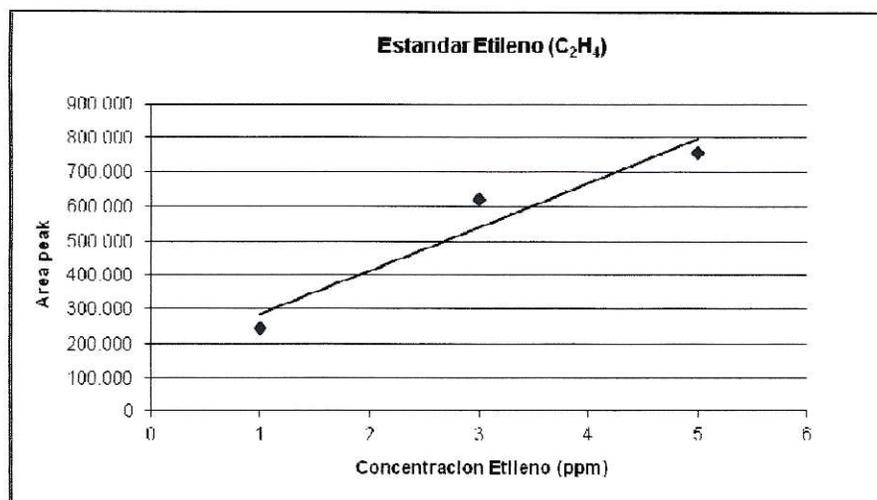


Figura 11. Curva de calibración de concentraciones del gas C₂H₄ (ppm), respecto a las áreas arrojadas por cromatografía de gases.

Esta curva permitió conocer la concentración de C₂H₄ (ppm) formado por las distintas muestras de cultivo unialgal de *Nostoc sp.*, a través de los valores de área obtenidos de la cromatografía.

En cuanto a la fijación de N₂ realizada por *Nostoc sp.*, se encontró que la mayor tasa de la actividad de la nitrogenasa, dada en μmol de C₂H₂ fijado por hora, se obtuvo de aquellos cultivos sometidos a concentraciones de 3,0 ppm de Mo, con un valor promedio de $0,459 \pm 0,051 \mu\text{mol/h}$, seguido por cultivos sometidos a 0,5 ppm de Mo, con una fijación media de $0,387 \pm 0,036 \mu\text{mol/h}$. Finalmente, la tasa de reducción de C₂H₂ más baja, correspondió a la obtenida de los cultivos sometidos a 0,1 ppm de Mo, con valores promedio de $0,105 \pm 0,060 \mu\text{mol/h}$ (Tabla 4). Para el caso de las distintas muestras control, se obtuvieron valores de tasa de reducción de C₂H₂ inferiores a $0,0001 \mu\text{mol/h}$ para todos los tratamientos, los que a su vez, no mostraron diferencias significativas entre sí (ANOVA, $p > 0,05$).

Tabla 4. Valores de concentraciones de Mo y mediciones de etileno (C₂H₄) y acetileno (C₂H₂).

Mo (ppm)	Etileno (ppm)	Acetileno (μmol/h)
0,1	0,3535	0,0272
0,1	1,8233	0,1403
0,1	2,1510	0,1655
0,1	1,5036	0,1157
0,1	1,8934	0,1456
0,1	0,4316	0,0332
0,5	4,9925	0,3840
0,5	4,5611	0,3509
0,5	4,5970	0,3536
0,5	5,3095	0,4084
0,5	4,8853	0,3758
0,5	5,8027	0,4464
3,0	6,0913	0,4686
3,0	5,3898	0,4146
3,0	5,6527	0,4348
3,0	6,0219	0,4632
3,0	5,4391	0,4184
3,0	7,1846	0,5527
Promedios reducción acetileno vs concentraciones Mo		
0,1 ppm (Mo) = 0,105 ± 0,060* μmol/h		
0,5 ppm (Mo) = 0,387 ± 0,036* μmol/h		
3,0 ppm (Mo) = 0,459 ± 0,051* μmol/h		

*Desviación estándar

Las muestras de cultivo unialgal mostraron una tendencia a mayores valores de fijación de N₂ (μmol C₂H₂/h) a medida que se incrementó las concentraciones de Mo. No obstante, se observó una disminución paulatina en la reducción de C₂H₂ hacia concentraciones mayores de Mo (Figura 12).

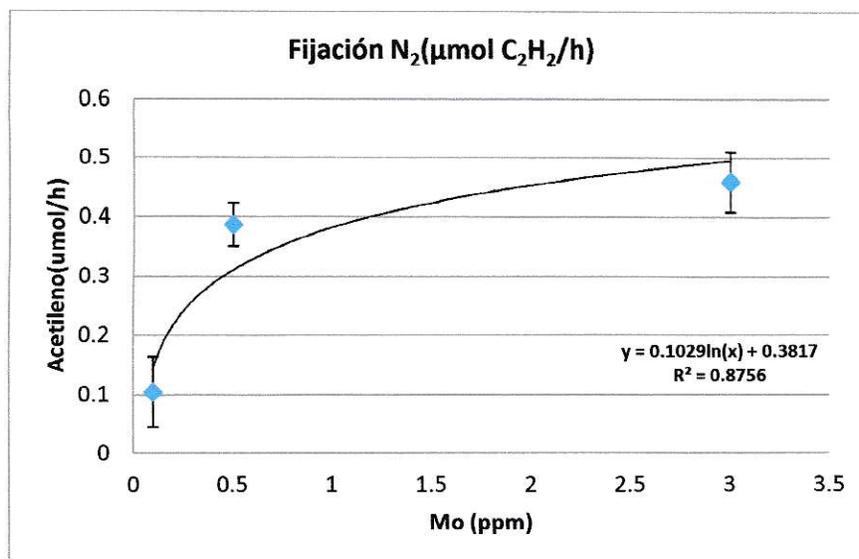


Figura 12. Tasa de fijación de N_2 ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_2/\text{h}$) de cultivos de *Nostoc sp.*, a distintas concentraciones de Mo (0,1 ppm, 0,5 ppm y 3,0 ppm). Barras de error indican desviación estándar. Se muestra línea de tendencia.

Para establecer la existencia de diferencias entre los distintos valores de las tasas de fijación de N_2 (reducción de C_2H_2) obtenidas entre las distintas concentraciones de Mo aplicadas a los cultivos, se realizó un análisis de varianza de una vía, el cual arrojó diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,0001$) entre las distintas tasas de reducción de los distintos cultivos (Figura 13). Con el objeto de determinar cuáles de las muestras presentaban diferencias entre sí, se realizó un análisis “post hoc” de comparación múltiple de Tukey. Dicho análisis permitió establecer que los cultivos unialgales de *Nostoc sp.*, sometidos a concentraciones de Mo de 0,1 ppm, presentaron diferencias significativas entre las tasas de reducción de C_2H_2 , tanto al compararlas con los resultados obtenidos para concentraciones de Mo de 0,5 ppm, y 3,0 ppm. En cambio, tanto los cultivos sometidos a concentraciones de Mo de 0,5 ppm, así como de concentraciones de 3,0 ppm, no arrojaron diferencias significativas entre sí (Tabla 5).

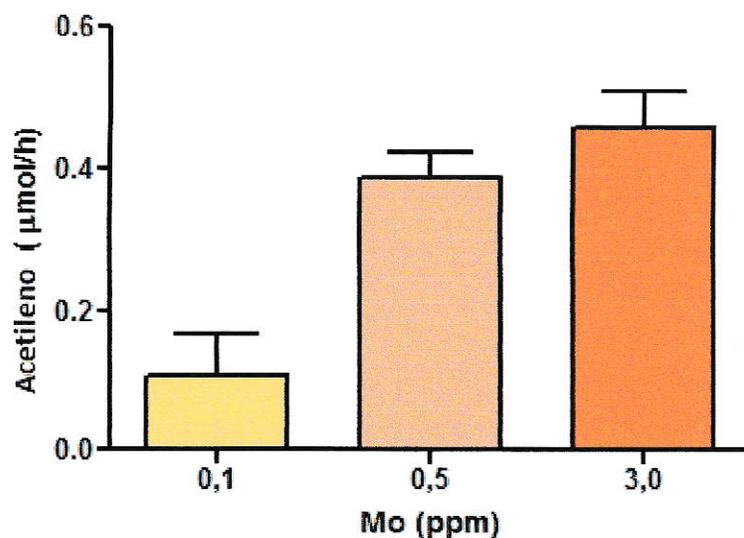


Figura 13. ANOVA de las tasas de reducción de C_2H_2 entre los distintos ensayos (concentraciones de Mo de 0,1 ppm, 0,5 ppm y 3,0 ppm). Barras de error indican desviación estándar.

Tabla 5. Valores de significancia (p) del Test de comparación múltiple de Tukey para tasa de reducción de C_2H_2 versus concentraciones de Mo.

	0,1 ppm	0,5 ppm	3,0 ppm
0,1 ppm	-	p<0,05	p<0,05
0,5 ppm	p<0,05	-	p>0,05 (n.s.)*
3,0 ppm	p<0,05	p>0,05 (n.s.)*	-

*n.s. = valores no significativos.

Nota: Software no arroja valores específicos de “p” en casos de significancia.

Adicionalmente, se realizó un análisis “post hoc” de comparación múltiple de Dunnett para comparar los valores de reducción de C_2H_2 entre los cultivos sometidos a distintas concentraciones de Mo, y los valores obtenidos para las muestras control. Los resultados de este análisis arrojaron que los bajos valores de reducción de C_2H_2 obtenidos para las muestras control, fueron significativamente menores ($p<0,0001$), a los obtenidos para cada uno de los ensayos con adición de Mo (0,1 ppm, 0,5 ppm y 3,0 ppm).

DISCUSIÓN

Diversos son los estudios que indican la importancia del Mo en la FBN (Goldman, 1965). Microorganismos capaces de realizar este proceso son las cianobacterias, las cuales cuentan con la enzima nitrogenasa, que es la encargada de reducir el N_2 a su forma asimilable NH_4^+ . Es por esto que estimamos, es importante determinar si hay aumento en las tasas de fijación de N_2 por parte de estos organismos al adicionarles Mo. Una especie que contaba con las características necesarias para la realización de nuestro trabajo y que además se encontraba como cultivo axénico fue *Nostoc sp.*, la cual fue sometida a distintas concentraciones de Mo para determinar la actividad de la enzima nitrogenasa.

Es necesario indicar, que si bien, se utilizó *Nostoc sp.* por sus condiciones adecuadas para este experimento, no se debe descartar a futuro realizar mediciones con otras especies de cianobacterias que presenten características diferentes a *Nostoc sp.*, como por ejemplo, la carencia de heterocistos, y poder comparar así, el efecto del Mo en ambas, y observar la efectividad del funcionamiento de la nitrogenasa (Frioni, 1990).

La medición del aumento de la biomasa algal mediante el cálculo de Cl "a", permitió definir (significativamente) un rango de 3 a 4 días como periodo óptimo de recambio del medio líquido Watanabe. Esto era necesario de conocer, ya que, el no llevar a cabo el cambio del medio de cultivo, mantendría el N producido por la muerte de la biomasa algal, afectando los valores obtenidos en las mediciones de la fijación N_2 , medida a través de la reducción C_2H_2 , ya que es sabido que el N combinado afecta el funcionamiento de la enzima nitrogenasa, llegándola incluso a inhibir (síntesis y función) (Stewart, 1969; Horne y Goldman, 1972; Horne y col. 1979; Carr y Whitton, 1982).

Para obtener resultados adecuados en la determinación de las tasas de fijación, a través del ensayo de reducción de acetileno-etileno (ARA), fue necesario ensayar varias técnicas. Se presentaron diversos problemas metodológicos al reproducir las técnicas establecidas en la literatura, lo que dificultó considerablemente la obtención de resultados. Uno de los primeros inconvenientes se originó por la baja formación de C_2H_4 generado por las microalgas, ya que los límites de detección de los equipos, no registraban la presencia de los compuestos formados. Esto debido a que la cantidad de material algal utilizada, fue bastante pequeña en comparación a trabajos donde se han realizado mediciones in situ (ríos y lagos), y para la utilización de biofertilizantes (arrozales) (Goldman, 1960; Pereira y col. 2005; 2009). Si bien, en este trabajo fue posible establecer condiciones apropiadas de crecimiento para *Nostoc sp.*, la obtención de grandes cantidades de biomasa algal, no fue posible, ya que se perdía cultivo durante el recambio del medio y la contaminación por otras algas impedía tener varios cultivos axénicos de *Nostoc sp.* Otro inconveniente fue la pureza del gas C_2H_2 (99,7%) con el que se contaba para trabajar, ya que provocaba la saturación de la columna, además del enmascaramiento de la poca concentración del C_2H_4 que se podía formar. El enmascaramiento era debido a la semejanza en peso molecular y tiempos de retención del C_2H_2 y C_2H_4 , en las columnas empacadas, con la que se trabajó en el caso del centro de investigación INIA.

Si bien, la medición de la actividad de la enzima nitrogenasa es un proceso muy bien estudiado (Hardy y col. 1973; Pereira y col, 2005: 2009), se deben tener siempre en cuenta las características individuales de cada experimento, ya que la metodología varía de acuerdo a las condiciones presentes en cada trabajo, como por ejemplo, la cantidad de la biomasa a utilizar. Esto último fue el gran inconveniente en este trabajo, ya que la metodología utilizada por Pereira y col. (2009) fue realizada a gran escala, es decir, una gran cantidad de biomasa a medir, así como también los compuestos generados, a diferencia de lo que se quiso realizar en este trabajo, por lo que finalmente y luego de muchos ensayos, se determinó

que era necesario adquirir una columna capilar de alta sensibilidad y específica para estos compuestos, y así lograr determinar incluso, bajas concentraciones de C_2H_4 .

El mayor valor de fijación de N_2 , expresado en μ moles de C_2H_2 por hora (μ m C_2H_2/h), se obtuvo a una concentración de 3 ppm de Mo, por sobre los 0,1 y 0,5 ppm, sin embargo, el análisis de varianza de una vía (ANOVA), arrojó diferencias significativas en las tasas de reducción de C_2H_2 , sólo entre las muestras con concentraciones de 0,1 ppm de Mo, respecto a 0,5 y 3,0 ppm, no así entre estas dos últimas concentraciones. Esta situación podría indicar que, para concentraciones superiores a 0,5 ppm de Mo, las tasas de fijación no presenten aumentos significativos. La razón de esto podría radicar en una posible saturación de la enzima nitrogenasa, a causa del incremento en las concentraciones de Mo, ya que estudios realizados por Goldman (1960) para la cianobacteria *Nostoc sp.*, mostraron que un aumento en la adición de Mo, luego de determinadas concentraciones (rango entre 0,5 y 3,0 ppm), no reflejaba mayores incrementos en procesos directamente relacionados con la fijación del N_2 de este organismo, como es el caso de la fotosíntesis. No obstante, para poder realizar una aseveración como esta, es necesario desarrollar futuras investigaciones, donde se ensaye con valores intermedios y superiores a los aquí mostrados, de tal forma de poder afirmar dicha hipótesis.

Si bien, el análisis de varianza de una vía (ANOVA, $p < 0,001$) establece que existen diferencias significativas entre las tasas de fijación de las distintas concentraciones de Mo ensayadas (mayor fijación a mayores concentraciones de Mo), la ausencia de diferencias significativas entre los valores más altos de fijación (0,5 y 3,0 ppm) (Tukey, $p > 0,001$), así como la tendencias de los datos, sugerirían que las tasas de fijación alcanzarían un máximo, por sobre determinados valores de concentración de Mo.

CONCLUSIONES

- La elección de un cromatógrafo de gas equipado con una columna capilar (de mayor especificidad y separación de compuestos), fue esencial para la obtención de resultados adecuados, ya que no presentó problemas de saturación, recubrimiento de señal, o baja sensibilidad de detección para C_2H_4 , aún trabajando con bajas cantidades de biomasa algal.
- Fue posible poner a punto la metodología, por lo que queda probar esta técnica con un mayor rango de concentraciones de Mo, así como también, trabajar con otras especies de cianobacterias fijadoras de N_2 . Esto, con el objetivo de ajustar la metodología a un rango mayor de condiciones.
- La disminución del tiempo de incubación bajo condiciones de experimento, mejoró considerablemente los valores de la tasa de fijación, situación que podría responder, según Hardy y col. (1973), a que el gas C_2H_2 , provoca una disminución en el crecimiento algal a mayores tiempos de exposición al C_2H_2 .
- A mayores concentraciones de Mo, se encontraron mayores tasas de fijación de N_2 , sin embargo, entre valores de 0,5 a 3,0 ppm de Mo en los cultivos, las tasas de fijación no resultaron ser significativamente distinta.
- La cianobacteria *Nostoc sp.* respondió favorablemente a la técnica ARA, situación que se había evidenciado en estudios realizados por Pereira y col. (2009), donde se determinó que este género resultó ser el más “eficiente” en su proceso de fijación de N_2 comparándola con otras cianobacterias. Es por esto que se recomienda trabajar con cultivos de *Nostoc sp.* para próximos ensayos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Allen M.B. 1956. Photosynthetic Nitrogen Fixation by Blue-Green Algae. The scientific Monthly. 83(2): 100-106.
2. Arnon, D.I y Stout, P.R. 1989. Molybdenum as an essential element for higher plants. Soil Sci. 44: 91-114.
3. Bachmann, R.W. y Goldman, C.R. 1964. The determination of microgram quantities of molybdenum in natural waters. Limnol. Oceanogr. 9:143-6.
4. Barica, J., Kling, H. y Gibson J. 1980. Experimental manipulation of algal bloom composition by nitrogen addition. Can J Fish Aquat Sci. 37:1175-1183.
5. Benavides, M., Arístegui, J., Agawin, N., Cancio, J. y Hernández-León, S. 2013. Enhancement of nitrogen fixation rates by unicellular diazotrophs vs. *Trichodesmium* after a dust deposition event in the Canary Islands. Limnol. Oceanogr. 58(1): 267-275.
6. Berrang, P.G. y Grill, E.V. 1974. The effect of manganese oxide scavenging on molybdenum in Saanich. Mar. Chem. 2:125-148.
7. Bishop, P.E. y Joerger, R.D. 1990. Genetics and molecular biology of alternative nitrogen fixation systems. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 41: 109-125.
8. Bortels, H. 1940. Uber die Bedeutung des Molybdäns far stickstoffbindende Nostocaceen. Arkiv fiir ikorbiologie.11:155-186.
9. Blomqvist, P., Pettersson, A. y Hyenstrand, P. 1994. Ammonium-nitrogen: a key regulatory factor causing dominance of non-nitrogen fixing cyanobacteria in aquatic system. Arch Hydrobiol. 132:141-164.
10. Bradford, G. R., Bair, F. L. y Hunsaker, V. 1968. Trace and Major Element Content of 170 High Sierra Lakes in California. Limnology and Oceanography. 13:526-530.
11. Brill, W.J. y Shah, V.K. 1980. Metabolism of molybdenum by nitrogen-fixing bacteria. In Newton, W. I. & S. Otsuka (eds), Molybdenum Chemistry of Biological

- Significance. Plenum Press, New York (NY): 171-178.
12. Brownlee, B.G. y Murphy, T.P. 1983. Nitrogen fixation and phosphorus turnover in a hypertrophic prairie lake, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40: 1853-1860.
 13. Bryhn, A.C. y Blenckner, T. 2007. Can nitrogen gas be deficient for nitrogen fixation in lakes? *Ecol. Mod.* 202: 362-372.
 14. Bulgakov, N.G. y Levich, A.P. 1999. The nitrogen phosphorus ratio as a factor regulating phytoplankton community structure. *Arch Hydrobiol.* 146:3-22.
 15. Buljan, M. 1957. Report on the results obtained by a new method of fertilization tried in the marine bay "Mljetskog Jerza" [Transl.]. *Fish. Res. Bd.Can. Biol. Sta., St. Andrews.* 30 p.
 16. Burgess, B.K. y Lowe, D.J. 1996. Mechanism of molybdenum nitrogenase. *Chem. Rev.* 96:2983-3011.
 17. Burris, R.H. 1972. Nitrogen fixation, assay methods and techniques. *Methods Enzymol.* 24:415-431.
 18. Cao, L., y Jain, A.K.. 2005. An earth system model of intermediate complexity: simulation of the role of ocean mixing parameterizations and climate change in estimated uptake for natural and bomb radiocarbon and anthropogenic CO₂, *Journal of Geophysical Research (Oceans).* 110:1-17
 19. Caraco, N., Tamse, A., Boutros, O. y Valiela, I. 1987. Nutrient limitation of phytoplankton growth in brackish coastal ponds. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44:473-476.
 20. Carmichael, W.W. 2001. Health effect of toxin-producing Cyanobacteria: "The CyanoHABs". *Human and Ecological Risk Assessment.* 7:1393-1407.
 21. Carpenter, E.J. 1971. Effects of phosphorus mining wastes on the growth of phytoplankton in the Pamlice River estuary. *Chesapeake Sci.* 12:85-94.
 22. Carr, N.G. y Whitton, B.A. 1982. *The Biology of Cyanobacteria.* Botanical monograp. v.19.

23. Chappell, W.R. 1975. Transport and biological effects of molybdenum in the environment. In: Heavy metals in the aquatic environment. P.A. Krenkel, ed. Pergamon Press Ltd., Oxford.
24. Cheng, Q. 2008. Perspectives in Biological Nitrogen Fixation Research. *J. Integ. Plant Biol.* 50(7):786-798.
25. Cole, J.J., Howarth, R.W., Nolan, S.S. y Marino, R. 1986. Sulfate inhibition of molybdate assimilation by planktonic algae and bacteria: Some implications for the aquatic nitrogen cycle. *Biogeochemistry*. 2:179-196.
26. Cole, J.J., Lane, J.M., Marino, R. y Howarth, R.W. 1993. Molybdenum assimilation by cyanobacteria and phytoplankton in freshwater and salt water. *Limnol. Oceanogr.* 38(1):25-35.
27. Christiansen, J., Dean, D. R. y Secfeldt, L C. 2001. Mechanistic features of the Mo-containing nitrogenase. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 52: 269-295.
28. Curatti, L., Hernandez, J.A., Igarashi, R.Y., Soboh, B., Zhao, D. y Rubio, L.M. 2007. In vitro synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase from iron, sulfur, molybdenum, and homocitrate using purified proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104:17626-17631.
29. Dell'Anno, A., Mei, M. L., Pusceddu, A. y Danovaro, R. 2002. Assessing the trophic state and eutrophication of coastal marine systems: A new approach based on the biochemical composition of sediment organic matter. *Marine Pollution Bulletin.* 44(7):611-622.
30. Dixon, R. y Khan, D. 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews. Microbiol.* 2:621-631.
31. Dokulil, M.T. y Teubner, K. 2000. Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiología.* 438:1-12.
32. Doremus, C.1982. Geochemical control of dinitrogen fixation in the open ocean. *Biol. Occanogr.* 1:4129-4136.

33. Duffus, J. H. 2002. "Heavy metals"- A meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure. Appl.Chem.*74:793-807.
34. Dumont, H. J. 1972. The biological cycle of molybdenum in relation to primary production and waterbloom formation in a eutrophic pond. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 18:84-92.
35. Fang, Y. Y., Yang, X. E., Pu, P. M., Chang, H. Q. y Ding, X. F. 2004. Water eutrophication in Li-Yang Reservoir and its ecological remediation countermeasures. *J. Soil and Water Conserv.* 18(6):183-186.
36. Foog, G. E. y Wolfe, M. 1954. Nitrogen metabolism of blue-green algae. *Symp. Sot. Gen. Microbiol.* 4:99-125.
37. Forchhammer, K. y Tandeau de Marsac, N. 1994. The PII protein in the cyanobacterium *Synechococcus sp.* strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status. *J Bacteriol.* 176:84-91.
38. Fortescue, J.A.C. 1992. Landscape geochemistry: retrospect and prospect. *Appl. Geochem.* 7:1-53.
39. Flett, R.J., Schindler, D.W., Hamilton, R.D. y Campbell, N.E.R. 1980. Nitrogen fixation in Canadian Precambrian Shield lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37:494-505.
40. Frioni, L. 1990. *Ecología microbiana del suelo.* Montevideo. Universidad de la República. 323 pag.
41. Gaete, H., Aránguiz, F., Cienfuegos, G., y Tejos, M. 2007. Metales Pesados y Toxicidad de aguas del Río Aconcagua en Chile. *Quim. Nova.* 30(4):885-891.
42. Glass, J. B, Axler, R.P., Chandra, S. y Goldman, C. R. 2012. Molybdenum limitation of microbial nitrogen assimilation in aquatic ecosystems and pure cultures. *Front. Microbiol.* 3:331-339.
43. Goldman, C.R. 1960. Molybdenum as a Factor Limiting Primary Productivity in Castle Lake, California. *Science. New Series.* 132(3433):1016-1017.
44. Goldman, C.R. 1964. Primary productivity and micronutrient limiting factors in

- some North American and New Zealand lakes. *Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. Verh.* 15:365-374.
45. Halbleib, C. M. y Ludden, P.W. 2004. Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *J. Nutr.* 130:1081-1084.
 46. Hardy, R.W.F., Burns, R.C. y Holtcn, R.D. 1973. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Bid. Biorhem.* 5:47-81.
 47. Henry, R. y Tundisi, J. 1982. Evidence of limitation by molybdenum and nitrogen on the growth of the phytoplankton community of the Lobo Reservoir (Sao Paulo, Brazil). *Rev. Hydrobiol. Trop.* 15(3):201-208.
 48. Herrero, A., Muro-Pastor, A.M. y Flores, E. 2001. Nitrogen control in Cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 183(2):411-425.
 49. Horne, A.J. y Commins, M.L. 1987. Macronutrient controls on nitrogen fixation in planktonic cyanobacterial populations. *N Z J Mar Freshwater Res.* 21:423-433.
 50. Howarth, R.W. y Cole, J.J. 1985. Molybdenum Availability, Nitrogen Limitation, and Phytoplankton Growth in Natural Waters. *Science.* 229(4714):653-655.
 51. Howarth, R.W., Marino, R. y Lane, J. 1988. Nitrogen fixation in freshwater, estuarine, and marine ecosystems. 1. Rates and importance. *Limnol. Oceanogr.* 33(4, part 2):669-687.
 52. Howarth, R.W. y Marino, R. 1988. Nitrogen fixation in freshwater, estuarine, and marine ecosystems. 2. Biogeochemical control. *Limnol. Oceanogr.* 33(4, part 2):688-701.
 53. Hutchinson, G.E. 1957. Concluding Remark. *Cold spring Harbor Symposia in quantitative biology.* 22:415-427.
 54. Jacquet, S., Briand, J. F., Leboulanger, C., Avois-Jacquet, C., Oberhaus, L., Tassin, B., Vinc-on-Leite, B., Paolini, G., Druart, J.C., Anneville, O. y Humbert, J.F. 2005. The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). *Harmful Algae.*

- 4:651-672.
55. Jeanfils, J. y Tack, J.P. 1992. Identification and Study of Growth and Nitrogenase Activity of Nitrogen Fixing. *Vegetatio* 103(1):59-66. Cyanobacteria from Tropical Soil.
 56. Jeffrey, S.W. y Humphrey, G.F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 167:191-194.
 57. Khan, F.A. y Ansari, A.A. 2005. Eutrophication: An ecological vision. *The Botanical Rev.* 71(4):449-482.
 58. Lia'o, C. F.H. 1977. The effect of nutrient enrichment on nitrogen fixation activity in the Bay of Quinte, Lake Ontario. *Hydrobiologia.* 56:273-279.
 59. Li, J. X. y Liao, W.G. 2002. Discussion on the synthetic adjustive guidelines for the prevention and cure of eutrophication. *Protec. Water Resour.* 2(5):4-5.
 60. Liu, W. y Qiu, R.L. 2007. Water eutrophication in China and the combating strategies. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 82(9):781-786.
 61. Mackinney, G. 1941. Absorption of light by Chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* 140:315-322.
 62. Mague, T.H. y Burris, R.H. 1973. Biological nitrogen fixation in the Great Lakes. *Bioscience.* 32:236-239.
 63. Mague, T.H. 1977. Ecological aspects of dinitrogen fixation by bluegreen algae. In: *A Treatise on Dinitrogen Fixation. Section IV: Agronomy and Ecology.* Hardy RWF, Gibson AH (eds.) J. Wiley and Sons, New York. pp 85-140.
 64. Mainstone, C.P. y Parr, W. 2002. Phosphorus in rivers-ecology and management. *Sci. Total Environ.* 282-283(1-3):25-47.
 65. Manheim, F.T. y Landergren, S. 1978. Molybdenum, *Handbook of geochemistry.* Springer-Verlag, Berlin, sect. 42 B-O, vol. II/5.
 66. Marino, R., Chang, F., Howarth, R., Pace, M. y Likens, G. 2002. Ecological and

- biogeochemical interactions constrain planktonic nitrogen fixation in estuaries. *Ecosystems*. 5:719-725.
67. Masepohl, B., Drepper, T., Paschen, A., Gross, S., Pawlowski, A., Raabe, K., Riedel, K.U. y Klipp, W. 2002. Regulation of nitrogen fixation in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4(3):243-248.
 68. Mayz-Figueroa, J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno. *Rev. UDO Agrícola*. 4(1):1-20.
 69. Mazur-Marzec., H. 2006. Toxic *Nodularia spumigena* blooms in the coastal waters of the Gulf of Gdańsk: a ten-year survey. *Oceanologia*. 48(2):255-273.
 70. Mez, K., Beattie, K.A., Codd, G.A., Hanselmann, K., Hauser, B., Naegeli, H. y Preisig, H.R. 1997. Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland. *Eur. J. Phycol.* 32:111-117.
 71. Ministerio Secretaría General de la Presidencia (MINSEGPRES). 2001. Establece norma de emisión para la regulación de contaminantes asociados a las descargas de residuos líquidos a aguas marinas y continentales superficiales. Santiago, Chile.
 72. Ministerio Secretaría General de la Presidencia (MINSEGPRES). 2006. Establece la norma de emisión para Molibdeno y Sulfatos de efluentes descargados desde tranques de relave al estero Carén. Santiago, Chile.
 73. Ministerio Secretaría General de la Presidencia (MINSEGPRES). 2010. Establece normas secundarias de calidad ambiental para la protección de las aguas continentales superficiales de la cuenca del río Serrano. Santiago, Chile.
 74. Mur, L. R., Skulberg, O.M. y Utkilen, H. 1999. Cyanobacteria in the environment. In: Chorus, I., Bartram, J. (eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon, London. pp 15-40.
 75. Nichols, J. M. y Adams, D.G. 1982. Akinetes. In Carr, N.G., y Whitton, B.A. (Eds.) *The Biology of Cyanobacteria*. Botanical Monographs, Volume 19. Boston:

Blackwell Scientific.

76. NRC, 2000. Clean Coastal Waters: Understanding and Reducing the Effects of Nutrient Pollution. National Academy Press, Washington D.C. 405p.
77. Paulsen, D., Paerl, W. y Bishop, P. 1991. Evidence that Molybdenum- dependent nitrogen fixation is not limited by high sulfate concentrations in marine environments. *Limnol. Oceanogr.* 36 (7):1325-1334.
78. Paerl, H.W. 1986. Growth and reproductive strategies of freshwater blue-green algal (cyanobacteria), In: Sandgren CD (ed) Growth and Reproductive Strategies of Freshwater Phytoplankton. Cambridge Univ Press.
79. Paerl, H.W. y Millie, D.F. 1996. Physiological ecology of toxic cyanobacteria. *Phycologia.* 35(6):160-167.
80. Paerl, H.W., Fulton, R.S., Moisaner, P.H. y Hyble, J .2001. Harmful Freshwater Algal Blooms, With an Emphasis on Cyanobacteria. *The Scientific World* 1:76-113.
81. Pardo, R. y Vila, I. 2006. Causas que podrían determinar la eutrofización en los lagos chilenos, en : Eutrofizacão na América do Sul: Causas, consequências e tecnologias de gerenciamento e controle. Ed. José Galicia Tundisi. Takako Matsumura. EUTROSUL. IANAS International Institute of Ecology. 197-208.
82. Pereira, I., Ortega, R., Barrientos, L., Moya, M., Reyes, G. y Kramm, V. 2009. Development of a biofertilizer based on filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria for rice crops in Chile. *Journal of Applied Phycology.* 21(1):135-144.
83. Peters, J. W., Stowell, M.H., Soltis, S.M., Finnegan, M. G., Johnson, M. K. y Rees, D.C. 1997. Redox-dependent structural changes in the nitrogenase P-cluster. *Biochem.* 36:1181-1187.
84. Pienkos, P. T., Bodmer, P. y Tabita, F.R. 1983. Oxygen inactivation and recovery of nitrogenase activity in cyanobacteria. *J Bacteriol.* 153 (1):182-190.
85. Pizarro, P. 2003. Estudio de especies químicas en la laguna Carén. Seminario de título, Química Ambiental, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

86. Pope, M. T., Still, E.R. y Williams, R.J.P. 1980. A comparison between the chemistry and biochemistry of molybdenum and related elements. In M.P. Coughlan (ed.), Molybdenum and molybdenum containing enzymes. Pergamon. pp 3-40.
87. Raymond, J., Siefert, J.L., Staples, C.R. y Blankenship, R.E. 2004. The Natural History of Nitrogen Fixation. Mol. Biol. Evol. 21(3):541-554.
88. Reddy, K.J., Munn, L.C. y Wang, L. 1997. Chemistry and mineralogy of molybdenum in soils. In: Gupta UC, (ed.) Molybdenum in agriculture. Cambridge: Cambridge University Press.
89. Rees, D. C. y Howard, J.B. 2000. Nitrogenase: standing at the crossroads. Curr. Opin. Chem. Biol. 4:559-566.
90. Reynolds, C.S. 1999. Non-determinism to probability, or N: P in the community ecology of phytoplankton. Arch Hydrobiol. 146:23-35.
91. Rizzo, A. , Daga, R., Arcagni, M., Perez C., S., Bubach, D., Sánchez, R., Ribeiro G., S., Arribére, M.A. 2010. Concentraciones de metales pesados en distintos compartimentos de lagos andinos de Patagonia Norte. Ecol. Austral. 20(2):155-171.
92. Rossmann, R y Barres, J. 1988. Trace element concentrations in near-surface waters of the Great Lakes and methods of collection, storage, and analysis. J. Gt. Lakes Res. 14(2):188-204.
93. Ruttner. 1963. Fundamentals of limnology, 3er ed. Univ. Toronto Press, Toronto, Canada. 295 p.
94. Ryther, J. H. y Dunstan, W.M. 1971. Nitrogen, phosphorus and eutrophication in the coastal marine environment. Science. 171:1008-1013.
95. Schindler, DW. 1977. Evolution of Phosphorus Limitation in Lakes, Science. 195(4275):260-262.
96. Seefeldt, L.C., Dance, I.G. y Dean, D.R. 2004. Substrate Interactions with Nitrogenase: Fe versus Mo. Biochem. 43:1401-1409.
97. Shah, V.K., Ugalde, R.A., Imperial, J. y Brill, W.J. 1984. Molybdenum in

- nitrogenase. *Annu. Rev. Biochem.* 53:231-257.
98. Sherrell, R. M. y Ross, J.M. 1999. Temporal variability of trace metals in New Jersey Pinelands Streams: Relationships to discharge and pH. *Geochimical et Cosmochimica Acta.* 63:3321-3336.
 99. Sigel, A. y Sigel, H. 2002. Molybdenum and Tungsten: Their Roles in Biological Systems. New York, NY: Marcel Dekker.
 100. Simpson, F. B. y Burris, R. H. 1984. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. *Science.* 224:1095-1097.
 101. Smith, V. H. 1983. Low nitrogen to phosphorus ratios favour dominance by blue-green algae in Lake Phytoplankton. *Science.* 221:669-671.
 102. Smith, V. H. 2003. Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems: a global problem. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 10:126-139.
 103. Spencer, C.P. 1957. On the use of antibiotics for isolating bacteria-free cultures of marine phytoplankton organisms. *J. gen. Microbiol.* 16:282-285.
 104. Spiro, T. G. 1985. Molybdenum Enzymes. WileyInterscience, New York (NY).
 105. Sprent, J. y Sprent, P. 1990. Nitrogen fixing organisms. Pure and applied aspects. Chapman and Hall, Cambridge. Great Britain. pp. 256.
 106. Steinberg, C.E.W. y Hartmann, H.M. 1988. Planktonic bloomforming Cyanobacteria and the eutrophication of lakes and rivers. *Freshwater Biol.* 20(2):279-287.
 107. Stewart, W.D.P., Fitzgerald, G.P. y Burris, R.H. 1968. Acetylene reduction by nitrogen fixing blue-green algae. *Arch. Microbiol.* 62:336-348.
 108. Stewart, W. D. P. y Alexander, G. 1971. Phosphorous availability and nitrogenase activity in aquatic bluegreen algae. *Freshwater Biol.* 1:389-404.
 109. Tezcan, F. A., Kaiser, J.T., Mustafi, D., Walton, M.Y., Howard, J.B. Y Rees, D.C. 2005. Nitrogenase complexes: multiple docking sites for a nucleotide switch protein. *Science.* 309:1377-1380.
 110. Tilman, D. 1981. Test of resources competition theory using four species of Lake

- Michigan algae. Ecology. 62:802-815.
111. Tilman, D. 1982. Resource competition and community structure. Princeton University Press, Princeton.
 112. Tilzer, M. M. 1987. Light-dependence of photosynthesis & growth in cyanobacteria: implications for their dominance in eutrophic lakes. NZ J. Mar. Freshwater Res. 21:401-412.
 113. Todar, K. 2004. Todar's Online Textbook of Bacteriology. Important Groups of Prokaryotes.
 114. Tong, C. H., Yang, X.E. y Pu, P.M. 2003. Degradation of aquatic ecosystem in the catchment of Mu-Ge Lake and its Remediation countermeasures. J. Soil and Water Conserv.17(1):72-88.
 115. Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Mitteilungen der Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie. 9:1-38.
 116. Vitousek, P.M. y Howarth, R.W. 2008. Nitrogen limitation on land in the sea: How can it occur? Biogeochemistry. 13(2):87-115.
 117. Watanabe, A. 1973. On the inoculation of paddy fields in the Pacific area with nitrogen blue-green algae. Soil Biol Biochem. 5:161-162.
 118. Wolfe, M. 1954. The effect of molybdenum upon the nitrogen metabolism of *Anabaena cylindrica* 1. A study of the molybdenum requirement for nitrogen fixation, and for nitrate and ammonia assimilation. Ann. Bot. N.S. 18:299-308.
 119. Wolk, C. P., Ernst, A. y Elhai, J. 1994. Heterocyst metabolism and development. In The molecular biology of cyanobacteria (ed. Bryant D.A.), pp. 769-863 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
 120. Zexing, C., Zhou, J., Wan, H. y Zhang, Q. 2005. Enzymatic and Catalytic Reduction of Dinitrogen to Ammonia: Density Functional Theory Characterization of Alternative Molybdenum Active Sites. Inter. J. Quantum Chemis. 103:344-353.