



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Programa de Magíster en Ciencias con mención en Oceanografía

**Origen y ciclaje del óxido nitroso (N₂O) en cultivos
monoclonales de microalgas marinas: el caso de las clorófitas
Micromonas pusilla y *Nannochloris* sp.**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en Oceanografía

CYNTHIA VANESSA ESCARES CIFUENTES

CONCEPCIÓN-CHILE

2015

Profesor guía: Dra. Laura Farías

Departamento de Oceanografía,

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Universidad de Concepción

La tesis de Magíster en Ciencias con mención en Oceanografía titulada “Origen y ciclaje del óxido nitroso (N₂O) en cultivos monoclonales de microalgas marinas: el caso de las clorófitas *Micromonas pusilla* y *Nannochloris* sp.” de la Srta. Cynthia Vanessa Escares Cifuentes realizada en el Departamento de Oceanografía de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, ha sido aprobada por la siguiente Comisión de Evaluación:

Laura Farías
Profesor Guía
Universidad de Concepción

Beatriz Diez
Profesor Co-Guía
Pontificia Universidad
Católica de Chile

Oswaldo Ulloa
Miembro del Comité de tesis
Universidad de Concepción

Laura Farías
Director de Programa
Universidad de Concepción



AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no hubiese sido posible sin la guía y apoyo de mi tutora la Dra. Laura Farías quien me dio las herramientas y la confianza para poder desarrollar esta investigación. También quisiera agradecer profundamente al Laboratorio de Oceanografía Microbiana (LOM) y al Dr. Osvaldo Ulloa por la buena disposición que siempre tuvo hacia mi trabajo en su laboratorio.

Mi eterno agradecimiento a mis compañeros de Laboratorio de Biogeoquímica, a todos y cada uno de ellos, especialmente a Gerardo García, por dedicarme pacientemente horas de su preciado tiempo y por responder todas a mis dudas, y Sandra Sanhueza por todo el trabajo que compartimos para nuestras tesis. A mis compañeros de postgrado, que sin duda alguna han sido siempre una luz en el camino.

Por último, agradezco de manera especial a Silvana Collado-Fabri, Alejandro Murillo y Álvaro Muñoz por su apoyo en la metodología de este trabajo, y a Nathalie Del'herbe por entregarme todo su conocimiento en el manejo de cultivos y herramientas moleculares.

CURICULLUM VITAE

Cynthia Vanessa Escares Cifuentes

22 de noviembre 1984, Los Ángeles, Chile

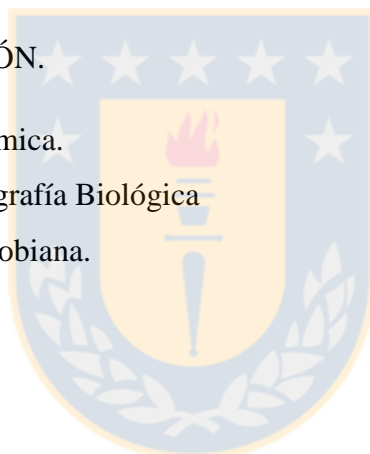
- 2007-2012: Biología Marina; Universidad de Concepción, Chile.
- 2012-2015: Magíster en Ciencias con mención Oceanografía, Universidad de Concepción, Chile.

PUBLICACIONES.

- Escares C., Florez-Leiva L., Farías L. 2015. Production of Nitrous Oxide in different microalgae culture regimes. Enviado Algal Research.

AREAS DE INVESTIGACIÓN.

- Principal: Biogeoquímica.
- Secundaria: Oceanografía Biológica
- Otras: Ecología Microbiana.



EXPERIENCIA DOCENTE.

Ayudantías Universidad de Concepción:

- asignatura Oceanografía II, Universidad de Concepción, Chile, 2011-2012-2013
- asignatura Taller de Sistemas Pelágicos, Universidad de Concepción, Chile, 2012.
- asignatura Zoología general I, Universidad de Concepción, Chile, 2010.

Otros

- asignatura Bases Biológicas del ser Humano y la Pedagogía, Instituto Profesional Providencia, Chile, 2013

CRUCEROS OCEANOGRÁFICOS.

- Serie de tiempo, Departamento de Oceanografía, Universidad de Concepción, Concepción, Chile. 2011-2013.

- MILOCO, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.2009.
- MPH 3-4 Instituto Fomento Pesquero (IFOP), Chile, agosto- septiembre- 2014.
- Jurel Norte Instituto Fomento Pesquero (IFOP), Chile, marzo- abril- 2015.
- MPH 3-4 Instituto Fomento Pesquero (IFOP), Chile, agosto- septiembre- 2015.

ESTADIAS DE INVESTIGACIÓN

- Laboratorio de Biogeoquímica. Departamento de Oceanografía, Universidad de Concepción. Dra. Laura Farías, Chile, agosto 2012-enero 2014.
- Laboratorio de Oceanografía Microbiana (LOM).Departamento de Oceanografía, Universidad de Concepción. Dr. Osvaldo Ulloa, Chile, enero 2013-enero 2014.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El rol del óxido nitroso (N ₂ O) en el clima de la Tierra.....	1
1.2. El rol del océano en la producción y ciclaje de N ₂ O.	1
1.3. Vías de producción de N ₂ O en la columna de agua.....	2
1.3.1. La nitrificación y la nitrificación-desnitrificante como vía de producción de N ₂ O en aguas oxigenadas.....	2
1.3.2. La desnitrificación como vía de producción/consumo de N ₂ O en aguas hipóxicas.....	4
1.3.3. La nitrato amonificación como vía de producción de N ₂ O en ambientes deficientes de oxígeno.....	5
1.3.4. Procesos asimilativos como vía potencial de ciclaje del N ₂ O.....	5
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
2.1. Hipótesis.....	10
2.2. Objetivo general.....	10
2.3. Objetivos específicos	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. Obtención y cultivo de los modelos biológicos.....	11
3.2. Caracterización de condiciones de cultivo y la curva de crecimiento de microalgas.....	12
3.3. Metodología para cumplir con el objetivo 1.	
3.3.1. Bacterias acompañantes en cultivos de microalgas: análisis del gen 16S rRNA por DGGE.....	13
3.3.2. Análisis PCR para beta-proteobacteria y arqueas amonio oxidante.....	15
3.4. Metodología para cumplir objetivos 2 y 3.....	17
4. RESULTADOS	22
4.1. Caracterización de la curva de crecimiento de los modelos biológicos	22
4.2. Presencia del gen funcional <i>amoA</i> y la composición filogenética de la comunidad bacteriana mediante el gen 16S rRNA.....	27

4.2.1.	Análisis de la comunidad microbiana mediante el gen 16S rRNA a través de la técnica de electroforesis en gel de gradiente denaturante (DGGE).....	27
4.2.2.	Análisis para determinar la presencia del gen <i>amoA</i> para beta-proteobacterias amonio oxidantes y arqueas amonio oxidantes a través de PCR.	29
4.3.	Variación en la concentración de N ₂ O en cultivos monoclonales de microalgas marinas y su respuesta a distintas sales nitrogenadas.	31
4.3.1.	Evolución temporal de N ₂ O en un cultivo de <i>Micromonas pusilla</i>	31
4.3.2.	Evolución temporal de N ₂ O en un cultivo de <i>Nannochloris</i> sp.....	35
4.3.3.	Publicación	39
4.4.	Variación en la concentración de N ₂ O en cultivos monoclonales de microalgas marinas y su respuesta frente a la inhibición de la fotosíntesis.	70
5.	DISCUSIÓN GENERAL.....	74
6.	CONCLUSIONES.....	83
7.	ANEXOS.....	84
7.1.	ANEXO I. Bacterias acompañantes de los cultivos de microalgas a través de Citometría de Flujo	84
7.2.	ANEXO II: Bandas obtenidas a través de DGGE para los cultivos de: A) <i>Micromonas pusilla</i> y B) <i>Nannochloris</i> sp.	86
7.3.	ANEXO III: concentración de N ₂ O (nmol L ⁻¹) en cultivo de <i>Micromonas pusilla</i>	87
7.4.	ANEXO IV: concentración de N ₂ O (nmol L ⁻¹) en cultivo de <i>Nannochloris</i> sp. ..	88
7.5.	ANEXO V: Data normalizada por biomasa para cultivos de <i>Micromonas pusilla</i> y <i>Nannochloris</i> sp.	89
8.	REFERENCIAS.....	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de PCR para análisis de 16 S rRNA general bacterias. GC358F-907RM (Massana & Balagué 2010).	15
Tabla 2. Genes y secuencias de nucleótidos analizados a través de PCR para beta-proteobacteria y arquea amonio oxidante.	16
Tabla 3. Condiciones de PCR para beta-proteobacterias amonio oxidantes. Extraído y modificado de Rotthauwe <i>et al.</i> (1997).	16
Tabla 4. Condiciones de PCR para arqueas amonio oxidantes. Extraído y modificado de Francis <i>et al.</i> (2005).	17
Tabla 5. Concentración de nutrientes adicionados al experimento de evolución de N ₂ O... ..	20
Tabla 6. Secuenciación del gen 16S rRNA general bacterias (GC358F-907RM), organismos acompañantes en los cultivos de <i>Micromonas pusilla</i> , y <i>Nannochloris</i> sp.	29
Tabla 7. Análisis t-student pareado; experimento de evolución de N ₂ O en un cultivo de <i>Micromonas pusilla</i>	32
Tabla 8. Análisis t-student pareado; experimento de evolución de N ₂ O en un cultivo de <i>Nannochloris</i> sp.	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Análisis moleculares para el gen 16S rRNA general bacterias.	14
Figura 2: Diseño experimental de crecimiento microalgas e inoculación con sales de nitrógeno.	20
Figura 3. Efecto de la inhibición del fotosistema II a través del DCMU.	21
Figura 4. Diseño experimental: Evolución temporal N ₂ O durante la inoculación con DCMU.	21
Figura 5. Curvas de crecimiento de: (a) <i>Micromonas pusilla</i> , (b) <i>Nannochloris</i> sp.	23
Figura 6. Abundancia celular de <i>Micromonas pusilla</i> y <i>Nannochloris</i> sp.	25
Figura 7. Abundancia celular para diversos grupos de biota acompañante.	26
Figura 8. Afiliación filogenética (basada en nucleótidos) de secuencias parciales del gen 16S rRNA de bacteria.	28
Figura 9. Amplificación del gen <i>amoA</i> específico para beta-proteobacterias amonio oxidantes.	30
Figura 10. Concentración de N ₂ O (nmol L ⁻¹) en un cultivo de <i>Micromonas pusilla</i> para tratamientos de adición de sales nitrogenadas	34
Figura 11. Concentración N ₂ O (nmol L ⁻¹) en un cultivo de <i>Nannochloris</i> sp.	38
Figura 12. Concentración de N ₂ O (nmol L ⁻¹) en un cultivo de <i>Micromonas pusilla</i> para tratamientos de adición de DCMU	72
Figura 13. Concentración de N ₂ O (nmol L ⁻¹) en un cultivo de <i>Nannochloris</i> sp. para tratamientos de adición de DCMU.	73
Figura 14. Modelo del acoplamiento de los fotosistemas I y II a través del flujo de electrones.	81
Figura 15. Modelo de la potencial vía de formación N ₂ O.	82

RESUMEN

Origen y ciclaje del óxido nitroso (N₂O) en cultivos monoclonales de microalgas marinas: el caso de las clorófitas *Micromonas pusilla* y *Nannochloris* sp.

Cynthia Escares Cifuentes. 2015. Profesor guía: Dra. Laura Farías

Programa Magíster en Ciencias con mención en Oceanografía. Universidad de Concepción.

El óxido nitroso (N₂O) es un potente gas de efecto invernadero presente en la atmósfera en concentraciones traza (320 ppbv) y con un potencial radiativo 300 veces mayor que el CO₂. El océano representa una fuente neta de este gas hacia la atmósfera, estimada en aproximadamente 3.9 Tg N año⁻¹, esto equivale a un 20 % de todas las fuentes naturales globales. Los microorganismos producen N₂O a través de rutas bioquímicas bien estudiadas como la desnitrificación y la nitrificación. No obstante, estudios recientes sugieren que organismos fotosintéticos también estarían involucrados en la producción de N₂O y NO. Sin embargo, las vías potenciales de producción de N₂O asociadas a microorganismos fotosintéticos marinos aún no han sido exploradas.

Con el objetivo de inferir sobre los mecanismos responsables del ciclaje del N₂O en las microalgas marinas *Micromonas pusilla* y *Nannochloris* sp. y discernir respecto a los organismos involucrados en la producción y/o consumo de este gas; se realizaron: 1) análisis moleculares para evaluar si los cultivos de microalgas marinas son efectivamente monoclonales y cuáles son las características de su biota acompañante (bacterias y/o arqueas); 2) experimentos para estimar la producción de N₂O en los cultivos de ambas microalgas, bajo ciclos de luz y oscuridad. Con la finalidad de dilucidar si el ciclaje de N₂O estuvo asociado a las microalgas o a su biota acompañante, se realizaron incubaciones con los siguientes tratamientos: 1) fracción total "FT" (microalga y su biota acompañante) y 2) fracción bacteriana "FB" (tamaño celular < 1.2 μm). Adicionalmente se realizaron incubaciones con nutrientes NO₃⁻ (FT+NO₃⁻) y NH₄⁺ (FT+ NH₄⁺), y con un inhibidor del fotosistema II, 3,4-diclorofenil-1,1-dimetil urea (FT+DCMU).

Los análisis moleculares indicaron que los cultivos de microalgas son monoclonales y que existe la presencia potencial de bacterias amonio oxidante. Los experimentos de

evolución temporal de N₂O mostraron la producción de dicho gas y que esta producción podría estar relacionado tanto a bacterias, como a microalgas marinas. Además, los experimentos de reciclaje mostraron que ambos cultivos de microalgas produjeron N₂O, tanto en la fracción FB como en FT. Las mayores concentraciones fueron en horas luz para ambas microalgas; *Micromonas pusilla* presentó valores de $11.6 \pm 1.6 \text{ nmol L}^{-1}$ en FT y $8.0 \pm 1.1 \text{ nmol L}^{-1}$ en FB. En contraste, *Nannochloris* sp. que presentó valores de $7.3 \pm 0.4 \text{ nmol L}^{-1}$ en FT y de $6.9 \pm 0.2 \text{ nmol L}^{-1}$ en FB.

En los tratamientos con adición de nutrientes (NH₄⁺ y NO₃⁻) las concentraciones de N₂O también fueron mayores en horas luz; *Micromonas pusilla* presentó valores más altos en el tratamiento FT+ NH₄⁺ ($11.2 \pm 1.5 \text{ nmol L}^{-1}$) respecto a FT+ NO₃⁻ ($9.2 \pm 1.2 \text{ nmol L}^{-1}$). En contraste, *Nannochloris* sp. presentó valores más bajos en ambos tratamientos. En los tratamientos con la adición de DCMU, la acumulación de N₂O en horas de oscuridad fue 2 y 3 veces mayor que el control en *Micromonas pusilla* (11.3 nmol L^{-1}) y *Nannochloris* sp. (33.5 nmol L^{-1}), respectivamente. Una posible vía de producción de N₂O es a través de la inhibición de la fotosíntesis, ya que al bloquear el flujo de electrones del fotosistema II afectaría la disponibilidad de ferredoxina para la asimilación de NO₂, el cual al acumularse intracelularmente sería contrarrestado a través de mecanismos de detoxificación en la forma de gases de nitrógeno, como lo son NO y N₂O.

Nuestros resultados indican que cultivos de *Micromonas pusilla* y *Nannochloris* sp. están involucrados en la producción N₂O y que esta producción se incrementaría al inhibir la fotosíntesis. Estos microorganismos, junto a otras microalgas clorófitas, podrían tener un importante rol en el ciclo marino del nitrógeno (N₂O), el cual aún no ha sido cuantificado, representando una ruta alternativa vía fotosíntesis y de asimilación de nutrientes nitrogenados en la producción del gas invernadero N₂O.

ABSTRACT

Origin and cycling of nitrous oxide (N₂O) in cultures monoclonal marine microalgae: the case of the chlorophytes *Micromonas pusilla* and *Nannochloris* sp.

Cynthia Escares Cifuentes. 2015. Advisor: Dra. Laura Farías

Master of Sciences, mention in Oceanography, University of Concepcion

Nitrous oxide (N₂O) is a strong biogenic greenhouse gas present in the atmosphere in trace concentrations (320 ppbv) and with a radiative potential of 300 times than carbon dioxide (CO₂). The ocean is a net source of N₂O into the atmosphere, with an estimated rate around 3.9 Tg N yr⁻¹, which is 20 % of all global natural sources. N₂O is produced by microbes through biochemical pathways such as nitrification and denitrification, both mechanisms which have been deeply studied. Recent studies suggest that photosynthetic organisms are also involved in N₂O production. However, the potential N₂O production pathways associated with marine photosynthetic microorganisms have not yet been explored.

With the aim of inferring the mechanisms responsible for cycling of the N₂O in the marine microalgae *Micromonas pusilla* and *Nannochloris* sp. and discerning the organisms involved in the production and /or consumption of gas, we performed: 1) molecular analyses to evaluate if the two microalgae cultures were monoclonal and the characteristics of their associated biota (bacteria and or archaea) and 2) experiments to evaluate if N₂O production by the microalgae cultures, under cycle of light and darks. In the experimental design, we used the following treatments to determine if N₂O cycling was attributable to the microalgae or their associated biota: 1) the total fraction "FT" (containing both microalgae and the associated biota) and 2) only the bacterial fraction "FB" (cell size <1.2 μm). In addition, the incubations were inoculated with the nutrients: NO₃⁻ (FT + NO₃⁻) and NH₄⁺ (FT + NH₄⁺), and with a photosystem II inhibitor, 3,4-dichlorophenyl-1,1-dimethyl urea (FT+ DCMU).

Molecular analyses indicated that microalgae cultures were monoclonal and that there was a potential presence of ammonium-oxidizing bacteria. N₂O cycling experiments revealed a strong N₂O production related to both, bacteria and marine microalgae cultures since both fractions, FB and FT, exhibited an accumulation of N₂O. The highest

concentrations were found during daylight hours for both microalgae. *Micromonas pusilla* N₂O production values as high were as 11.6 ± 1.6 nmol L⁻¹ in FT; and 8.0 ± 1.1 nmol L⁻¹ in FB. In contrast to *Nannochloris* sp. values were similar in both treatments, 7.3 ± 0.4 nmol L⁻¹ in FT and 6.9 ± 0.2 nmol L⁻¹ in FB.

The experiments with nutrient addition also showed highest N₂O concentrations during daylight; *Micromonas pusilla* displayed higher values in the FT + NH₄⁺ treatment (11.2 ± 1.5 nmol L⁻¹) than in FT + NO₃⁻ (9.2 ± 1.2 nmol L⁻¹). In contrast, *Nannochloris* sp. values were lower in both treatments. In the treatments with the addition of DCMU, the accumulation of N₂O under darkness was 2 and 3 times greater than in the controls of *Micromonas pusilla* (11.3 nmol L⁻¹) and *Nannochloris* sp. (33.5 nmol L⁻¹), respectively. One possible way of N₂O production is through the inhibition of photosynthesis which, in turn, could be related to the blocking the electron flow in photosystem II. This would affect the availability of ferredoxin for the assimilation of NO₂⁻ which, when intracellularly accumulated, would be readily eliminated through detoxification mechanisms producing nitrogen gases such as NO and N₂O.

Our results indicate that *Micromonas pusilla* and *Nannochloris* sp. cultures are involved in N₂O production and this would increase by inhibiting the photosynthesis. These microorganisms, together with other chlorophytes, could play an important role in the marine nitrogen cycle (N₂O), which has not yet been well explained, representing an alternative route of N₂O production via photosynthesis and nitrogen nutrient assimilation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El rol del óxido nitroso (N₂O) en el clima de la Tierra.

El Planeta Tierra absorbe energía proveniente del sol, la que es imprescindible para la vida en éste; una parte de esta energía es reflejada hacia el espacio y otra es irradiada hacia la atmósfera exterior en forma de calor (energía infrarroja) mientras que una porción de ella queda retenida en la superficie de la Tierra. Esto es debido a la presencia de gases de efecto invernadero (GEI) en la atmósfera. El vapor de agua (H₂O), el dióxido de carbono (CO₂), el metano (CH₄) y el óxido nitroso (N₂O) son los gases de efecto invernadero con mayor impacto en el balance radiativo del planeta, y desempeñan, por lo tanto, un importante papel en el control de la temperatura atmosférica (Sarmiento & Gruber, 2006). Entre estos gases, el N₂O contribuye alrededor de un 6% del forzante radiativo del planeta (Prather *et al.*, 1995; Punshon & More, 2004); además, el N₂O es el precursor del óxido nítrico (NO) (McElroy & McConnell, 1961), el cual es un potente destructor de la capa de ozono que es capaz de catalizar la ruptura del O₃, jugando así un importante rol en la fotoquímica de la estratósfera (Johnston, 1971).

Según el Panel Intergubernamental para el Cambio Climático (IPCC, 2007), las emisiones de GEI han aumentado en un 70% entre los años 1970 y 2004. En el caso del N₂O, este aumento deriva principalmente del incremento en las actividades agrícolas que añaden fertilizantes ricos en nitrógeno a suelos cultivables, lo que conlleva a un incremento exponencial de este gas en la atmósfera. El océano también representa una fuente neta de este gas hacia la atmósfera, estimada en aproximadamente 3.9 Tg N año⁻¹, equivalente a un 20 % de todas las fuentes naturales globales (IPCC, 2007).

1.2. El rol del océano en la producción y ciclaje de N₂O.

En una escala global, la superficie del océano se encuentra ligeramente sobresaturada de N₂O, con niveles cercanos a 105% saturación respecto a la atmósfera (Nevison *et al.*, 1995). El origen de esta saturación ha sido explicado por la advección o difusión de este gas desde aguas sub-superficiales, usualmente sobresaturadas en N₂O, dada las características de bajas concentraciones de oxígeno y una alta depositación de material orgánico detrítico (particularmente en las picnoclinas), que favorecen la producción de

N₂O (Charpentier *et al.*, 2007). Este es el caso de las zonas de afloramiento costero, donde se han reportado sobresaturaciones superficiales de N₂O particularmente altas, debido principalmente al aumento de la carga orgánica (eutrofización) de las aguas superficiales y de la hipoxia en las aguas de fondo; un ejemplo de esto es la plataforma India alcanzando hasta 8.250% de saturación (Naqvi *et al.*, 2000) y de Chile central con niveles de 4849% de saturación (Farías *et al.*, 2015).

1.3. Vías de producción de N₂O en la columna de agua.

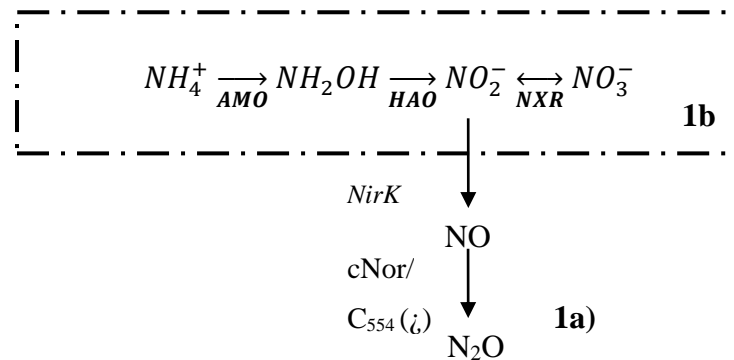
El N₂O se produce y utiliza naturalmente en aguas continentales, suelos y océanos, siendo los procesos microbianos mediados por bacterias y arqueas los responsables de su ciclaje. El N₂O producido en los sistemas acuáticos y que no es utilizado en distintos procesos microbianos se escapa a través de la interface mar-atmósfera, permaneciendo en la atmosfera por aproximadamente 120 años, teniendo como destino final su destrucción en la estratosfera (Sarmiento & Gruber, 2006).

Los principales procesos microbianos descritos en la producción de N₂O corresponden a la nitrificación y la desnitrificación. Mientras que la nitrificación corresponde a un proceso quimiolitotrófico, la desnitrificación, en cambio, puede ser un proceso heterótrofo asociado a la respiración anaeróbica de la materia orgánica, a través de la reducción secuencial de NO₃⁻ a N₂O y N₂, o bien un proceso autotrófico en el donde el azufre puede actuar como donador de electrones (Van Loosdrecht *et al.*, 1998), aunque es la desnitrificación heterótrofa el principal productor de N₂O vía desnitrificación parcial.

1.3.1. La nitrificación y la nitrificación-desnitrificante como vía de producción de N₂O en aguas oxigenadas.

La nitrificación es un proceso de oxidación aeróbica del amonio (OAA) y de oxidación aeróbica nitrito (OAN) para obtener una fuente de energía, dicho proceso es autotrófico al usar el carbono inorgánico como fuente de carbono (Codispoti & Christensen, 1985). En este proceso, el NH₄⁺ se oxida hasta NO₂⁻, por lo que el N₂O es un subproducto de la oxidación desde la NH₂OH a NO (Reacción 1a), esta reacción es mediada por la enzima hidroxilamina oxigenasa (HAO) (Schreiber *et al.*, 2012). Por otra parte, el N₂O también ha sido reportado en el proceso conocido “nitrificación desnitrificante” (Reacción 1b), el cual está mediado por bacterias amonio oxidante (AOB)

y nitrito oxidantes (NOB) (Schreiber *et al.*, 2012). Aquí, el NH_4^+ es oxidado a NO_2^- para luego experimentar un proceso de reducción, teniendo como intermediario al N_2O (Arp & Stein, 2003). Esta es un reacción altamente dinámica y podría deberse a un mecanismo de detoxificación de NO_2^- , el cual a ciertas concentraciones puede ser tóxico (Beaumont *et al.*, 2002).



Reacción 1a): corresponde a la reacción de **nitrificación**, donde ocurre una oxidación desde NH_4^+ a NO_3^- , las enzimas involucradas son: AMO (amonio oxigenasa), HAO (hidroxilamina oxigenasa), NXR (nitrito oxido-reductasa). La reacción 1b): es el proceso de **nitrificación desnitrificante**, en donde el NO_2^- es reducido teniendo como intermediario N_2O , involucra las enzimas: NiR (nitrito reductasa), NOR (óxido nítrico reductasa) (Schreiber *et al.*, 2012).

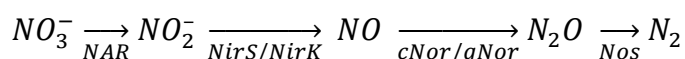
Tanto el proceso de nitrificación como la nitrificación desnitrificante requieren O_2 para activar la enzima amonio monooxigenasa (AMO), por lo que es un proceso estrictamente aeróbico el cual genera hidroxilamina (NH_2OH), este es un sustrato que se utiliza tanto para la oxidación a NO_2^- en la nitrificación (hidroxilamina oxigenasa), como agente reductor (dador de electrones) en la “nitrificación-desnitrificante” (Schreiber *et al.*, 2012).

En aguas superficiales, el N_2O puede ser advechado y/o difundido desde las aguas sub-superficiales, pero es posible que parte del N_2O también pueda estar siendo producido *in situ* por microorganismos nitrificantes. Muchos estudios demuestran que bacterias y arqueas amonio-oxidantes presentan distinta sensibilidad a condiciones de pH (Nicol *et al.*, 2008), temperatura (Tourna *et al.*, 2008) y concentración de NH_4^+ (Martens-Habbena *et al.*, 2009). De todas las variables señaladas, la luz podría ser el principal factor responsable de la inhibición de la AOB en aguas superficiales (Horrihan *et al.* 1981). Se ha demostrado que ambos grupos (AOB, AOA) presentan distinta sensibilidad a la foto inhibición, por lo

que afecta la distribución y diversidad de estos microorganismos en aguas superficiales (Merbt *et al.* 2011). Sin embargo, son AOA las dominantes sobre AOB, por lo que estas serían los organismos claves en la producción de N₂O a través de la nitrificación (Santoro *et al.*, 2011, Löscher *et al.* 2012).

1.3.2. La desnitrificación como vía de producción/consumo de N₂O en aguas hipóxicas.

La desnitrificación heterótrofa (Reacción 2) es un proceso de respiración anaeróbica de la materia orgánica, donde los aceptores de electrones corresponden a NO₃⁻, NO₂⁻, NO y N₂O. Si la desnitrificación es completa, se produce N₂, mientras que si la desnitrificación es parcial, la reacción se detiene en el N₂O. La regulación de la desnitrificación ha sido explicada a través de las concentraciones umbrales de O₂ sobre cada una de estas reducciones. La desnitrificación parcial y acumulación de NO y N₂O ocurre bajo condiciones de subóxica (O₂ < 0.1 ml L⁻¹) (Castro *et al.*, 2004; Naqvi *et al.*, 2010), mientras que la desnitrificación total que tiene como producto final N₂ ocurre bajo condiciones anóxicas (Dalsgaard *et al.*, 2012). Además, las enzimas responsables de cada reducción necesitan co-factores enzimáticos como el molibdeno (Mo) para la reducción de NO₃⁻, hierro (Fe) o cobre (Cu) para la reducción de NO₂⁻; Fe para la reducción de NO; y Cu para la reducción de N₂O. El mecanismo de incorporación de estos co-factores es aún desconocido y probablemente sean claves para una completa apreciación de su rol en las emisiones de N₂O al medio ambiente (Richardson *et al.*, 2009).



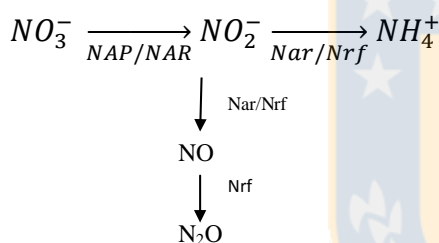
Reacción 2: reacción del proceso de desnitrificación, las enzimas involucradas son; NAR (nitrito reductasa), NiR (nitrito reductasa), NOR (óxido nítrico reductasa) y NOS (óxido nitroso reductasa) (Schreiber *et al.*, 2012).

Como las aguas superficiales son oxigenadas debido a la fotosíntesis y su proximidad con la atmósfera, la producción de N₂O en aguas superficiales de los océanos podría explicarse sólo por procesos de nitrificación, ya que la desnitrificación en aguas oxigenadas se vería inhibido por las altas concentraciones de oxígeno (Morley *et al.*, 2008), al menos que existan micro-nichos anóxicos colonizados por bacterias anaeróbicas;

como es el caso de consorcio entre bacterias anammox (bacterias anaerobias oxidantes del amonio) y grupos del bacteriopláncton en zonas subóxicas de afloramiento costero en Namibia (Woebken *et al.*, 2007).

1.3.3. La nitrato amonificación como vía de producción de N₂O en ambientes deficientes de oxígeno.

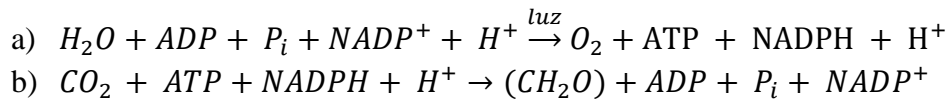
Por otra parte, el N₂O también se produce por procesos heterotróficos fermentativos como la disimilación reductora de NO₂⁻ a NH₄⁺ (DNRA), también conocida como nitrato amonificación: esta ocurre en zonas deficientes de O₂ como en sedimentos y en la columna de agua (Reacción 3) (Kartal *et al.*, 2007). Este mecanismo ha sido ampliamente estudiado, siendo las bacterias heterótrofas como por ejemplo *Escherichia coli*, quien puede producir N₂O por un mecanismo de detoxificación de NO a través de flavorubredoxina (Costa *et al.*, 1990).



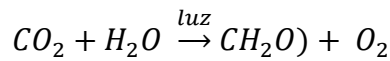
Reacción 3: reacción de nitrato amonificación: reducción de nitrato a amonio teniendo como intermediario N₂O, las enzimas involucradas son: NAR (nitrato reductasa), NRF (citocromo c nitrito reductasa), la producción de N₂O puede representar una detoxificación de nitrito a través de la enzima flavorubredoxina (Schreiber *et al.*, 2012).

1.3.4. Procesos asimilativos como vía potencial de ciclaje del N₂O.

La fotosíntesis (Reacción 4) por parte de microalgas y cianobacterias es uno de los procesos más importantes en el océano (Horton *et al.* 1995). Esta está compuesta por una serie de reacciones que comprenden la fotólisis del agua y la asimilación de carbono inorgánico. La asimilación de carbono está ligada a la asimilación de nitrógeno y fósforo, pues son los elementos constituyentes de ATP y NAPH generados en la fotosíntesis (Horton *et al.* 1995).



En suma:

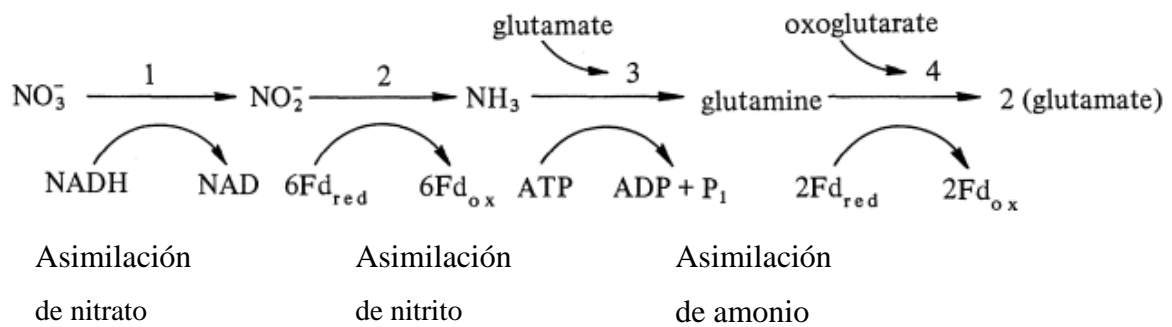


Reacción 4 Las reacciones parciales y reacción neta de la fotosíntesis (Horton *et al.* 1995):

La Reacción 4 es posible debido a que los organismos fotosintéticos son capaces de utilizar la energía luminosa y utilizarla en su metabolismo. En esta fase ocurre la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i por acción de los protones derivados del agua, mientras que un átomo de hidrogeno del agua se utiliza para la reducción del $NADP^+$ a NADPH, siendo la ruptura de la molécula de agua lo que deriva en la producción de oxígeno gaseoso.

El segundo proceso (b) no es dependiente de la luz y utiliza a través de una serie de reacciones, el NADPH y el ATP formado en la reacción (a), permitiendo la reducción del CO_2 gaseoso a la forma de carbohidratos.

El proceso de asimilación de nutrientes se acopla a la asimilación de carbono inorgánico en los organismos fotosintéticos, debido a que el fitoplancton incorpora nitrógeno inorgánico (fundamentalmente en la forma de iones NO_3^- ; NO_2^- ; NH_4^+). Las formas oxidadas de nitrógeno se reducen intracelularmente (Taiz & Zeiger, 2010), siendo asimilado en el citoplasma hasta reducirse a NH_4^+ , para la posterior síntesis de aminoácidos a través de glutamina y glutamato sintetasa (Tempest *et al.*, 1973). La energía necesaria para este proceso asimilativo es tomada directamente del poder reductor del NADPH generado en la fotosíntesis (Ulrich, 1983) (Reacción 5). Las tasas de asimilación de nitrógeno biodisponible en microalgas están directamente relacionadas con la intensidad luminosa, por lo que estas son mayores en condiciones de luz que en oscuridad (Payne 1973). No obstante, la enzima NR (nitrato reductasa) que se encuentra en el citoplasma puede reducir el NO_3^- a NO_2^- también en oscuridad, siempre y cuando exista disponibilidad de NADPH en el citoplasma. Caso contrario ocurre con la enzima NiR, la cual se encuentra en el cloroplasto y no puede llevar a cabo la reducción de NO_2^- a NH_4^+ si la fotosíntesis no regenera ferredoxina reducida (Fd red). (Sakihama *et al.*, 2002; Taiz & Zeiger, 2010).



Reacción 5: 1. Nitrato reductasa 2. Nitrito reductasa 3. Glutaminasintetasa 4. Glutamato sintetasa (GOGAT).

La ruta Glutamato y Glutamina sintetasa (GS/GOGAT) es la principal vía de asimilación de nitrógeno en las plantas; la GS tiene una alta afinidad por el NH_4^+ y puede operar en muy bajas concentraciones de NH_4^+ en la célula. Estudios de marcaje isotópico demuestran que el NH_4^+ es incorporado fundamentalmente en el grupo amino de la glutamina, y luego aparece en los grupos amino del glutamato (Buchanan *et al.*, 2000). El paso final de la incorporación del ion NH_4^+ es el nitrógeno amínico de glutamina, el cual consume un equivalente de energía de 12 ATP. (Taiz & Zeiger, 2010). Las células vegetales evitan la toxicidad del NH_4^+ producido por la reducción de NO_2^- o foto respiración, por lo que rápidamente convierten el NH_4^+ generado en aminoácidos. La principal vía para esta conversión, consiste en reacciones secuenciales de glutamina sintetasa. Estudios demuestran que tanto el N_2O como el NO podrían ser subproductos en el proceso de asimilación de nutrientes durante la fotosíntesis (Weathers, 1984; Sakihama *et al.*, 2002; Guieysse *et al.* 2013). Como ejemplo de ello, las microalgas del género *Chlamydomonas* son capaces de producir NO a través de la enzima NiR (nitrito reductasa) en el proceso de asimilación de NO_2^- y en condiciones de oscuridad o de inhibición del transporte de electrones del fotosistema II (Sakihama *et al.*, 2002). Estudios realizados en organismos fotosintéticos terrestres, específicamente en hojas de trigo, demuestran que existe producción de N_2O a través de la asimilación de NO_2^- relacionado también con la actividad de la enzima nitrito reductasa (NiR) (Smart & Bloom 2001). Existen antecedentes tempranos de producción de N_2O en cultivos axénicos de microalgas clorófitas, donde se ha observado producción del gas durante la asimilación de especies nitrogenadas, particularmente las más oxidadas como el NO_3^- y el NO_2^- (Weathers, 1984). Esto incitó a nuevas investigaciones quienes corroboraron el hecho que cultivos de microalgas reciclan activamente el N_2O , pero al ser cultivos no axénicos, la micro-biota

acompañantes podría ser el responsable de tal ciclaje. Como lo demuestran los resultados de Fagerstone *et al.* (2011), quienes registran elevadas emisiones de N₂O en cultivo de microalga *Nannochloropsis salina* en condiciones de oscuridad. Los análisis moleculares de estos experimentos reportaron la presencia de bacterias desnitrificantes, quienes serían las responsables de la producción del gas en presencia de NO₃⁻ y en condiciones anóxicas.

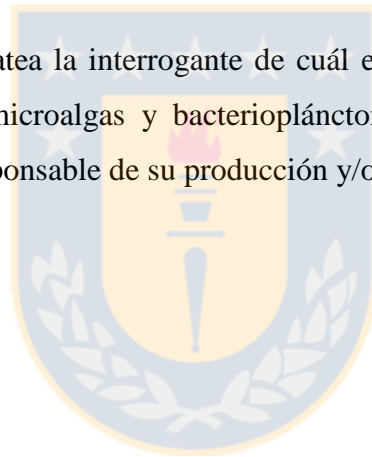
Recientemente, Guieysse *et al.* (2013) demuestran que el N₂O se genera a partir de cultivos axénicos de *Chlorella vulgaris*. Estas observaciones sugieren que la formación de N₂O en *C. vulgaris* podría proceder a través de la reducción de NO₂⁻ (mediada por nitrato reductasa), produciendo NO que puede actuar como precursor de N₂O, esto representa una vía similar a la formación de N₂O en bacterias desnitrificantes. Alternativamente, NR puede reducir el nitrito a nitroxilo (HNO) el cual puede dimerizar a N₂O bajo condiciones óxicas. No obstante la reducción de NO a N₂O en condiciones oxigenadas sigue sin demostrarse cabalmente en células vegetales.

Relativo a procesos alternativos que ciclan N₂O, actualmente, el único proceso conocido de consumo de N₂O en el océano es la desnitrificación total o reducción desasimilativa de N₂O a N₂, la que ocurre en condiciones de anoxia/suboxia, (Codispoti *et al.*, 1985). Sin embargo, tanto en aguas tropicales como sub-tropicales del Pacífico Sur Oriental, así como en cultivos de laboratorio con cianobacterias fotosintéticas, se ha demostrado que la asimilación biológica de N₂O podría ser una vía significativa capaz de transformar el N₂O en nitrógeno orgánico particulado (Farías *et al.*, 2013)

Con todos estos antecedentes expuestos, surge la pregunta de la relación que existe entre los organismos fotosintéticos y el ciclaje de N₂O y la implicancia que esto tendría en el ciclo del nitrógeno. Los cultivos de microalgas han aumentado exponencialmente en las últimas décadas, debido a la creciente demanda de alimentos (acuicultura) y la escasez de energía, derivada principalmente de la explotación de combustibles fósiles; esto ha llevado a considerarlas como una fuente alternativa de energía limpia, y posiblemente como la única fuente de biodiesel renovable que es capaz de satisfacer la demanda mundial de combustibles para el transporte (Chisti, 2007). Por esta razón, el estudio y cultivo de microalgas podrían ser claves tanto para alimentación, y como materia prima de biocombustibles de tercera generación (Scott *et al.*, 2010).

Además, las microalgas juegan un rol biogeoquímico que repercute en el ciclaje de gases invernaderos, como es el caso de la asimilación de CO₂. Sin embargo, poco se conoce de la relación con otros gases invernaderos como el N₂O. Por otra parte si los cultivos de microalgas presentan señal de emisión de N₂O, nos planteamos la pregunta: ¿podrían ser los organismos acompañantes los responsables de esto? Las asociaciones entre microorganismos existen tanto en ambiente natural como en cultivos, como la asociación de microalgas y bacterias, las que pueden beneficiarse mutuamente de sus actividades metabólicas (Monronta *et al.*, 2006). Estas asociaciones de microorganismos, que dominan la comunidad planctónica, son de gran importancia tanto en su rol ecológico y representan un importante eslabón trófico para muchos herbívoros que predan sobre ellos. Esto se ha demostrado, por ejemplo, en las diversas relaciones entre cianobacterias y pequeñas microalgas, los que presentan altas tasas de bacterivoría en los giros oligotróficos (Hartmann *et al.*, 2012).

Por lo expuesto, se plantea la interrogante de cuál es el origen y ciclaje del N₂O en cultivos donde co-existen microalgas y bacteriopláncton y así comprobar si existe un metabolismo asimilativo responsable de su producción y/o consumo del N₂O.



2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

2.1. Hipótesis.

H₀: En cultivos monoclonales de las microalgas marinas *Micromonas pusilla* y *Nannochloris* sp. existe ciclaje de N₂O asociado a los organismos eucariontes fotosintéticos.

H_a: En cultivos monoclonales de microalgas marinas *Micromonas pusilla* y *Nannochloris* sp. existe ciclaje de N₂O asociado a microorganismos nitrificantes.

H₀: La producción de N₂O está asociado a la asimilación de nutrientes nitrogenados y en directa relación con el proceso fotosintético por parte de las microalgas marinas *Micromonas pusilla* y *Nannochloris* sp.

H_a: La producción de N₂O no está asociado a la asimilación de nutrientes nitrogenados ni tiene relación con el proceso fotosintético por parte de las microalgas marinas *Micromonas pusilla* y *Nannochloris* sp.

2.2. Objetivo general.

Inferir los mecanismos responsables del ciclaje del gas invernadero óxido nitroso (N₂O) en cultivos monoclonales de las microalgas marinas *Micromonas pusilla* y *Nannochloris* sp. y discernir respecto a si los organismos involucrados en la producción y/ o consumo del gas corresponden a las microalgas marinas o su microbiota acompañante.

2.3. Objetivos específicos

- 2.3.1. Determinar la presencia del gen funcional *amoA* y la composición filogenética de la comunidad bacteriana mediante el gen 16S rRNA en los cultivos monoclonales de microalgas marinas y si estos están implicados en el ciclaje del N₂O.
- 2.3.2. Determinar si existe producción y/o consumo de N₂O en cultivos monoclonales de microalgas marinas y evaluar su respuesta frente a distintas sales nitrogenadas.
- 2.3.3. Evaluar si la producción y/o consumo de N₂O en cultivos de microalgas marinas está asociado al proceso de fotosíntesis.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención y cultivo de los modelos biológicos.

Para este estudio se utilizaron las especies de microalgas marinas *Micromonas pusilla* RCC 827 y *Nannochloris* sp. RCC 632, ambas cepas adquiridas desde la Colección de Cultivos Roscoff (Roscoff Culture Collection), Francia. La microalga *Micromonas pusilla* representa un importante componente planctónico en términos de diversidad, biomasa y productividad, encontrándose tanto en la zona eufótica de océanos oligotróficos como en aguas costeras eutróficas (Li ,1994; Not et al., 2004). Este puede llegar a representar hasta un 40% de la biomasa de picoeucariontes fotosintéticos de la comunidad picoplanctónica de la zona de surgencia de Chile central (Collado-Fabri *et al.*, 2011), teniendo un importante rol en la trama trófica, dado que representa un importante recurso de carbono para las poblaciones zooplanctónicas que se alimentan de picoplancton.

Por otro lado, la microalga *Nannochloris* sp. es una especie de amplia distribución y se utiliza comúnmente en acuicultura por ser un alimento adecuado para el crecimiento de diversos organismos heterótrofos (como rotíferos, copépodos y ostras) debido a su alta adaptabilidad, tasa de crecimiento y alto valor nutritivo (Witt *et al.*, 1981). Además, esta microalga es utilizada en producción de biodiesel debido a su riqueza en lípidos intracelulares (Park *et al.*, 2012).

3.2. Caracterización de condiciones de cultivo y la curva de crecimiento de microalgas.

Las cepas mencionadas se mantuvieron en iguales condiciones de temperatura, luminosidad y nutrientes en que eran mantenidas en la Colección de Cultivos de Roscoff. Estas se incubaron en medio de cultivo K (Guillard & Keller 1985; Keller *et al.* 1987), a una temperatura de 20° C, con 100 μ E de luminosidad y un fotoperiodo de luz: oscuridad de 12:12 horas. El agua de mar utilizada fue recolectada de la estación 18 (36° 30'S y 73° 07'W) frente a Concepción. Esta agua de mar pasó por un proceso de consumo de nutrientes, conocido como “envejecimiento” durante dos meses, en oscuridad y a 4°C. El agua se esterilizó, siendo filtrada por 0,2 μ m y posteriormente fue autoclavada, para luego preparar el medio de cultivo siguiendo rigurosamente los protocolos de cultivo y mantención propuestos por Anderson (2005).

Para determinar la duración de cada fase de crecimiento (fases lag, exponencial, estacionaria y senescencia), se obtuvieron curvas de crecimiento para cada una de las cepas en nuestro laboratorio. Se cuantificó proteínas totales mediante el método de Lowry (Lowry, *et al* 1951) y en paralelo se midió la densidad óptica a 750 nm (OD_{750}) *in vivo* para poder correlacionar esta medición con las proteínas totales correspondientes a cada una de las fases de crecimiento. Dicha información fue utilizada al momento de incubar las muestras para los experimentos.

Una vez que los cultivos alcanzaron la fase exponencial de crecimiento fueron transferidos a los diferentes medios de cultivo modificados (descritos en la siguiente sección). Mediante citometría de flujo se monitoreo los cultivos para verificar que estos se mantuvieran monoclonales durante los experimentos. Para ello se utilizó un citómetro de flujo FACS Calibur BD, el que realiza conteo de células, este está equipado con un láser de 488 nm, el cual al impactar las células emiten cierta longitud de onda que son captadas por diferentes PMT's (fotomultiplicadores) quienes convierten la luz en pulsos eléctricos. El equipo presenta 5 fotomultiplicadores basados en FSC (Tamaño), SSC (rugosidad), FL1 (ficobilina), FL2 (ficoeritrina) y FL3 (clorofila). A través de citometría de flujo es posible distinguir diferentes grupos del pico-fitoplancton, incluyendo Picoeucariontes y Bacterio-plancton (bacterias y arqueas). Su unidad de medida es de 10^3 (células mL^{-1}), y su factor de dilución 500 μ L para picoplancton y 300 μ L para picoplancton no fotosintético (bacterias).

Se calculó abundancia celular para ambas microalgas además de análisis del picoplancton no fotosintético por medio de la tinción SybrGreen. (Marie *et al.*, 2000)

3.3. Metodología para cumplir con el objetivo 1: Determinar la presencia del gen funcional *amoA* y la composición filogenética de la comunidad bacteriana mediante el gen 16S rRNA en los cultivos monoclonales de microalgas marinas y si estos están implicados en el reciclaje del N₂O.

Con el fin de determinar si los cultivos, al momento de hacer los experimentos eran monoclonales y si otros microorganismos tienen la capacidad de reciclar N₂O (presencia o ausencia de genes funcionales involucrados en el reciclaje de N₂O) en los cultivos de microalgas, se realizaron distintos análisis moleculares

3.3.1. Bacterias acompañantes en cultivos de microalgas: análisis del gen 16S rRNA por DGGE.

Para conocer las características de la biota acompañante de los cultivos de microalgas marina se extrajo el ácido desoxirribonucleico (ADN) comunitario para cada cultivo de microalga mediante el método CTAB (Wilson, 1990) y se determinó su integridad y concentración por espectrofotometría con un Nanodrop1000 (Thermo Scientific). Posteriormente, este DNA fue amplificado a través de la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) lo que permitió amplificar un fragmento específico de ADN basado en análisis de 16 S rRNA general bacterias, los primers utilizados fueron GC358F-907RM (Massana & Balagué 2010). Las condiciones de PCR se especifican en la Tabla 1. El resultado de este producto de PCR fue la obtención de un gran número de copias de un fragmento específico para 16 S rRNA general bacterias, las cuales fueron observadas mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa 1% en buffer TAE, para comprobar el éxito del PCR.

El producto de PCR fue analizado mediante la técnica de electroforesis en gel de gradiente denaturante (DGGE) (Figura 1). El DGGE es una técnica de trazado molecular que consiste en la separación de cadenas de ADN, dependiendo de su punto de denaturación. Este punto de denaturación aumenta con el tamaño y composición de la secuencia de nucleótidos, la que suele aumentar con altos contenidos de Guanina y

Citosina. La finalidad de esta técnica es obtener bandas que representen la diversidad microbiana en las muestras de cultivos de microalgas. Las bandas obtenidas por DGGE son nuevamente amplificadas por PCR, en donde se utilizan los mismos primers pero sin cola de GC (Díez *et al.*, 2001). Con la finalidad de una óptima secuenciación de bandas, estas fueron cortadas en un trans-iluminador cuantificadas a través de Nanodrop y posteriormente purificadas (Wizard® Genomic DNA Purification Kit Technical Manual) para su posterior secuenciación en Macrogen, Tokio. <http://dna.macrogen.com/>. Las secuencias fueron alineadas con MAFFT usando el algoritmo E-INS-i (Katoh *et al.*, 2005). Se calculó el porcentaje de similitud entre las secuencias, y se consideraron las secuencias con similitud superior al 99,5% de pertenecer a la misma unidad operativa taxonómica (OTU), utilizando la plataforma BLAST (<http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).de la NCBI (National Center for Biotechnology Information). Posteriormente se realizó un árbol filogenético en donde se utilizó el modelo de ajuste óptimo Kimura de 2 parámetros.

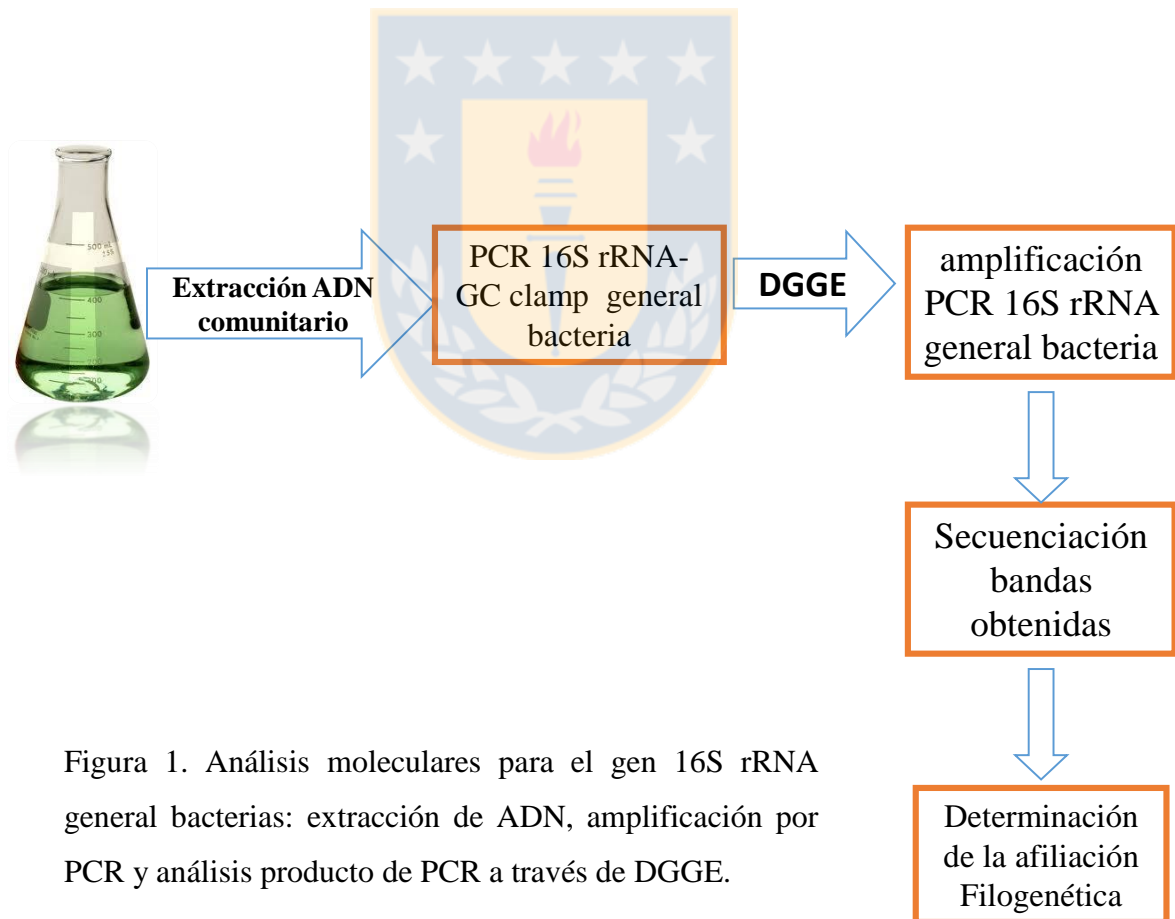


Figura 1. Análisis moleculares para el gen 16S rRNA general bacterias: extracción de ADN, amplificación por PCR y análisis producto de PCR a través de DGGE.

3.3.2. Análisis PCR para beta-proteobacteria y arqueas amonio oxidante.

El material genético extraído de los cultivos de microalgas marinas se amplificó a través de la técnica de PCR descrita anteriormente; esta vez para el gen específico *amoA*, con la finalidad de identificar los genes involucrados en la producción de N₂O y/o NO en los cultivos de microalgas.

El gen *amoA* está implicado en la oxidación de amonio (NH₄⁺) a hidroxilamina (NH₂OH) que es sustrato para que actúe la enzima hidroxilamina-oxigenasa (HAO) en la nitrificación, y como dador de electrones en la “nitrificación desnitrificante” (Schreiber *et al.*, 2012). Los partidores y las condiciones de PCR fueron tomadas y modificadas de Rothhauwe *et al.* (1997) para beta-proteobacteria amonio oxidantes (Tabla 2), y de Francis *et al.* (2005) para arqueas amonio oxidantes (Tabla 2). Las temperaturas de annealing fueron modificadas para encontrar una temperatura óptima de amplificación del gen. El producto amplificado de PCR para el gen *amoA* se comparó con el control positivo facilitado por la Dr. Verónica Molina de la Universidad Andrés Bello el cual presenta el gen *amoA* específico a amplificar correspondiendo al clon ST080550.F7 para beta-proteobacteria y al clon ST080515.E11 para arqueas amonio oxidantes (Molina *et al.*, 2007).

Tabla 1. Condiciones de PCR para análisis de 16 S rRNA general bacterias. GC358F-907RM (Massana & Balagué 2010).

Temperatura (° C)		Tiempo (minutos)	
5	10	Denaturación inicial	
95	1	Denaturación	
60	1	Annealing	1° serie de ciclos Touchdown 10 ciclos (-1°C x ciclo)
72	1	Extensión	
95	1	Denaturación	
54	1	Annealing	2° serie de ciclos 22 ciclos normal
72	1	Extensión	
72	1	Extensión final	

Tabla 2. Genes y secuencias de nucleótidos analizados a través de PCR para beta-proteobacteria y arquea amonio oxidante.

Organismos	Gen	oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'
β-proteo bacteria amonio oxidante	<i>amoA</i>	amoA1F'	GGGGTTTCTACTGGTGG
		amoA2R	CCTCKGSAAAGCCTTCTTC
Arquea amonio oxidante	<i>amoA</i>	Arch-AmoAF	STAATGGTCTGGCTTAGACG
		Arch-AmoAR	GCGGCCATCCATCTGTATGT

Tabla 3. Condiciones de PCR para beta-proteobacterias amonio oxidantes. Extraído y modificado de Rotthauwe *et al.* (1997).

Temperatura (° C)	Tiempo (minutos)		
94	5	Denaturación inicial	
94	20''	Denaturación	1° serie Touchdown
53.6 - 60.1	1	Annealing	30 ciclos (-°C x ciclo)
72	90 ''	Extensión	
94	1	Denaturación	2° serie
60	1	Annealing	
72	10	Extensión	

Tabla 4. Condiciones de PCR para arqueas amonio oxidantes. Extraído y modificado de Francis *et al.* (2005).

Temperatura (° C) Tiempo (minutos)			
94	5	Denaturación inicial	
94	45''	Denaturación	
48.1 – 53.4	1	Annealing	1° serie Touchdown 30 ciclos (-1°C x ciclo)
72	1	Extensión	
72	10	Extensión final	

3.4. Metodología para cumplir objetivos 2 y 3: Diseño experimental evolución temporal de N₂O.

Los experimentos de evolución de N₂O a través del tiempo se realizaron en función del ciclo día-noche de las microalgas, con la finalidad de seguir la ritmicidad que persiste en condiciones constantes de luz y temperatura, con un periodo aproximado de 24 horas (Harding *et al.*, 1993). Esta ritmicidad se encuentra tanto en organismos fotosintéticos como no fotosintéticos, sin embargo en los organismos fotosintéticos la luz es su fuente de energía, por lo que el ciclo de luz/ oscuridad adquiere un mayor protagonismo (Suzuki *et al.*, 2001). El diseño experimental para cumplir con los objetivos 1 y 2 se realizó en la fase de crecimiento exponencial, de modo de eliminar la variabilidad asociada a las distintas fases del ciclo de vida de las microalgas. Los experimentos duraron un total de 24 horas para monitorear si existe variación en su ciclo día-noche. Se dividieron en 4 tiempos para horas luz y 4 tiempos para horas oscuridad, con una diferencia de 3 horas entre cada toma de muestras. Las mediciones se realizaron en triplicado para cada tiempo y en ambas fases de luz/ oscuridad abarcando un total de 12 horas para fase luz y 12 horas para fase oscuridad.

Las cepas fueron mantenidas en matraces Erlenmeyer de 1000 mL que contenían un volumen de 600 mL de cultivo. Las mediciones se realizaron durante el final de la fase exponencial, con el objeto que los cultivos estuviera bordeando la capacidad de carga del sistema, y así cualquier adición o restricción de nutrientes tuviera un impacto significativo en su metabolismo. Para esto, los cultivos fueron filtrados suavemente por 0.2 μm con la finalidad de transferir las células a un medio libre de nitrógeno combinado.

Con el objeto de llevar a cabo el objetivo 2: Determinar si existe producción y/o consumo de N_2O en cultivos monoclonales de microalgas marinas y evaluar su respuesta frente a distintas sales nitrogenadas; posterior a la transferencia de las microalgas a un medio libre de nitrógeno combinado, estas fueron incubadas con un porcentaje en base a un 10 % de adición de sales nitrogenadas de NO_3^- y NH_4^+ , estas concentraciones fueron calculadas en relación a los promedios de nutrientes en una zona de surgencia costera (Farías *et al.*, 2009). Los tratamientos seleccionados corresponden a la adición de dos sales nitrogenadas utilizadas por los organismos marinos (Tabla 5): *tratamiento adición NO_3^-* , *tratamiento adición NH_4^+* , además de los controles de; *fracción bacteriana (FB)*, y *la fracción total (FT)* que corresponde a la fracción bacteriana y a la fracción bacteriana más la microalga, respectivamente. Para obtener la FB, se filtró un volumen total de cultivo por 1.2 μm para *Micromonas pusilla* y para *Nannochloris* sp. y así retener la microalga y permitir que sólo se colecte la biota acompañante (Figura 2).

Las muestras se tomaron en un tiempo inicial t_1 , el cual corresponde a la toma de muestra una hora después de iniciado el experimento. Se utilizaron viales cromatográficos de 20 ml (24 viales por cada tratamiento) y se incubaron bajo las condiciones experimentales idénticas a la mantención de cultivos establecidas al principio de la incubación. Todo vial cromatográfico fue envenenado con HgCl_2 saturado cada 3 horas y en triplicado para frenar cualquier actividad biológica.

Con el objeto de llevar a cabo el objetivo 3: Evaluar si la producción y/o consumo de N_2O en cultivos de microalgas marinas está asociado al proceso de fotosíntesis; Con la finalidad de discernir si existe alguna relación en la producción de N_2O y el proceso fotosintético, se utilizó el inhibidor 3.4-diclorofenil-1.1-dimetil urea (DCMU), el cual bloquea el flujo de electrones del fotosistema II (Garrigue *et al.*, 1992). El DCMU es ampliamente utilizado como plaguicida y puede afectar a los organismos marinos a través de la contaminación por fertilizantes y pesticidas que llega a las zonas

costeras. Estos plaguicidas proviene de actividades agropecuarias o a partir de la lixiviación de los biocidas, utilizados como agentes anti incrustantes marinos (De Lorenzo *et al* 2001). El DCMU al bloquear el flujo de electrones de la fotosíntesis también podría inhibir el poder reductor necesario para llevar a cabo la asimilación de NO_2^- intracelular. Según estudios recientes (Guieysse *et al*, 2014) esto podría estar relacionado con la producción de N_2O por detoxificación de NO_2^- a través de la enzima nitrato reductasa (Figura 3).

Al igual que en el diseño experimental del objetivo 2, se realizaron experimentos con un ciclo día y noche (horas luz/ horas oscuridad), y se separó la fracción bacteriana de la fracción total (que consistió en filtrar un volumen de cultivo por $1.2 \mu\text{m}$ para *Micromonas pusilla* y *Nannochloris* sp.). Además de un control que correspondió a la evolución del N_2O en el medio de cultivo libre de cualquier microorganismo. El tratamiento de inoculación con DCMU (FT+DCMU) tuvo una concentración final de $100 \mu\text{M}$ y se encontraba en óptimas condiciones de crecimiento y de nutrientes (Figura 4). Las muestras se tomaron en un tiempo inicial t_1 , el cual corresponde a la primera toma de muestra, una hora después de iniciado el experimento. Se utilizaron viales cromatográficos de 20 ml (24 viales por cada tratamiento) y se incubaron bajo las condiciones experimentales idénticas a la mantención de cultivos establecidas al principio de la incubación. Todo vial cromatográfico fue envenenado con HgCl_2 saturado cada 3 horas y en triplicado para frenar cualquier actividad biológica.

La concentración de N_2O para todos los experimentos fue cuantificada por la técnica de headspace (Helio) a través de cromatografía gaseosa en el equipo GC Shimadzu 17a, columna QS PLOT, detector ECD, las concentraciones de equilibrio se calcularon según el protocolo de Sarmiento & Gruber, 2006, el cual considera la solubilidad de los gases como una función de la temperatura y la salinidad. Se realizó una curva de calibrado la cual es lineal con estándares certificados SCOTTY Specialty Gas Calibration Standards a las concentraciones de 0.1 ppm, 0.5 ppm y 1.0 ppm, adicionalmente se utiliza Helio como estándar 0 pp, y aire ambiental que corresponde a 0.33 ppm.

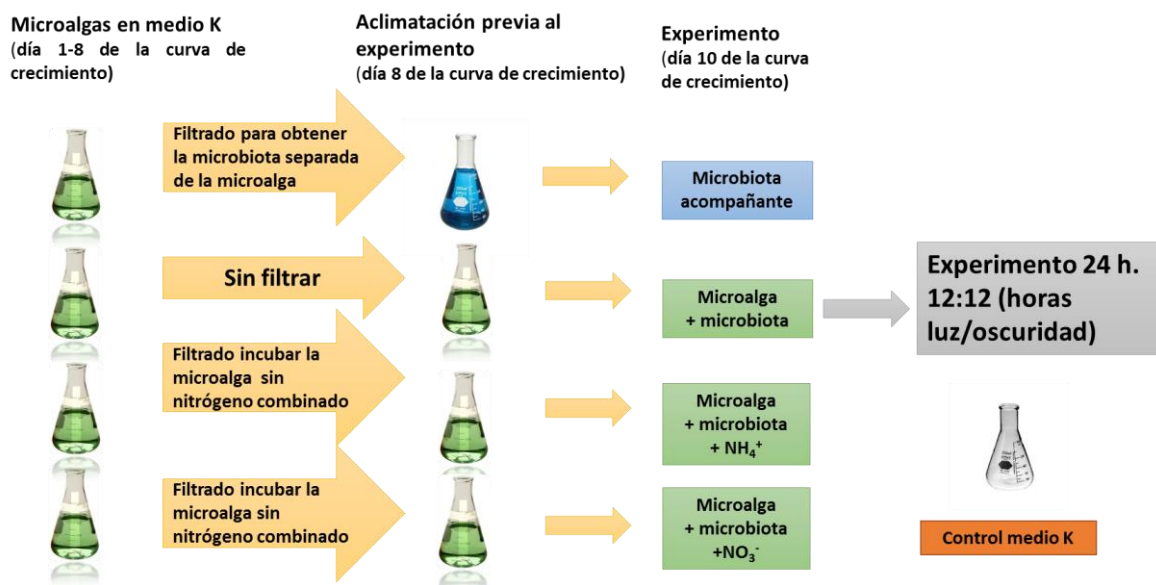


Figura 2: Diseño experimental de crecimiento microalgas e inoculación con sales de nitrógeno.

Tabla 5. Concentración de nutrientes adicionados al experimento de evolución de N_2O frente a sales nitrogenadas

Microalgas	Natural		Adicionado	
	NO_3^- (μM)	NH_4^+ (μM)	NO_3^- (μM)	NH_4^+ (μM)
<i>M. pusilla</i>	2,323	4	23	27
<i>Nannochloris</i> sp.	2,323	4	23	27

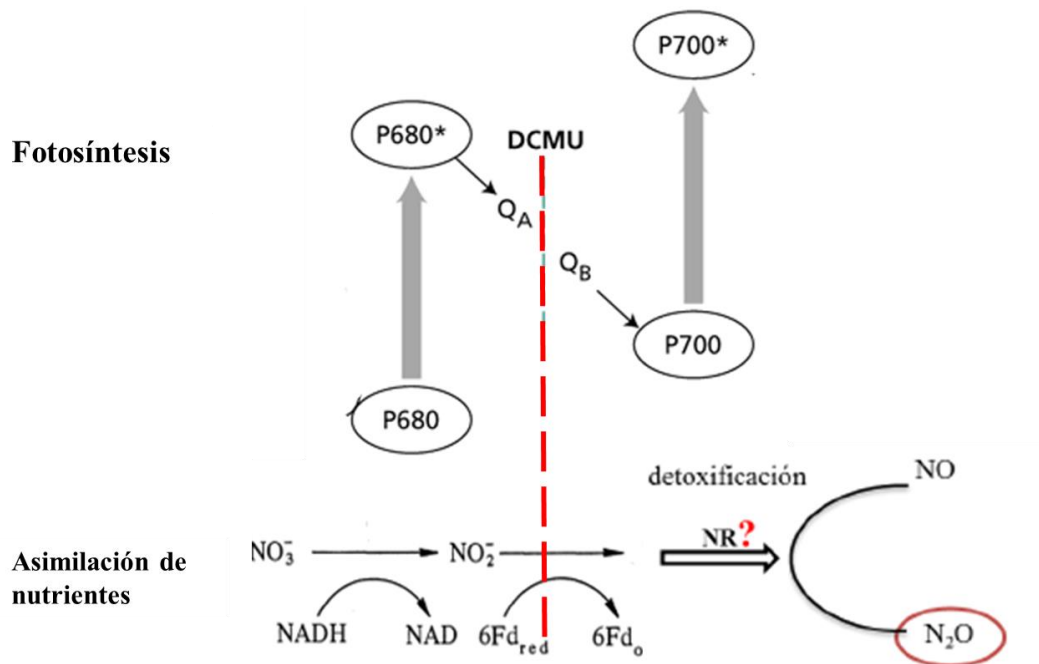


Figura 3. Efecto de la inhibición del fotosistema II a través del DCMU.

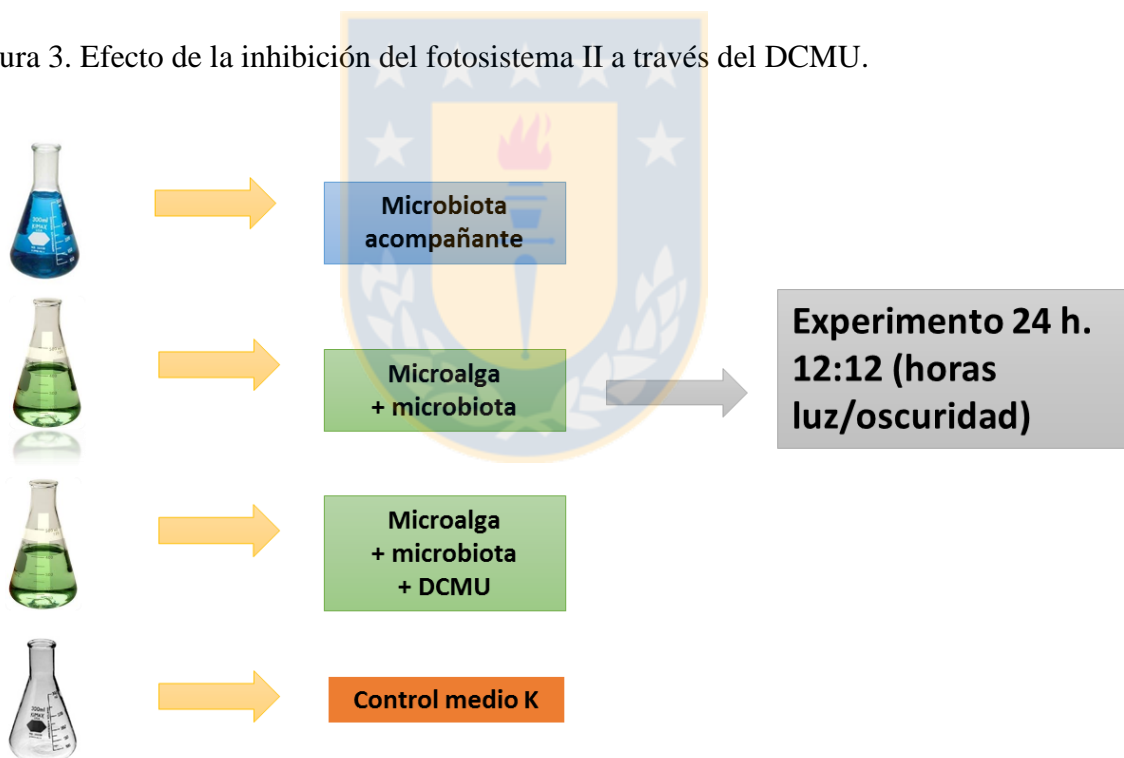


Figura 4. Diseño experimental: Evolución temporal N_2O durante la inoculación con DCMU.

Con el objeto de detectar las diferencias entre el control medio de cultivo inerte (MC), las fracciones bacteria (FB) y total (FT), y los tratamientos de adición de sales nitrogenadas y el de inhibición con DCMU, los datos fueron analizados a través del programa estadístico SigmaStat y Statistica, comprobándose los supuestos de normalidad y homoestabilidad (homogeneidad de varianza) de los datos, con la finalidad de discernir qué tipo de pruebas son las indicadas para el tipo de datos y comprobar si hay diferencias significativas entre los tratamientos y el medio inerte, de esta forma se compararon las medias de la concentración de cada tratamiento a través del test T-student muestras pareadas.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de la curva de crecimiento de los modelos biológicos *Micromonas pusilla* y *Nannochloris* sp.

En la Figura 5 se puede observar la curva de crecimiento de ambas microalgas a través de proteínas totales (gr/ml) versus el OD 750. En ambas curvas, se observa la correlación entre ambos parámetros definiendo el ciclo de cada microalga en tres fases: la fase de crecimiento exponencial, que es la que dura mayor tiempo (8 días aproximadamente), la fase meseta, la cual suele ser un periodo breve aproximadamente 4 días, y la fase de decaimiento o senescencia, en donde la concentración de proteínas totales y el OD750 desciende por debajo del valor de máximo exponencial y este decaimiento se mantiene en el tiempo.

Los resultados de curva de crecimiento para ambas microalgas muestran que *Micromonas pusilla* (Figura 5 a) y *Nannochloris* sp. (Figura 5 b) tienen distintas tasas de crecimiento; en el caso de *Micromonas pusilla* su ciclo total aproximado fueron 24 días, alcanzando su fase exponencial aproximadamente el día 15, la concentración de proteínas totales y OD 750 fue mayor que en *Nannochloris*, la que alcanzó su máximo exponencial aproximadamente en el día 8; su crecimiento fue más rápido, y por lo tanto alcanzó la etapa de senescencia más pronto, por lo que su ciclo total duró aproximadamente 20 días. Para hacer comparativos los resultados, todos los experimentos

fueron realizados en la misma etapa de crecimiento. *Micromonas pusilla* presentó un OD₇₅₀ de 0,348 equivalente a 0,5 g/L de proteínas totales, en tanto que *Nannochloris* sp. presentó un OD₇₅₀ de 0.151 equivalente a 0,4 g/L de proteínas totales.

Figura 5 a)

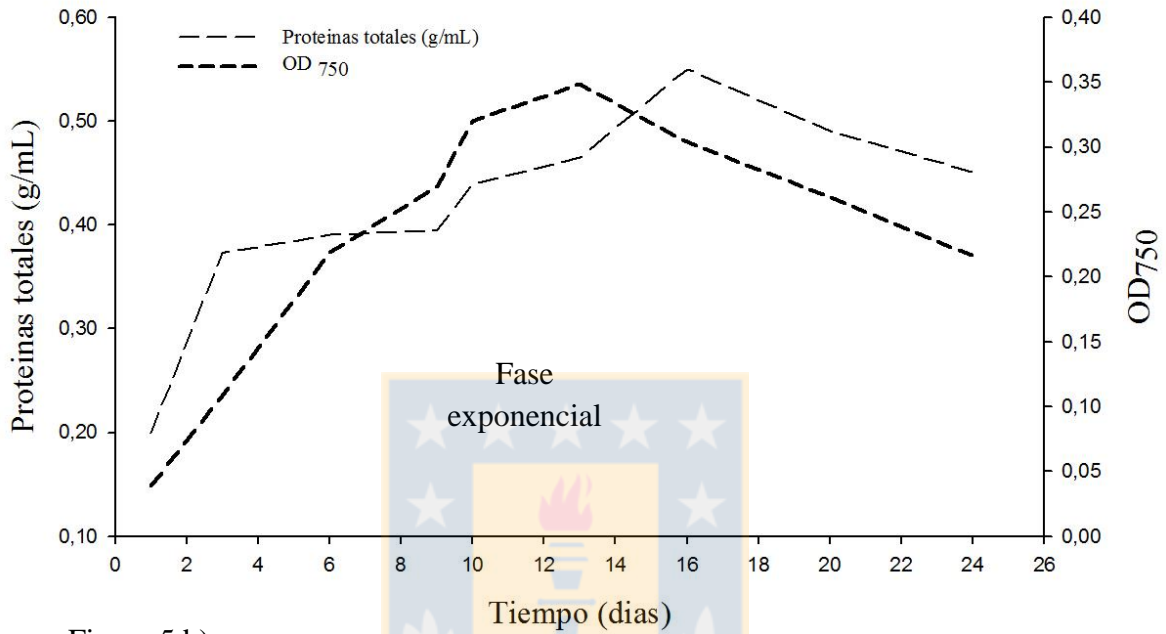


Figura 5 b)

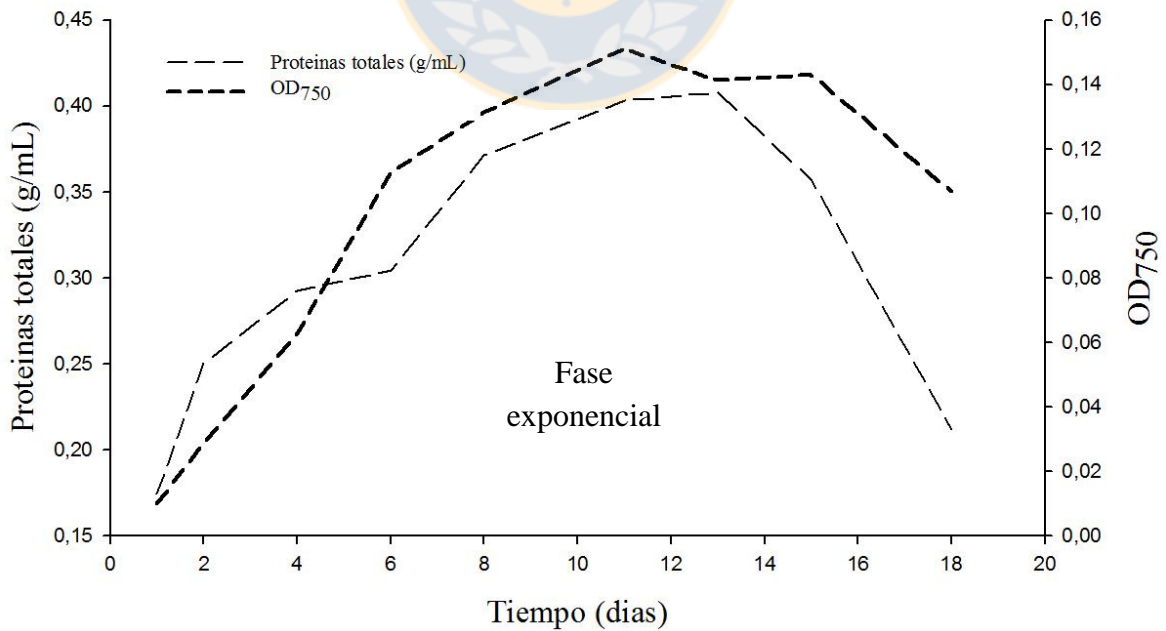


Figura 5. Curvas de crecimiento de: (a) *Micromonas pusilla*, (b) *Nannochloris* sp. a través de proteínas totales (g/ml) versus OD₇₅₀.

En el caso de los resultados de abundancia celular obtenidos a través de citometría de flujo, estos indican que para ambos cultivos se diferenciaba solo un grupo de picoeucariontes fotosintético, no obstante estas muestras no eran axénicas, ya que estaban acompañadas por distintos grupos de bacterias.

La Figura 6 ilustra a ambas poblaciones de microalgas a través de un gráfico de contorno en donde se observa la similitud de los tamaños de *Micromonas pusilla* y *Nannochloris* sp. En el cultivo de *Micromonas pusilla* se identificó una población de microalga (Figura A, Anexo I), mediante los parámetros de clorofila y complejidad celular (Side Scatter SSC-H), cuyo tamaño era cercano a las 2 μm . En la Figura B, Anexo I se observa la población de *Nannochloris* sp. mediante los parámetros de clorofila y complejidad celular (Side Scatter SSC-H), cuyo tamaño al igual que en el cultivo de *Micromonas pusilla* era cercano a las 2 μm .

En cuanto a la microbiota acompañante se identificaron diversos grupos de bacterias a través de la tinción con SybrGren. En el caso de *Micromonas pusilla* fue posible identificar hasta 3 grupos de bacterias (Figura 7 a.). En el caso del cultivo de *Nannochloris* sp., fue posible diferenciar hasta 4 poblaciones diferentes (Figuras 7 b y c).

En la Figura C y D (Anexo I) se observa el crecimiento de la población de microalgas versus la población bacteriana que las acompaña, la cual presentó un ciclo concordante con la curva de crecimiento de microalgas.

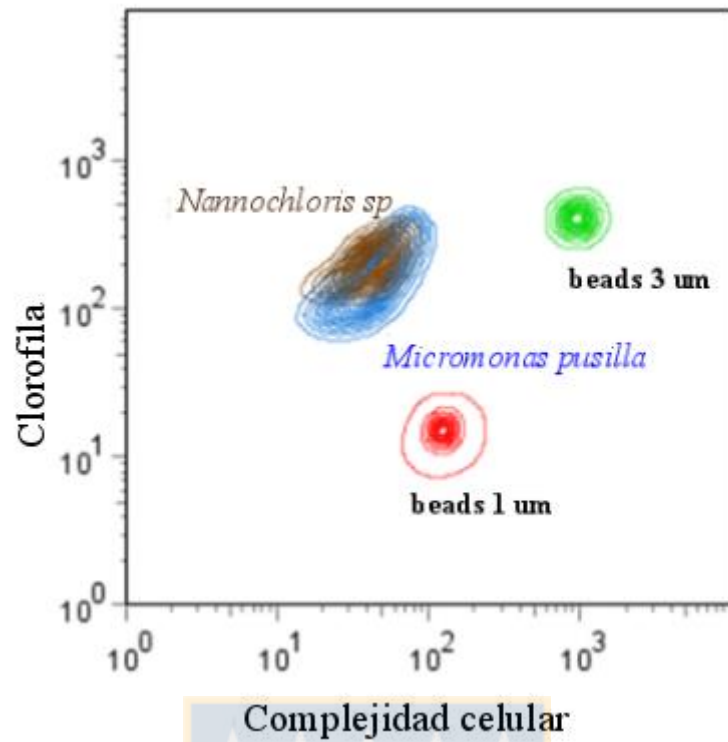


Figura 6. Abundancia celular de *Micromonas pusilla* (azul) y *Nannochloris sp.* (Café) a través de citometría de flujo, bajo los parámetros de clorofila y complejidad celular.

Figura a)

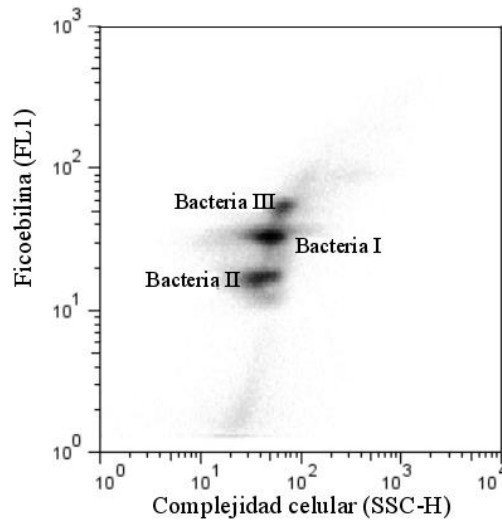


Figura b)

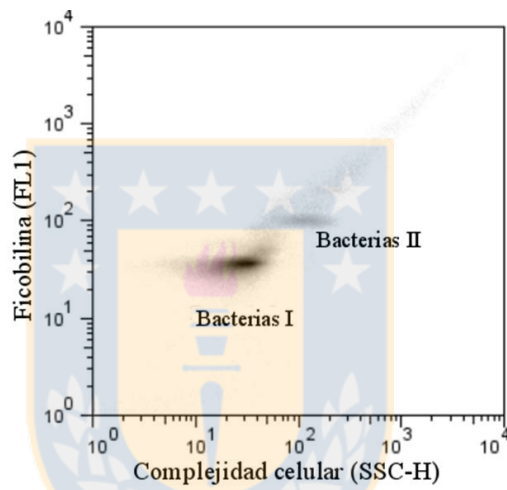


Figura c)

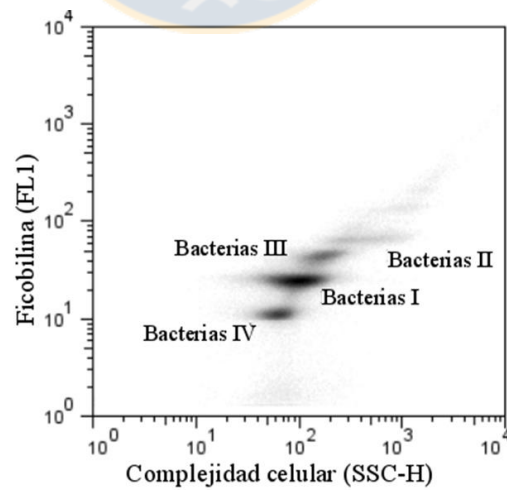


Figura 7. Abundancia celular para diversos grupos de biota acompañante obtenidos a través de citometría de flujo: a) *Micromonas pusilla*, b) y c) *Nannochloris* sp.

4.2. Presencia del gen funcional *amoA* y la composición filogenética de la comunidad bacteriana mediante el gen 16S rRNA.

4.2.1. Análisis de la comunidad microbiana mediante el gen 16S rRNA a través de la técnica de electroforesis en gel de gradiente denaturante (DGGE).

Los resultados obtenidos a través de la técnica del DGGE indicaron que se obtuvieron 5 bandas para el cultivo de *Micromonas pusilla* y 4 bandas en el caso de *Nannochloris* sp. (ver figura gel DGGE, Anexo II), esto rectifica que las microalgas estaban acompañados por diversos grupos de bacterias, los cuales diferían entre los cultivos de *Micromonas pusilla* y *Nannochloris* sp. Los diferentes grupos de bacterias acompañantes para cada cultivo nos indican que no existió contaminación cruzada durante la manipulación de las muestras, ni de microalgas ni de bacterias. Además, estos análisis son concordantes con los resultados observados a través de citometría de flujo.

En la Figura 8 se puede identificar la afiliación filogenética (basada en nucleótidos) de secuencias parciales del gen 16S rRNA de bacteria, las cuales fueron obtenidas a partir de bandas de DGGE. Como resultado se obtiene el árbol filogenético de la secuenciación de estas bandas, las cuales presentaban una comunidad bacteriana acompañante compuesta por diversos grupos de alfa-proteobacterias y beta-proteobacterias (Tabla 6).

La afiliación filogenética de secuencias parciales del gen 16S rRNA de bacteria fueron obtenidas a partir de la secuenciación de bandas de DGGE para cada uno de los cultivos. Con esta afiliación se realizó la búsqueda en la base de datos de NCBI para genes funcionales de genomas secuenciados que podrían estar implicados en la producción de N₂O. A través del análisis de afiliación filogenética se encontraron géneros potencialmente implicados en la producción de N₂O, como lo son miembros del género *Sphingomonas*, que contienen genes que participan en la producción de N₂O (sub unidad del gen Nor B y C de la óxido nítrico reductasa). Además, el género *Paracoccus* el cual posee la capacidad de respirar NO₃⁻, por lo tanto es un organismo desnitrificante. Otro género representativo es *Limnobacter*, el cual podría desempeñar un importante papel en el ciclo biogeoquímico del azufre.

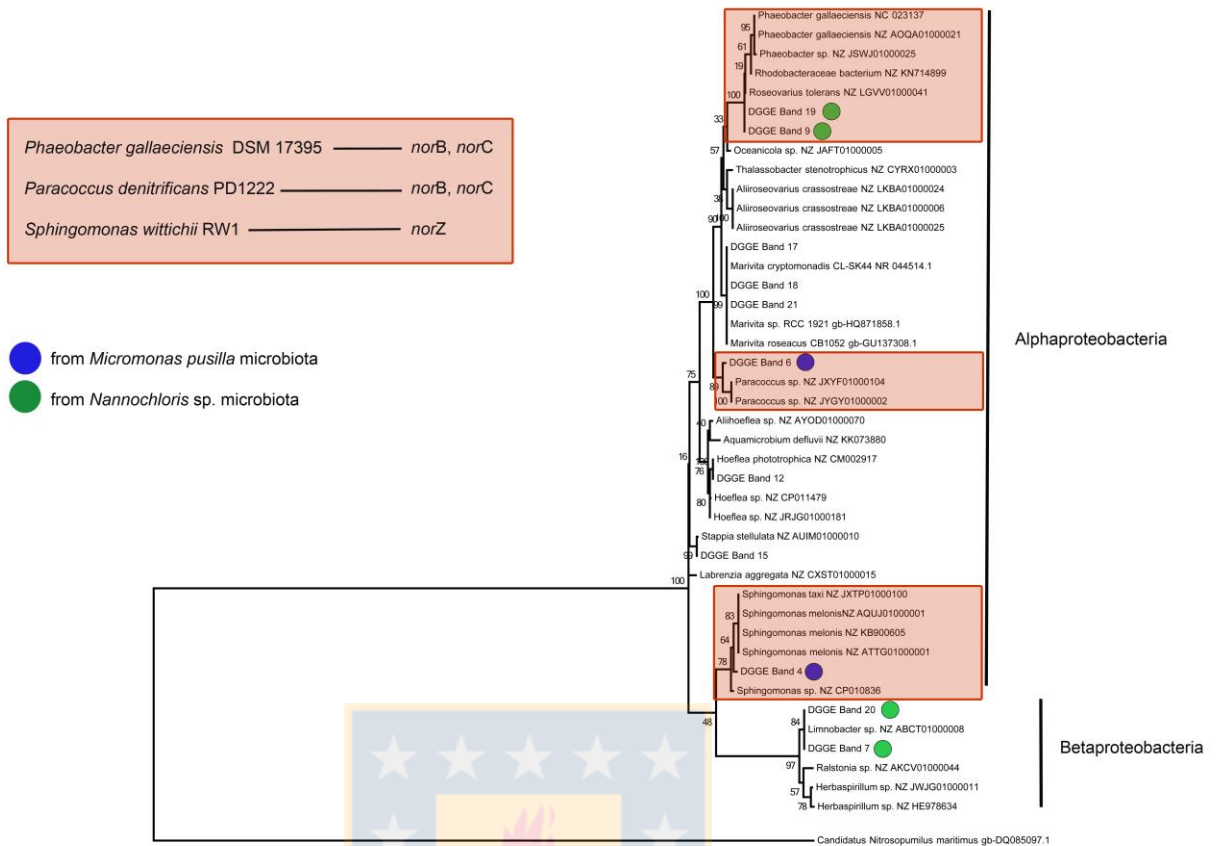


Figura 8. Afiliación filogenética (basada en nucleótidos) de secuencias parciales del gen 16S rRNA de bacteria, obtenidas a partir de secuenciaciones de amplicones de DGGE. Los círculos color azul corresponden a la biota acompañante del cultivo de *Micromonas pusilla*, mientras que los círculos de color verde a la biota acompañante de *Nannochloris* sp. El bootstrap fue hecho con 100 iteraciones y se encuentra enraizado en *Candidatus nitrosopumilos maritimus*.

Tabla 6. Secuenciación del gen 16S rRNA general bacterias (GC358F-907RM), organismos acompañantes en los cultivos de *Micromonas pusilla*, y *Nannochloris* sp.

Microalga	banda	n° acceso	Bacterias asociadas secuenciadas	% identidad
<i>Micromonas pusilla</i>	B1	FN563098.1	<i>Micromonas</i> sp. RCC299 chloroplast, complete genome	99%
	B4	FJ664807.1	<i>Sphingomonas hunanensis</i> strain JSM 083058 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
	B5	FJ377401.1	<i>Limnobacter</i> sp. Aph2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%
	B6	KF923452.1	<i>Paracoccus marcusii</i> strain 42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%
<i>Nannochloris sp.</i>	B7	FJ377401.1	<i>Limnobacter</i> sp. Aph2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence <i>Limnobacter</i> <i>thiooxidans</i>	100%
	B9	HQ871863.1	<i>Roseovarius</i> sp. RCC 1928 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
	B10	AB758571.1	<i>Tropicibacter</i> sp. SNM-13 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence.	98%
	B11	HQ871860.1	<i>Sagittula</i> sp. RCC 1923 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%

4.2.2. Análisis para determinar la presencia del gen *amoA* para beta-proteobacterias amonio oxidantes y arqueas amonio oxidantes a través de PCR.

Se realizaron análisis de PCR para los grupos de bacterias y arqueas amonio oxidante. En el PCR de arqueas amonio oxidantes, los primers no amplificaron para el gen *amoA* para ninguna de las variaciones en las temperaturas de annealing (Tabla 4), por lo tanto es posible que este grupo no se encuentre en los cultivos de *Micromonas pusilla* y de *Nannochloris* sp. En el caso de grupo de beta-proteobacterias amonio oxidantes, se lograron obtener amplificaciones del gen para cultivos de ambas microalgas y para todas las temperaturas de annealing (ver Tabla 3). En la Figura 9 se observa la optimización del

PCR específico para beta-proteobacterias amonio oxidante de los cultivos de *Micromonas pusilla* y *Nannochloris* sp. en donde es posible diferenciar una clara y distinta resolución de bandas del gen *amoA* en todas las temperaturas annealing, tanto para *Micromonas pusilla* como para *Nannochloris* sp. esto ocurrió para los controles positivos (Molina *et al.*, 2007), como para las muestras extraídas de los cultivos. El gen *amoA* no amplificó para los controles negativos (el que incluye todo el mix de PCR menos la muestra de ADN).

Los resultados muestran que existen diferencias en la resolución de bandas, dependiendo de la temperatura de annealing. En el caso de *Micromonas pusilla*, esta fue con la temperatura de 53,6 °C, observándose baja inespecificidad. En el caso de *Nannochloris* sp. se observó una clara banda para todas las temperaturas de annealing pero de menor inespecificidad con la temperatura mayor 60,1 °C. No se observaron bandas para los controles negativos los cuales no incluían ADN de cultivos.



Figura 9. Amplificación del gen *amoA* específico para beta-proteobacterias amonio oxidantes con variación temperatura de annealing. MP corresponde al marcador de peso, M₁- M₄ a *M. pusilla*, y N₁-N₄ a *Nannochloris* sp. (+) corresponde al control positivo y (-) al control negativo.

4.3. Variación en la concentración de N₂O en cultivos monoclonales de microalgas marinas y su respuesta a distintas sales nitrogenadas.

Todos los experimentos de reciclaje de N₂O fueron realizados bajo las mismas condiciones de luz, temperatura y medio de cultivo. Se realizaron modificaciones al medio de cultivo sólo al momento de hacer los experimentos (entre 48 y 72 horas antes de las mediciones) con efecto de lograr una aclimatación previa. Además, se separaron en dos fases; luz y oscuridad para así poder diferenciar si existe diferencias entre el ciclo día-noche

4.3.1. Evolución temporal de N₂O en un cultivo de *Micromonas pusilla*.

La evolución temporal de N₂O en un cultivo de *Micromonas pusilla* fue monitoreada en distintas comunidades (experimentos fraccionados) los que incluyen los controles: 1) fracción total (FT), 2) la fracción bacteriana (FB). También se cuantificó la evolución temporal de N₂O en respuesta a la adición de las sales nitrogenadas de; 3) NO₃⁻: (FT+NO₃⁻) y 4) NH₄⁺: (FT+NH₄⁺). Estos tratamientos fueron comparados contra un control inerte que sólo incluía medio de cultivo (MC). En el Anexo II se muestran los promedios de la concentración de N₂O (nmol L⁻¹) a) horas luz y b) horas oscuridad. En la Figura 9 se observa la comparación de los controles FT y FB y los tratamientos de adición de sales de nitrógeno frente a un control inerte MC para horas luz a) y horas oscuridad b); el control inerte MC presentó las menores concentraciones de N₂O, existiendo diferencias significativas entre el control MC y las fracciones FT y FB y aquellos con adición de sales nitrogenadas (Tabla 7a). La concentración de N₂O en la fracción FT presentó las mayores concentraciones respecto al control FB y que los tratamientos de sales nitrogenadas, alcanzando un promedio de 11.6 ± 1.76 nmol L⁻¹. Las concentraciones de N₂O para FB alcanzaron un valor de 8.5 ± 1.58 nmol L⁻¹, mientras que las concentraciones de FT+NO₃⁻ y FT+NH₄⁺ fueron de 9.19 ± 1.22 nmol L⁻¹ y 11.2 ± 1.59 nmol L⁻¹ respectivamente. Este mismo patrón se observó en horas oscuridad, en donde existen diferencias significativas entre MC y las fracciones FT y FB y aquellos tratamientos con adición de sales nitrogenadas (Tabla 7b) con concentraciones de N₂O en la fracción FT de 11.3 ± 1.6 nmol L⁻¹, FB de 8.01 ± 1.1 nmol L⁻¹ de FT+NO₃⁻ 10.02 ± 2 nmol L⁻¹ y FT+NH₄⁺ de 10.3 ± 1.6 nmol L⁻¹. No se observan diferencias significativas entre las concentraciones de N₂O entre las fases luz y oscuridad (Tabla 7c).

Tabla 7. Análisis t-student pareado; experimento de evolución de N₂O en un cultivo de *Micromonas pusilla*.

a) Horas luz.

Comparación	Tratamientos	Valor t	Valor p	G L
MC	FT	-7.45	2.18E-05	10
	FB	-2.39	3.56E-02	11
	NO ₃ ⁻	-5.55	2.44E-04	10
	NH ₄ ⁺	-6.56	6.37E-05	10
	DCMU	-5.40	2.17E-04	11
FT	FB	4.04	0.00	10
	NO ₃ ⁻	4.45	0.00	10
	NH ₄ ⁺	0.96	0.36	10
	DCMU	1.05	0.32	10
FB	NO ₃ ⁻	-1.38	0.19	10
	NH ₄ ⁺	-3.64	0.01	10
	DCMU	-2.63	0.02	11
NO ₃ -	NH ₄ ⁺	-3.01	0.01	10
	DCMU	-1.63	0.13	10
NH ₄ ⁺	DCMU	0.525	0.61	10

b) Horas oscuridad

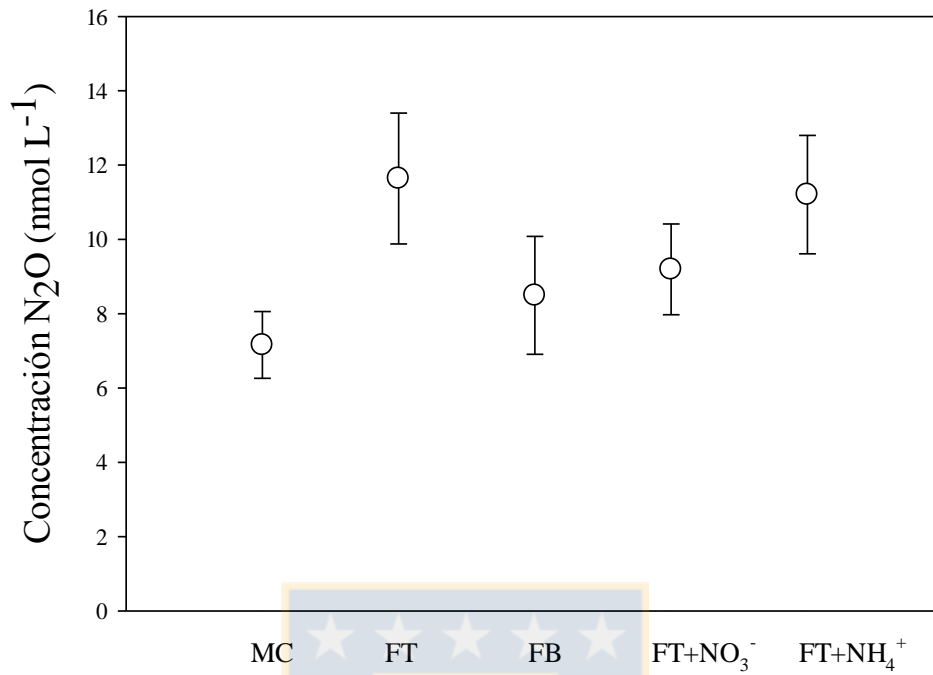
Comparación	Tratamientos	Valor t	Valor p	G L
-------------	--------------	---------	---------	-----

MC	FT	-10.43	1.08E-06	10
	FB	-2.71	2.19E-02	10
	NO ₃ ⁻	-4.79	7.34E-04	10
	NH ₄ ⁺	-6.84	4.49E-05	10
	DCMU	-3.91	2.90E-03	10
FT	FB	5.74	8.91E-06	22
	NO ₃ ⁻	1.89	0.09	11
	NH ₄ ⁺	1.97	0.06	11
	DCMU	0.63	0.54	11
FB	NO ₃ ⁻	-2.79	0.02	11
	NH ₄ ⁺	-4.59	7.71E-04	11
	DCMU	-2.91	0.014	11
NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	-0.36	0.72	11
	DCMU	-0.70	0.49	11
NH ₄ ⁺	DCMU	-0.448	0.663	11

c) Comparación horas luz versus oscuridad.

Comparación	tratamientos	Valor t	Valor p	GL
MC	MC	0.50	0.62	21
FT	FT	0.61	0.56	10
FB	FB	0.91	0.38	11
NO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻	-1.03	0.33	10
NH ₄ ⁺	NH ₄ ⁺	1.20	0.26	10
DCMU	DCMU	0.15	0.88	11

a) horas luz



b) horas oscuridad

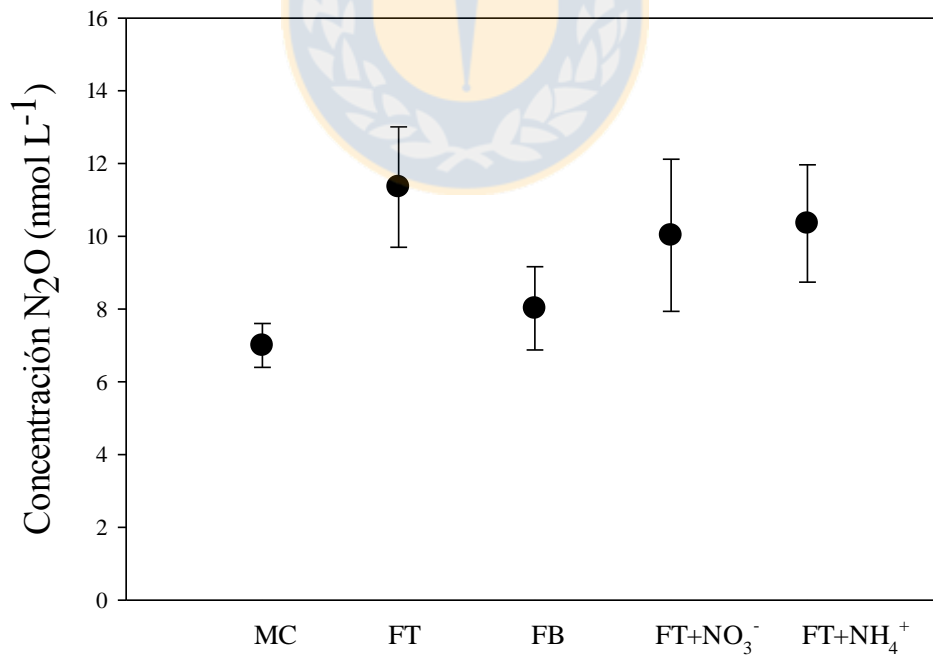


Figura 10. Concentración de N₂O (nmol L⁻¹) en un cultivo de *Micromonas pusilla* para tratamientos de adición de sales nitrogenadas en: a) horas luz, b) horas oscuridad.

4.3.2. Evolución temporal de N₂O en un cultivo de *Nannochloris* sp.

Todos los experimentos de reciclaje de N₂O fueron realizados bajo las mismas condiciones de luz, temperatura y medio de cultivo. Se realizaron modificaciones al medio de cultivo sólo al momento de hacer los experimentos (entre 48 y 72 hrs antes de las mediciones). La evolución temporal de N₂O en un cultivo de *Nannochloris* sp y su respuesta a las sales nitrogenadas de NO₃⁻ y NH₄⁺ fue monitoreada y comparada respecto al control inerte que sólo incluía medio de cultivo MC. En el Anexo III se encuentra los promedios de concentración de N₂O (nmol L⁻¹) para todos los controles y tratamientos. En la Figura 10 se observa la concentración de N₂O (nmol L⁻¹) en un cultivo de *Nannochloris* sp., la concentración del gas siempre fue menor en MC respecto a los controles: FT (7.3 ± 0.4 nmol L⁻¹), FB (6.9 ± 0.4 nmol L⁻¹) y con los tratamientos de sales nitrogenadas: FT+NO₃⁻ (6.5 ± 0.4 nmol L⁻¹) y FT+NH₄⁺ (6.4 ± 1.3 nmol L⁻¹). El análisis estadístico (Tabla 8 a) indicó que existieron diferencia significativa en la producción de N₂O entre el control MC y las fracciones FT y FB, y todos los tratamientos de sales nitrogenadas para horas luz y que también esta diferencia se manifestó al comparar la FT con el resto de los tratamientos. En horas de oscuridad se observan distintas concentraciones para los controles: FT (6.5 ± 0.7 nmol L⁻¹), FB (6.8 ± 0.2 nmol L⁻¹) y con los tratamientos de sales nitrogenadas: FT+NO₃⁻ (6.3 ± 1.3 nmol L⁻¹) y FT+NH₄⁺ (6.3 ± 1 nmol L⁻¹), sin embargo estas diferencias solo fueron significativas al comparar los tratamientos con el control MC y no con la fracción FT (Tabla 8 b).

Por lo tanto, existe una producción de N₂O tanto para las fracciones FT como FB y todos los tratamientos de adición de sales nitrogenadas. Las concentraciones de N₂O para los tratamientos de sales nitrogenadas son similares a la fracción FT, por lo que la adición de sales nitrogenadas no potenciaría un aumento en la concentración de N₂O.

Tabla 8. Análisis t-student pareado; experimento de evolución de N₂O en un cultivo de *Nannochloris* sp.

a) Horas luz.

Comparación	Tratamientos	Valor t	Valor p	GL
MC	FT	-11.26	1.31E-06	9
	FB	-9.11	7.73E-06	9
	NO ₃ ⁻	-9.71	4.6E-06	9
	NH ₄ ⁺	-9.23	6.92E-06	9
	DCMU	-9.62	1.13E-05	8
FT	FB	2.57	0.03	10
	NO ₃ ⁻	9.63	2.23E-06	10
	NH ₄ ⁺	3.66	0.01	10
	DCMU	2.50	0.03	9
FB	NO ₃ ⁻	2.64	0.03	10
	NH ₄ ⁺	1.02	0.33	10
	DCMU	1.02	0.33	10
NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	-0.37	0.72	11
	DCMU	-0.87	0.41	9
NH ₄ ⁺	DCMU	-0.19	0.85	9

b) Horas oscuridad

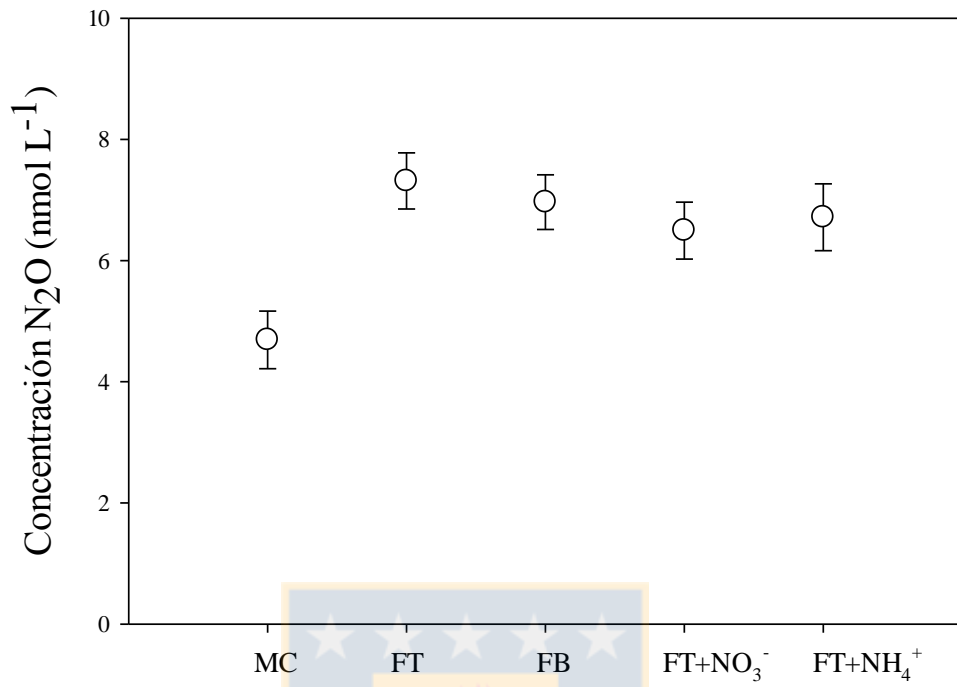
Comparación	Tratamientos	Valor t	Valor p	GL
MC	FT	-10.16	7.53E-06	8
	FB	-11.21	5.53E-07	10
	NO ₃ ⁻	-5.55	3.57E-04	9
	NH ₄ ⁺	-5.44	4.13E-04	9
	DCMU	-2.55	3.10E-02	9
FT	FB	1.19	0.26	10
	NO ₃ ⁻	1.25	0.24	10
	NH ₄ ⁺	1.79	0.10	10
	DCMU	-2.30	0.05	9

	NO ₃ ⁻	0.75	0.47	10
	NH ₄ ⁺	1.56	0.15	10
FB	DCMU	-2.32	0.04	11
	NH ₄ ⁺	0.36	0.73	10
NO ₃ ⁻	DCMU	-2.35	0.04	10
	DCMU	-2.45	0.03	10
NH ₄ ⁺	DCMU	-2.45	0.03	10

c) Fase luz versus fase oscuridad

Comparación	tratamientos	Valor t	Valor p	G L
MC	MC	-0.162	0.875	8
FT	FT	0.859	0.410	10
FB	FB	0.689	0.507	10
NO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻	-0.450	0.662	10
NH ₄ ⁺	NH ₄ ⁺	1.215	0.255	9
DCMU	DCMU	-2.297	0.042	11

a) horas luz



b) horas oscuridad

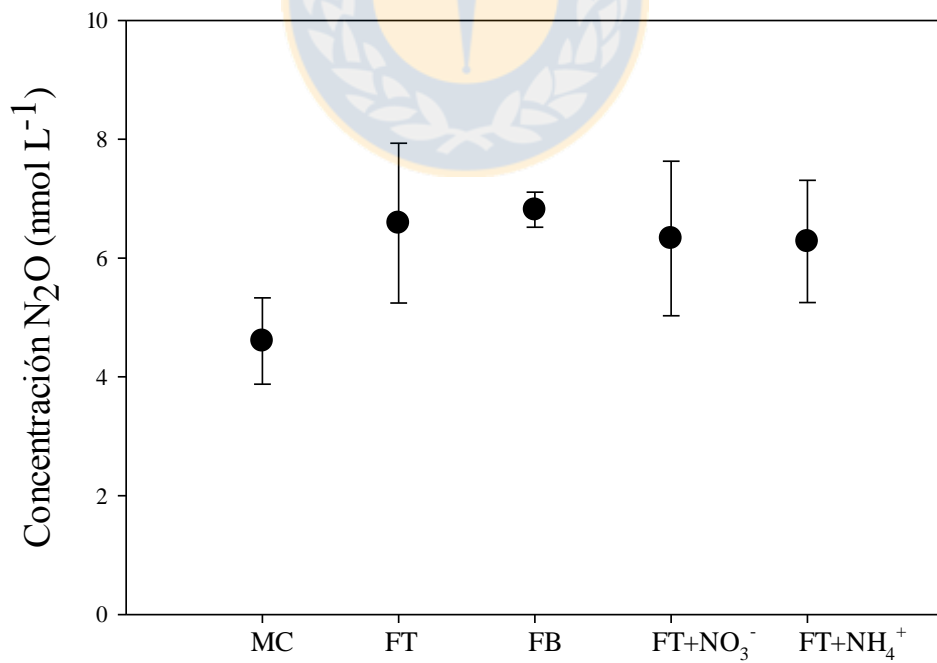


Figura 11. Concentración N₂O (nmol L⁻¹) en un cultivo de *Nannochloris* sp. para tratamientos de adición de sales nitrogenadas en; a) horas luz, b) horas oscuridad.

4.3.3. Publicación

Producción de óxido nitroso en diferentes regímenes de cultivos de microalgas

Cynthia Escares, Master in Oceanography, Lennin Florez-Leiva M Sc. in Oceanography and Laura Farias, Ph.D. in oceanography

Resumen

Las concentraciones de óxido nitroso (N_2O), uno de los principales gases de efecto invernadero y que contribuyen al adelgazamiento de la capa de ozono, fueron medidos junto a otras variables ambientales en cultivos de microalgas, tanto en una pileta al aire libre como en laboratorio. En el primero se utilizó la microalga *Nannochloris* sp., bajo procedimientos de rutina utilizando un cultivo comercial y la segunda con cultivos uni-algales de *Nannochloris oculata* y *Isochrysis galbana* bajo regímenes controlados de luz, nutrientes y oxigenación.

Posterior a la adición de sales de nitrógeno y fósforo, la pileta al aire libre presentó un crecimiento exponencial de microalgas (con fase I de 17 días), seguido de un periodo de senescencia (con una fase II de 26 días). Con un rápido incremento de N_2O desde la fase I al final de la fase II, alcanzando niveles de 580 nmol L^{-1} (saturación 5500 %) y produciendo una tasa de acumulación diaria de $18,5 \text{ nmol L}^{-1}$. Los experimentos de laboratorio revelaron que ambas microalgas también acumulan N_2O en el tiempo pero a diferentes tasas dependiendo de la cepa cultivada y el tipo de nutriente añadido (NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+). *Isochrysis galbana* ($0,82 \text{ nmol L}^{-1}h^{-1}$) produce más N_2O por célula que *Nannochloris oculata* ($0,29 \text{ nmol L}^{-1}h^{-1}$). La adición de NO_3^- produjo tasas de acumulación de N_2O de 1,4 a 2,3 veces mayor que con NH_4^+ . Adicionalmente, la acumulación de N_2O no fue inhibida por la adición de aliiythiorea (ATU) un conocido inhibidor de la oxidación aerobia del amonio (OAA). Nuestros resultados demuestran que la acumulación de N_2O no está totalmente asociada con OAA y también discute cual es el proceso más probable responsable de la producción de N_2O en sistemas oxigenados.

El papel de cultivos de microalgas en reservorios acuáticos podría ser cuantificado, teniendo en cuenta que las microalgas son ampliamente utilizadas para fines de acuicultura y biocombustibles. Estos resultados pueden ser incorporados a los actuales esfuerzos para mitigar el cambio climático y prevenir el agotamiento de la capa de ozono.

Palabras calves: cultivos de microalgas, óxido nitroso, fertilización de nutrientes.

Production of Nitrous Oxide in different microalgae culture regimes

Cynthia Escares^{1,3}, Lennin Florez-Leiva² and Laura Farías^{1,3*}

¹ Graduate Program in Oceanography, Departamento de Oceanografía. Universidad de Concepción, Chile.

² Programa de Oceanografía, Universidad de Antioquia, Colombia

³Laboratorio de Procesos Oceanográficos y Clima (PROFC). Departamento de Oceanografía, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile and Centro de Ciencia de Clima y la Resiliencia (CR²)

* **corresponding author : lfarias@profc.udec.cl**



Abstract. Concentrations of nitrous oxide (N₂O), a major greenhouse and ozone-depleting gas, were measured along with other environmental variables in outdoor pond and laboratory cultures of microalgae. We included *Nannochloris sp* under routine procedures used in their commercial culture and unialgal cultures of *Nannochloris oculata* and *Isochrysis galbanas* under laboratory controlled light, nutrient and oxygenation regimen. Subsequent to the addition of N- and P-rich salt, the outdoor pond presented exponential *Nannochloris sp* growth (phase I of 17 days), followed by a senescence period (phase II of 26 days). N₂O rapidly increased from phase I to the end of phase II, reaching levels as high as 580 nmol L⁻¹ (5500% saturation) and yielding a daily accumulation rate of 18.5 nmol L⁻¹. Laboratory experiments also revealed that both microalgal cultures accumulated N₂O over time, but at different rates depending on the cultured strains and the type of added nutrients (i.e., NO₃⁻, NO₂⁻ and NH₄⁺). *Isochrysis galbana* produced more N₂O (rates ranged from 0.36 to 0.82 nmol L⁻¹ h⁻¹) than *Nannochloris oculata* (rates ranged from 0.21 to 0.29 nmol L⁻¹ h⁻¹), and the addition of NO₃⁻ yielded N₂O accumulation rates of 1.4-2.3 times higher than with the addition of NH₄⁺. Additionally, N₂O accumulation was not inhibited by the addition of allythiorea (ATU), a well-known inhibitor of the aerobic ammonia oxidation (AAO). Our findings demonstrate that N₂O accumulation is not entirely associated with AAO, and we discuss the potential role that microalgae have on N₂O production in oxygenated systems. N₂O emission by microalgae culture should be quantified, considering that microalgae are widely used for aquaculture or biofuels purposes and can be incorporated into current efforts to mitigate climate change and prevent the depletion of the ozone layer. **Keywords:** microalgal cultivation; nitrous oxide; nutrient fertilization.

1. Introduction

Nitrous oxide (N₂O) is the most significant ozone-depleting compound [1] and the third most important greenhouse gas released into the atmosphere [2]. N₂O has a variety of natural and anthropogenic sources; however a strong recorded increase in anthropogenic emissions is responsible for the current observed increase of N₂O in the atmosphere [3]. Agriculture is by far the largest source of anthropogenic N₂O emissions, associated with the use of fertilizers, accounting for about two-thirds of total anthropogenic emissions [4,5]. Similarly, but to a lesser extent, wastewater treatment processes and aquaculture both contribute about 5% of the total anthropogenic emissions of N₂O [6, 7, 8]. The aquaculture N₂O emission estimation, that should include the N₂O production from second and third generation biofuels, has still not been quantified and included in the global budget [9].

The successful development of “third generation” biofuels, i.e., biofuels derived from aquatic autotrophic algal organism, has led to the widespread and intensive culture of unicellular marine algae [10, 11]. Currently, the large-scale and intense production of algae in open-air ponds and bags extends globally [12]. Since the development of these procedures a number of microalgae have been suggested and evaluated to simplify their cultivation and maximize their yield, in order to give rapid results in field and laboratory applications as these are potential sources of energy in the form of biofuel oil and gas [13, 14].

The environmental impacts caused by the culture of microalgae, including the production of biofuel and feed for bivalve hatcheries, may be to some extent comparable to agriculture, as there may be diverse impacts and include both positive and negative effects. Microalgal cultures may generate an important modification and intensification of bio-element fluxes in both natural and artificial systems [15], whereby diverse compounds are released as carbon (C), nitrogen (N) and phosphorus (P), as metabolic products of living

organisms. If the fluxes of these elements into the environment exceed the assimilative capacity of those systems, they can severely affect water and sediment/soil quality, causing eutrophication, oxygen depletion and the consequential disruption of local biodiversity, among other effects [15, 16, 17].

During the culture of microalgae, light energy is converted into biomass, removing CO₂ from the atmosphere by photosynthesis. As a result this is considered as a “green process”, as it reduces the consumption of fossil fuels [11]. Thus, considering the high availability of nutrients that the microalgal cultures are exposed [18], it is expected that these cultures also cycle gases such as nitrous oxide (N₂O), which are known to affect the earth’s radiative forcing [19].

The origin of N₂O in aquatic systems has mainly been attributed to dissimilative microbial processes associated with prokaryotes, both bacteria and archaea, and depends on the availability of O₂, nutrients and organic matter (OM). N₂O is mainly cycled by nitrifying and denitrifying microorganisms [20]. Nonetheless, early works found that N₂O production from microalgal and cyanobacterial cultures [21, 22] was associated to assimilative nitrite reduction. Similar result were recently found for the species *Chlorella vulgaris* by [23]; who suggested that N₂O formation may occur via NO₂⁻ reduction into nitric oxide (NO) and nitroxyl (HNO), both acting as N₂O precursors. However, this finding does not preclude the possible co-occurrence of algae and bacteria, as is commonly observed in non-axenic algal cultures. Indeed, [24] revealed the existence of a bacterial origin of N₂O emissions in algal cultures, by demonstrating that N₂O production ceases when *Nannochloropsis salina* was supplied with bacterial antibiotics, and also by detecting genetic material within the bacteria culture encoded for NO reductase (NOR), an enzyme associated with N₂O production during bacterial denitrification. In a massive culture of a

marine diatom, [25] found that N₂O can be accumulated or consumed (i.e., source or sink) depending on nitrate level; when nitrate was exhausted that system act as a sink for N₂O.

Our research investigates N₂O accumulation over short (hours) and long-term (months) timeframes, and with different cultivation procedures, for *Nannochloris oculata* and *Nannochloris* sp, as well as for *Isochrysis galbana*. These strains are widely used in aquaculture and the production of biofuels [11]. The objective of this work is to evaluate the contribution made by these cultured strains to the accumulation of N₂O in different nutrient regimes and under controlled light and O₂ conditions.

2. Materials and Methods

2.1 Long term monitoring in a open pond massive culture

The temporal dynamics of N₂O in a large-scale culture of *Nannochloris* sp were determined. The culture system consisted of a 48 m³ open-air pond (6 m length x 4 m width x 2 m depth) filled with filtered seawater (filtered through 20 µm mesh) pumped in from nearby coastal water. Pre-cleaning prior to cultivation excluded the accumulation of sediments or organic detritus on the floor of the pond. The system operated with an air flux of 0.5 m³ s⁻¹ and natural light conditions. Several biological and physicochemical variables, including N₂O, were monitored every 2-3 days at the same time (10:00 h AM). The open pond was fertilized on the 5th day and cell inoculation with *Nannochloris* sp was carried out on the 6th day. The nutrient additions consisted of calcium triphosphate (CaP₃O₁₀) and urea CO(NH₂)₂, with final concentrations of 0.833 and 24.19 mmol L⁻¹, respectively. The cell inoculation was carried out with concentrated algae producing an initial algal abundance of 1.2 x10⁷ cell L⁻¹. A continuous airlift recirculation system maintained a well-mixed open pond throughout the whole study period. From the outset of the experiment, representative discrete water samples were collected to determine dissolved gases (O₂, N₂O), nutrients (NO₃⁻, NO₂⁻), chlorophyll *a* (Chl-*a*) concentrations,

and cell abundance. Temperature, salinity and pH were also recorded with various calibrated sensors.

2.2. Short term monitoring in microalgal laboratory cultures

A set of experiments were performed under controlled laboratory conditions to determine if N₂O cycling occurs in unialgal cultures of *Nannochloris oculata* and *Isochrysis galbana*, and to assess if the accumulation of N₂O over time is favored by the addition of N-nutrients in different states of oxidation (i.e., NO₃⁻, NO₂⁻ and NH₄⁺). Unialgal cultures were provided from the culture collection at the Center of Research CIEN (Austral, University of Austral-Chile). These strains were grown at 20±2°C in a Walne culture medium [26], with a light/dark photoperiod of 12:12 h. A 2-L stock cultures of *Nannochloris oculata* (initial density of 6.02 x 10⁶ cell L⁻¹) and *Isochrysis galbana* (initial a density of 5.61 x 10⁶ cell L⁻¹), previously amended with Allythiourea (ATU) were distributed in three sets of GC vials (50 mL). The experimental design depends upon the use of ATU, a well-recognized inhibitor of NH₄⁺ oxidation in bacteria (e.g., [27]) and recently confirmed to carry out the similar effect on Archaea [28], at a final concentration of 600 µL L⁻¹. Therefore, if these microorganisms were present in a stock culture amended with ATU, it would be expected that no active AAO occurs and that over time microorganisms would not produce N₂O.

Prior to the experiments, nitrogen salts were added to each set of vials (triplicate vials of 50 mL volume). NO₃⁻, NO₂⁻ and NH₄⁺ at concentrations of 20% above background levels, according to the nutrient composition of the culture medium were added (Walne medium, [29]). Subsequently, each vial was sealed with a rubber cap, leaving 15 mL of headspace with ultra-pure Helium. The resulting vials, which contained 15 mL of gas headspace and 35 mL of enriched nutrient medium, were incubated in similar conditions to the stock culture (i.e. under controlled temperature conditions at 20°C on a 12:12 h light dark regime). A gas sample (100 µL) was taken from vial's headspace with a gastight syringe at

the initiation of incubation and after 2 and 4 hours and immediately analyzed by gas chromatography. Prior to each experiment (i.e. the addition of N-salt), cell abundance was recorded and the health and purity of cultures were checked using flow cytometry and microscopy. Throughout experimentation the nutrients, O₂ and pH levels were recorded.

2.3. Chemical analysis

In samples taken from the open pond, dissolved O₂ (125 mL sample) was analyzed using the automatic Winkler method (AULOX Measurement System). For the laboratory experiments, dissolved O₂ concentrations from different incubation times were monitored with non-invasive optical oxygen sensors (PreSens GmbH, Germany, these are planar sensor spots that are fixed on the inner surface of the glass (incubation bottle). The O₂ concentration can therefore be measured in a non-invasive and non-destructive manner from outside, through the wall of the bottle. The planar mini-sensor was stimulated with fluorescent light and data were recorded and saved in the Fibox-3 LCD trace model (PreSens GmbH, Germany). Calibration points were checked and measured independently for each bottle. Subsequently, the O₂ content was calculated using the calibration values for their respective bottles and incubation time. For N₂O analysis, 100 µL was taken from each bottle and immediately determined using gas chromatography (Varian 3380), with an electron capture detector maintained at 350°C and connected to an autosampler device using the He-headspace equilibration technique [30, 31]. A calibration curve was made with four concentrations for N₂O (0.1 ppm, air, 0.5 ppm, and 1 ppm, by Matheson standards). The detector linearly responded to the concentration range. The analytical error for the N₂O was less than 3%.

Duplicated seawater samples of nutrients (NO₃⁻ and NO₂⁻) from the open pond were previously collected, filtrated through 0.7 µm Whatman GF/F filters and frozen (-20°C) until laboratory analysis by standard colorimetric methods [32]. Samples of Chl-a were

filtered in triplicate and then stored at -80°C . The pigment content was extracted from the filter of the thawed samples using acetone and analyzed via fluorometry using a Digital Turner 10AU Field *Fluorometer* [33]. Aliquots of seawater samples were preserved in Lugol's iodine and observed and counted through an optical microscope. Cell abundances were counted in a Fuchs-Rosenthal chamber haemocytometer using five fields and were counted for individual samples at 40 x magnification.

2.4. Data analysis

The correlation between N_2O and other biological variables (e.g., Chl-a) were examined using the Spearman's correlation analysis (r_s), with a 0.05 level of significance. The data recorded from the vials from lab cultures for N_2O increase/decrease were plotted against time and fitted to the linear model, $A(t) = A_0 \pm m t$, using the method of least squares, where t is the incubation time, A_0 is the gas concentration at $t=0$, and m is the linear slope. Same procedure was applied to open pond data. The rates were calculated from the linear slope and their uncertainties were calculated from the errors in the linear regressions, as the square root of the sum of the variance of each rate (triplicate). In each treatment a student's t -test was used to evaluate the differences between the slopes of accumulation or depletion of N_2O over time during incubation. The rate of uncertainty (standard error) was estimated using the propagation error from the standard deviations of the slopes, but only in the case that the slopes were statistically significant.

3. Results

3.1. N_2O cycling in the open pond system.

Figure 1 shows the temporal variability over 50 consecutive days of the physicochemical variables obtained from the open pond system. Temperature and salinity varied from 8.2°C to 13.4°C and from 31.8 to 34.5, respectively (Figure 1a). The pH and

O₂ levels increased from 7.52 to 8.55 and from 168 to 179 μmol L⁻¹, respectively, during the first 18 days. From that day up to the final days of the monitoring period these values decreased to 7.61 and 149 μmol L⁻¹, respectively (Figure 1b).

Temporal variability of Chl-a along with cell abundance and nitrogen nutrient concentrations are shown in Figure 2a. The initial values of Chl-a, during the first 5 days, were around 1.4 μg L⁻¹. This background level increased subsequent to fertilization (day 5) and during the initial stage of culture, and reached a maximum value of 95.97 μg L⁻¹ on approximately day 18, levels then dropped to as low as 2.10 μg L⁻¹ during the final days of the study period. Cell abundance increased immediately after nutrient additions from 3.4 x10⁹ and 1.0x10¹⁰ cells L⁻¹ and then maintained constant levels of around 4.25x10⁹ cells L⁻¹ until day 20. Subsequently levels decreased to abundances as low as 6.25 x10⁷ cells L⁻¹.

In accordance with the temporal distribution of pH and O₂ levels (Figure 1a and 1b), along with both Chl-a and cell abundance, the monitoring period can be separated in two periods: i) a growth phase (phase I), where the Chl-a, pH and dissolved O₂ levels increase and ii) a senescence phase (phase II), where Chl-a, pH and O₂ levels abruptly decrease, suggesting an diminution or dominance of photosynthetic activity throughout the experiment/ monitoring.

N-nutrient concentration was initially similar to the adjacent seawater content at 31 μmol L⁻¹ (area subjected to coastal upwelling), but these levels immediately doubled after fertilization (day 5) and then irregularly decreased as biomass increased, reaching values of less than 0.1 μmol L⁻¹ (see Figure 2b). In contrast, N₂O fluctuated widely during the monitoring period (Figure 2b). N₂O concentrations during the study period increased steadily from 10 nmol L⁻¹ (111% saturation according with solubility coefficient at sampled temperature and salinity) at the initial period after fertilization to 580 nmol L⁻¹ (5500% saturation) on day 32, subsequently N₂O levels dropped abruptly to near seawater

background levels, coinciding with a simultaneous drop in nutrients and Chl-a. Spearman's correlations (r_s) between Chl-a content and N_2O were carried out for each phase. During phase I, N_2O was positively and significantly correlated with Chl-a ($r_s = 0.96$, $p=0.08$), while during phase II, N_2O had negative but significant correlation with Chl-a ($r_s = -0.94$, $p=0.02$)

3.2. N_2O cycling in laboratory experiments

Figure 3a shows the time course experiments carried out with unialgal *Nannochloris oculata* incubated with ATU + NO_3^- , ATU + NO_2^- and ATU + NH_4^+ . The accumulation of N_2O over time was almost linear during incubation for the three previously mentioned N-salts; however N_2O levels over time varied depending on the oxidation state of the added N-salts. This signifies that N_2O accumulated at different rates, being $0.29 \pm 0.06 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ with NO_3^- , $0.24 \pm 0.10 \text{ nmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ with NO_2^- , and $0.21 \pm 0.09 \text{ nmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ with NH_4^+ . There were no significant differences in N_2O accumulation rates between the different added N-salts (no data is presented).

Figure 3b shows the time course experiments carried out with unialgal *Isochrysis galbana* also incubated with ATU+ NO_3^- , ATU + NO_2^- and ATU + NH_4^+ . N_2O accumulation rates were 0.82 ± 0.06 , 0.73 ± 0.04 , and $0.36 \pm 0.08 \text{ nmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ respectively. In the case of *Isochrysis galbana* a significant difference was observed between treatments with NO_3^- and NO_2^- compared to NH_4^+ , these differences were observed between the treatments ATU+ NO_3^- vs. ATU + NH_4^+ and ATU+ NO_2^- vs. ATU + NH_4^+ (Table 1).

Furthermore, despite a lower cell density in the experiment with *Isochrysis galbana* ($5.61 \times 10^6 \text{ cell L}^{-1}$) respect to *Nannochloris oculata* ($6.02 \times 10^6 \text{ cell L}^{-1}$), the former strain yielded higher N_2O accumulation rates under all treatments, with an almost three-fold increase in rate compared to *Nannochloris oculata* (Figure 4). Measurements of O_2 levels

over incubation (through the non-invasive method) indicated that levels never decreased below $88 \mu\text{mol L}^{-1}$, and nutrients did not show any significant variations during the 4 hours of incubation (data not shown).

4. Discussion

4.1. Long term N₂O accumulation during in large scale microalgal production

The impact of anthropogenic interference in the global N budget is known as global fertilization, a phenomenon mainly attributed to N fertilization by agriculture activity [34]. N fertilization produces an excess of fixed nitrogen and large amounts of N₂O [35], also algal aquaculture may be an additional activity that affects the entire N budget and its N₂O emissions. Large scale microalgal cultivations, including cultivation in raceway ponds, are the most economical systems and offer the largest production capacities relative to other systems of comparable cost. However, these culture regimes are highly susceptible to contamination by external microorganisms, such as other algal species, bacteria and protozoa, which occasionally leads to the decay of the desired algal culture [26].

One of the rationales for using microalgae in aquaculture is for its efficiency in converting CO₂ into biomass through photosynthesis, obtaining dense algal cultures that exceed the natural levels of efficiency for biomass production in both the marine environment and terrestrial crops [36]. However, there are numerous indirect environmental effects to be considered, which could potentially disturb the environment, and therefore require prior assessment before they are put into practice.

As illustrated in Figure 2a, the growth in algal biomass over time affected the environmental variables such as pH, O₂ and nutrients (Figure 1a, 1b), demarking two clear phases: Phase I, where the photosynthetic processes predominate rather than oxidative

(aerobic respiration), whereas in phase II the contrary occurs. Ratios of change of N₂O and Chl-a levels during both phases (Figure 2) may indicate different dominance of biogeochemical processes involved in the cycling of these gases over time.

However, N₂O levels gradually increased during Phase I and reached a maximum during Phase II, yielding an accumulation rate of 18.5 nmol L⁻¹ d⁻¹. It is important to note that levels of dissolved N₂O could be widely underestimated, as this open pond system is subject to constant aeration and therefore a high proportion of the gases escape into the atmosphere, therefore it is not possible to measure the true gas production.

N₂O steadily increased in the days following fertilization, and peaked in phase II. This trend suggests that the net autotrophic phase could be partially responsible for some N₂O production, however in phase II the bacterial or archaeal activity involved in N₂O production [24] or micrograzing activity which may be controlling the photoautotrophic biomass, would be affecting the production of this greenhouse gas as the biomass decays. Microalgae density appears also to have been a critical factor in affecting the optimal physiological state of the cell. As biomass increases up to a certain level, some competition for light may have occurred [37]. It was not possible to determine whether bacterial biomass increased (most of them heterotrophic bacteria) or microalgae were being grazed upon by nanoplankton. However, these types of systems are frequently subjected to massive microalgae decay leading to cell lysis and death [38].

Contrary to N₂O dynamics, the algal culture system efficiently removed CO₂ via photosynthesis during phase I, but during the senescence phase CO₂ could be produced during microalgae biomass declination and degradation. In order to compare the relative contribution of N₂O with respect to CO₂ cycling in this long-term monitoring system, an indirect estimation of CO₂ cycling was made taking into consideration a phytoplanktonic Chl-a: C org ratio of 60, and assuming that one mole of typical marine plankton biomass or

particulate organic matter (POM) (molecular weight of POM of 3555 g mol⁻¹) requires 106 moles of inorganic/organic carbon for its synthesis (photosynthesis) or oxidation (aerobic respiration). Thus, considering the difference of carbon algal biomass during phase I (day 17 minus background) and phase II (day 18- day 46), in phase I the pond should be consuming 169,200 μmol m⁻³ of CO₂, while in phase II it is releasing 155,870 μmol m⁻³ of CO₂, giving a total net consumption of CO₂ of 13,330 μmol m⁻³ for the entire period. However in the case of N₂O, it was produced in both phases with a total cumulative contribution of 2049 nmol L⁻¹. Thus, while this system consumes and releases CO₂ according to the phases of that culture, it simultaneously produces N₂O.

Considering that the radiative contribution for N₂O is 230-300 times higher than that of CO₂ [39], the net contribution of N₂O into this open pond is insufficient to offset the radiative contribution of N₂O into the atmosphere, despite the observation of CO₂ removal. Furthermore, continuous aeration in open systems can drag other dissolved gas molecules, leading to rapid outgassing. Thus, the actual level of N₂O could be higher than the observed data and thereby be underestimating the cumulative concentration over time.

4.2. Short term N₂O accumulation in laboratory experiments.

Likewise, laboratory culture assays also reveal that N₂O accumulation occurs in both culture strains (Figure 3a, 3b), however the rates of N₂O accumulation varies between each strain. It is important to note that the N₂O accumulation appears to be related to microalgae species, in this sense diatoms do not seem to mediate any significant N₂O cycling during massive growth (Cornejo data non published) and [25] and these results call for attention about metabolic pathways implicated. The greatest N₂O accumulation occurs in *Isocrhysis galbana* and can be attributed to their structure and size; this microalga has two flagella and is approximately 5 μm, which is comparably larger than *Nannochloris oculata*, which in turn is spherical in shape with an average size of

approximately 2 μm and does not have/display scourge. Each species belongs to different clades of microalgae; *Isocrhysis* to Haptophyceae, and *Nannochloris* to Viridiplantae. Furthermore, both microalgae are rich in polyunsaturated fatty acids [40] and essential amino acids [41, 42], with a higher concentration of fatty acids in *Isocrhysis galbana* than in *Nannochloris sp.*; these differences are related to the stage of crop growth and the concentration of CO_2 [39]. Moreover, amino acid formation requires reduced N compounds, which can be achieved via the assimilation of NO_3^- , NH_4^+ or other available sources of combined nitrogen to amino acids and glutamine by glutamate synthase [43]. In the case of NO_3^- , a process of intracellular reduction is required to form NH_4^+ , which is mediated by the enzymes nitrate and nitrite reductase [44]. During these pathways, N_2O may be generated in similar way to the process occurring during the nitrate or nitrate ammonification [45].

Our findings also reveal that N_2O accumulation did not totally depended on photosynthetic cell abundance, but instead on the type of culture regime employed. If we compare the N_2O accumulation in the open pond systems to the laboratory conditions for the *Nannochloris* species, N_2O production appears to be higher in culture assays than the open systems, despite the fact that the air-open pond allows for continuous gas escape to the atmosphere while close systems (bottles) permit the gas to accumulate without any escape during the incubation. These results suggest that N_2O production is related with physiological state, it may be the case that the cultured cells in the open system have a higher oxidative stress than those growing in the laboratory, that have passed through several acclimation cycles.

Figure 4 illustrates N_2O accumulation rates normalized to cell abundance for algal experiments (with different added N salt). Beside to highlighting differences between the two cultivated strains, treatments with NO_3^- had the highest observed N_2O accumulation

rate and generally the accumulation rates obtained from the lab experiments, normalized by cell abundance (measured initially by flow cytometry), were two orders of magnitude higher than those measured in the open pond system.

4.3. Potential pathways of N₂O production

According to current knowledge, under oxygenated conditions N₂O is mainly produced by bacterial and archaeal nitrifying activities [46, 28]. The predominance of a biochemical route is not yet clear, however new evidence indicates that AAO could be a more plausible process. In addition, NO₂⁻ may be reduced to N₂O during nitrification (a process referred to as nitrifier-denitrification), a reduction which involves NH₄⁺ oxidizing bacteria [47]. This pathway is reported in many different microbial communities, including in NH₄⁺ oxidizing archaea that are now reported as being more active and abundant than previously thought [48].

In the case of laboratory experiments, the ATU inhibitor should preclude the N₂O production by AAO, but it is apparent from the accumulation of N₂O during ATU amended experiments that part of this N₂O did not come from aerobic NH₄⁺ oxidizers (Figure 3). Our data suggests that N₂O production does not exclusively occur via classical AAO. A mechanism like to nitrite-denitrification, an alternative biogeochemical pathway producing considerable quantities of N₂O via nitrite reduction to N₂O by aerobic ammonia oxidizers may be plausible; however these mechanisms have not fully been investigated and some new insight was provided by [23]. Coincidentally, many algae, some bacteria, and even archaea possess NO₂⁻ reductase [49]. This gene is well conserved and has been previously described as aiding the detoxification of NO₂⁻ and NO [50]. This adds to the evidence opposing the formation of N₂O by AAO. Furthermore, the addition of NH₄⁺ did not increase the N₂O accumulation suggesting that AAO was not stimulated.

It is important to note that preliminary reports have revealed that green algae may be a previously unrecognized source of N₂O. [21] found that axenic cultures of several green algae, including *Chlorella spp.*, produced N₂O when fertilized with NO₂⁻. This process was stimulated by glucose, but unaffected by the presence of acetylene and photo-synthetically produced O₂. Assuming the assimilative reduction of NO₃⁻ and/or NO₂⁻ is similar to dissimilative reduction of NO₃⁻ (denitrification or nitrate-amonification), it is viable that during nutrient assimilation, this process leads to N₂O production. Although algae and other micro-organisms tend to use NH₄⁺ in preference to NO₃⁻, which must be reduced before it can be assimilated [51], in the cases where there was a high availability of oxidized nutrient as NO₃⁻ in the culture, the algae produced higher levels of N₂O than those measured under NH₄⁺ and NO₂⁻. This indicates that the oxidation state of nitrogen nutrients may play a role in N₂O release/production through an assimilative and autotrophic process. As studies indicate (for example [21], [23]), N₂O production in cultures of microalgae may be mediated by the enzymes nitrate and nitrite reductase, and favored by assimilating oxidized N sources.

4.4. N₂O emission gap

Sustainability is a key principle in natural resource management, and it involves operational efficiency, minimization of environmental impact, and socio-economic considerations; all of which are interdependent. It has become increasingly obvious that continued reliance on fossil fuel energy resources is unsustainable, on account of both the continual depletion of global reserves, and to greenhouse gas emissions such as N₂O [8] To add complexity, industrial aquaculture is one of the fastest growing economic sectors, constituting around 10% of the global food industry [52] and the pursuit of exploitation and utilization of coastal marine waters is growing. Aquaculture is perceived as a possible

solution to increase global food supply and to avoid the “Malthusian paradigm” that humanity could be faced with in coming years [53].

The effect of microalgal aquaculture on the climate is uncertain [8]. More investigation is required in order to quantify the climatic effects of aquaculture production. Greenhouse gas emissions should be considered, and these emissions are likely to depend on the type of algae under cultivation. In addition, other cultivated species, such as bivalves (*Mytilus edulis*), could have a far greater contribution to global warming [54] through the release of N₂O. Furthermore, determining gas-aerosol interactions could substantially alter the relative importance of the current global warming potential [55]. [7]. Made a theoretical assessment of the global N₂O emission from the aquaculture industry based on food production (farming of fish and shellfish), feces and waste, and concluded that the production of biogases such as N₂O may become an important source of input into the atmosphere.

Our results show that the growth of microalgae, including green algae, is associated with the production of N₂O, but the responsible biogeochemical mechanisms for this production are not yet evident. Thus, biochemical and molecular studies on these issues deserve further attention. In particular, our data also reveal that large scale cultures of green microalgae (e.g. *Nannochloris*) could be a previously unrecognized source of N₂O. These results should be viewed in light of current predictions of increasing aquaculture activity worldwide. At present, there is a great deal of global growth in microalgae cultivation due to the possibility that algal oils could be used for the production of biodiesel, which is considered to be a green energy source that sequesters atmospheric CO₂. The potentially high biomass production of microalgae has been given a lot of attention by researchers, particularly due to the environmental advantages of biodiesel production. Global world production of dry algal biomass is estimated at approximately

10,000 tons per year, with about half of this taking place on mainland China under similar conditions as those reported in this study. The true radiative balance of CO₂ and N₂O should be determined, taking into account the species cultivated, the biochemical pathways and the nutrient conditions of the culture medium.

5. Conclusions

The net N₂O accumulation in the open pond and the significant positive correlation between N₂O and Chl-a in phase I, seem to indicate that some phototrophic pathway may trigger N₂O accumulation. In the case of the laboratory culture, the accumulation of N₂O during ATU amended experiments suggested that part of N₂O did not come from NH₄⁺ oxidizers. Our data suggest that N₂O production is not occurring exclusively via classical aerobic NH₄⁺ oxidation or via NO₂⁻ (nitrite-denitrification), but other phototrophic biogeochemical pathways produce significant amounts of N₂O, however thus far these mechanisms have been poorly studied. Global (natural and anthropogenic) N₂O emissions are rapidly increasing and are expected to almost double by 2050 unless mitigation action will be accelerated. The utilization of algal biomass represents just one approach among many that will be required for meeting future energy, but an adequate evaluation of greenhouse gas emissions is needed.

Acknowledgements

We acknowledge Eduardo Tarifeño, Jesica Cabrera Torres and Oswaldo Gómez Correa from the aquaculture laboratory at Dichato for their dedicated lab and fieldwork. This research was funded by FONDECYT N° 1120719. CE received partial support from FONDECYT N° 1120719. This is a contribution by 15110009 (FONDAP-CONICYT).

References

- [1] P. J. Crutzen, The influence of nitrogen oxides on the atmospheric ozone content. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society* 96 (408) (1970) 320-325. <http://dx.doi.org/10.1002/qj.49709640815>.
- [2] M. Prather, D. Ehhalt, F. Dentener, R. Derwent, E. Dlugokencky, E. Holland, I. Isaksen, J. Katima, V. Kirchhoff, P. Matson, P. Midgley, M. Wang, T. Berntsen, I. Bey, G. Brasseur, L. Buja, W.J. Collins, J. Daniel, W.B. DeMore, N. Derek, R. Dickerson, D. Etheridge, J. Feichter, P. Fraser, R. Friedl, J. Fuglestvedt, M. Gauss, L. Grenfell, A. Grüber, N. Harris, D. Hauglustaine, L. Horowitz, C. Jackman, D. Jacob, L. Jaeglé, A. Jain, M. Kanakidou, S. Karlsdottir, M. Ko, M. Kurylo, M. Lawrence, J.A. Logan, M. Manning, D. Mauzerall, J. McConnell, L. Mickley, S. Montzka, J.F. Müller, J. Olivier, K. Pickering, G. Pitari, G.J. Roelofs, H. Rogers, B. Rognerud, S. Smith, S. Solomon, J. Staehelin, P. Steele, D. Stevenson, J. Sundet, A Thompson, M. van Weele, R. von Kuhlmann, Y. Wang, D. Weisenstein, T. Wigley, O. Wild, D. Wuebbles, R. Yantosca, Atmospheric Chemistry and Greenhouse Gases, in *Climate Change 2001: The Scientific Basis, Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, edited by J. T. Houghton, Y. Ding and D. J. Griggs, Cambridge University Press, Cambridge UK (2001) 239- 287. <http://dx.doi.org/AC05-76RL01830>.
- [3] T. Machida, T. Nakazawa, Y. Fujii, S. Aoki, O. Watanabe, Increase in the atmospheric nitrous oxide concentration during the last 250 years, *Geophysical Research Letters*, 22(21) (1995) 2921-2924. <http://dx.doi.org/10.1029/95GL02822>.
- [4] A. Mosier, C. Kroeze, C. Nevison, O. Oenema, S. Seitzinger, O Van Cleemput, Closing the global N₂O budget: nitrous oxide emissions through the agricultural nitrogen cycle, *Nutrient cycling in Agroecosystems* 52 (2-3) (1998) 225-248. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1009740530221>.

- [5] E. A. Davidson, The contribution of manure and fertilizer nitrogen to atmospheric nitrous oxide since 1860, *Nature Geoscience* 2 (2009). <http://dx.doi.org/10.1038/ngeo608>.
- [6] Y. Law, L. Ye, Y. Pan, Z. Yuan, Nitrous oxide emissions from wastewater treatment processes, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367(2012) 1265-1277. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2011.0317>.
- [7] J. Williams P. J. Crutzen, Nitrous oxide from aquaculture, *Science* 3 (2010) 143. <http://dx.doi.org/10.1038/ngeo804>.
- [8] UNEP, Drawing Down N₂O to Protect Climate and the Ozone Layer, A UNEP Synthesis Report, United Nations Environment Programme (UNEP) (2013) Nairobi, Kenya. ISBN: 978-92-807-3358-7
- [9] F. Creutzig, A. Popp, R. Plevin, G. Luderer, J. Minx, O. Edenhofer, Reconciling top-down and bottom-up modelling on future bioenergy deployment, *Nature Climate Change* 2(5) (2012) 320-327. <http://dx.doi.org/10.1038/nclimate1416>.
- [10] L. Brennan, P. Owende, Biofuels from microalgae: A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2010) 557–577. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>.
- [11] T. Mata, A. A. Martins, N. S. Caetano, Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2010) 217- 232. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>.
- [12] M. Borowitzka, Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *J. Appl. Phycol.* 9 (1999) 393-401. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1007921728300>.

- [13] S. Ami, Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae, *Energy Conver and Managements* 50 (7) (2009)1834-1840. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2009.03.001>.
- [14] A. Demirbas, Use of algae as biofuel source, *Energy, Conver and Managements*, 51 (12) (2010) 2738- 2749. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2010.06.010>.
- [15] J. N. Galloway, F. J. Dentener, D. G. Capone, E. W. Boyer, R. W. Howarth, S. P. Seitzinger, G. P. Asner, C. C. Cleveland, P. A. Green, E. A. Holland, D. M. Karl, A. F. Michaels, J. H. Porter, A. R. Townsend, C. J. Vöosmarty, Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future, *Biogeochemistry*, 70 (2) (2004) 153-226. <http://dx.doi.org/10.1007/s10533-004-0370-0>.
- [16] N. Gruber, Nitrogen in the Marine Environment, *The Marine Nitrogen Cycle: Overview and Challenges*, Elsevier Inc. (2008) 1-50. ISBN: 978-0-12-372522-6
- [17] S. Doney, The growing human footprint on coastal and open-ocean biogeochemistry, *Science* 328 (2010) 1512-1516. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1185198>.
- [18] A. Clarens, E. P. Resurreccion, M.A. White, L. M. Colosi, Environmental life cycle: comparison of algae to other bioenergy feedstocks, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 1813–1819. <http://dx.doi.org/10.1021/es902838n>.
- [19] K. Shine, W. Sturges, CO₂ is not the only gas, *Science* 315 (2007) 1804-1806. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1141677>.
- [20] H. W. Bange, A. Freing, A. Kock, C.R. Löscher, Marine pathways to nitrous oxide (N₂O) In: *Nitrous oxide and climate change*, Earth scan Ltd. London, UK (2010) 232. ISBN: 978-1-84407-757-1
- [21] P. Weathers, N₂O evolution by green algae, *Appl. Environ. Microb.* 48 (6) (1984) 1251-1253. PMID: PMC241719

- [22] P. Weathers, J. J. Niedzielski, Nitrous oxide production by cyanobacteria, Archives of Microbiology 146 (2) (1986) 204-206. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00402352>.
- [23] B. Guieysse, M. Plouviez, M. Coilhac, L. Cazali, Nitrous Oxide (N₂O) production in axenic Chlorella vulgaris microalgae cultures: evidence, putative pathways, and potential environmental impacts, Biogeosciences 10 (2013) 6737–6746. <http://dx.doi.org/10.5194/bg-10-6737-2013>.
- [24] K. D. Fagerstone, J. C. Quinn, T. H. Bradley, S. K. De Long, A. J. Marchese, Quantitative Measurement of Direct Nitrous Oxide Emissions from Microalgae Cultivation, Environ. Sci. Technol. 45 (2011) 9449–9456. <http://dx.doi.org/10.1021/es202573f>.
- [25] S. Ferrón, D T. Ho, Z. I. Johnson, M. E. Huntley, Air–Water Fluxes of N₂O and CH₄ during Microalgae (*Staurosira sp.*) Cultivation in an Open Raceway Pond, Environmental Science & Technology 46 (19) (2012), 10842-10848. <http://dx.doi.org/10.1021/es302396j>.
- [26] R. A. Andersen, Algal Culturing Techniques, Phycological Society of America, Elsevier Inc. (2005) 205-219. ISBN: 0-12-088426-7.
- [27] P. Ginestet, J. Audic, V. Urbain, J. Block, Estimation of nitrifying bacterial activities by measuring oxygen uptake in the presence of the metabolic inhibitors allylthiourea and azide, Appl. Environ. Microbiol. 65 (6) (1998) 2266-2268. PMID: PMC106310
- [28] A. E Santoro, C. Buchwald, M. R. McIlvin, K. L. Casciotti, Isotopic signature of N₂O produced by marine ammonia- oxidizing archaea, Science 333 (2011) 7–10. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1208239>.

- [29] I. Laing, Cultivation of marine unicellular algae, MAFF Laboratory Leaflet Number Directorate of Fisheries Research Lowestoft, UK, 67 (1991). ISSN: 0143-8018
- [30] C. C. McAuliffe, Gas Chromatography determination of solutes by multiple phase equilibration, Chem. Technol. 1(1971) 46-51.
- [31] M. Cornejo, L. Farías, M. Gallegos, Seasonal variability in N₂O levels and air-sea N₂O fluxes over the continental shelf waters off central Chile (~36°S), Progr. Oceanogr. 75 (2007) 383-395. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pocean.2007.08.018>.
- [32] K. Grasshoff, M. Ehrhardt, K. Kremling, Methods of Seawater Analysis, 2nd edition, Weinheim: Verlag Chemie, Germany, (1983) 8-97. ISBN: 3-527-29589-5
- [33] T. Parsons, Y. Maita, C. M. Lali, A manual of chemical and biological methods for seawater analysis, Pergamon Press. (1985) 172-178. ISBN 0-08-030288-2
- [34] P. M. Vitousek, Beyond global warming, Ecology and Global change, Ecology 75 (1994) 1861-1876. <http://dx.doi.org/10.2307/1941591>.
- [35] P.K. Barton, J. Atwater, Nitrous Oxide Emissions and the Anthropogenic Nitrogen in Wastewater and Solid Waste, J. Environ. Eng. 128 (2002) 137-150. [http://dx.doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2002\)128:2\(137\)](http://dx.doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2002)128:2(137)).
- [36] Y. Chisti, Biodiesel from microalgae, Biotech. Adv. 25 (2007) 294-306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>.
- [37] J.R. Harding, L.W. Meeson, T.R. Fisher, Phytoplankton production in two East Coast estuaries: Photosynthesis- light functions and patterns of carbon assimilation in Chesapeake and Delaware bays, Estuarine, Coastal and Shelf, Sci. 23 (1986) 773-806. [http://dx.doi.org/10.1016/0272-7714\(86\)90074-0](http://dx.doi.org/10.1016/0272-7714(86)90074-0).
- [38] R. L. Naylor, R. J. Goldburg, J. H. Primavera, N. Kautsky, M. C. M. Beveridge, J. Clay, C. Folke, J. Lubchenco, H. Mooney, M. Troell, Effect of aquaculture on world fish supplies, Nature 405 (2000) 1017-1024. <http://dx.doi.org/10.1038/35016500>.

- [39] IPCC, 2007: Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, Pachauri, R.K and Reisinger, A.(eds.)]. Geneva, Switzerland, 104 pp. ISBN 92-9169-122-4
- [40] A. Roncarati, A. Meluzzi, S. Acciarri, N. Tallarico, P. Meloti, Fatty Acid Composition of Different Microalgae Strains (*Nannochloropsis* sp., *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd, *Nannochloris atomus* Butcher and *Isochrysis* sp.) According to the Culture Phase and the Carbon Dioxide Concentration, *Journal of the World Aquaculture Society* 35 (3) (2004) 401-411. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-7345.2004.tb00104>.
- [41] K. J. Flynn, K. Davidson, J. W. Leftley, Carbon-nitrogen relations at whole-cell and free-amino-acid levels during batch growth of *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae) under conditions of alternating light and dark, *Marine Biology* 118 (2) (1994) 229-237. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00349789>.
- [42] K. J. Flynn, K. Davidson, J. W. Leftley, Carbon-nitrogen relations during batch growth of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) under alternating light and dark, *Journal of Applied Phycology* 5 (4) (1993) 465-475. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02182739>.
- [43] D. W Tempest, J. L Meers, C. M Brown In: Prusiner S, Stadtman ER (eds) *The enzymes of glutamine metabolism*. (1973) Academic Press, London New York
- [44] W.R. Ullrich, II.5 Uptake and Reduction of Nitrate: Algae and Fungi *Encyclopedia of Plant Physiology* 15 (1983) 376-397. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-68885-0_13.
- [45] C. Costa, A. Macedo, I. Moura, J. G. G. Moura, J. Le Gall, Y. Berlier, et al, Regulation of the hexaheme nitrite/nitric oxide reductase of *Desulfovibrio*

- desulfuricans, *Wolinella succinogenes* and *Escherichia coli*: a mass spectrometric study, *FEBS Lett.* 1 (1990) 67–70. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80508-G](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(90)80508-G).
- [46] G. A. Ritchie, D. J. D. Nicholas, Identification of the sources of nitrous oxide produced by oxidative and reductive processes in *Nitrosomonas europaea*, *Biochem. J.* 126 (1972) 1181-1191.
- [47] L. J. Shaw, G. W. Nicol, Z. Smith, J. Fear, J. I. Prosser, E. M. Baggs, *Nitrosospira spp.* can produce nitrous oxide via a nitrifier denitrification pathway, *Environ. Microbiol.* 8 (2006) 214-222. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00882.x>.
- [48] C. B. Walker, J. R. de la Torre, M. G. Klotz, H. Urakawa, N. Pinel, D. J. Arp, C. Brochier-Armanet, P. S. G. Chain, P. P. Chan, A. Gollabgir, J. Hemp, M. Hügler, E. A. Karr, M. Konneke, M. Shin, T. J. Lowe, W. Martens-Hubben, L. A. Sayavedra-Soto, D. Lang, S. M. Sievert, A. C. Rosenzweig, G. Manning, D. A. Stahl, *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107 (2010) 8818-8823. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0913533107>.
- [49] K.L Casciotti, B.B. Ward, Dissimilatory nitrite reductase genes from autotrophic ammonia-oxidising bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 2213-2221. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.5.2213-2221.2001>.
- [50] G. Braker, J.M. Tiedje, Nitric oxide reductase (norB) genes from culture and environmental samples, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 3476-3483. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.6.3476-3483.2003>.
- [51] J. I. Sprent, *The ecology of the nitrogen cycle*, Cambridge University Press. Cambridge (1987). ISBN 0 521 32537 4

- [52] FAO, Planning and Management for Sustainable Coastal Aquaculture development, GESAMP Reports and Studies 68 (2001) FAO, Rome. ISBN 92-5-104634-4.
- [53] C. M. Duarte, N. Marbá, M. Holmer, Rapid domestication of marine species, *Science* 316 (2007) 382-383. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1138042>
- [54] P. Stief, M. Poulsen, L. P. Nielsen, H. Brix, A. Schramm, Nitrous oxide emission by aquatic macrofauna, *PNAS* 106 (2009) 4296-4300. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0808228106>.
- [55] D. T. Shindell, G. Faluvegi, D. M. Koch, G. A. Schmidt, N. Unger, S. E. Bauer, Improved attribution of climate forcing to emissions, *Science* 326 (2009) 716-718. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1174760>.

Figure captions

Figure 1. Temporal variability observed during culturing of *Nannochloris sp* of (a) salinity and temperature, (b) pH and oxygen, observed in the open pond. Bars represent ± 1 SE (n= 3).

Figure 2. Temporal variability during culturing of *Nannochloris sp* of (a) cell abundances (cell L⁻¹) and chlorophyll-a ($\mu\text{g L}^{-1}$). (b) nitrous oxide (nmol L⁻¹) and nitrite + nitrate concentration ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

Figure 3.a) Time course experiments of N₂O cycling (accumulation in nmol L⁻¹) for *Nannochloris oculata* cultured in a medium amended with ATU (NH₄⁺ oxidizing inhibitor) and with the addition of different nitrogen salt NO₃⁻, NO₂⁻ and NH₄⁺. b) Time course experiments of N₂O cycling (accumulation) for *Isochrysis galbana* cultured in a medium amended with ATU and with the addition of different nitrogen salts NO₃⁻, NO₂⁻ and NH₄⁺. Error bars indicate standard deviation for triplicate samples taken at each incubation time.

Figure 4. Daily accumulated N_2O rates $\text{nmol d}^{-1} \text{cell}^{-1}$ (scale multiplied by $\times 10^6$), normalized to cell abundance biomass estimated for each culture strain under the addition of different N-salts (enrichment at approximately 20% of the background)

Figure 1a.

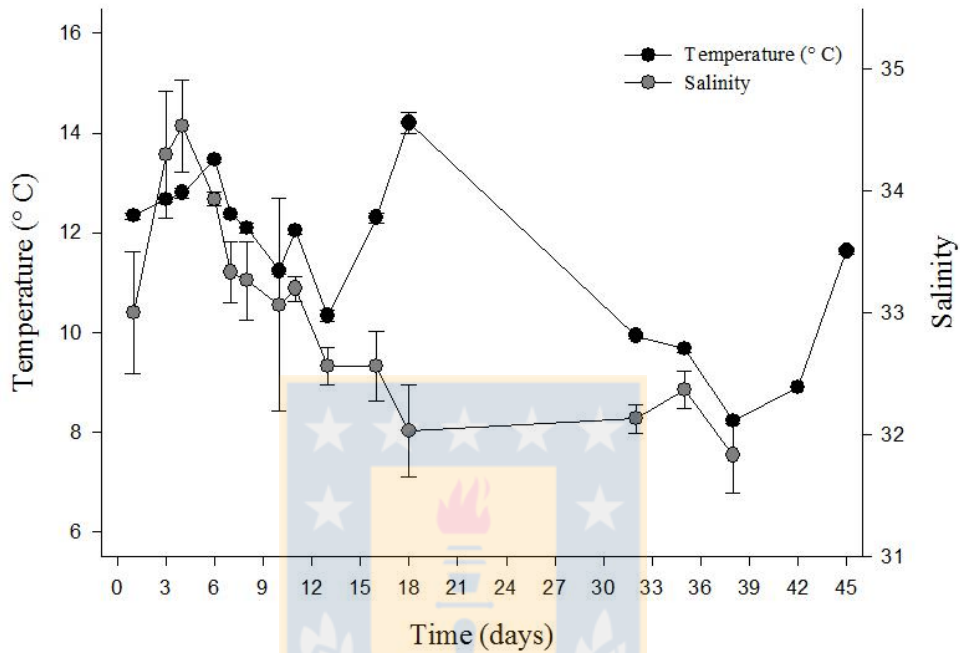


Figure 1b

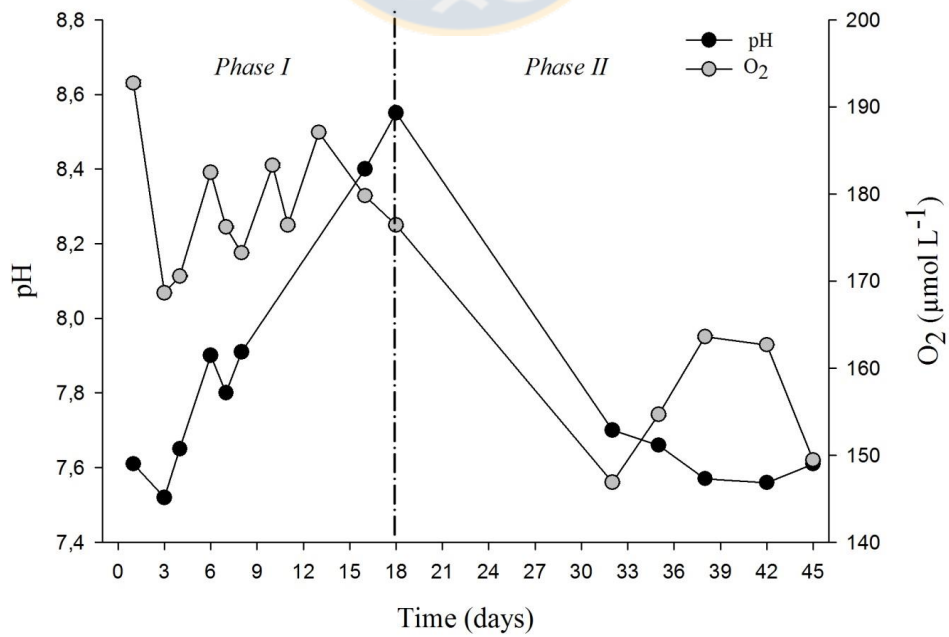


Figure 2 a

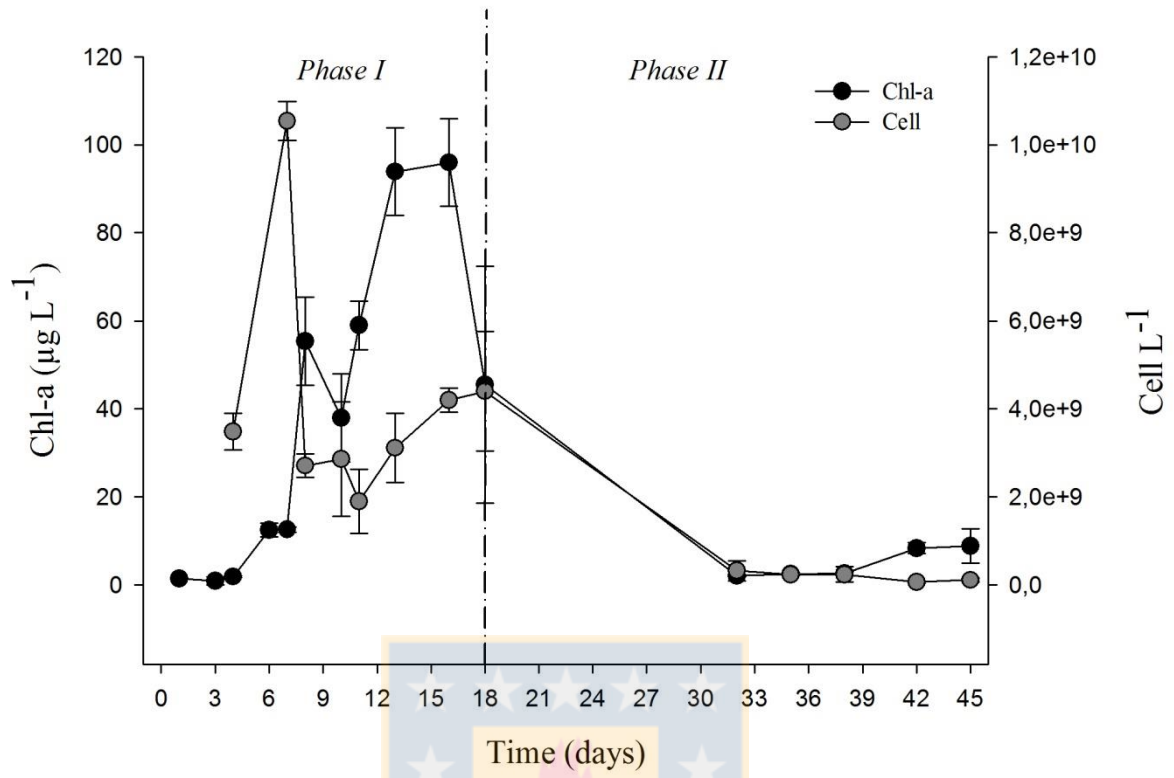


Figure 2b

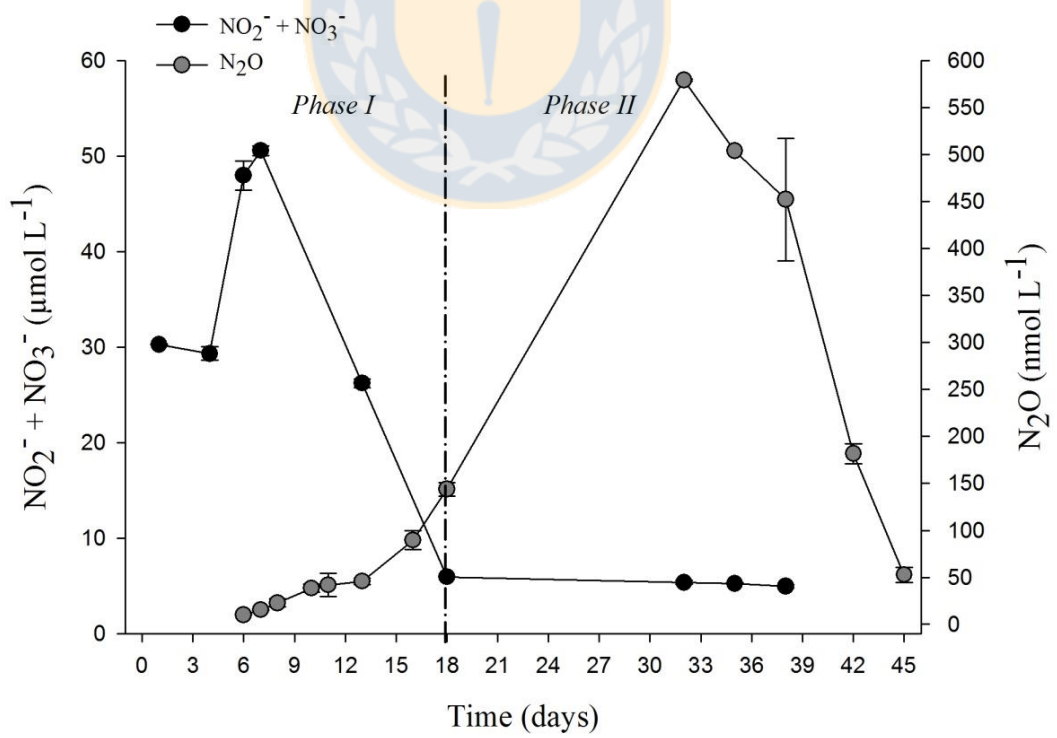


Figure 3a

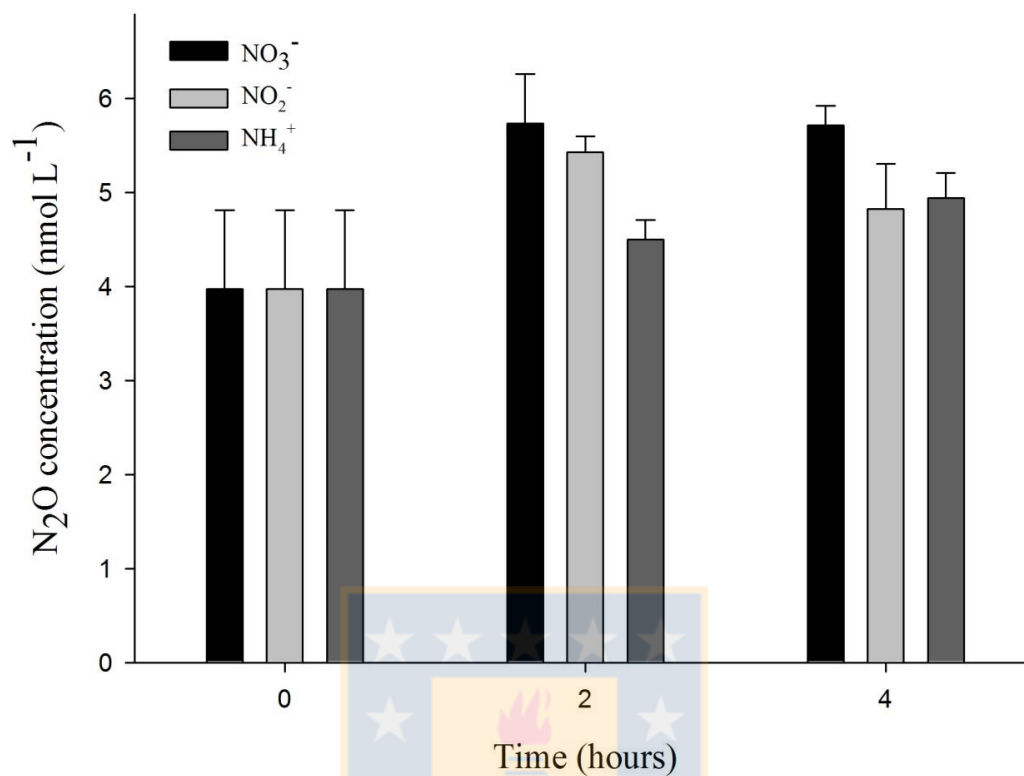


Figure 3b

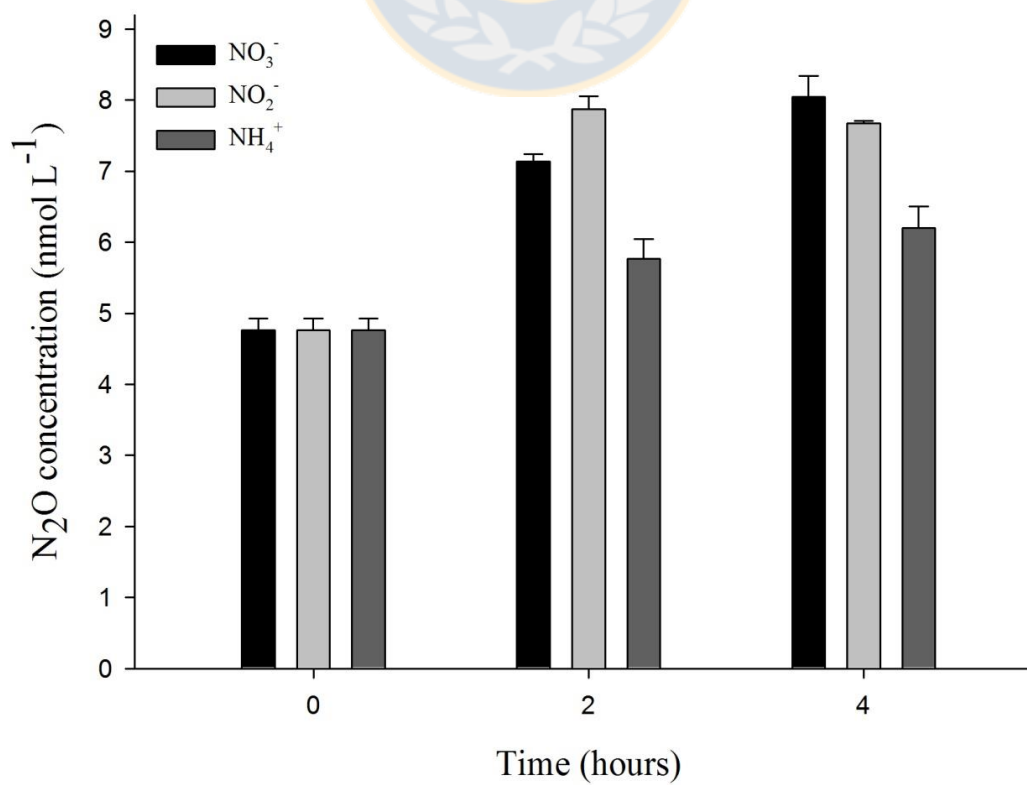


Figure 4

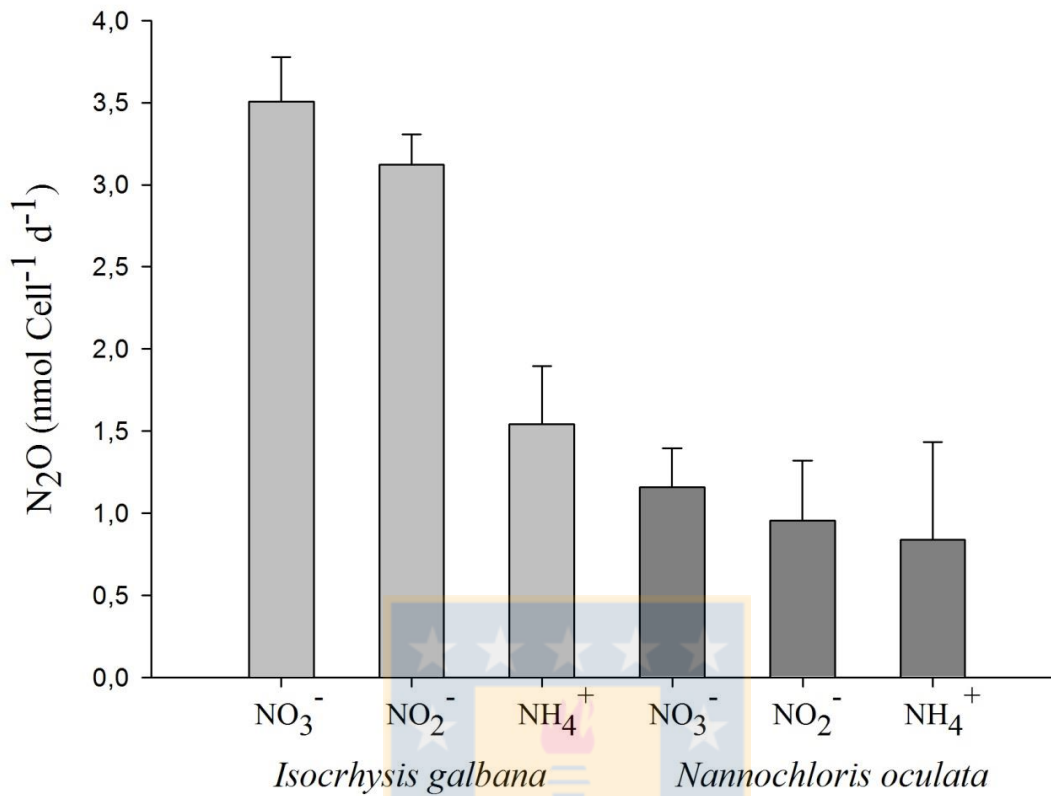


Table 1. T-test for N₂O accumulation rate for different treatments in cultures of *Isochrhysis galbana* from independent samples

Treatment		Mean	Mean	t-value	df	p	SD	SD
Group 1	Group 2	Group 1	Group 2				Group 1	Group 2
NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	0.82	0.72	2.14	4	0,09	0.062	0.043
NO ₂ ⁻	NH ₄ ⁺	0.72	0.35	6.8	4	0.002	0.043	0.082
NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	0.82	0.35	7.7	4	0.001	0.062	0.082

Group 1 and 2 correspond to the comparison between treatments (NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺). The *p* value indicates that significant differences for treatments found NO₃⁻ and NO₂⁻ versus treatment of NH₄⁺. Note: variables were treated as independent samples

4.4. Variación en la concentración de N₂O en cultivos monoclonales de microalgas marinas y su respuesta frente a la inhibición de la fotosíntesis.

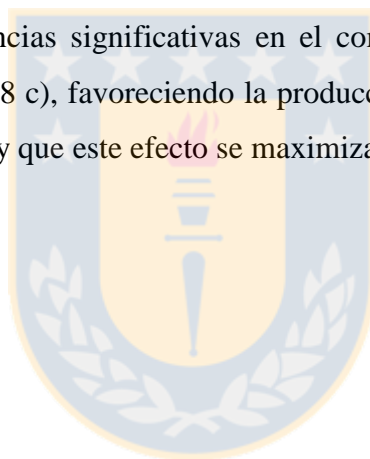
Experimento de adición de un inhibidor del fotosistema II en un cultivo de *Micromonas pusilla* y *Nannochloris* sp.

Todos los experimentos de reciclaje de N₂O fueron realizados bajo las mismas condiciones de luz, temperatura y medio de cultivo. No se realizaron modificaciones al medio de cultivo, sólo la adición de DCMU en el momento de iniciar el experimento. La evolución temporal de N₂O en un cultivo de *Micromonas pusilla* y *Nannochloris* sp. y su respuesta frente al inhibidor DCMU fue monitoreada cada 3 horas al igual que el experimento de adición de sales nitrogenadas.

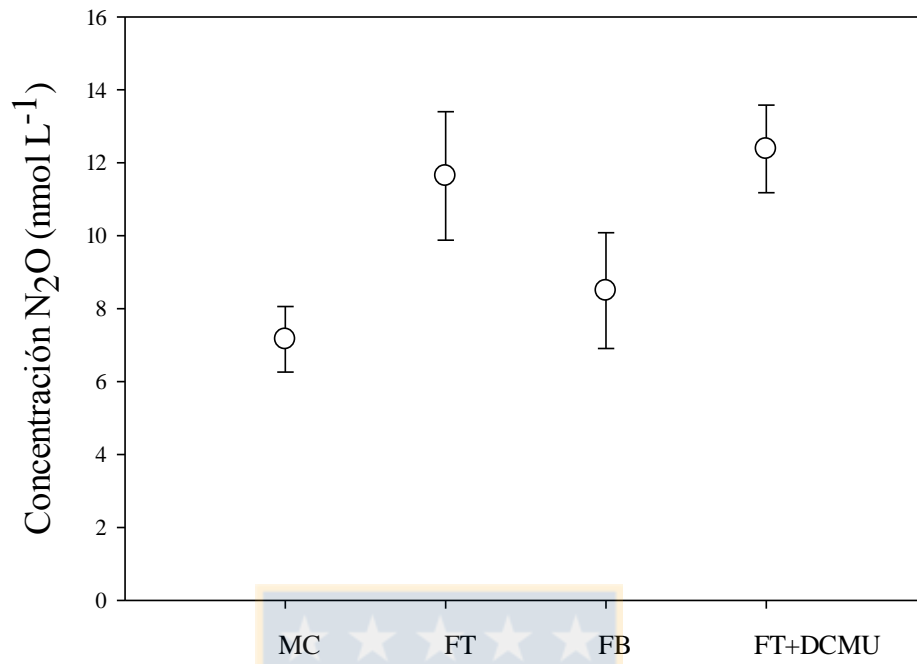
En el Anexo II se muestra los promedios de la concentración de N₂O (nmol L⁻¹) para *Micromonas pusilla* en a) horas luz y b) horas oscuridad tanto para las fracciones FT y FB, así como para el tratamiento de adición de DCMU (FT+DCMU) además del control MC. El MC presentó las menores concentraciones de N₂O, mientras que el tratamiento FT+DCMU presentó concentraciones promedio de N₂O 12.38 ± 1.2 nmol L⁻¹ para horas luz y 11.27 ± 2.2 nmol L⁻¹ en horas oscuridad, indicando que en ambos tratamientos existió producción significativa del gas comparado con MC (Tabla 7 a y b). Sin embargo la adición de DCMU no incrementó significativamente la producción N₂O comparado con la fracción FT. En la Figura 11 se observa la concentración promedio de N₂O para las fracciones FT, FB y el tratamiento FT+DCMU frente al control MC para horas luz a) y horas oscuridad b), el comportamiento de la producción del gas fue similar en ambas fases no observándose una diferenciación significativa (Tabla 7 c) en la producción del gas entre las fases de luz y oscuridad, por lo que no habría diferencias en el comportamiento de producción de N₂O relacionado al ciclo día-noche.

En el caso de *Nannochloris* sp. en el Anexo III se observan los promedios de la concentración de N₂O (nmol L⁻¹) a) horas luz y b) horas oscuridad tanto para las fracciones FT y FB, como para el tratamiento de adición de DCMU (FT+DCMU) frente a un control inerte MC. Para las horas luz, el comportamiento fue similar al de *Micromonas pusilla*, la concentración de N₂O para el tratamiento FT+DCMU fue mayor que el control MC presentando un promedio de 6,74 ± 0.6 nmol L⁻¹ de N₂O para horas luz; esta concentración

fue menor que FT y similar a FB, esto refleja un moderado consumo de N_2O por parte del tratamiento de adición de DCMU, lo que podría estar relacionado a un efecto del frasco matraz debido a que la inoculación con DCMU se realizó el mismo día del experimento. Un comportamiento completamente distinto ocurre en las horas de oscuridad, en donde el promedio de concentración de N_2O para el tratamiento FT+DCMU fue de $33,5 \pm 23 \text{ nmol L}^{-1}$, lo que implica que la adición de DCMU habría estimulado significativamente la producción N_2O en horas oscuridad (Tabla 8 b) alcanzando un valor máximo de $73,75 \text{ nmol L}^{-1}$ de N_2O . De esta forma también existe diferencias entre la adición de DCMU frente a los tratamientos FT y FB y esta diferencia estaría vinculado a un proceso metabólico que ocurre en ausencia de luz. En la Figura 12 se observa la concentración promedio de N_2O para las fracciones FT, FB, el tratamiento FT+DCMU y el control MC, para horas luz a) y horas oscuridad b). El comportamiento de la producción del gas fue distinto en ambas fases, observándose una mayor producción del gas en la fases de oscuridad, existiendo diferencias significativas en el comportamiento del N_2O entre las fases luz y oscuridad (Tabla 8 c), favoreciendo la producción de N_2O al inhibir el flujo de electrones del fotosistema II y que este efecto se maximizaría en la fase de oscuridad.



a) horas luz



b) horas oscuridad

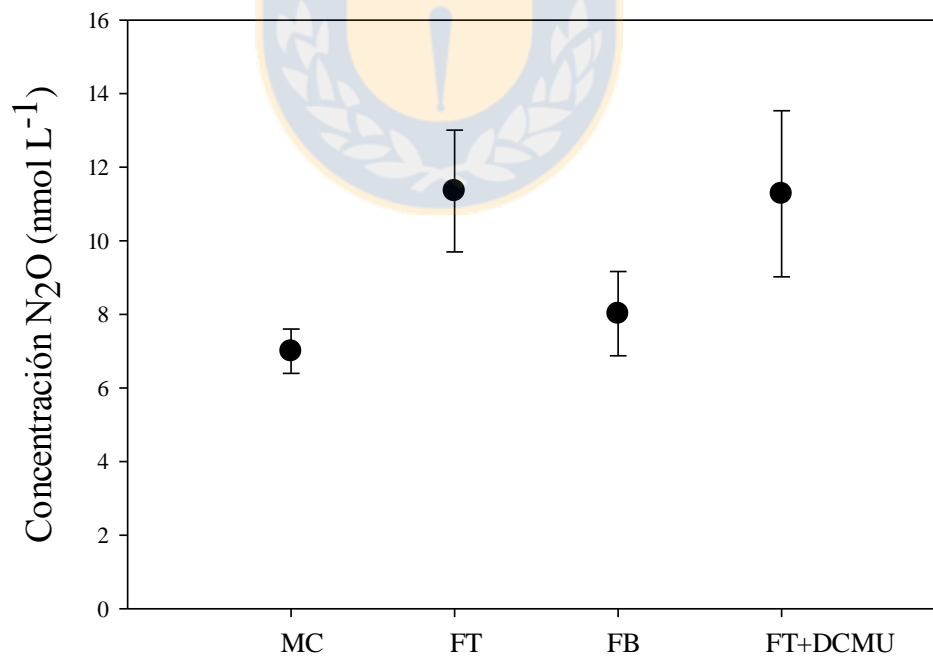
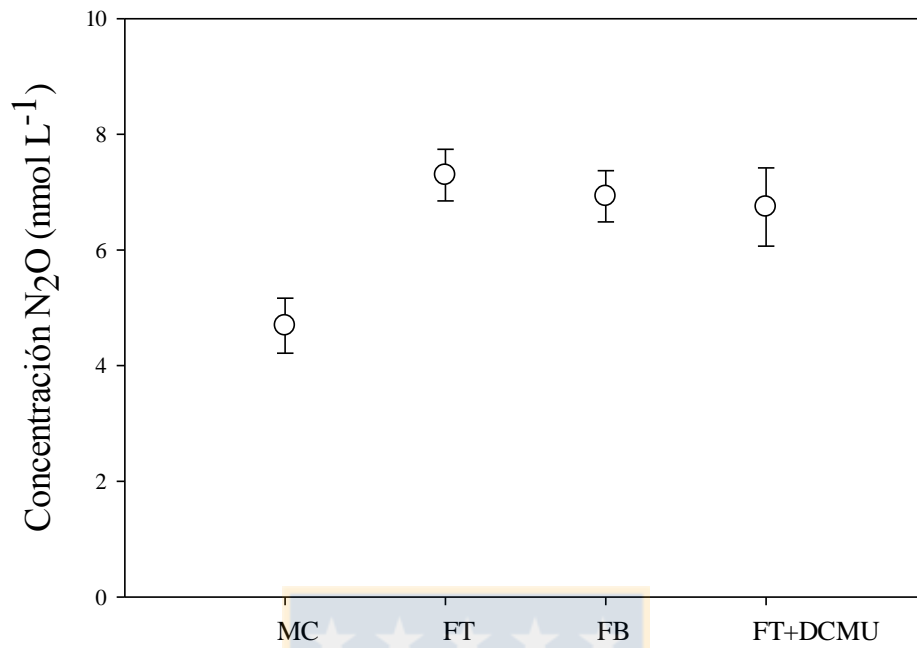


Figura 12. Concentración de N₂O (nmol L⁻¹) en un cultivo de *Micromonas pusilla* para tratamientos de adición de DCMU en; a) horas luz, b) horas oscuridad.

a) horas luz



c) horas oscuridad

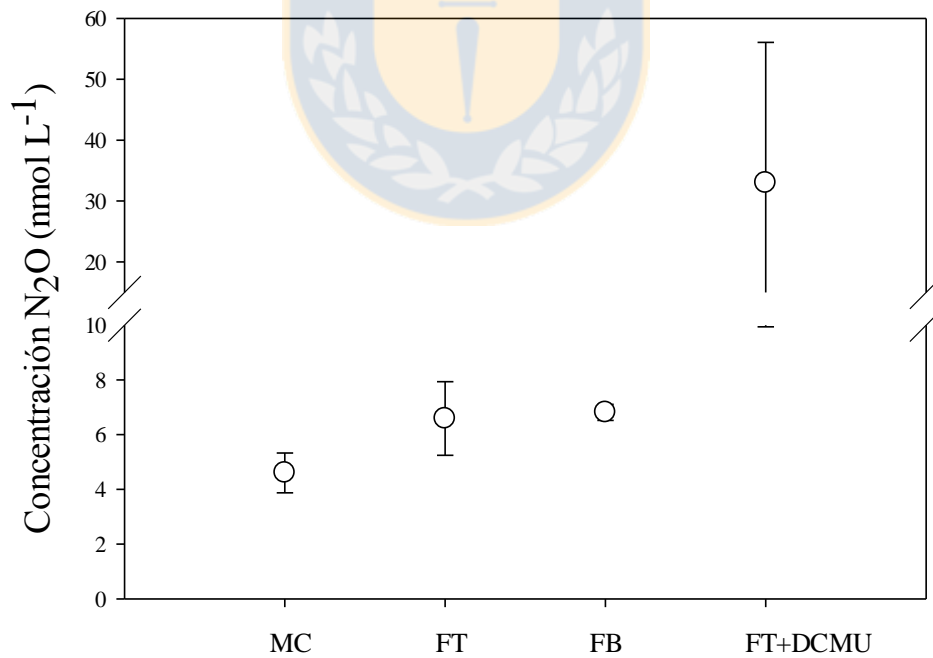


Figura 13. Concentración de N₂O (nmol L⁻¹) en un cultivo de *Nannochloris* sp. para tratamientos de adición de DCMU en; a) horas luz, b) horas oscuridad.

Una forma de comparar los resultados de producción del gas N₂O entre las microalgas es a través de las tasas de producción, estas son una medida de producción de gas estandarizadas en el tiempo (nM h⁻¹). En el Anexo IV se observan las tasas de producción de N₂O estandarizadas por la biomasa (nmol cel⁻¹h⁻¹) en donde *Micromonas pusilla* presentó mayores tasas de producción comparas con *Nannochloris* sp. exceptuando el tratamiento de inhibición con DCMU donde la tasa de producción de N₂O por parte de *Nannochloris* sp., fue significativamente más alta que *Micromonas pusilla*.

5. DISCUSIÓN GENERAL.

5.1. Composición de los cultivos de fitoplancton fotosintético.

Respecto a los análisis moleculares de la amplificación del gen *amoA* a través de PCR, estos muestran que el gen *amoA* de beta-proteobacteria amonio oxidante se encuentra potencialmente en los cultivos de *Micromonas pusilla* y de *Nannochloris* sp. ya que se lograron obtener amplificaciones del gen en cultivos de ambas microalgas para distintas temperaturas de annealing. En el caso del PCR de arqueas amonio oxidantes, no fue posible obtener la resolución de bandas debido a que los primers no amplificaron. En el caso de grupo de beta-proteobacteria amonio oxidantes la presencia del gen *amoA* sugiere que, si bien, aunque no se encontraron bacterias amonio oxidantes en los análisis de secuenciación es posible que el gen *amoA*, si se encuentre en los cultivos. Además, estos organismos podrían estar involucrados en la producción de N₂O en los experimentos de adición de nutriente de NH₄⁺.

Es importante mencionar que los resultados de secuenciación muestran los plástidos de *Micromonas pusilla* y *Nannochloris* sp., respectivamente y no de otros eucariontes, esto confirmaría el hecho de que el cultivo era monoclonal, pues sólo presentaba una microalga. Sin embargo, los cultivos no eran axénicos, ya que presentaron una gran cantidad de bacterias acompañantes. Respecto a la secuenciación de bacterias en los cultivos de microalgas, el árbol filogenético muestra que estos organismos corresponden principalmente alpha-proteobacterias (Sphingomonadales y Rhodobacterales) y beta-proteobacterias (Burkholderiales) ninguna de las especies presentes en los análisis de DGGE presentarían el gen *amoA*. Sin embargo, esto no implica que este gen no se

encuentre potencialmente en los cultivos. Como se discutió para el análisis de PCR, este gen podría estar presente en ambos cultivos. Un análisis de DGGE exclusivo para el gen *amoA* podría indicar con seguridad si existen bacterias que sean capaces de realizar oxidación aerobia del amonio.

De acuerdo a los resultados de análisis del gen 16S rRNA a través de DGGE, para el cultivo de *Micromonas pusilla*, la principal característica en común que presentan estos organismos es que son quimio heterótrofos, el análisis indicó que el género *Sphingomonas* y *Phaeobacter* contienen genes que participan en la producción de N₂O a través del gen Nor (óxido nítrico reductasa), en las subunidades B y C, un representante de *Sphingomonas* es la especie *Sphingomonas hunanensis* la cual ha sido aislada del suelo de bosques no salinos (Chen *et al.*, 2010), el representante del género *Phaeobacter* encontrado en el cultivo es *Phaeobacter gallaeciensis*, es un representante del abundante clado marino Roseobacter, cuya principal característica es ser un efectivo colonizador de superficies marinas tanto bióticas como abióticas (Thole *et al.*, 2012).

El género *Limnobacter* pertenece al grupo de beta-proteobacterias, las cuales son bacterias heterótrofas, utilizan como fuente de energía ácidos carboxílicos y aminoácidos (Spring *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2011). La principal característica de *Limnobacter* es la capacidad de oxidar tiosulfato (S₂O₃²⁻) a sulfato (SO₄²⁻) (Spring *et al.*, 2001). El género *Limnobacter* podría desempeñar un importante papel en el ciclo biogeoquímico del azufre, este género no se ha vinculado a la producción o consumo de gases de nitrógeno.

Algunos representantes del género *Paracoccus* son capaces de crecer anaeróbicamente y utilizar NO₃⁻ como aceptor de electrones (Harker *et al.*, 1998), como por ejemplo *Paracoccus denitrificans* el cual presenta la enzima norB y norC. También existen representantes de este género, como por ejemplo *Paracoccus marcusii* que es quimio- heterótrofo, y presenta un metabolismo estrictamente aerobio.

Los resultados de secuenciación para el cultivo de *Nannochloris* sp. indicaron que al igual que *Micromonas pusilla*, este tampoco era axénico ya que contenía una gran cantidad de bacterias acompañantes incluido el género *Tropicibacter* que al igual que las microalgas presenta un tipo de clorofila y por lo tanto la capacidad de realizar fotosíntesis.

De acuerdo a los resultados de secuenciación, el cultivo de *Nannochloris* sp. y *Micromonas pusilla* presentan solo un género en común: *Limnobacter*. Respecto a los

demás géneros de bacterias que acompañaban el cultivo de *Nannochloris* sp.; *Roseovarius* pertenece a la clase alpha-proteobacterias y al grupo de los fototrofos aeróbicos anoxigénicos, representando a bacterias foto-heterótrofas que requieren oxígeno para su crecimiento y para la síntesis bacterio-clorofila (BChl-a) (Beja *et al.*, 2002). Este género junto a otros grupos de bacteriopláncton fotosintético pueden jugar un importante rol en la productividad del bacteriopláncton y en los ciclos biogeoquímicos de la superficie del océano (Jeanthon *et al.*, 2011).

En el cultivo de *Nannochloris* sp. también es posible identificar al género *Tropicibacter*, el cual fue descrito junto a la especie *Tropicibacter naphthalenivorans*, son organismos aislados de aguas marinas, presentan la enzima oxigenasa y la capacidad de reducir NO_3^- a NO_2^- (Harwati *et al.*, 2009), aunque los estudios de Lucena *et al.* (2012) difieren respecto a la capacidad de *Tropicibacter* sp. de reducir el NO_3^- .

En el caso del género *Sagittula* presenta la enzima catalasa y oxigenasa pero no es capaz de reducir NO_3^- y su crecimiento es óptimo en presencia de NH_4^+ como recurso de nitrógeno (González *et al.*, 1997).

5.2. Ciclaje de N_2O en cultivo de *Micromonas pusilla*.

En el cultivo de *Micromonas pusilla* existió producción del gas N_2O en ambas fracciones: FT y FB. La fracción FT, que incluía a la microalga como a la comunidad bacteriana acompañante, presentó las mayores concentraciones de N_2O tanto para la fase luz como para la fase oscuridad. En horas luz el tratamiento FT+ NH_4^+ con adición de NH_4^+ fue el que presentó un aumento en la concentración del gas, esto posiblemente relacionado con una producción por parte de las bacterias amonio oxidantes que se encontraban en el cultivo.

En el caso de la fase de oscuridad, la concentración de N_2O también fue mayor en la fracción FT comparada con la fracción FB. Además, los promedios de los tratamientos FT+ NO_3^- y FT+ NH_4^+ , fueron siempre mayores que la fracción FB. Por otro lado, la producción del gas se vio levemente favorecida con la adición de NH_4^+ , este aumento de producción de gas con NH_4^+ podría estar relacionado a las bacterias amonio oxidantes, mientras que la adición de NO_3^- podría estar relacionado a un proceso de asimilación de

nutrientes por parte de *Micromonas pusilla*, ya que la asimilación de NO_3^- puede ocurrir en fase de luz como de oscuridad (Ulrich, 1983). Este proceso podría ser mediado por la enzima NiR (nitrito reductasa) de una forma similar a la formación de N_2O por desnitrificación bacteriana, como lo sugieren trabajos como el de Guieysse *et al.* 2013. Por otra parte *Micromonas pusilla* posiblemente tenga una preferencia por el NH_4^+ ya que es capaz de asimilar distintas fuentes de nitrógeno combinado (como NH_4^+ y urea) (Cochlan *et al.*, 1991), por lo que el NH_4^+ podría estar siendo utilizado tanto por bacterias amonio oxidantes como por *Micromonas pusilla*. De esta forma, la producción de gas podría haber sido potencialmente mayor sin la presencia de la microalga.

Por lo tanto, existe una producción de N_2O tanto para las fracciones FT como FB y todos los tratamientos de adición de sales nitrogenadas, la producción en la fracción FB posiblemente esté relacionado con las bacterias amonio oxidantes mientras que la mayor producción en FT estaría relacionada con la microalga *Micromonas pusilla* y las bacterias nitrificantes. Las concentraciones de N_2O para los tratamientos de sales nitrogenadas aunque presentan concentraciones de gas mayores que el control MC siguen siendo menores o semejantes que la fracción FT; esto se debe posiblemente al tiempo de aclimatación de la microalga, la cual estuvo restringida de una fuente de nitrógeno combinado, lo que podría llevar a la microalga a utilizar las fuentes de nitrógeno más eficientemente sin ningún tipo de subproducto como N_2O .

5.3. Ciclaje de N_2O en cultivo de *Nannochloris* sp.

En el caso de *Nannochloris* sp. en la fase de luz; la concentración de N_2O en la fracción FT fue mayor que en la fracción FB y que en los tratamientos de adición de sales nitrogenadas. La producción de N_2O por la fracción FB se debe posiblemente a la presencia de bacterias amonio oxidantes, mientras que la mayor producción de gas en la fracción FT estaría relacionada con la microalga *Nannochloris* sp. y las bacterias nitrificantes. Los tratamientos con sales de nitrógeno no presentaron una producción de N_2O significativamente mayor que la fracción FT. Respecto a la fase de oscuridad; la concentración promedio de N_2O para las fracciones FT y FB tuvo un comportamiento similar a las horas luz, al igual que los tratamientos de adición de sales de nitrógeno, no presentando una producción significativa del gas. Esto podría deberse, al igual que

Micromonas pusilla, a la aclimatación previa del experimento en donde la microalgas estuvieron restringidas en suministro de nitrógeno combinado por lo que la condición celular podría no haber sido la óptima.

Nuestros resultados indican que sí existe producción de N₂O en cultivos de microalgas tanto de *Micromonas pusilla* como de *Nannochloris* sp. lo que concuerda con el estudio de Escares *et al.*, (2015, enviado), quienes encontraron altas tasas de producción de N₂O en piletas de cultivo masivo de microalgas. Además, esta producción de gas en la fracción FB podría estar vinculada a la presencia de bacterias amonio oxidantes y no a bacterias desnitrificantes como concluyen algunos trabajos como por ejemplo Fagerstone *et al.* (2011). Además, la producción del gas N₂O en la fracción FT estaría relacionada con los organismos eucariontes fotosintéticos aunque esta producción del gas no se vio estimulada con la adición de sales de nitrógeno, ya que no fue significativamente mayor si la comparamos con las fracciones FT y FB. En relación a las horas de luz y oscuridad no se observaron diferencias asociadas entre ambas fases, esto difiere de los estudios de Weathers (1984) que indican producción de N₂O durante la asimilación de especies nitrogenadas oxidadas como el NO₃⁻ y el NO₂⁻ y en fase de oscuridad.

5.4. Respuesta a la inhibición del Fotosistema II: relación entre la inhibición de la fotosíntesis, la asimilación de nitrógeno y la producción de N₂O.

Respecto a la inhibición del fotosistema II, en el caso de *Micromonas pusilla* en la fase de luz; el tratamiento con el inhibidor DCMU presentó un incremento 3 veces mayor de concentración de N₂O en comparación con el control MC y con la fracción FB, presentando un leve aumento de concentración comparado con la fracción FT esto fue así tanto para horas luz como para horas de oscuridad, lo que indica que la inhibición del flujo de electrones de la fotosíntesis provocaría un aumento en la concentración del gas invernadero en el cultivo de la microalga.

En el caso de *Nannochloris* sp. en horas luz; la concentración de N₂O para el tratamiento de inhibición del fotosistema II (FT+DCMU) fue levemente menor que la fracción FT, pero significativamente mayor que el control MC, esto podría deberse a una

repuesta más lenta de producción del gas por parte de la microalga *Nannochloris* sp. a la inoculación con DCMU. Un comportamiento distinto se registró en horas de oscuridad en donde la concentración de N_2O se elevó a un promedio de 33.5 nmol L^{-1} . Estos resultados concuerdan con los de Sakihama *et al.* (2002). Esto sugiere que el N_2O como el NO podrían ser subproductos en el proceso de asimilación de nutrientes durante la fotosíntesis, y que las microalgas podrían tener la capacidad de producir gases de nitrógeno como NO y N_2O a través de la enzima NiR (nitrito reductasa) en el proceso de asimilación de NO_2^- y en condiciones de oscuridad o de inhibición del transporte de electrones del fotosistema II.

Las mayores concentraciones de N_2O se relacionaron con los tratamientos en donde se adhirió DCMU. Ambas microalgas presentaron aumentos en la concentración de N_2O en la fase oscuridad y cuando el flujo de electrones de la fotosíntesis fue inhibido. Esto es consistente con los resultados de producción de N_2O para microalgas clorófitas de distintos géneros, tal es el caso el estudio de Weathers *et al.* (1984), en donde se registró producción de N_2O en la microalga *Chlorella vulgaris*. Esta producción estuvo asociada a la presencia de glucosa y al proceso de foto-respiración.

Por otra parte, Guieysse *et al.* (2014) demostró que existe producción de N_2O en cultivos de *Chlorella vulgaris* y que esta producción se incrementa en condiciones que favorecen a la acumulación de NO_2^- y que disminuye cuando la enzima NR es inhibida.

Otros estudios realizados en organismos fotosintéticos terrestres, específicamente en hojas de trigo, demuestran que existe producción de N_2O a través de la foto-asimilación de NO_2^- relacionado con la actividad de la enzima NiR (Smart & Bloom, 2001). Esta evidencia de producción de gases de nitrógeno como NO y N_2O , tanto en plantas terrestres como en microalgas marinas, sustentan nuestros resultados concordando en que sí existe relación en la producción de N_2O por parte de microalgas marinas, al menos del grupo de las clorófitas.

La asimilación de nitrógeno está directamente relacionada a las tasas de fotosíntesis y la fijación de dióxido de carbono (Payne, 1973) debido a la necesidad de compuestos de carbono, sintetizados en la fotosíntesis, que son utilizados en la incorporación de NH_4^+ (Taiz & Zeiger, 2010). Además, la asimilación de nitrógeno inorgánico luego de un déficit de este, tiene un profundo efecto sobre la respiración y el metabolismo de la fotosíntesis aumentando la tasa de respiración de CO_2 , esto implica un aumento substancial de la tasa de consumo de O_2 durante la fotosíntesis (Turpin *et al.*, 1988)

Una ruta putativa que explique la producción de N₂O a través de un proceso relacionado con la fotosíntesis y la asimilación de nutrientes nitrogenados, estaría vinculado a la reducción intracelular de NO₃⁻, la asimilación de NO₃⁻ se lleva a cabo en el citoplasma y es mediada por la enzima NR, esta reducción depende de la disponibilidad de NADPH, en cambio, la reducción de NO₂⁻ es mediada por la enzima NiR, la cual es dependiente de ferredoxina reducida (Reacción 5); que a su vez deriva del transporte de electrones de la fotosíntesis, específicamente como aceptor final del fotosistema I, reduciendo el NADP a NADPH. Por lo tanto, al estar el fotosistema II y el fotosistema I íntimamente relacionados, la inhibición del flujo de electrones en el fotosistema II por el DCMU repercute directamente en la inhibición del fotosistema I, lo que afectaría la disponibilidad de ferredoxina para la asimilación de NO₂. (Figura 13). Esta acumulación de NO₂⁻ intracelular, es potencialmente tóxico para la célula (Taiz & Zeiger, 2010) por lo que debe ser rápidamente eliminado a través de mecanismos de detoxificación. Una alternativa a esto, es la producción de óxidos de nitrógeno como NO y N₂O (Figura 14).

Respecto a las tasas de producción de N₂O (nmol h⁻¹), estas se estimaron para poder comparar diferencias de producción de gas entre las microalgas en función de su biomasa (nmol cel⁻¹ h⁻¹). El problema con esta estandarización es que se pierde la señal de cada tiempo, esto es importante ya que la producción de gas varió entre el ciclo día y noche y también dentro de estas fases, esta variabilidad no es apreciable cuando los datos se estandarizan en tasas. Las concentraciones de N₂O no aumentaron ni disminuyeron de manera paulatina en el tiempo o con algún marcado patrón en las horas de luz y oscuridad. Para fines de este estudio, las tasas no fueron comparadas estadísticamente, en cambio, se evaluó el comportamiento del gas en función de su concentración en cada periodo (luz/oscuridad). En el Anexo IV se observan las tasas de producción de N₂O estandarizadas por la biomasa (nmol cel⁻¹h⁻¹) en donde *Micromonas pusilla* presentó mayores tasas de producción comparas con *Nannochloris* sp. exceptuando el tratamiento de inhibición con DCMU donde la tasa de producción de N₂O por parte de *Nannochloris* sp. fue casi un orden de magnitud mayor que *Micromonas pusilla*. Referente a las tasas negativas esto estaría relacionado con la variabilidad de concentraciones en el tiempo, las cuales no presentaron un comportamiento lineal, por lo que estos valores de consumo no son necesariamente representativos del comportamiento del gas en los cultivos.

Los resultados indican que organismos que forman parte del picopláncton fotosintético marino podrían estar implicados en la producción del gas invernadero N₂O,

dichos organismos son importantes componentes de la comunidad planctónica inclusive en zonas de surgencia del Pacífico Sur-Oriental (Collado-Fabri *et al.*, 2011). Estos microorganismos juntos con otras microalgas clorófitas podrían tener un importante rol en el ciclo del nitrógeno y presentar una ruta alternativa de producción del gas invernadero N_2O .

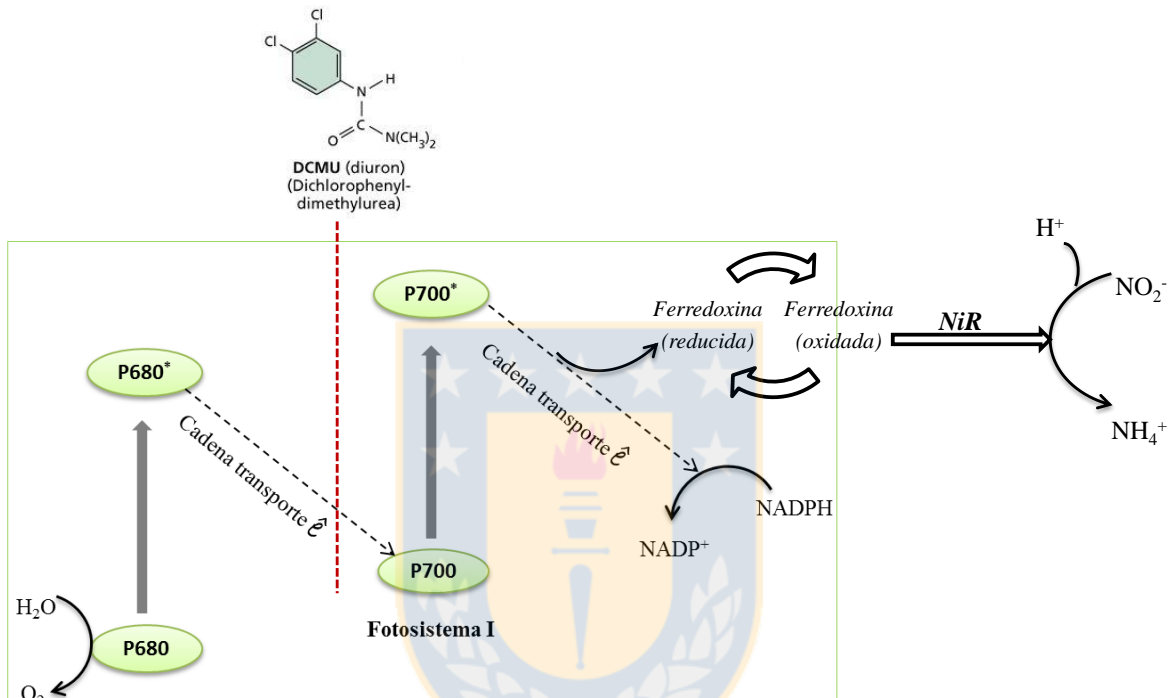
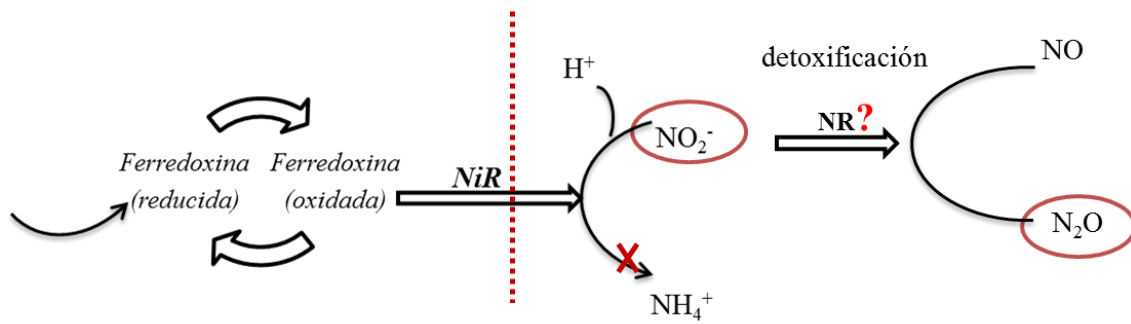


Figura 14. Modelo del acoplamiento de los fotosistemas I y II a través del flujo de electrones con la reducción del NO_2^- por la enzima *NiR* (nitrito reductasa), vía ferredoxina (Basado Turpin *et al.*, 1988; Taiz & Zeiger, 2010). Los pigmentos P680 y P700 captan los fotones de los fotosistema I y II y son los responsables del flujo electrones a través de la cadena transportadora de electrones. Un producto intermediario es la ferredoxina, que es utilizado por la enzima *NiR* para la posterior reducción de NO_2^- a NH_4^+ .



impide la reducción del NO₂⁻ por la enzima NiR (nitrito reductasa) a NH₄⁺. NR corresponde a la enzima nitrato reductasa la que podría estar implicada en la producción de gases de nitrógeno como N₂O. (Basado Guieysse *et al.*, 2014 Taiz & Zeiger, 2010).



6. CONCLUSIONES.

El comportamiento de ambas microalgas parece ser diferente en cuanto a la producción de N_2O , respecto a los tratamientos, como en su ciclo día-noche. En donde *Micromonas pusilla* presentó mayores concentraciones de N_2O que *Nannochloris* sp. tanto en horas luz como en horas oscuridad

Referente a los tratamientos con DCMU, este provoca un aumento en las concentraciones de N_2O en ambas microalgas maximizándose en *Nannochloris* sp. la cual presentó mayor producción de gas en horas de oscuridad.

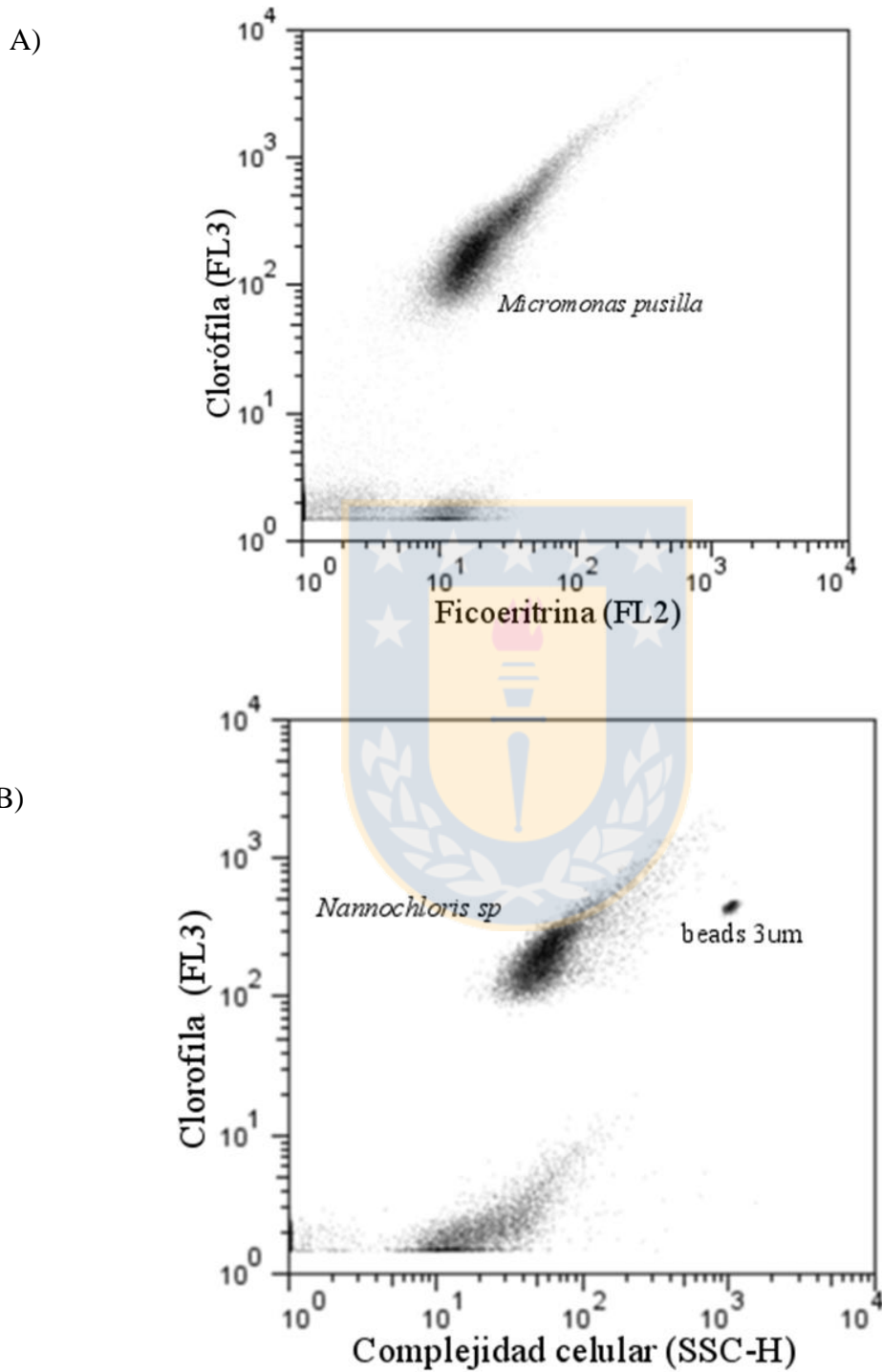
Las bacterias amonio oxidantes podrían ser las responsables de parte de la producción de N_2O en los cultivos de ambas microalgas marinas, esto se vio reflejado en la fracción FB que solo incluía a bacterias y que presentó mayores concentraciones de N_2O comparados con el control (MC).

Nuestros resultados indican que es altamente probable que exista un rol por parte de los organismos fotosintéticos en el ciclaje del N_2O , tanto para los cultivos de *Micromonas pusilla* como de *Nannochloris* sp. y que esta producción podría estar relacionado con la asimilación de compuestos nitrogenados oxidados como NO_3^- y NO_2^- .

Las microalgas *Micromonas pusilla* y *Nannochloris* sp. parecen reaccionar a la inhibición del fotosistema II aumentando la concentración de N_2O en los cultivos estudiados, por lo que la producción de gas podría estar vinculada a un proceso fotosintético.

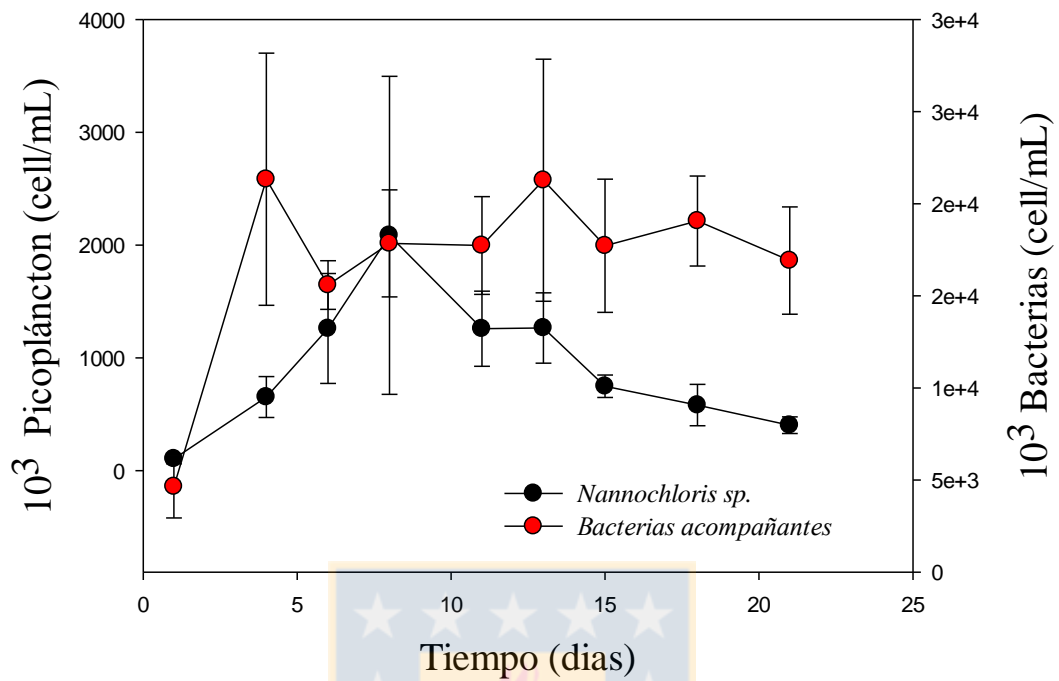
7. ANEXOS

7.1. ANEXO I. Bacterias acompañantes de los cultivos de microalgas a través de Citometría de Flujo

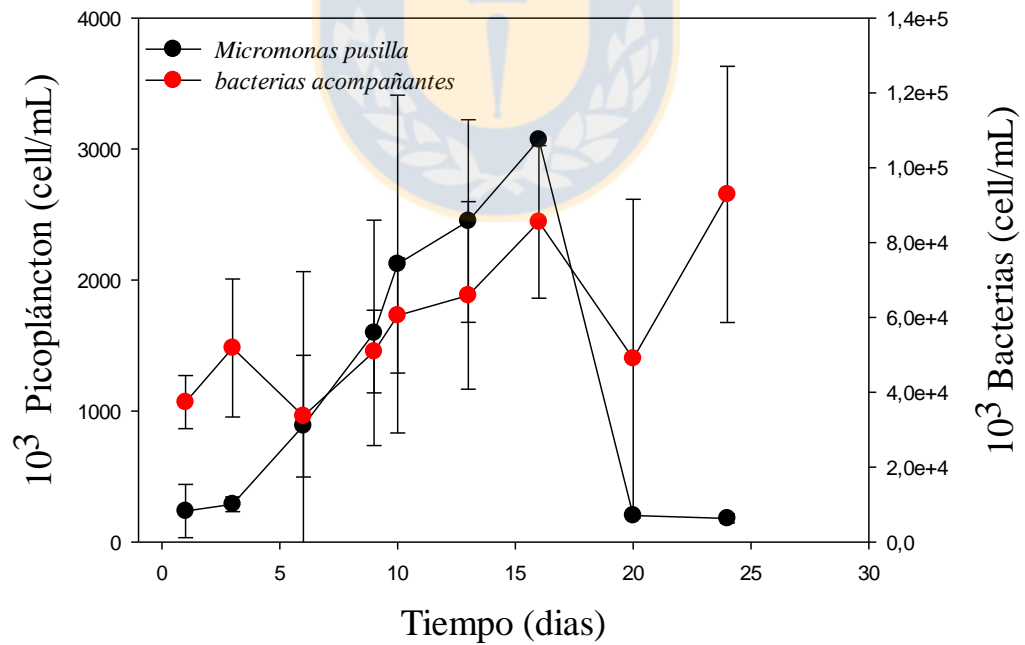


Figuras; A) abundancia celular obtenidos a través de citometría de flujo para *Micromonas pusilla* y B) *Nannochloris sp*.

C)

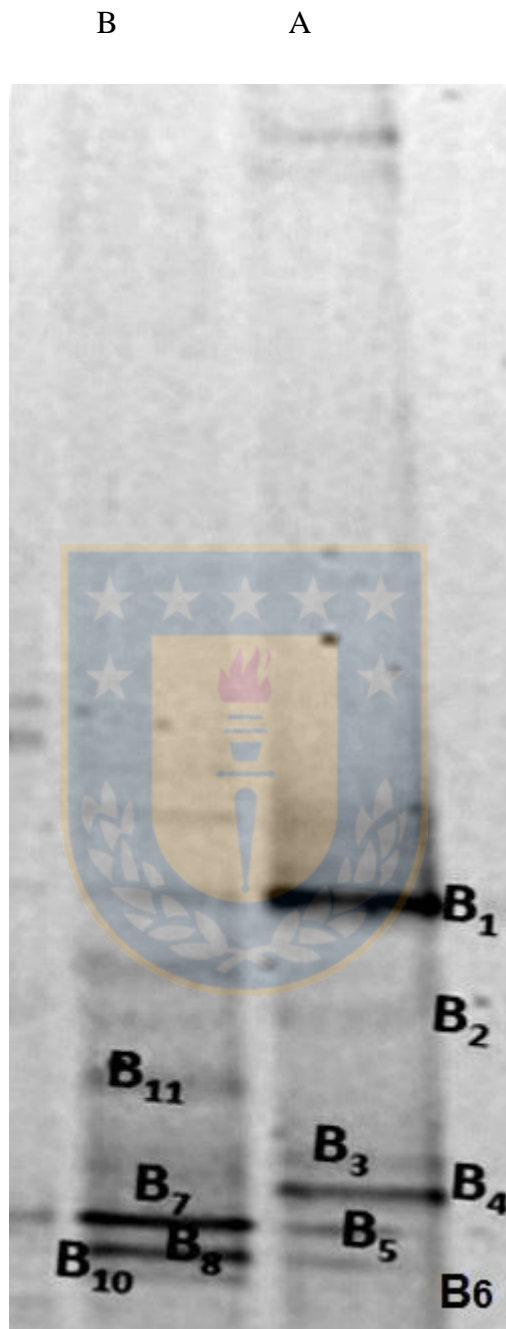


D)



Figuras Crecimiento en el tiempo de las poblaciones de microalgas versus la población de bacterias acompañantes (B.A) para cultivos de: C) *Micromonas pusilla* y D) *Nannochloris sp.*

7.2. ANEXO II: Bandas obtenidas a través de DGGE para los cultivos de: A) *Micromonas pusilla* y B) *Nannochloris* sp.



7.3. ANEXO III: concentración de N₂O (nmol L⁻¹) en cultivo de *Micromonas pusilla*.

a) Horas luz

Variablen	N válidos	media	Desv. Est	Máximo	Mínimo
CM	12	7.16	0.89	8.27	5.00
FT	11	11.64	1.76	13.65	8.94
FB	12	8.493	1.59	10.95	6.41
FT+NO ₃ ⁻	11	9.193	1.22	11.49	7.38
FT+NH ₄ ⁺	11	11.21	1.59	12.89	7.85
FT+DCMU	8	12.38	1.20	13.19	9.61

b) Horas oscuridad

Variablen	N válidos	media	Desv. Est	Máximo	Mínimo
CM	11	6.99	0.60	7.91	5.67
FT	12	11.35	1.65	13.92	8.48
FB	12	8.019	1.14	10.07	5.76
FT+NO ₃ ⁻	12	10.03	2.091	12.83	7.53
FT+NH ₄ ⁺	12	10.35	1.61	13.09	7.74
FT+DCMU	11	11.28	2.26	13.97	8.45

7.4. ANEXO IV: concentración de N₂O (nmol L⁻¹) en cultivo de *Nannochloris* sp.

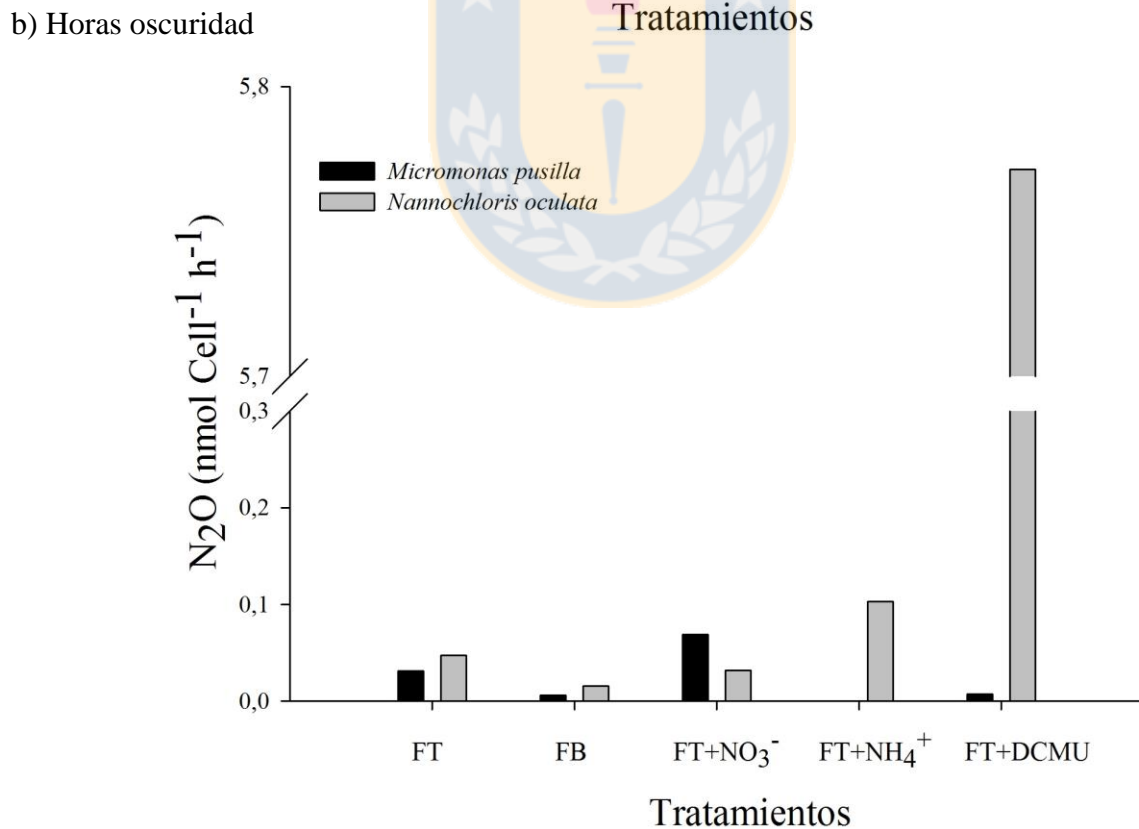
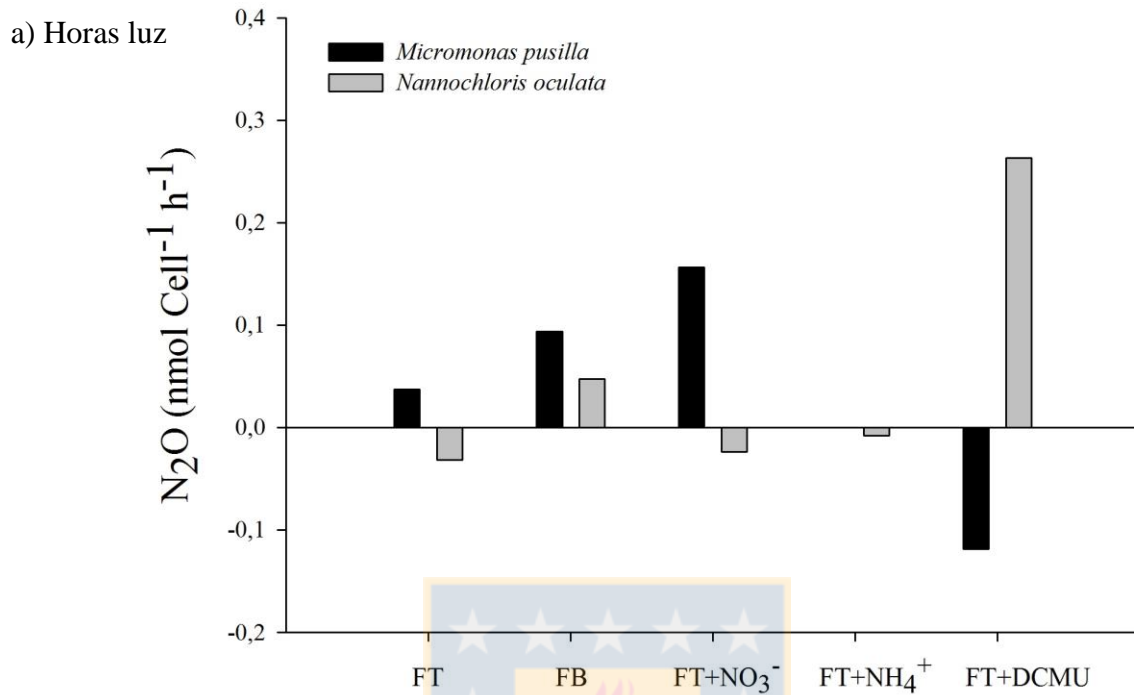
a) Horas luz.

VARIABLES	N válidos	media	Desv. Est	Máximo	Mínimo
CM	10	4.69	0.48	5.44	4.08
FT	11	7.29	0.44	7.97	6.70
FB	11	6.93	0.44	7.61	6.22
FT+NO ₃ ⁻	12	6.52	0.43	7.13	5.55
FT+NH ₄ ⁺	12	6.37	1.34	7.62	2.43
FT+DCMU	10	6.74	0.68	7.32	5.41

b) Horas oscuridad.

VARIABLES	N válidos	media	Desv. Est	Máximo	Mínimo
CM	11	4.60	0.73	5.55	3.28
FT	11	6.59	1.35	8.15	4.03
FB	12	6.81	0.29	7.28	6.38
FT+NO ₃ ⁻	12	6.33	1.30	7.45	3.013
FT+NH ₄ ⁺	12	6.28	1.03	7.35	3.71
FT+DCMU	11	33.51	23.06	73.75	4.99

7.5. ANEXO V: Data normalizada por biomasa para cultivos de *Micromonas pusilla* y *Nannochloris* sp.



Comparación producción N₂O data normalizada entre *Micromonas pusilla* y *Nannochloris* sp. a) Horas luz, b) horas oscuridad

8. REFERENCIAS.

Andersen, R. 2005. Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press. 578 pp.

Arp, D., and Stein, L. 2003. Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidising bacteria. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol 38: 471–495.

Beaumont, H. J. E., Hommes, N. G., Sayavedra- Soto, L. A., Arp, D. J., Arciero, D. M., Hooper, A. B. 2002. Nitrite reductase of *Nitrosomonas europaea* is not essential for production of gaseous nitrogen oxides and confers tolerance to nitrite. J. Bacteriol. 184; 2557–2560.

Beja, O., Suzuki, M. T., Heidelberg, J. F., Nelson, W. C., Preston, C. M., Hamada, T., Eisen, J. A., Fraser, C. M., DeLong, E. F. 2002. Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. Nature 415: 630-633.

Buchanan. B., Gruissem. W., Russell. J. 2000. Biochemistry and molecular biology of plants (Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists).

Castro-González, M., Farías, L. 2004. Nitrous oxide cycling at the core of oxygen minimum zone off northern Chile. Mar. Ecol. Progr. Ser. 280: 1-11.

Charpentier, J., Farías, L., Yoshid N., Boontanon, N., & Raimbault, P. 2007. Nitrous oxide distribution and its origin in the central and eastern South Pacific Subtropical Gyre. Biogeosciences, 4 (5): 729 – 741, doi:10.5194/bg-4-729-2007.

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotech. Adv. 25: 294-306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>.

Codispoti, L. A. and Christensen, J. P. 1985. Nitrification, denitrification and nitrous oxide cycling in the eastern tropical South Pacific Ocean, Mar. Chem., 16: 277–300,.

Collado-Fabbri, S., D. Vaultot, Ulloa, O. 2011. Structure and seasonal dynamics of the eukaryotic picophytoplankton community in a wind-driven coastal upwelling ecosystem. Limnology Oceanography, 56(6): 2334-2346.

- Martin, T., Croft, A. D., Lawrence, E., Martin, R-D., Warren, J. and Smith, A G. 2005. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. Vol. 438, 3. Doi: 10.1038/nature04056.
- Costa, C., Macedo, A., Moura, I., Le Gall, J., Berlier, Y. 1990. Regulation of the hexaheme nitrite/nitric oxide reductase of *Desulfovibrio desulfuricans*, *Wolinella succinogenes* and *Escherichia coli*: a mass spectrometric study, FEBS Lett.1. 67–70. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80508-G](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(90)80508-G).
- Chen, Q-H., Chen, J-H., Ruan, Y., Zhang, Y-Q., Tang, S-K., Liu, Z-X, Li, W-J., Chen, Y-G. 2011. *Sphingomonas hunanensis* sp. nov., isolated from forest soil. Antonie van Leeuwenhoek, 99:753–760. DOI 10.1007/s10482-011-9549-2.
- Cochlan, W. P., and P. J. Harrison. 1991. Asimilación of nitrate ammonium, & urea by nitrogen starved cultures of *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae): transient responses. J. Phycol. 27: 673–679.
- Garrigue, C., Clavier, J. and Boucher, G. 1992. The use of photosynthesis inhibitor (DCMU) for in situ metabolic and primary production studies on soft bottom benthos. Hydrobiologia. 246, 141-145.
- Gonzalez, J. M., F. Mayer., Moran, M. A., Hodson, R. E., and Whitman, W. B. 1997. *Sagittula stellata* gen. nov., sp. nov., a Lignin-Transforming Bacterium from a Coastal. Env. Inter. J. of Syst. Bact. 47, No. 3 773-780.
- Dalsgaard, T., Thamdrup, B., Farías, L., Revsbech, N. P. 2012. Anammox and denitrification in the oxygen minimum zone of the eastern South Pacific, Limnology and Oceanography, 57. Doi: 10.4319/lo.2012.57.5.1331.
- De Lorenzo, M. E., Scott, G. I. and Ross, P. E. 2001. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review. Environmental Toxicology and Chemistry, 20: 84–98. Doi: 10.1002/etc.5620200108.
- Díez, B., Pedrós-Alió, C., and Massana, R. 2001. Study of Genetic Diversity of Eukaryotic Picoplankton in Different. Environmental. Microbiology, 2932-2941. DOI: 10.1128/AEM.67.7.2932–2941.2001.

- Fagerstone, K. D., Quinn, J. C., Bradley, T. H., De Long, S. K., Marchese, A. J. 2011 Quantitative Measurement of Direct Nitrous Oxide Emissions from Microalgae Cultivation, Environ. Sci. Technol. 45 9449–9456. <http://dx.doi.org/10.1021/es202573f>.
- Fariás, L., Faúndez, J., Fernández, C., Cornejo, M., Sanhueza, S., Carrasco, C. 2013. Biological N₂O Fixation in the Eastern South Pacific Ocean and Marine Cyanobacterial Cultures. PLoS ONE 8(5). Doi: e63956. doi:10.1371/journal.pone.0063956.
- Fariás, L., Besoain, V., García-Loyola, S. 2015. Presence of nitrous oxide hotspots in the coastal upwelling area off central Chile: an analysis of temporal variability based on ten years of a biogeochemical time series. Environ. Res. Lett. 10 044017.
- Francis, C. A., Roberts, K.J., Beman, J.M., Santoro, A.E., and Oakley, B.B. 2005 Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. Proc Natl Acad Sci USA 102:14683–14688.
- Guieysse, B., Plouviez, M., Coilhac, M., Cazali, L. 2013. Nitrous Oxide (N₂O) production in axenic *Chlorella vulgaris* microalgae cultures: evidence, putative pathways, and potential environmental impacts, Biogeosciences 10, 6737–6746. <http://dx.doi.org/10.5194/bg-10-6737-2013>.
- Guillard, R. R. L., and Keller, M. 1984. Culturing dinoflagellates. In: Spector, D. L., ed. Dinoflagellates. Academic Press, New York, pp. 391–442
- Hartmann M., Grob, C., Tarran, G. A. et al. 2012 Mixotrophic basis of Atlantic oligotrophic ecosystems. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Doi:10.1073/pnas.1118179109.
- Harker, M., Hirschberg, J., and Oren, Aharon. 1998. *Paracoccus rmarcusii* sp. nov., an orange Gram-negative coccus. Int. J. of Syst. Bact. 48, 543-548.
- Harwati, T. U., Kasai, Y., Kodama, Y., Susilaningih, D. & Watanabe, K. 2009. *Tropicibacter naphthalenivorans*, gen. nov., sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from Semarang Port in Indonesia. Int J Syst Evol Microbiol 59, 392–396.
- Horrigan S. G., A. F. Carlucci; & P. M. Willmms. 1981. Light inhibition of nitrification in sea-surface films. J. of Mar. Res. 39: 557-565.

Horton, H. 1995. *Bioquímica*. Editorial Prentice Hall. Hispanoamerica. S.A. México.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment 21 Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Eds: Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M., and Miller, H.L. Cambridge. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. 996 pp.

Jeanthon, C., Boeuf, D., Dahan, O., Le Gall, F., Garczarek, L., Bendif, El Mahdi, Lehours, A. C. 2011. Diversity of cultivated and metabolically active aerobic anoxygenic phototrophic bacteria along an oligotrophic gradient in the Mediterranean Sea. *Biogeosciences*, 8 (7), 1955-1970. Doi.org/10.5194/bg-8-1955-2011.

Johnston. H. 1971: Reduction of Stratospheric Ozone by Nitrogen Oxide Catalysts from Supersonic Transport Exhaust. Reprinted from *Science*. Vol 173,517-522.

Kartal B, Kuypers M, Lavik G, Schalk J, Op den Camp HJM, Jetten MSM. 2007. Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium. *Environ Microbiol* 9: 635–642.

Katoh, K., Kuma, K., Toh, H., Miyata, T. 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res* 33(2):511-518.

Keller, M. D., Selvin, R. C., Claus, W., and Guillard, R. R. L. 1987. Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *J. Phycol.* 23:633–8.

Li, W. K. W. 1994. Primary production of prochlorophytes, cyanobacteria, and eukaryotic ultraplankton: Measurements from flow cytometric sorting. *Limnol. Oceanogr.* 39: 169 –175.

Löscher, C., Kock, A., Könneke, M., LaRoche, J., Bange, H. W. & Schmitz, R. S. 2012. Production of oceanic nitrous oxide by ammonia-oxidizing archaea. *Biogeosciences*. 9, 2419–2429. Doi:10.5194/bg-9-2419-2012.

Lowry, O., H. Rosebroug, A. Farr & R. Randall. 1951. Protein measurement with the Folinphenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.

- Lu, H., Sato, Y., Fujimura, R., Nishizawa, T., Kamijo, T., and Ohta, H. 2011. *Limnobacter litoralis* sp. nov., a thiosulfateoxidizing, heterotrophic bacterium isolated from a volcanic deposit, and emended description of the genus *Limnobacter*. *Inter. J. of Syst. Evol. Microbiol.* 61:404–407.
- Lucena, T., Pujalte, M. J., Ruvira, M. A, Garay, E., Macia, M. C., Arahall, D.R. 2012 *Tropicibacter multivorans* sp. nov., a strictly aerobic Alphaproteobacterium isolated from surface sea-water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62:844–848.
- Massana, R & Balagué, V. 2010. *Molecular marine microbiology protocols*. Departament de Biologia Marina i Oceanografia, Institut de Ciències del Mar, CSIC, Barcelona
- Marie D, Simon N, Guillou L, Partensky F, Vaulot D. 2000. Flow cytometry analysis of marine picoplankton. In: Diamond RA, DeMaggio S, editors. *In living color: protocols in flow cytometry and cell sorting*. Springer, Berlin. 421–454.
- Martens-Habbena, W., Berube, P. M., Urakawa, H. de la Torre, J, R Stahl, D. 2009 Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature*. Doi.org/10.1038/nature08465M.
- Merbt, S. N, Auguet, J-C, Casamayor, E. O & Martí´ E. 2011. Biofilm recovery in a wastewater treatment plant-influenced stream and spatial segregation of ammonia-oxidizing microbial populations. *Limnol. Oceanogr.* 56:1054– 1064.
- Molina, V., Ulloa, O., Farías, L., Urrutia, H., Ramírez, S., Junier, P., and Witzel, K.-P. 2007. Ammonia-oxidizing β -Proteobacteria from the oxygen minimum zone off northern Chile. *Appl Environ Microbiol* 73: 3547–3555.
- Morley, N., Baggs, E. M., Dörsch, P., and Bakken, L. 2008. Production of NO, N₂O and N₂ by extracted soil bacteria, regulation by NO₂ and O₂ concentrations, *FEMS Microbiol. Ecol*, 65, 102–112.
- Naqvi SWA, Jayakumar DA, Narvekar PV, Naik H, Sarma VVSS. 2000. Increased marine production of N₂O due to intensifying anoxia on the Indian continental shelf. *Nature* 408: 346–349. Doi:10.1038/35042551.

- Naqvi, S. W. A., Naik, H., D Souza, W., Narvekar, P. V., Paropkari, A. L., and Bange, H. W. 2010. Carbon & nitrogen fluxes in the North Indian Ocean, in: Carbon & nutrient fluxes in continental margins: A global synthesis. New York, 180–192.
- Nevison, C. D., Weiss, R. F., & Erickson, D. J.: 1995. Global oceanic emissions of nitrous oxide, *J. Geophys. Res.*, 100, 15809–15820.
- Nicol, G. W., Leininger, S., Schleper, C. and Prosser, J. I. 2008. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ. Microbiol.* 10: 2966–2978. Doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01701.x.
- Not, F., M. Latasa, D. Marie, T. Cariou, D. Vaultot, and N. Simon. 2004. A single species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae), dominates the eukaryotic picoplankton in the western English Channel. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4064–4072
- McAuliffe, C. 1971. Gas chromatographic determination of solutes by multiple phase equilibrium: *Chem. tech.*, 1: 46-51pp.
- McElroy, M B. and McConnell, J. C 1971: Nitrous Oxide: A Natural Source of Stratospheric NO. *J. Atmos. Sci.*, 28, 1095–1098.
- Park, S. J., Choi, Y. E., Kim, E. J., Park, W K, Kim, C. W., Yang, J. W. 2012. Serial optimization of biomass production using microalga *Nannochloris oculata* and corresponding lipid biosynthesis. *Bioprocess Biosyst Eng.* 35(1-2):3-9. Doi: 10.1007/s00449-011-0639-3
- Prather, M., Derwent, R., Ehhalt, D., Fraser, P., Sanhueza, E., Zhou, X., 1995. Radiative forcing of climate change. In: Houghton, J.T., Meira Filho, L.G.
- Punshon, S., Moore, R. M. 2004: Nitrous oxide production and consumption in a eutrophic coastal embayment Department of Oceanography, Dalhousie University, Halifax, Canada N.S. B3H 4J1 Marine Chemistry OI:10.1016/j.marchem..04.003
- Payne, W. J. 1973 Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacteriol Rev* 37:409-452.

- Richardson, D., Felgate, H., Watmough, N., Thomson, A., & Baggs, E.M. 2009. Mitigating release of the potent greenhouse gas N₂O from the nitrogen cycle could enzymic regulation hold the key? *Trends Biotechnol.* 27, 388–397.
- Rotthauwe, J.-H., Witzel, K.-P., and Liesack, W. 1997. The Ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol* 63:4704–4712.
- Santoro, A.E., Buchwald, C., McIlvin, M. R., and Casciotti, K. L. 2011. Isotopic signature of N₂O produced by marine ammonia-oxidizing archaea. *Science* 333, 7–10.
- Sarmiento, J. & Gruber. 2006. *Ocean Biogeochemical Dynamics*. Princeton University Press. United Kingdom. 503pp
- Schreiber F, Wunderlin P, Udert KM, Wells GF. 2012. Nitric oxide and nitrous oxide turnover in natural and engineered microbial communities: biological pathways, chemical reactions, and novel technologies. *Frontiers in Microbiol.* 2012; 3:372. Doi: 0.3389/fmicb.2012.00372
- Smart, D. R. & Bloom, A. J. 2001. Wheat leaves emit nitrous oxide during nitrate assimilation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, vol 98, 7875–7878.
- Sakihama, Y., Nakamura, S., Yamasaki, H. 2002. Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthesis organisms. *Plant and Cell Physiology* 43: 290–297.
- Scott, S.A., Davey, M.P., Dennis, J.S., Horst, I., Howe, C.J., Lea-Smith, D.J., Smith, A.G., 2010. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 277–286.
- Spring, S., Kampfer P., and Schleifer, K. H. 2001. *Limnobacter thiooxidans* gen. nov., sp. nov., a novel thiosulfate-oxidizing bacterium isolated from freshwater lake sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1463–1470.

Taiz, L., Zeiger, E. 2002. Plant physiology. Fourth edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. 672pp.

Thole, S., Kalhoefer, D., Voget, S., Berger, M., Engelhardt, T., Liesegang, H., Wollherr, A., Kjelleber, S., Daniel, R., Simon, M., Thomas, T., Brinkhoff, T. 2012. *Phaeobacter gallaeciensis* genomes from globally opposite locations reveal high similarity of adaptation to surface life. *ISME J.* 6(12): 2229-44. Doi: 10.1038/ismej.2012.62.

Tourna, M., Freitag, T. E., Nicol, G. W. and Prosser, J. I. 2008. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environmental Microbiology*, 10: 1357–1364. Doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01563.x

Ulrich, W. R. 1983. Uptake and reduction of nitrate: algae and fungi. Edited by A. Lauc Wi and R L. Bielecki. *Inorganic plant nutrition* 1st edition by Springer-Verlag Berlin-Heidelberg. Softcover reprint of the hardcover. 449 pp.

Van Loosdrecht, M. C. M., Jetten, M. S. M. 1998. Microbiological conversions in nitrogen removal. *Water Sci Technol.* 38(1):1-7.

Weathers, P. 1984. N₂O Evolution by Green Algae. *Applied & environmental microbiology*, dec. 1251-1253.

Worden, A., F. Not. 2008. Ecology & diversity of picoeukaryotes. In by David L. Kirchman. *Microbial Ecology of the Oceans (Wiley Series in Ecological & Applied Microbiology)*. 259-205. New Jersey

Witt, U., Koske, P. H., Kuhlmann, D., Lenz, J., Nellen, W. 1981. Production of *Nannochloris spec.* (Chlorophyceae) in large-scale outdoor tanks and its use as a food organism in marine aquaculture. *Aquaculture* 23:171–181.

Woebken, D., Fuchs, B. M., Kuypers, M. M., and Amann, R. 2007 Potential interactions of particle-associated anammox bacteria with bacterial and archaeal partners in the namibian upwelling system. *Appl Environ Microbiol* 73: 4648–4657.