



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas



Evaluación de la actividad fotosintética y enzimática asociada a la capacidad depuradora de Nitrógeno en una comunidad microalgal de la laguna urbana Las Tres Pascualas (Bíobío, Chile).

Seminario de Título presentado a la
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Para optar al título de Biólogo

Gino Emilio Romo Sagardia

Concepción, octubre 2025



Este Seminario de Título ha sido desarrollado en el Departamento de Botánica,
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción.



Prof. Guía

Dr. Pablo Castro Varela

Prof. Co-Guía

Dr. Enrique Ostria Gallardo

Prof. Evaluadores

Dra. Patricia Gómez Vergara

Dra. Luisa Bascuñán Godoy

Prof. Coordinador Seminario de Título

Dr. Víctor Hernández Santander

Concepción, octubre 2025

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mis padres por siempre apoyarme y aconsejarme en todas las experiencias y situaciones que he pasado, también quiero agradecerle a mi lela por haberme criado y ser parte fundamental en mi vida. También agradecer a mis amigos del colegio que siempre están ahí, a los amigos que hice en la carrera y a los del gimnasio. Quiero agradecer de todo corazón al profesor Pablo por darme la oportunidad de trabajar con él y haberme apoyado a lo largo de este proyecto. También a toda la gente del Ficolab por el buen ambiente y la disposición de ayudarme, a la profesora Patricia, al personal de apoyo Sandra y Daniela, A la compañera de laboratorio Daniela Chamorro. Por último, pero no menos importante, a las personas que integran el laboratorio de fisiología vegetal, a la profesora Luisa y sobre todo al profesor Enrique por abrirme las puertas de su laboratorio, para terminar mi proyecto y a María Paz por la ayuda y la paciencia para hacer los experimentos. ¡Muchas gracias!

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3
INDICE.....	4
INDICE DE FIGURAS	6
INDICE DE TABLAS.....	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	10
INTRODUCCION.....	11
<i>Eutrofización: causas e impactos</i>	11
<i>Microalgas como herramienta de biorremediación</i>	13
<i>Metabolismo del nitrógeno en microalgas</i>	14
<i>Relación fotosíntesis-asmiliación de N</i>	15
<i>Justificación del estudio</i>	17
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	18
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS.....	18
<i>Objetivo general:</i>	19
<i>Objetivos específicos</i>	19
METODOLOGÍA.....	19
<i>Comunidad microalgal utilizada y muestreo</i>	20
<i>Diseño experimental</i>	20
<i>Análisis fisiológicos</i>	23

<i>Análisis bioquímicos</i>	27
<i>Determinación del potencial depurador a partir de remoción de nutrientes</i>	31
<i>Análisis estadísticos</i>	32
RESULTADOS	33
<i>Análisis fisiológicos</i>	33
<i>Análisis bioquímicos</i>	44
<i>Determinación potencial depurador</i>	47
DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIÓN	57
BIBLIOGRAFIA	58
ANEXO	69

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación laguna Las Tres Pascualas en la ciudad de Concepción, región del Biobío.....	21
Figura 2. Esquema simplificado del diseño experimental.....	23
Figura 3. Curva de crecimiento de los tratamientos basada en la concentración de Chl a ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).....	34
Figura 4. Gráfico Fv/Fm a lo largo del experimento.....	35
Figura 5. Gráfico αETR a lo largo del experimento.....	36
Figura 6. Gráfico ETRmax a lo largo del experimento.....	37
Figura 7. Gráfico NPQ a lo largo del experimento.....	38
Figura 8. Relaciones pigmentarias clorofilas, carotenoides totales	42
Figura 9. Relaciones pigmentarias compuestos ficobilínicos.....	43
Figura 10. Relación entre la suma de pigmentos accesorios y clorofila a.....	44
Figura 11. Actividad de la enzima nitrato reductasa (NR).....	45
Figura 12. Actividad de la enzima glutamina sintetasa (GS).....	46
Figura 13. Actividad de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH).....	47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Peso seco calculado a partir de la biomasa seca en los tratamientos.....	35
Tabla 2. Concentración promedio de pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en la comunidad microalgal cultivada en medio NaNO_3 a lo largo del experimento.....	39
Tabla 3. Concentración promedio de pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en la comunidad microalgal cultivada en medio NH_4Cl a lo largo del experimento.....	40
Tabla 4. Concentración promedio de pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en la comunidad microalgal cultivada en medio $\text{NaNO}_3+\text{NH}_4\text{Cl}$ a lo largo del experimento.....	41
Tabla 5. Contenido de proteínas (%) a partir de la biomasa seca en los tratamientos.....	45
Tabla 6. Tasa y porcentaje de remoción de nutrientes inorgánicos (N y P) al día 19 de cultivo en los diferentes tratamientos (NaNO_3 , NH_4Cl y $\text{NaNO}_3+\text{NH}_4\text{Cl}$).....	48

RESUMEN

Los sistemas lacustres urbanos enfrentan un grave proceso de eutrofización, provocado principalmente por el vertido de aguas residuales con alta carga orgánica de origen antrópico. Este fenómeno acelera el enriquecimiento de nutrientes, genera zonas con bajo oxígeno disuelto y produce desequilibrios ecológicos que afectan la biodiversidad, el turismo, la disponibilidad hídrica y la salud pública. A pesar de su importancia, la depuración de estos cuerpos de agua sigue siendo un desafío tecnológico, especialmente porque se desconocen los procesos fisiológicos y el potencial de las comunidades microalgales que los habitan para el tratamiento de aguas. Dado que la ficorremediación ha sido más estudiada en efluentes que en cuerpos de aguas, este estudio evaluó, en condiciones controladas, el desempeño de una comunidad microalgal de una laguna urbana eutrófica (Laguna Tres Pascualas, Chile), expuesta a dos fuentes de nitrogenadas, aplicadas en forma individual (NO_3^- , NH_4^+) y su combinación ($\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$). Se monitorearon parámetros fotosintéticos (F_v/F_m , αETR , ETR_{max} , NPQ), pigmentarios (clorofila a, carotenoides y pigmentos ficobilínicos), bioquímicos (proteínas) y enzimáticos (NR, GS/GOGAT, GDH), además de la remoción de nitrógeno (N), fósforo (P) y la carga de coliformes fecales. Los resultados muestran que no se evidenció una inhibición a nivel del fotosistema II (PSII) en los diferentes tratamientos ($F_v/F_m \approx 0,80\text{--}0,85$). Sin embargo, la mezcla $\text{NaNO}_3 + \text{NH}_4\text{Cl}$ promovió simultáneamente alta eficiencia fotosintética y mayor tasa de transporte de electrones (ETR_{max}) asociado con una menor disipación no fotoquímica (NPQ). Además de un aumento en el contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides). El contenido de proteínas celulares fue mayor en presencia de NH_4Cl , seguido por $\text{NaNO}_3 + \text{NH}_4\text{Cl}$ y NaNO_3 , lo que refleja el menor costo energético del nitrógeno reducido, lo cual fue respaldado por la actividad de las enzimas NR, GDH ($\text{nmol NADH oxidados} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$) y GS ($\text{nmol } \gamma\text{-glutamihidroxamato} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$). En términos operativos, todos los tratamientos lograron una alta remoción de N (98–99,8%), moderada de P (64–75%) y una reducción significativa de coliformes totales. La mezcla $\text{NaNO}_3 + \text{NH}_4\text{Cl}$ se posiciona como la opción

más eficiente para maximizar el rendimiento fotosintético y la calidad del efluente sin comprometer la eficacia del tratamiento.

Palabras claves: Eutrofización, Fitorremediación, Nitrógeno.

ABSTRACT

Urban lake systems in Chile face severe eutrophication driven primarily by inputs of wastewater with high anthropogenic organic loads. This accelerates nutrient enrichment, generates low-dissolved oxygen zones, and disrupts ecosystem services, with consequences for biodiversity, recreation, water availability, and public health. Yet remediation remains technologically challenging, in part because the physiology and treatment potential of resident microalgal communities are poorly characterized. Given that phycoremediation has been studied more in effluents than in whole water bodies, we evaluated under controlled conditions the performance of a native microalgal community from an eutrophic urban lake (Tres Pascualas Lagoon, Chile) exposed to three nitrogen sources: NO_3^- , NH_4^+ , and their mixture. We monitored photosynthetic parameters (F_v/F_m , αETR , ETR_{max} , NPQ), pigment pools (chlorophyll a, carotenoids, phycobiliproteins), biochemical metrics (total protein), and enzymatic activities (nitrate reductase, NR; glutamine synthetase/glutamate synthase, GS/GOGAT; glutamate dehydrogenase, GDH), together with removal of nitrogen (N), phosphorus (P), and total coliforms. Across treatments, F_v/F_m values ($\sim 0.80\text{--}0.85$) indicated no photosystem II inhibition. The $\text{NaNO}_3+\text{NH}_4\text{Cl}$ mixture concurrently enhanced photosynthetic efficiency and electron transport capacity (higher ETR_{max}) while reducing non-photochemical quenching (NPQ) and increasing photosynthetic pigment content. Cellular protein content was highest with NH_4Cl , followed by $\text{NaNO}_3+\text{NH}_4\text{Cl}$ and NaNO_3 , consistent with the lower energetic cost of reduced nitrogen and supported by NR, GDH ($\text{nmol NADH oxidized}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$), and GS ($\text{nmol }\gamma\text{-glutamylhydroxamate}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$) activities. Operationally, all treatments achieved high N removal (98–99.8%), moderate P removal (64–75%), and a significant reduction in total coliforms. The $\text{NO}_3^-+\text{NH}_4^+$ mixture emerges as the most efficient option to maximize photosynthetic performance and effluent quality without compromising treatment efficacy.

Keywords: Eutrophication, Phycoremediation, Nitrogen.

INTRODUCCION

Eutrofización: causas e impactos

El agua es un recurso vital y esencial para todos los aspectos de la vida; sin embargo, su gestión sostenible sigue siendo un desafío crítico a nivel mundial, acentuado por el crecimiento poblacional, el desarrollo industrial y la expansión urbana (Abdel-Raouf et al., 2012). A pesar de los esfuerzos por gestionar eficientemente los recursos hídricos, los niveles de contaminación continúan en aumento, amenazando la salud humana y al ecosistemas acuático (Sousa et al., 2018). En este contexto, la comunidad internacional ha propuesto Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) adoptados por la Asamblea General de las Naciones Unidas en 2015, para hacer frente este problema, uno de ellos es el ODS 6 “Garantizar la disponibilidad y la gestión sostenible del agua y el saneamiento para todos” (ONU, 2015).

A pesar de los esfuerzos de la comunidad internacional, la eutrofización sigue siendo uno de los principales problemas que presentan los cuerpos de agua (Chen & Wang, 2020). Este fenómeno se define como una condición en la que un cuerpo de agua presenta altas concentraciones de nutrientes, particularmente nitrógeno y fosforo, generando aguas turbias y fétidas (Akinnowo, 2023). Sus causas pueden ser naturales o impulsado por actividades humanas. En su forma natural, se produce a lo largo de escalas de tiempo geológicas, como parte del envejecimiento gradual de los cuerpos de agua hasta alcanzar un estado eutrófico (Akinnowo, 2023). Por otro lado, la eutrofización de origen antropogénico, también llamada eutrofización cultural, es el resultado del enriquecimiento excesivo de nutrientes debido a actividades humanas, lo que altera el equilibrio ecológico de los ecosistemas acuáticos (Sonarghare et al., 2020). Entre las principales actividades antropogénicas que contribuyen a este fenómeno se incluyen la escorrentía de fertilizantes agrícolas y el vertido de aguas residuales sin tratar, como efluentes provenientes de actividades agrícolas, acuícolas, domésticas e industriales (Ahmad et al., 2021). Estas actividades han incrementado significativamente los niveles de nitratos y fosfatos en lagos y ríos, sobrepasando la

capacidad natural de autodepuración generando impactos ecológicos significativos (Zhang, 2022).

El exceso de nutrientes, sumado a luz solar y CO₂ favorece la proliferación de comunidades de dinoflagelados y cianobacterias tóxicas, lo que reduce la penetración de luz solar y limita la fotosíntesis de la vegetación acuática sumergida (Costa et al., 2019). A medida que estas floraciones algales se descomponen, el oxígeno disuelto en el agua disminuye, generando condiciones de hipoxia afectando la biodiversidad favoreciendo la formación de zonas muertas en los ecosistemas acuáticos, lo que altera la cadena trófica (Rathore et al., 2016). Además, las cianobacterias que proliferan pueden liberar toxinas como las microcistinas y nodularinas, que afectan a la fauna acuática y pueden bioacumularse en la red trófica, representando un riesgo para la salud humana mediante el consumo de agua y organismos contaminados (Usman et al., 2022). Desde un punto de vista económico, la eutrofización impacta negativamente en sectores como la pesca, el abastecimiento de agua y el turismo, además de obstruir infraestructuras hídricas (Chen & Wang, 2020).

La magnitud del problema es evidente a nivel global. Según una encuesta realizada por el “International Lake Environment Committee” (ILEC), el 48% de los lagos y embalses en América del Norte son eutróficos, mientras que en Asia y el Pacífico la cifra asciende al 54%, en Europa al 53%, en África al 28% y en Sudamérica al 41% (Cai et al., 2013). En Chile, este fenómeno se ha documentado ampliamente en lagos, embalses y sistemas costeros, siendo impulsado principalmente por descargas urbanas, escorrentía agrícola y vertimientos industriales (Abarzúa et al., 2018; Buschmann et al., 2006; Pizarro et al., 2012). Un caso emblemático es la Laguna Las Tres Pascualas, ubicada en la zona urbana de Concepción, que presenta condiciones de eutrofización avanzada, evidenciadas por altos niveles de nutrientes, hipoxia recurrente, proliferación de microalgas y especies invasoras, así como pérdida de macrófitas nativas que cumplían un rol regulador del ecosistema (Almanza-Marroquín et al., 2016; Vollenweider & Kerekes, 1982). La dinámica trófica del sistema ha sido fuertemente alterada por la descarga de aguas pluviales sin tratamiento adecuado, y residuos urbanos, lo que ha promovido un cambio hacia una comunidad fitoplanctónica dominante, con presencia de cianobacterias potencialmente tóxicas (Costa et al., 2019).

Microalgas como herramienta de biorremediación

La eutrofización puede ser mitigada mediante un enfoque integral que combine la reducción en la entrada de nutrientes, la aplicación de técnicas de remediación en los cuerpos de agua y una adecuada gestión territorial (Abdel-Raouf et al., 2012). El control de fuentes externas de nitrógeno y fósforo es fundamental, lo que implica mejorar los sistemas de tratamiento de aguas residuales, promover prácticas agrícolas sostenibles que minimicen el uso excesivo de fertilizantes, y manejar adecuadamente los desechos ganaderos y urbanos (Akinawo, 2023). En este contexto, el tratamiento de aguas residuales juega un rol clave, especialmente en entornos urbanos donde los cuerpos de agua reciben una carga constante de nutrientes provenientes de actividades humanas que al no ser tratadas generan eutrofización. Sin embargo, a pesar de los avances tecnológicos, los tratamientos convencionales (primarios, secundarios e incluso terciarios) no siempre logran una remoción efectiva de estos nutrientes (Ahmad et al., 2021). Además, el alto costo de capital y la elevada demanda energética de estos procesos representan desventajas importantes (Kaloudas et al., 2021). Por ello, existe una creciente necesidad de métodos sostenibles, rentables y más eficientes que logren reducir significativamente la carga de nutrientes y otros compuestos tóxicos que persisten incluso después del tratamiento terciario (Alavianghavanini et al., 2024).

Independientemente del método utilizado, tanto el fósforo (P) como el nitrógeno (N) se consideran contaminantes; pero también son nutrientes esenciales para los organismos (Cai 2013). Por ello, su remoción mediante procesos que permitan su reutilización representa una estrategia óptima para el reciclaje de residuos (Chen & Wang, 2020). En este contexto, el uso de microalgas destaca como un enfoque prometedor para mitigar la contaminación ambiental, ya que permite la eliminación eficiente de nutrientes, reduce su toxicidad, disminuye los costos energéticos y posibilita la obtención de productos de valor económico, aportando a la “economía circular” (Almanza-Marroquín et al., 2016; Zhang et al., 2014). Además, su alta tasa de crecimiento y mayor productividad de biomasa por unidad de superficie en comparación con las plantas terrestres las posiciona como organismos clave en el reciclaje de nutrientes y la fijación de carbono inorgánico en moléculas orgánicas, reduciendo además la emisión de gases de efecto invernadero (Cai et al., 2013).

Metabolismo del nitrógeno en microalgas

El nitrógeno es un elemento esencial para el metabolismo de las microalgas. Representa entre el 7 y el 12% de su biomasa, formando parte de ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, pigmentos como clorofila, fitohormonas y metabolitos secundarios (Chen & Wang, 2020). A nivel fisiológico influye en el crecimiento, composición bioquímica e interacciones ecológicas (Sanz-Luque et al., 2015). Sin embargo, a diferencia de los organismos diazotróficos como *Azotobacter*, *Rhizobium* y algunas cianobacterias que presentan heterocistos como el género *Anabaena* y *Nostoc*, las microalgas no pueden asimilar directamente el nitrógeno atmosférico (N_2) (Carcaño-Montiel et al., 2006). En consecuencia, deben obtenerlo de fuentes biodisponibles en el entorno acuático (Chen & Wang, 2020; Neilson & Lewin, 1974).

Principalmente asimilan amonio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) y fuentes de nitrógeno orgánico, mayormente urea y otras, como extracto de levadura, peptona, aminoácidos y purinas (Cai et al., 2013). Su absorción se lleva a cabo mediante transportadores específicos: el amonio (NH_4^+) es mediado por las familia de transportadores MEP (eucariotas) y AMT (cianobacterias); nitrato (NO_3^-) y nitrito (NO_2^-) por familias de transportadores NTR1, NTR2, NAR1 para eucariotas y NRT para cianobacterias, mientras que fuentes de nitrógeno orgánico, principalmente urea, es absorbido a través de un cotransporte con Na^+ (Su, 2021).

Entre las diferentes fuentes de nitrógeno biodisponibles, las microalgas muestran una preferencia por el amonio (NH_4^+), ya que es la fuente energéticamente más eficiente, debido a que su asimilación requiere un menor gasto energético en comparación con las otras fuentes de nitrógeno (Fernández et al., 2009). El metabolismo de asimilación del amonio es catalizado por la vía GS/GOGAT, en cloroplastos (o citoplasma en procariontes), donde actúan las enzimas glutamina sintetasa (GS) que produce glutamina a partir de glutamato y amonio, lo que consume ATP; y luego glutamato sintasa (GOGAT), toma la glutamina y un α -cetoglutarato (proveniente del ciclo de Krebs) y poder reductor (NADPH o ferredoxina reducida), generando 2 moléculas de glutamato, de las cuales una se recicla para volver al ciclo GS/GOGAT y la otra se usa como precursor de otros aminoácidos, a partir de reacciones

de transaminación catalizadas por aminotransferasas (Fernández et al., 2009; Perez-Garcia et al., 2011; Sanz-Luque et al., 2015).

Alternativamente, el amonio se incorpora al glutamato a través de la aminación reductora del α -cetoglutarato, catalizada por glutamato deshidrogenasa (GDH) en citoplasma o mitocondrias (se oxida NADPH) (Inokuchi et al., 2002). GDH asimila amonio cuando su concentración es alta y cuando los niveles de energía son limitados, proporcionando una ruta alternativa para la síntesis de glutamato sin depender de la GS, que requiere ATP. Además, en situaciones de estrés por exceso de amonio, la GDH ayuda a metabolizarlo y evitar su acumulación tóxica (Lu et al., 2005).

Por otra parte, tanto el nitrato como nitrito no se pueden asimilar directamente a aminoácidos, por lo que deben ser reducidos previamente a amonio. En este proceso participan dos enzimas, nitrato reductasa (NR), enzima citoplasmática que reduce NO_3^- a NO_2^- (mediante la oxidación de NADPH) y nitrito reductasa (NiR), en cloroplastos, que reduce NO_2^- a NH_4^+ , oxidando ferredoxina (Perez-Garcia et al., 2011).

Relación fotosíntesis-asimilación de N

La fotosíntesis de las microalgas ocurre en los cloroplastos (tilacoides en cianobacterias) y se divide en reacciones luminosas y reacciones de fijación de carbono (ciclo de Calvin-Benson). En las reacciones luminosas, el PSII oxida agua mediante el complejo liberador de oxígeno (OEC), liberando O_2 y cediendo electrones a la cadena transportadora de electrones: plastoquinona \rightarrow citocromo b_6/f \rightarrow plastocianina \rightarrow PSI. Este flujo genera un gradiente de protones que impulsa a ATP sintasa (para síntesis de ATP) y, al final, PSI reduce ferredoxina y FNR produciendo NADPH (Ruban, 2016). Cuando se requiere más ATP relativo a NADPH, la fotofosforilación cíclica alrededor de PSI recicla electrones para aumentar ATP sin formar NADPH (Masojídek et al., 2013).

En el ciclo de Calvin-Benson, la enzima RuBisCO fija CO_2 formando 3-PGA que se reduce (con ATP y NADPH de la fase luminosa) a triosas; parte se exporta a rutas anabólicas (carbohidratos, lípidos, aminoácidos) y parte regenera RuBP. Las microalgas ajustan su aparato antena (LHC o ficobilisomas en cianobacterias) y pigmentos (clorofila a; clorofilas

b/c y carotenoides) para fotoaclimatarse: pueden capturar mejor la luz o disipar el exceso de esta, reparar proteínas de PSII y redistribuir antenas (transiciones de estado) (Ruban, 2016).

En microalgas, la fotosíntesis y la asimilación de nitrógeno (N) están estrechamente acopladas: la fase luminosa provee ATP y poder reductor (NADPH/ferredoxina) que alimentan la reducción de $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ (NR) y $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$ (NiR) y, ya como NH_4^+ , su incorporación a aminoácidos mediante GS/GOGAT (Fernández et al., 2009; Perez-Garcia et al., 2011). La regulación de estas rutas es sensible al estado celular y al ambiente: la actividad de NR (nitrato reductasa) se modula post-traduccionalmente por señales redox y de energía, coordinando el uso del poder reductor fotosintético con la disponibilidad de N (Perez-Garcia et al., 2011). En términos funcionales, la forma de N altera el balance energético: el NH_4^+ reduce costos al evitar la reducción previa, mientras que el NO_3^- demanda más electrones, pero puede actuar como sumidero de poder reductor bajo alta irradiancia, o limitaciones del ciclo de Calvin, contribuyendo a estabilizar el flujo electrónico y el presupuesto redox (Masojídek et al., 2013). Además, mezclas $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ y la propia señalización del N modulan el transporte y la expresión de genes de asimilación, suele haber represión de vías de NO_3^- cuando abunda NH_4^+ (Glibert et al 2016).

En este contexto, las técnicas de fluorescencia de la clorofila a se han convertido en una herramienta clave para estimar la actividad fotosintética, especialmente en el fotosistema II (PSII). La luz absorbida por la clorofila a en el PSII (P680) puede ser utilizada fotoquímicamente, disipada como calor o reemitida como fluorescencia, y cualquier cambio en uno de estos procesos afecta a los otros dos, dado que todos comparten la misma fuente de energía luminosa absorbida (Maxwell & Johnson, 2000). Por ello, la fluorescencia de la clorofila a se considera un indicador directo del rendimiento fotoquímico del PSII. La medición de esta fluorescencia, mediante fluorímetros de pulso de amplitud modulada (PAM), permite una evaluación *in vivo*, no destructiva y altamente sensible del estado fotosintético, proporcionando datos en tiempo real sobre parámetros clave como F_v/F_m , αETR , ETR_{max} y NPQ. Estos parámetros reflejan la eficiencia del transporte electrónico y la disipación de energía, y responden a factores como la disponibilidad de nitrógeno: un suministro adecuado de este nutriente tiende a mejorar el rendimiento fotoquímico, mientras

que su deficiencia incrementa la disipación no fotoquímica, revelando un desbalance energético dentro del aparato fotosintético (Maxwell & Johnson, 2000; Masojídek et al., 2013; Ruban, 2016).

Justificación del estudio

Diversos estudios han demostrado que, aunque el amonio (NH_4^+) suele inhibir la absorción de nitrato (NO_3^-) cuando estos se suministran juntos en cultivos microalgales, esta inhibición varía según la especie (Carletti et al., 2024; Glibert et al 2016). En particular, especies eucariotas como *Auxenochlorella protothecoides* (Pastore et al., 2020) y *Chlamydomonas reinhardtii* (Llamas et al., 2002), y consorcios microalgas-bacterias (Perera, 2022) mantienen una asimilación dual, modulada por las concentraciones relativas de ambas formas nitrogenadas. Esta flexibilidad regulatoria contrasta con especies como *Synechocystis* sp. PCC 6803, donde la presencia de amonio bloquea la captación de nitrato (Watzer et al., 2019). Adicionalmente, otras microalgas como *Chlorella vulgaris* (Syrett & Morris, 1963) *Nannochloropsis* sp. (Hii et al., 2011), *Haematococcus lacustris* (Bian et al., 2023) y *Tetrademus obliquus* (Starkenbug et al., 2017), presentan perfiles genéticos compatibles con absorción dual de amonio y nitrato, sustentada por la expresión de transportadores como AMT, NRT1, NRT2 y NAR1 (Carletti et al., 2024).

Dado que las aguas residuales y cuerpos de agua eutróficos presentan frecuentemente composiciones mixtas de nitrógeno (Markou & Muylaert, 2014), **trabajar con comunidades microalgales que incluyan especies de comportamiento dual podría potenciar la eficiencia de biorremediación**, tanto a nivel fotosintético como bioquímico. Esta diversidad funcional se ve reflejada a nivel fisiológico a través de la actividad fotosintética y por las concentraciones de pigmentos fotosintéticos. También se ve reflejada en la variabilidad enzimática asociada a rutas de asimilación, como nitrato reductasa (NR), glutamina sintetasa (GS) y glutamato deshidrogenasa (GDH), cuya actividad está directamente influenciada por la forma nitrogenada presente en el medio (Chen & Wang, 2020). Por lo tanto, la evaluación experimental de estas respuestas fisiológicas y enzimáticas en condiciones controladas permitirá establecer el potencial depurador de la comunidad microalgal.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo varían la actividad fotosintética y enzimática, y la capacidad de asimilación/remoción de N en función de la fuente nitrogenada (NaNO_3 , NH_4Cl y su combinación) en una comunidad microalgal nativa bajo condiciones controladas?

HIPÓTESIS

La combinación de $\text{NaNO}_3+\text{NH}_4\text{Cl}$ como fuente nitrogenada promoverá una mayor eficiencia fotosintética y enzimática en la comunidad microalgal en comparación con el uso exclusivo de cada fuente por separado.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno (NaNO_3 , NH_4Cl y su mezcla) en el desempeño del metabolismo fisiológico y bioquímico de una comunidad microalgal.

Objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto de las fuentes nitrogenadas (NaNO_3 , NH_4Cl y su mezcla) en el desempeño fotosintético de la comunidad microalgal.
2. Determinar cómo las fuentes de nitrógeno (NaNO_3 , NH_4Cl y su mezcla) afectan la asimilación de nitrógeno a través de las enzimas nitrato reductasa (NR), glutamina sintetasa (GS) y glutamato deshidrogenasa (GDH) en la comunidad microalgal.
3. Evaluar la capacidad de remoción de nitrógeno y fósforo por la comunidad microalgal.

METODOLOGÍA

1. Comunidad microalgal utilizada y muestreo

El área de estudio corresponde a la laguna Las Tres Pascualas ubicada en el casco urbano de Concepción, región del Biobío, específicamente en el sector de Barrio Norte (36°48'50"S ,73°02'30"O) (Figura 1). De origen fluvial, somera, presenta una superficie aproximada de 58.950 m², una profundidad de 8 m y un volumen de 300.135 m³ (Parra, 2009). El estado trófico actual de esta laguna es eutrófico ya que, la transparencia en la columna de agua es de 1,49 m (clasificación hipereutrófica), la biomasa algal es de 25,3 ug·L⁻¹ (Chl a) y la concentración de nutrientes es 1,66 mg·L⁻¹ para Nitrógeno total y 0,09 para Fosforo total mg·L⁻¹, todos estos valores son altos según clasificación OCDE (Almanza-Marroquín et al., 2016; Vollenweider & Kerekes, 1982). Estos parámetros favorecen la aparición de eventos ambientales singulares que afectan directamente a la diversidad de la laguna, como la mortandad de peces por la alteración en la calidad del agua e invasión de macrófitas (Parra, 2009).

Para el muestreo se sumergió una red fitoplactónica de 20um aproximadamente a 50cm de profundidad y se recolectaron aproximadamente 12L de agua. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio Ficolab de la Universidad de Concepción.

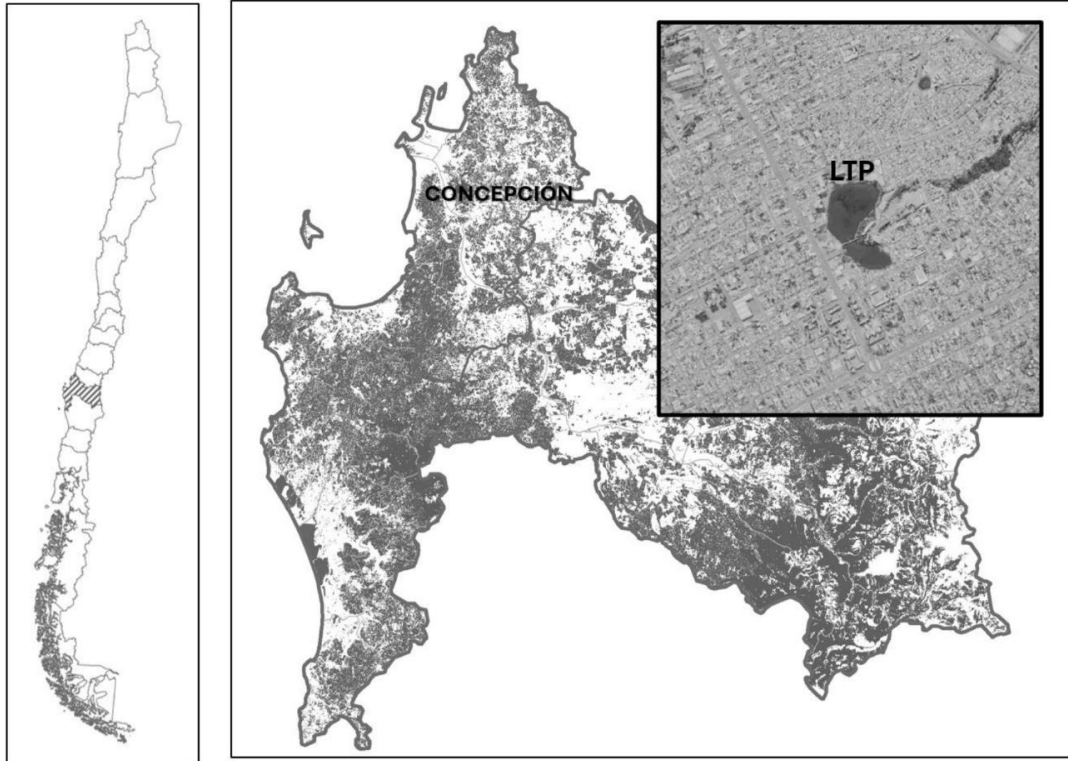


Figura 1. Ubicación laguna Las Tres Pascualas en la ciudad de Concepción, región del Biobío.

2. Diseño experimental

2.1 Preparación del medio de cultivo

Se utilizó medio de cultivo Bristol (Starr & Zeikus, 1993; Anexo 2) estandarizado para el crecimiento de microalgas, el cual fue preparado en tres variantes según la fuente de nitrógeno suministrada:

1. Medio con nitrato de sodio (NaNO_3) como única fuente nitrogenada.
2. Medio con cloruro de amonio (NH_4Cl) como única fuente nitrogenada.
3. Medio con mezcla de $\text{NaNO}_3 + \text{NH}_4\text{Cl}$, en proporciones equimolares para alcanzar la misma concentración total de nitrógeno que en los tratamientos individuales.

Para estandarizar la carga total de nitrógeno (N) entre tratamientos, se igualó el N aportado por cada sal en el medio final. El tratamiento NaNO_3 se preparó con $0,25 \text{ g NaNO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, equivalente a $41,2 \text{ mg N} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\text{NaNO}_3 = 84,99 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$; 1 mol aporta 14 g de N). El tratamiento suplementado con NH_4Cl se ajustó para alcanzar la misma carga de N ($41,2 \text{ mg N} \cdot \text{L}^{-1}$), lo

que corresponde a $0,158 \text{ g NH}_4\text{Cl}\cdot\text{L}^{-1}$ ($53,49 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). En el tratamiento mixto, el N se aportó en partes iguales desde ambas fuentes: $0,125 \text{ g NaNO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ ($\approx 20,6 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$) y $0,0788 \text{ g NH}_4\text{Cl}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\approx 20,6 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$), manteniendo $41,2 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$ totales. Cada tratamiento fue preparado en cuatro réplicas independientes, sumando un total de 12 matraces de 1 L de capacidad.

2.2 Preparación del inóculo

La biomasa inicial se estandarizó a 500 ug Chl a en 1000 mL de cultivo para todas las réplicas de los diferentes tratamientos presentados en el punto 2.1. La concentración de clorofila se determinó mediante extracción en acetona y cuantificación espectrofotométrica según el protocolo descrito por Strickland & Parsons (1972).

2.3 Condiciones de cultivo

Los tratamientos fueron trasladados a una sala con una temperatura $20\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, aireación constante (aire filtrado a $0,2 \text{ }\mu\text{m}$), fotoperiodo (luz:oscuridad) (16:8) horas con lámparas LED rojas y azules a una proporción mixta (50:50), las cuales mejoran el desempeño fotosintético, previamente evaluado en el laboratorio por Martínez et al., 2024. El flujo fotónico fue establecido previamente por la realización de curvas rápidas de luz mediante un fluorímetro (MINIPAM, Walz, Germany), evidenciándose una densidad de flujo fotónico de $50 \text{ }\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ya que con irradiancias superiores, existe fotoinhibición de la muestra algal ($Y(\text{II}) = 0.3$) de acuerdo con la metodología descrita por Ibrahim et al., (2014).

El experimento tuvo una duración total de 19 días, durante los cuales se realizaron evaluaciones periódicas de parámetros fisiológicos, incluyendo concentración de clorofila a y pigmentos fotosintéticos, actividad fotosintética (PAM), y peso seco. Además, se calculó el porcentaje de remoción de nutrientes. Luego la biomasa de cada tratamiento se liofilizó y con ella se determinó la concentración de proteínas totales, y las actividades enzimáticas asociadas al metabolismo del nitrógeno (NR, GS, GDH).

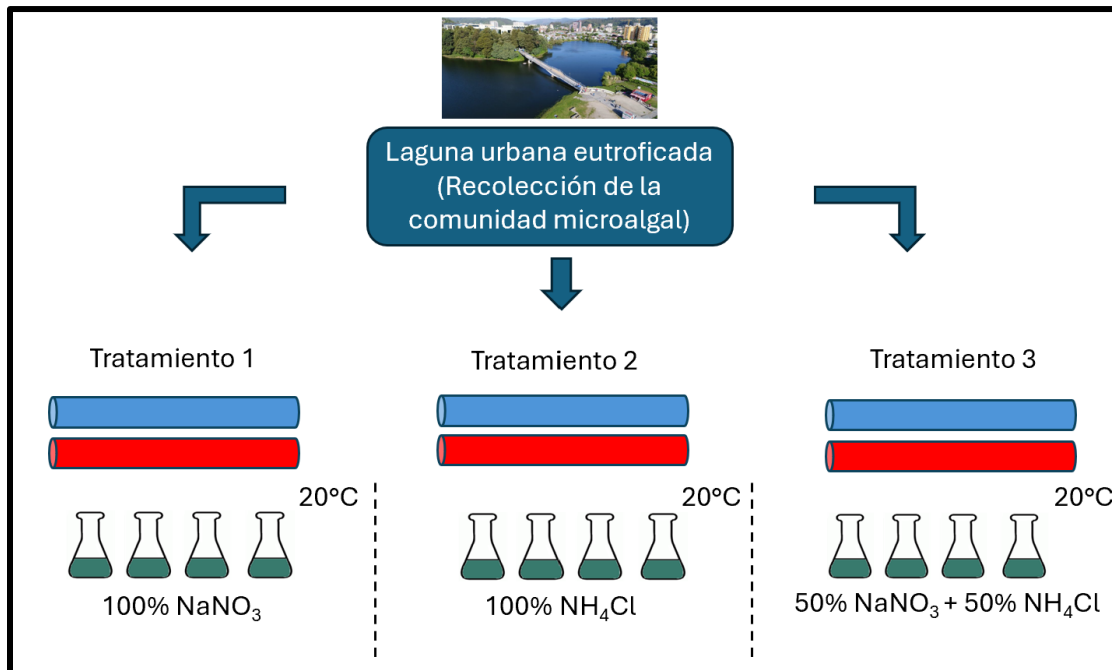


Figura 2. Esquema simplificado del diseño experimental.

3. Análisis fisiológicos.

3.1 Cuantificación de pigmentos fotosintéticos y accesorios.

3.1.1 Cuantificación clorofilas y carotenoides

Para el seguimiento del crecimiento de la comunidad microalgal, se cuantificó la concentración de clorofila a (Chl a) a lo largo del experimento (días 0, 4, 7, 9, 12, 14, 16, 19). Para ello, la determinación de clorofila y carotenoides totales se siguió el protocolo de Strickland & Parsons (1972). Se tomaron 10 mL de cultivo en tubos Falcon, y se centrifugaron a 4000 rpm por 10 min, para luego descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 3 mL de acetona al 90% v/v. Posteriormente los tubos fueron envueltos en papel aluminio para ser incubarlos durante 24 horas a 4°C. Pasado el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron 10 min a 4000 rpm, el sobrenadante se depositó en un matraz aforado de 5 mL, mientras que al pellet se le agregó 1 mL de acetona al 90% en un tubo del Homogenizador FastPrep, mezclando mediante vórtex y añadiendo una esfera de cerámica para homogenización. Las muestras fueron procesadas en un homogeneizador automático FastPrep en tres ciclos de 20 segundos cada uno. Tras la homogenización, las muestras se

centrifugaron a 10000 rpm durante 5 min. El sobrenadante obtenido se colectó en un matraz aforado de 5 mL, mientras que el pellet fue sometido a una nueva extracción con 1 mL adicional de acetona, repitiendo el proceso hasta que el solvente de extracción fuera incoloro. El volumen final del extracto se aforó a 5 mL con acetona, las muestras se leyeron a 750 nm (turbidez), 663 nm (Chl a), 644 nm (Chl b), 630nm, 453nm (carotenoides totales) y 445nm en el espectrofotómetro, utilizando acetona al 90% como blanco.

Las lecturas fueron corregidas por turbidez (750nm) de la siguiente manera:

$$\text{ABS } 663 = A750 - A663 \text{ (Chl a).}$$

$$\text{ABS } 644 = A750 - A644 \text{ (Chl b).}$$

$$\text{ABS } 453 = A750 - A453 \text{ (carotenoides totales).}$$

La clorofila c fue medida mediante ecuación de Jeffrey & Humphrey, (1975):

$$\text{ABS } 630 - \text{ABS } 663 - \text{ABS } 644 / \text{vol.}$$

Siguiendo las ecuaciones de Wegmann & Metzner (1971) se calcularon las concentraciones finales ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de cada pigmento.

3.1.2 Cuantificación pigmentos ficobilínicos

Se cuantificó la concentración de pigmentos ficobilínicos (ficoeritrina, ficocianina y alofococianina) a lo largo del experimento (días 0, 4, 7, 9, 12, 14, 16, 19). El método de Bennett & Bogobad (1973) fue utilizado para su extracción. Se centrifugaron a 4000 rpm por 10 min, 10 mL de cultivo en tubos Falcon de 15 mL en tubos de FastPrep y se extrajeron con 1 mL de tampón fosfato 100 mM, agregando una esfera de cerámica de homogenización, se procesó en el homogeneizador FastPrep en tres ciclos de 20 segundos. Luego, la muestra se congeló por 8 min a -80°C , se dejó descongelar a temperatura ambiente, se agitó en vórtex y se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min. El sobrenadante obtenido se recolectó en un matraz aforado de 10 mL, repitiendo la extracción con 1 mL adicional de tampón fosfato 100Mm (pH 6.8), sometiendo el pellet restante a tres ciclos de homogenización, congelación, agitación y centrifugación, hasta que el sobrenadante fuera incoloro. El extracto se aforó a

10 mL con tampón fosfato 100 mM (pH 7) y se leyó su absorbancia a 750 nm (turbidez), 650 nm (aloficocianina), 620 nm (ficocianina) y 565 nm (ficoeritrina) en espectrofotómetro, utilizando como blanco tampón fosfato 100 mM. Las lecturas fueron corregidas por turbidez (restándole a cada absorbancia la absorbancia a 750 nm) y las concentraciones de estos pigmentos son calculados en base a las ecuaciones de Bermejo et al. (2002):

Concentración Ficocianina PC ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$): $\text{ABS } 620 - 0,7 \times \text{ABS } 650/7,38$.

Concentración Aloficocianina APC ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$): $\text{ABS } 650 - 0,19 \times \text{ABS } 620/5,65$.

Concentración Ficoeritrina PE ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$): $\text{ABS } 565 - 2,8 \times \text{PC} - 1,34 \times \text{APC}/12,7$.

3.2 Determinación del peso seco

Para determinar el rendimiento de los cultivos expresado como peso seco, se secaron filtros de nitrocelulosa (poro 0,45 μm) por 24 horas a 80°C, se enfriaron en un desecador y se pesaron hasta peso constante. El último día de cultivo se filtraron 10 mL de cultivo por réplica en cada filtro seco y pesado, posteriormente se dejó secar los filtros con biomasa en la estufa a 80°C por 48 horas y se volvieron a pesar. La diferencia del peso del filtro con y sin biomasa, dividido por el volumen de cultivo filtrado, corresponde al peso seco de la biomasa microalgal por volumen de cultivo ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

3.3 Fluorescencia in vivo de la clorofila a

Esta es una medida basada en la determinación de la fluorescencia de la clorofila a asociada al fotosistema II (P680) determinada mediante fluorímetro de pulso de amplitud modulada (MINI PAM) controlado por el software WinControl v3.25 (Walz GmbH, Germany). La fluorescencia basal (F_0), proveniente de los centros de reacción del PSII completamente oxidados, y la fluorescencia máxima (F_m), de los centros de reacción del PSII completamente reducidos, se determinaron en oscuridad para obtener el rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m), siendo F_v la diferencia entre F_m y F_0 (Figuroa et al., 2003) mediante la siguiente expresión matemática:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$$

El cociente F_v/F_m y las Curvas Rápidas de Luz (RLCs, por sus siglas en inglés) se midieron utilizando luz azul como luz de medición, actínica y de pulso de saturación (Junior PAM, Walz GmbH, Effeltrich, Alemania), según Figueroa et al. (2003). Las muestras adaptadas a la oscuridad (15 min) fueron expuestas a doce intensidades actínicas crecientes ($E_1=25$; $E_2=45$; $E_3=66$; $E_4=90$; $E_5=125$; $E_6=190$; $E_7=285$; $E_8=420$; $E_9=625$; $E_{10}=845$; $E_{11}=1150$ y $E_{12}=1500$ $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 20 segundos cada una, en una cámara de medición protegida de la luz (15 mL).

El nivel de fluorescencia adaptado a la luz (F') y el nivel máximo de fluorescencia (F_m') se registraron al final de cada pulso de saturación. El rendimiento cuántico fotoquímico real bajo luz, Yield (II) o $\Delta F/F_m'$, se determinó como $(F_m' - F') / F_m'$ en cada nivel de irradiancia correspondiente.

La tasa de transporte de electrones (ETR) a través del PSII por unidad de clorofila a ($\mu\text{mol e}^- \text{mg}^{-1} \text{Chl a}^{-1} \text{s}^{-1}$) se determinó de la siguiente forma:

$$ETR = \text{Yield (II)} * \Delta F/F_m' * E_{par} * A * fQ_{A_{psii}}$$

Donde EPAR es la irradiancia fotosintéticamente activa incidente ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$), A es la absorptancia (unidades relativas), que es la fracción de luz absorbida a través de una película de 3mm de medio de cultivo y se calculó mediante $A = 1 - (E_f / E_t)$, y $fQ_{A_{psii}}$ es la fracción de cuantos absorbidos por el PSII, siendo 0,51 para Chlorophyceae (tomado de Johnsen y Sakshaug, 2007).

La ETR frente a la irradiancia se graficó para obtener las curvas P-E. Las curvas se ajustaron por regresión no lineal de mínimos cuadrados utilizando la función tangencial reportada por Eilers y Peeters (1988), para estimar los parámetros de la curva P-E: ETR máxima (ETR_{max}), la pendiente inicial de ETR frente a EPAR (α ETR) como estimador de la eficiencia fotosintética.

El apagamiento no fotoquímico [$NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$] de la fluorescencia es una medida de la disipación de energía, y se expresa también como la razón entre las pérdidas de rendimiento $Y(NPQ)/Y(NO)$, siendo $Y(NPQ)$ una pérdida de rendimiento fotoregulada a

través del ciclo de las xantofilas y Y(NO) una disipación térmica no fotoregulada. Y(NPQ) y Y(NO) están inversamente relacionadas con la fotoquímica (Y(II)), y el NPQ se considera un indicador de la fotoprotección frente al exceso de irradiancia (Celis-Plá et al., 2017). El NPQ máximo (NPQ_{max}) se obtuvo a partir de la función tangencial de NPQ frente a la irradiancia, según Eilers y Peeters (1988).

3.4 Relaciones pigmentarias

Las concentraciones absolutas de pigmentos ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) se normalizaron respecto a la clorofila a (Chl a) de cada muestra, obteniendo las razones Chl b/Chl a, Chl c/Chl a, carotenoides/Chl a, ficocianina (PC)/Chl a, ficoeritrina (PE)/Chl a, aloficocianina (APC)/Chl a, y la sumatoria (Σ) pigmentos accesorios/Chl a. Las relaciones, expresadas como valores adimensionales, se calcularon para el día 19 del experimento en cada réplica (n=4).

4. Análisis bioquímicos.

4.1 Extracción y cuantificación de proteínas totales de la biomasa microalgal

Al día 19 en todos los tratamientos, la biomasa fue recolectada por centrifugación a 4000 rpm por 10 min y congelada a -18°C . Posteriormente la biomasa se liofilizó por 48 horas y se mantuvo a -18°C hasta su análisis químico. Con la biomasa liofilizada se cuantificaron las proteínas totales. Preliminar a la cuantificación, se prepararon las siguientes soluciones con el procedimiento descrito por Lowry et al. (1951):

- Solución A: Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0,1 M.
- Solución B1: $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ al 0,5%.
- Solución B2: Tartrato de Sodio y Potasio al 1%.
- Solución C: 49 mL de solución A + 1 mL de solución B1 + 1 mL de solución B2.
- solución D: reactivo Folin-Ciocalteau 50% v/v.

La biomasa seca correspondiente a cada tratamiento fue depositada en tubos de vidrio de 12 mL con 5 mL de NaOH 0,1 M, posteriormente estos se agitaron en vortex durante 30 seg.

Los tubos más un tubo de muestra control (NaOH) se incubaron a 100°C durante una hora en una placa calefactora y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se agitaron en vortex durante 10 seg, luego se colectó una alícuota de 1mL en tubos de microcentrífuga (Eppendorf) de 1,5 mL para ser centrifugadas a 7000 rpm por 15 min. Se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos. El sobrenadante fue repartido por triplicado en volúmenes de 250 ul a tubos de vidrio de 12 mL y se completó con 750 ul de NaOH 0,1 M. A cada tubo se le agrego 1 mL de la solución C, se agitaron en vortex y se incubaron a temperatura ambiente por 10 min, y a continuación, se adicionaron 100 ul de solución D, volviendo a agitarse en vortex y finalmente se incubaron en oscuridad durante 30 min. Se realizó la lectura de absorbancias en espectrofotómetro a 750 nm. Las concentraciones de proteínas totales se calcularon de acuerdo con la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración construida previamente a partir de la proteína de referencia seroalbúmina de bovino (BSA), preparada con 300 ug de BSA en NaOH 0,1 M a diferentes concentraciones donde la absorbancia de la reacción fue medida a 750 nm en espectrofotómetro. Los datos obtenidos fueron graficados y utilizados para establecer la ecuación de la recta.

4.2 Determinación de actividad enzimática

Las actividades enzimáticas se midieron rehidratando (con buffer de extracción a 4°C) extractos de 10 mg de biomasa liofilizada para cada tratamiento (n=4), aplicando una etapa previa de disrupción mecánica. Para ello, las muestras fueron agitadas en vortex para posteriormente ser incubadas con 1mL de buffer de extracción en tubos de Homogenizador FastPrep con una esfera de cerámica para homogenización en tres ciclos de 20 seg cada uno. Tras la homogenización, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 min. El sobrenadante obtenido se colectó en frío (hielo), mientras que el pellet fue sometido a una nueva extracción con 1 mL de buffer adicional.

4.2.1 Actividad enzimática de Nitrato Reductasa

La determinación de la actividad de la enzima Nitrato Reductasa (NR) se realizó siguiendo el protocolo de Allan et al. (1975). La enzima se extrajo de muestras que contenían 10 mg de biomasa hidratada incubándose con 1 mL de buffer de extracción (50 mM buffer fosfato, 1

mM EDTA, 25 mM cisteína, 3 % BSA, pH 8,8), centrifugándose a 11000 rpm por 10 min a 4°C. Posteriormente se extrajo 100 uL del sobrenadante y se incubó con 900 uL de buffer de reacción (50 mM buffer fosfato, 10 mM KNO₃, 0,1 mM NADH). Se midió la oxidación del NADH por acción de la enzima NR en el espectrofotómetro a 340 nm a tiempo 0 min y a tiempo 10 min. Los controles se midieron incubando la enzima con el buffer de reacción sin NADH e incubando la enzima desnaturalizada con el buffer de reacción. La actividad enzimática se calculó con n=4 para cada tratamiento, con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad NR} = [(\Delta A/t)/k] \times V_{\text{react}} \times 60 \times 1000/m_{\text{prot}}$$

Donde: $\Delta A/t$ es la diferencia de absorbancia dividida por el tiempo final (10 min); k es constante (6.22); V_{react} suma del volumen de buffer (0,9 mL) con el volumen de la enzima (0,1 mL); 60 es el tiempo transcurrido en minutos, 1000 convierte umol en mol, m_{prot} masa de proteína en vol del extracto enzimático.

4.2.2 Actividad enzimática de Glutamina Sintetasa

La determinación de la actividad enzimática de Glutamina Sintetasa (GS) se realizó siguiendo el protocolo descrito por Lea (1990) para medir la conversión de hidroxamina (NH₂OH) (un sustrato alternativo al NH₄⁺) a γ -glutamilhidroxamato. La enzima se extrajo de muestras que contenían 10 mg de biomasa liofilizada incubándose con 1 mL de buffer de extracción (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM MgSO₄, 5 mM glutamato de sodio, 10 % etilenglicol (v/v), 1mM DTT, pH 7,8) y centrifugándose a 11000 rpm por 10 min a 4°C. Posteriormente se extrajo 200 uL del sobrenadante y se incubó con 500 uL de buffer de reacción (80 mM de glutamato, 20 mM MgSO₄, 8 mM ATP, 6 mM hidroxilamida, 1 mM EDTA, 0,1 M tricina, pH 7.8) por 15 min a 30 °C. La reacción se detuvo agregando 700 uL de buffer de detección (0,67 mM de FeCl₂, 0,37 M HCl, 20 % TCA). La detección de γ -glutamilhidroxamato se midió en espectrofotómetro a 540 nm. Para calcular la actividad de GS se debió usar una curva de calibrado de γ -glutamilhidroxamato. Los controles se midieron incubando la enzima con el buffer de reacción sin ATP e incubando la enzima desnaturalizada con el buffer de reacción. La actividad enzimática se calculó con n=4 para cada tratamiento en función de la siguiente ecuación.

$$\text{Actividad GS} = [(A_{540} - b/m) \times V_{\text{lec}} / 25 \text{min}] \times 60 / m_{\text{prot}}$$

Donde: $A_{540} - b/m$ es el producto en la cubeta a la lectura 540nm; V_{lec} es la cantidad formada de γ -glutamilhidroxamato en nmol, 60 es el tiempo transcurrido en minutos; m_{prot} masa de proteína en vol del extracto enzimático.

4.2.3 Actividad enzimática de Glutamato Deshidrogenasa

La determinación de la actividad enzimática de aminación de la enzima Glutamato Deshidrogenasa (GDH) se realizó siguiendo el protocolo descrito por Kumar et al. (2000) para detectar la oxidación de NADH. La enzima se extrajo de muestras que contenían 10 mg de biomasa liofilizada incubándose con 1 mL de buffer de extracción (100 mM Tris-HCl, 3,3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM β -mercaptoetanol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, pH 8) y centrifugándose a 11000 rpm por 20 min a 4°C. Posteriormente se extrajo 200 uL del sobrenadante que contenía la enzima. Para medir la aminación, el extracto se hizo reaccionar con 900 uL de buffer de reacción (76 mM Tris-HCl, 20 mM α -cetoglutarato, 150 mM (NH₄)₂SO₄, 0,2 mM NADH, 1 mM MgCl₂, pH 8.1). La absorbancia se midió en el espectrofotómetro a 340 nm en 0 min y 10 min. Los controles se midieron incubando la enzima con el buffer de reacción sin NADH, e incubando la enzima desnaturalizada con los buffers de reacción. La actividad enzimática se calculó con n=4 para cada tratamiento mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad GDH} = [(\Delta A/t)/k] \times V_{\text{react}} \times 60 \times 1000 / m_{\text{prot}}$$

Donde: $\Delta A/t$ es la diferencia de absorbancia dividida por el tiempo final (10 min); k es constante (6.22); V_{react} suma del volumen de buffer (0,9 mL) con el volumen de la enzima (0,2 mL), 60 es el tiempo transcurrido en minutos, 1000 convierte umol en mol; m_{prot} masa de proteína en vol del extracto enzimático.

5. Determinación del potencial depurador de la comunidad microalgal respecto a la remoción de nutrientes

Las concentraciones de nitrato (en forma de $\text{NO}_3\text{-N}$), amonio (en forma de $\text{NH}_3\text{-N}$) y fosfato (PO_4^3) disueltos se determinaron mediante un fotómetro multiparamétrico HI83303, utilizando reactivos y métodos adaptados de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante (Hanna Instruments). Para el caso de $\text{NO}_3\text{-N}$ se basa en la reducción de cadmio; para el caso de $\text{NH}_3\text{-N}$ el método de Nessler, y para el caso de PO_4^3 el método del aminoácido), con longitudes de onda de 525, 420 y 525 nm, respectivamente. Las mediciones se expresaron en $\text{mg N}\cdot\text{L}^{-1}$ para $\text{NO}_3\text{-N}$ y $\text{NH}_3\text{-N}$, y en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ del ion para PO_4^3 . Las muestras que excedieron el rango de lectura del equipo ($0\text{--}30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para $\text{NO}_3\text{-N}$ y PO_4^3 , $0\text{--}100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para $\text{NH}_3\text{-N}$) se diluyeron en proporciones 1:10 o 1:100, incorporando el factor de dilución en el cálculo final. El límite de detección (LOD) del método fue de $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para los tres analitos, mientras que el límite de cuantificación (LOQ) operativo se consideró de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para $\text{NO}_3\text{-N}$ y $\text{NH}_3\text{-N}$, y de $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para PO_4^3 . Para el cálculo de porcentajes y tasas de remoción, se emplearon las concentraciones iniciales teóricas derivadas de la formulación del medio: $41,2 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$ para los tratamientos con una sola fuente de nitrógeno y $20,6 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$ para cada forma en el tratamiento mixto.

Para determinar la tasa de remoción ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{Día}$) = $\Delta t C_{\text{inicial}} - C_{\text{final}}/t$

Donde: $\Delta t C_{\text{inicial}}$: concentración inicial del ion ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); C_{final} : concentración final del ion ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); t: tiempo transcurrido (días).

Para determinar la eficiencia de remoción de nutriente (%): $(C_0 - C_t/C_0) \times 100$

Donde: C_0 : concentración inicial del ion ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); C_t : concentración del ion en el tiempo t.

6. Análisis estadísticos

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía y de dos vías para identificar diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes fuentes de nitrógeno (NaNO_3 , NH_4Cl y mezcla $\text{NaNO}_3+\text{NH}_4\text{Cl}$) y cuando correspondió, entre los días de cultivo. Todos los datos se presentan como media \pm desviación estándar (DE) de tratamientos realizados por cuatriplicado. Cuando se detectaron diferencias significativas (95%, $\alpha = 0,05$), se efectuaron comparaciones múltiples post hoc (test de Tukey). Previo a los análisis, se verificaron valores atípicos y se evaluaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas sobre los residuos del modelo. La normalidad se comprobó mediante el test de Shapiro–Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Bartlett. Cuando los datos no cumplieron los supuestos de normalidad, se aplicaron pruebas no paramétricas utilizando el test de Kruskal–Wallis, seguido de comparaciones múltiples post hoc mediante la prueba de Dunn. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el software GraphPad Prism (versión 8.0.1).

RESULTADOS

1. Análisis Fisiológicos.

1.1 Curva de crecimiento basada en la concentración clorofila a ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

La concentración de clorofila a fue utilizada como un indicador indirecto del crecimiento microalgal a lo largo del experimento. Si bien esta variable no representa de forma directa la biomasa total, se considera un proxy válido en estudios de fitoplancton, ya que su presencia está asociada a la capacidad fotosintética de las células y se correlaciona generalmente con la densidad celular durante la fase exponencial de crecimiento (Guiry, 2012).

En la curva de crecimiento se muestra la evolución temporal de la concentración de clorofila a (de ahora en adelante Chl a) en las comunidades microalgales sometidas a los tratamientos. A lo largo de los 19 días de cultivo, entre el día 0 al día 4 en todos los tratamientos el crecimiento se mantuvo similar, alcanzando una concentración promedio de $630 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Es a partir de este día 4 donde empieza un incremento progresivo en la concentración de Chl a en los tres tratamientos. El tratamiento suplementado con NaNO_3 mostró un aumento más lento y sostenido, alcanzando un valor final menor en comparación con los otros dos tratamientos. Por otro lado, tanto el tratamiento con NH_4Cl como el tratamiento mixto presentaron un crecimiento más pronunciado desde el día 14 en adelante hasta el final del experimento. El análisis post hoc de Tukey evidenció que las concentraciones finales de Chl a en el tratamiento con fuentes mixtas de nitrógeno fue significativamente mayor respecto al tratamiento con NaNO_3 ($p < 0,05$), le siguió el tratamiento NH_4Cl , que se mantuvo en un nivel intermedio sin diferencias claras con los otros dos tratamientos.

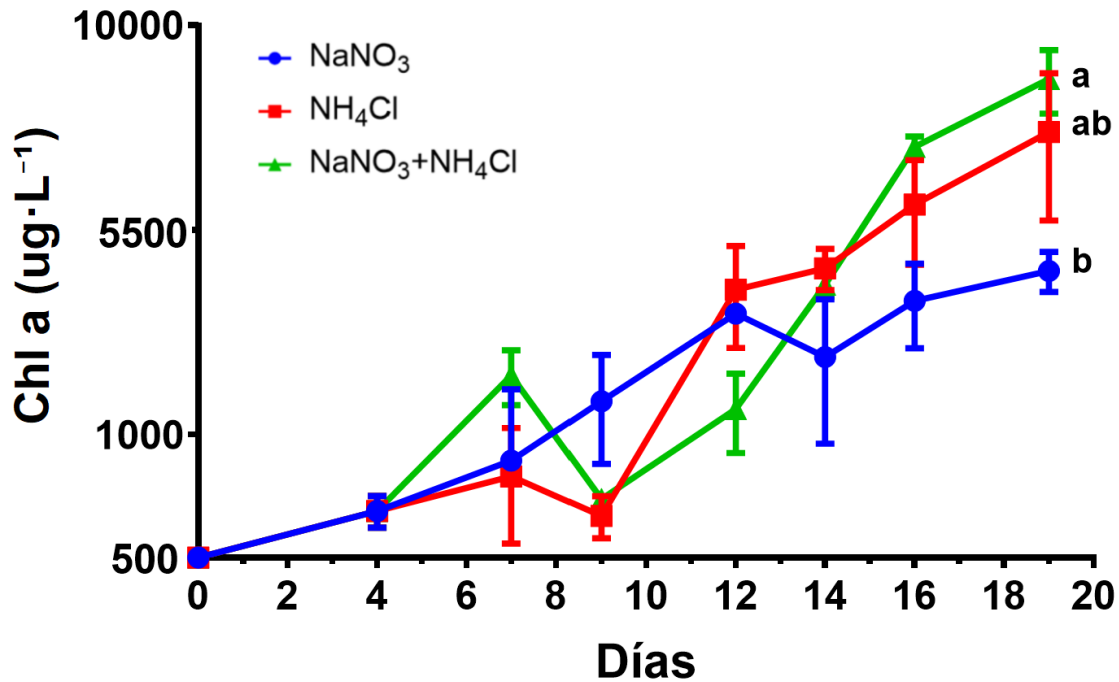


Figura 3. Curva de crecimiento de los tratamientos basada en la concentración de Chl a ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Cada punto representa la media de las 4 réplicas por tratamiento. Las barras verticales indican desviación estándar de la media. Superíndices con igual letra indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

1.2 Peso seco de los tratamientos

El análisis de la biomasa final expresada como peso seco ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de la comunidad microalgal cultivada bajo las distintas fuentes nitrogenadas no se evidenció diferencias significativas entre los tratamientos, según el análisis estadístico ($p > 0.05$). A pesar de que el tratamiento mixto presentó una leve disminución en la biomasa promedio respecto a los tratamientos con fuentes nitrogenadas únicas, todos los valores se mantuvieron en un rango similar, lo que sugiere que la comunidad microalgal evaluada fue capaz de desarrollarse de manera comparable en las tres condiciones evaluadas.

Tabla 1. Peso seco calculado a partir de la biomasa seca en los tratamientos. Superíndices con igual letra indican que no hay diferencias significativas ($p < 0.05$).

Medio	Biomasa ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
NaNO₃	$0,68 \pm 0,06^a$
NH₄Cl	$0,67 \pm 0,10^a$
NaNO₃+ NH₄Cl	$0,56 \pm 0,07^a$

1.3 Actividad fotosintética (Fluorescencia in vivo de la clorofila a)

La figura 4 muestra la evolución del rendimiento cuántico máximo del fotosistema II en la comunidad microalgal bajo los tres tratamientos nitrogenados durante los 19 días de cultivo. En general, se observa un aumento progresivo de Fv/Fm en los primeros días, alcanzando valores cercanos a 0.8–0.9, lo que indica una buena adaptación y eficiencia fotosintética en condiciones de laboratorio. A partir del día 7, los tres tratamientos muestran un rendimiento fotosintético estable, con ligeras variaciones entre ellos. Sin embargo, en el día 16 y 19 se evidenciaron diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos, siendo el tratamiento NaNO₃+NH₄Cl la que presentó el valor más alto de Fv/Fm ($\approx 0,85$), superando a los tratamientos con fuentes nitrogenadas únicas.

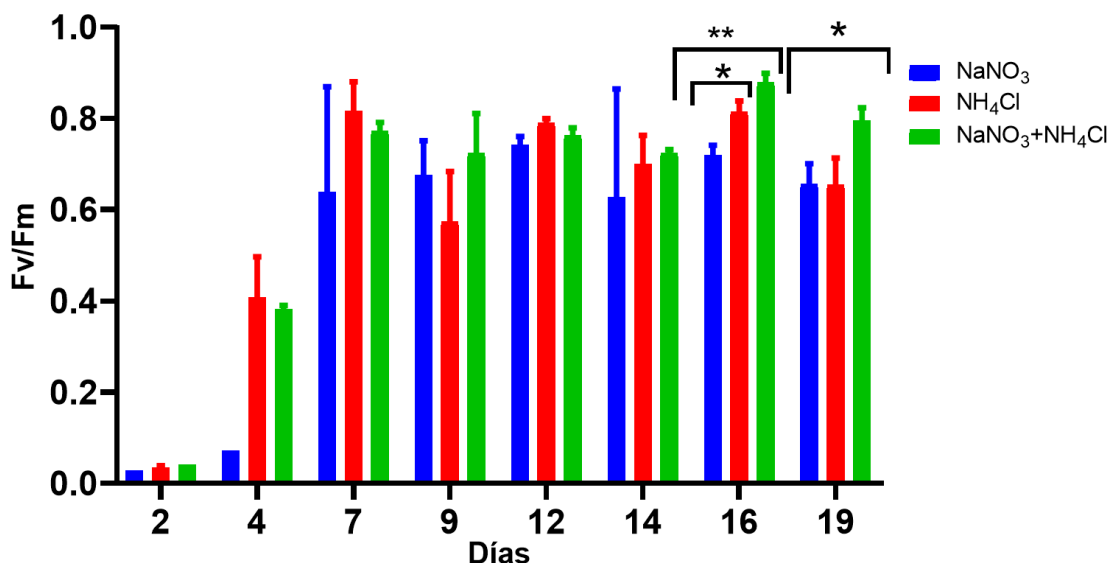


Figura 4. Gráfico Fv/Fm a lo largo del experimento. Las barras representan la media \pm desviación estándar por cada tratamiento (n = 4). Asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0.05).

La eficiencia fotosintética (α ETR) mostró una dinámica sin un patrón evidente hasta alcanzar valores máximos el día 12 para los tratamientos NH₄Cl y NaNO₃+NH₄Cl (\approx 0,38–0,40) y al día 14 para el tratamiento NaNO₃ (\approx 0,38). Luego, α ETR disminuyó en todos los tratamientos; no obstante, la mezcla tendió a mantener valores relativamente mayores entre los días 14–19, mientras que NH₄Cl y NaNO₃ cayeron más pronunciadamente y convergieron a valores bajos en el día 19 (\approx 0,15). No se detectaron diferencias significativas entre tratamientos.

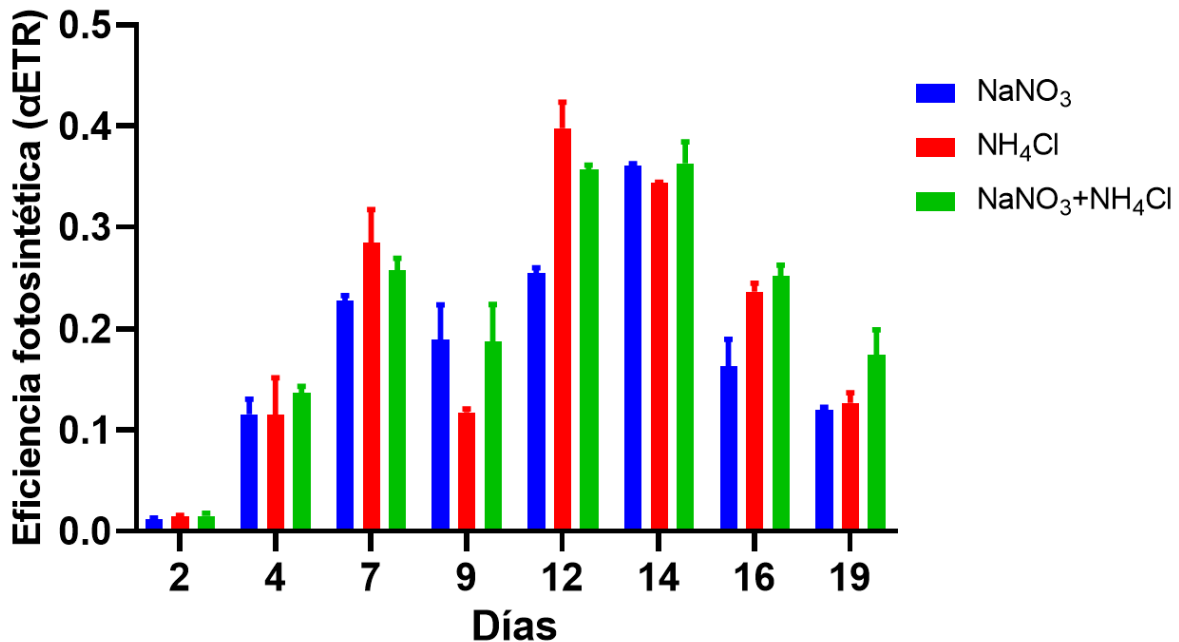


Figura 5. Gráfico α ETR a lo largo del experimento. Las barras representan la media \pm desviación estándar por cada tratamiento (n = 4). Asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos.

La figura 6 muestra la capacidad máxima de transporte de electrones (ETR_{max}), se observa una tendencia a mantener rangos similares a lo largo del tiempo en los tres tratamientos. Sin embargo, las floraciones de microalgas frente a la combinación NaNO₃+NH₄Cl presentaron los valores más elevados de ETR_{max} en los días 16 y 19, mostrando un marcado incremento en comparación con los tratamientos con NaNO₃ y NH₄Cl por separado. En el día 16, el

tratamiento con $\text{NaNO}_3+\text{NH}_4\text{Cl}$ evidenció un valor mucho mayor respecto a NaNO_3 y NH_4Cl ($p<0.05$), mientras que en el día 19, el tratamiento con $\text{NaNO}_3+\text{NH}_4\text{Cl}$ superó significativamente a NaNO_3 ($p<0.05$). Estos resultados sugieren una mayor eficiencia del transporte electrónico en el fotosistema II bajo condiciones mixtas de nitrógeno.

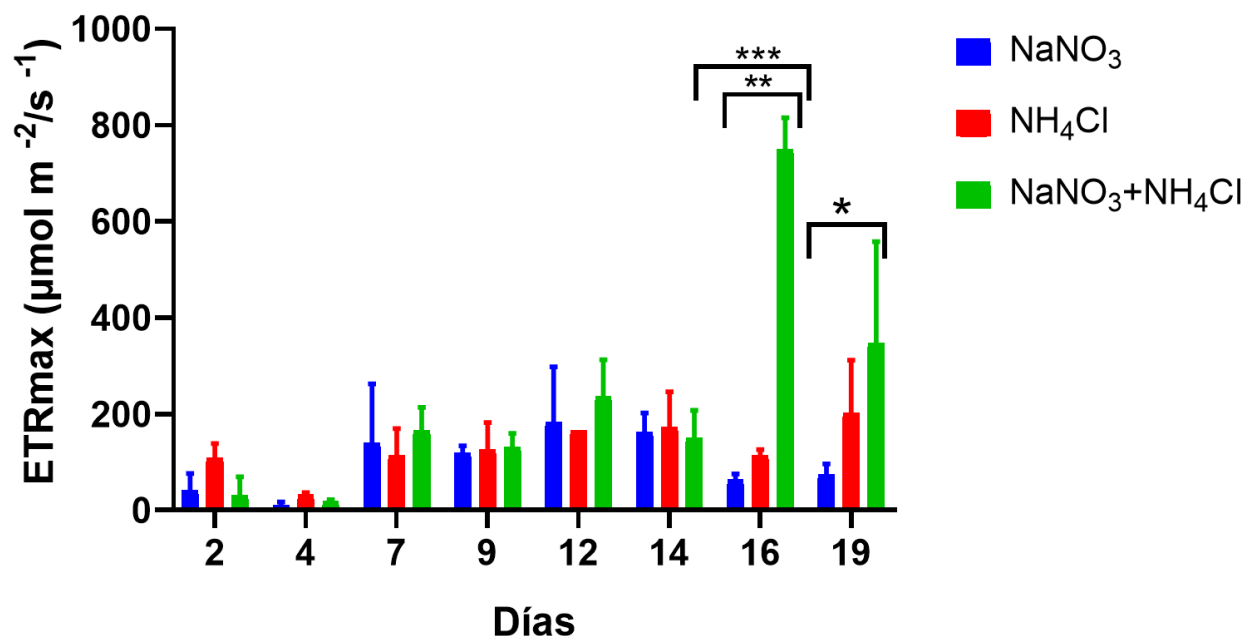


Figura 6. Gráfico ETRmax a lo largo del experimento. Las barras representan la media \pm desviación estándar por cada tratamiento ($n = 4$). Asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos.

En relación con el apagamiento no fotoquímico (Figura 7) (NPQ), se observa un aumento progresivo de la disipación no fotoquímica de energía a lo largo del tiempo en los tres tratamientos, lo que indica una creciente activación de mecanismos de protección frente al exceso de energía luminosa. A pesar de que no se evidencian diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en ninguno de los días evaluados, a partir del día 12 el tratamiento NH_4Cl tiende a presentar los valores más altos de NPQ y el tratamiento con fuentes mixtas de N los valores más bajos.

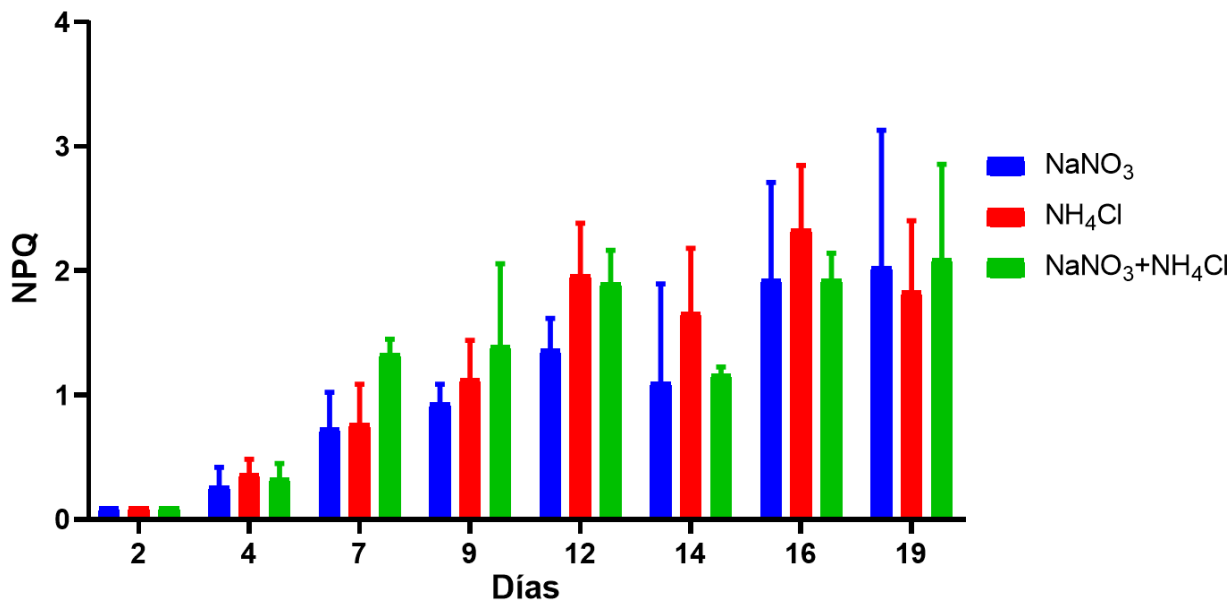


Figura 7. Gráfico NPK a lo largo del experimento. Las barras representan la media \pm desviación estándar por cada tratamiento ($n = 4$). Asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos.

1.4 Concentraciones pigmentarias ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

1.4.1 Concentraciones pigmentarias ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en tratamiento NaNO_3

En el tratamiento con NaNO_3 se observó un incremento progresivo de la mayoría de los pigmentos a lo largo del tiempo, destacando la clorofila a como el pigmento dominante, con valores que aumentaron desde $630 \pm 10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en el día 4 hasta $2.508 \pm 282 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en el día 19. La clorofila b y la clorofila c también presentaron incrementos notables, alcanzando máximos de $1.171 \pm 116 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $1.226 \pm 215 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente hacia el final del experimento. De igual manera, los carotenoides mostraron aumentos marcados, con máximos de $1.095 \pm 168 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

En contraste, las ficobiliproteínas (PC, APC y PE) mantuvieron concentraciones menores ($\leq 42 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), con incrementos más discretos y cierta estabilidad hacia la fase final del cultivo. En conjunto, los resultados indican que la comunidad microalgal bajo nitrato presentó un crecimiento sostenido, acompañado de un aumento coordinado en los pigmentos clorofilicos y carotenoides, mientras que los pigmentos ficobilínicos tuvieron un papel secundario en la

dinámica pigmentaria. Este resultado es posible confirmarlo visualmente al microscopio, observándose una composición abundante por microalgas verdes en la muestra (Anexo 3).

Tabla 2. Concentración promedio y desviación estándar (\pm DE) de pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en la comunidad microalgal cultivada en medio NaNO_3 a lo largo del experimento. Las letras superíndice distintas indican diferencias significativas entre pigmentos en cada día de cultivo ($p < 0,05$).

	Chl a	Chl b	Chl c	Caro	PC	APC	PE
Día 4	630 ^a (± 10)	120 ^b (± 49)	156 ^b (± 48)	259 ^b (± 102)	2,4 ^c ($\pm 1,2$)	3,7 ^c ($\pm 1,8$)	3,6 ^c ($\pm 1,7$)
Día 7	843 ^a ($\pm 44,9$)	302 ^b (± 198)	302 ^b (± 212)	419 ^b (± 209)	9,1 ^c ($\pm 0,8$)	12,3 ^c ($\pm 4,1$)	13,7 ^c ($\pm 1,7$)
Día 9	1.205 ^a (± 358)	427 ^b (± 124)	528 ^b (± 112)	557 ^b (± 156)	12,4 ^c ($\pm 1,1$)	23,4 ^c ($\pm 5,2$)	18,3 ^c ($\pm 1,3$)
Día 12	1.974 ^a (± 111)	520 ^b (± 42)	671 ^b (± 132)	987 ^c (± 169)	8,58 ^d ($\pm 2,9$)	43,2 ^e ($\pm 17,1$)	19,3 ^d ($\pm 1,5$)
Día 14	1.544 ^a (± 592)	507 ^b (± 185)	504 ^b (± 95)	883 ^c (± 266)	12,7 ^d ($\pm 2,6$)	44,1 ^e ($\pm 12,8$)	23,4 ^d ($\pm 2,8$)
Día 16	2.118 ^a (± 493)	947 ^b (± 240)	1.050 ^b (± 306)	952 ^b (± 213)	14,7 ^c ($\pm 2,3$)	41,9 ^d ($\pm 11,7$)	25,1 ^c ($\pm 3,9$)
Día 19	2.508 ^a (± 282)	1.171 ^b (± 116)	1.226 ^b (± 215)	1.095 ^b (± 168)	4,28 ^c ($\pm 7,7$)	41,6 ^d ($\pm 17,9$)	16,5 ^c ($\pm 9,9$)

1.4.2 Concentraciones pigmentarias ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en tratamiento NH_4Cl

En el tratamiento con NH_4Cl , la concentración de pigmentos mostró un marcado incremento hacia los días finales del cultivo. La clorofila a fue el pigmento predominante, con un aumento sostenido desde $630 \pm 21 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en el día 4 hasta alcanzar $4.440 \pm 600 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en el día 19. Las clorofilas accesorias (b y c) también incrementaron significativamente, llegando a $1.948 \pm 746 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $848 \pm 337 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente al final del experimento. Los carotenoides mostraron un aumento progresivo y alcanzaron una concentración de $1.849 \pm 729 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en el día 19. En contraste, los pigmentos ficobilínicos (PC, APC y PE) se mantuvieron en niveles bajos ($\leq 102 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Al igual que en el medio suplementado con NaNO_3 , en la comunidad microalgal dominan clorófitas (Anexo 3).

Tabla 3. Concentración promedio y desviación estándar (\pm DE) de pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en la comunidad microalgal cultivada en medio NH_4Cl a lo largo del experimento. Las letras superíndice distintas indican diferencias significativas entre pigmentos en cada día de cultivo ($p < 0,05$).

	Chl a	Chl b	Chl c	Caro	PC	APC	PE
Día 4	630 ^a (± 21)	201 ^b (± 66)	196 ^b (± 41)	341 ^b (± 111)	5,9 ^c ($\pm 1,8$)	9,4 ^c ($\pm 3,1$)	8,5 ^c ($\pm 2,9$)
Día 7	720 ^a (± 123)	281 ^b (± 118)	263 ^b (± 125)	381 ^b (± 130)	9,1 ^c ($\pm 2,1$)	16,4 ^c ($\pm 3,8$)	13,9 ^c ($\pm 2,5$)
Día 9	1.110 ^a (± 226)	184 ^b (± 70)	154 ^b (± 66)	190 ^b (± 32)	7,4 ^c ($\pm 1,1$)	19,2 ^c ($\pm 4,6$)	11,7 ^c ($\pm 1,8$)
Día 12	1.647 ^a (± 178)	652 ^b (± 165)	262 ^c (± 77)	753 ^b (± 231)	4,5 ^d ($\pm 1,1$)	40,3 ^e ($\pm 13,6$)	13,5 ^d ($\pm 2,7$)
Día 14	2.543 ^a (± 279)	851 ^b (± 109)	443 ^c (± 54)	852 ^b (± 79)	6,1 ^d ($\pm 1,7$)	49,2 ^e ($\pm 11,1$)	16,9 ^d ($\pm 4,4$)
Día 16	2.839 ^a (± 114)	1.158 ^b (± 338)	459 ^c (± 166)	1.211 ^b (± 347)	4,2 ^d ($\pm 2,5$)	94,7 ^e ($\pm 15,8$)	22,8 ^d ($\pm 7,1$)
Día 19	4.440 ^a (± 600)	1.948 ^b (± 746)	848 ^c (± 337)	1.849 ^b (± 729)	-	102 ^d ($\pm 17,9$)	26,6 ^d ($\pm 13,7$)

1.4.3 Concentraciones pigmentarias ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en tratamiento $\text{NaNO}_3 + \text{NH}_4\text{Cl}$

En el tratamiento con fuentes mixtas de N, la comunidad microalgal mostró un marcado incremento en la concentración de pigmentos a lo largo del cultivo, con un comportamiento más acentuado que en los tratamientos con una sola fuente de N. La clorofila a fue nuevamente el pigmento predominante, aumentando de $630 \pm 50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en el día 4 a $9.087 \pm 320 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en el día 19, valor superior al observado en los tratamientos con fuentes únicas de N. Las clorofilas accesorias (b y c) también aumentaron considerablemente, alcanzando concentraciones de $2.893 \pm 480 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $1.921 \pm 446 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Los carotenoides llegaron a $2.640 \pm 382 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en el día 19.

En contraste, las ficobiliproteínas (PC, APC y PE) se mantuvieron en niveles relativamente bajos (máximos de $82,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) hacia el final del experimento. Como en los tratamientos anteriores, dominan clorófitas en la comunidad microalgal (Anexo 3).

Tabla 4. Concentración promedio y desviación estándar (\pm DE) de pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en la comunidad microalgal cultivada en medio $\text{NaNO}_3+\text{NH}_4\text{Cl}$ a lo largo del experimento. Las letras superíndice distintas indican diferencias significativas entre pigmentos en cada día de cultivo ($p<0,05$).

	Chl a	Chl b	Chl c	Caro	PC	APC	PE
Día 4	630 ^a (± 50)	507 ^a (± 112)	445 ^b (± 43)	435 ^b (± 98)	6,4 ^c ($\pm 2,9$)	11,4 ^c ($\pm 5,1$)	9,8 ^c ($\pm 4,2$)
Día 7	2.210 ^a (± 161)	537 ^b (± 105)	508 ^b (± 163)	661 ^b (± 111)	10,5 ^c ($\pm 1,2$)	23,6 ^c ($\pm 6,1$)	17,4 ^c ($\pm 9,1$)
Día 9	670 ^a (± 98)	228 ^b (± 77)	229 ^b (± 75)	252 ^b (± 58)	9,4 ^c ($\pm 1,1$)	21,6 ^c ($\pm 4,4$)	14,4 ^c ($\pm 1,2$)
Día 12	1.711 ^a (± 210)	330 ^b (± 80)	151 ^c (± 56)	445 ^b (± 112)	4,1 ^d ($\pm 2,2$)	24,3 ^e ($\pm 7,4$)	9,1 ^d ($\pm 3,3$)
Día 14	4.491 ^a (± 115)	709 ^b (± 44)	389 ^c (± 90)	806 ^b (± 51)	5,6 ^d ($\pm 2,5$)	43,9 ^e ($\pm 7,5$)	14,5 ^d ($\pm 2,2$)
Día 16	7.213 ^a (± 112)	1.628 ^b (± 91)	890 ^c (± 182)	1.715 ^b (± 143)	5,4 ^d ($\pm 3,3$)	69,8 ^f (± 23)	22,3 ^e ($\pm 6,5$)
Día 19	9.087 ^a (± 320)	2.893 ^b (± 480)	1.921 ^b (± 446)	2.640 ^b (± 382)	15,5 ^c ($\pm 5,3$)	82,6 ^d ($\pm 50,1$)	38,5 ^c ($\pm 5,9$)

1.5 Relaciones pigmentarias en los distintos tratamientos.

1.5.1 Relaciones pigmentarias clorofilas y carotenoides totales

Las relaciones pigmentarias normalizadas a clorofila a mostraron diferencias significativas entre tratamientos para todos los pigmentos fotosintéticos evaluados (Figura 8). La relación Chl b/Chl a (a) fue significativamente mayor en NaNO_3 en comparación con tratamientos NH_4Cl y $\text{NaNO}_3+\text{NH}_4\text{Cl}$ ($p<0,05$), sin diferencias significativas entre estos últimos. De forma similar, la relación Chl c/Chl a (b) presentó valores más altos en NaNO_3 que en los otros dos tratamientos ($p<0,05$), que no difirieron entre sí. Para el caso de Car/Chl a (c), se continuó con la misma tendencia, NaNO_3 mostró valores superiores respecto los otros tratamientos ($p<0,05$), que no difirieron entre ellos.

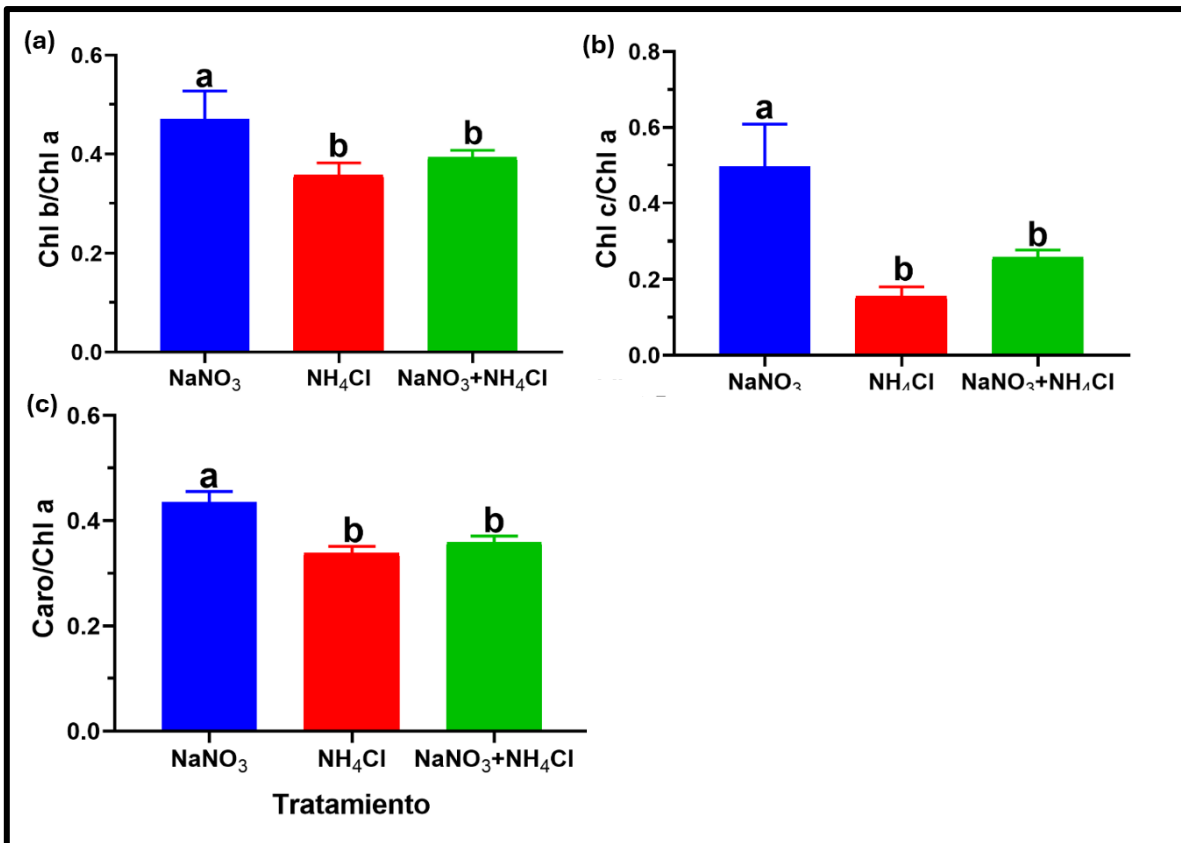


Figura 8. Relaciones pigmentarias: (a) Chl b/Chl a; (b) Chl c/Chl a; (c) Carotenoides/Chl a. Las barras representan la media \pm desviación estándar (n=4). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

1.5.2 Relaciones pigmentarias en relación con el complejo de las ficobiliproteínas

En el caso de las relaciones de pigmentos ficobilínicos normalizadas a clorofila a, el medio NaNO₃+NH₄Cl tendió a mostrar valores superiores que las medios con fuentes nitrogenadas únicas (Figura 9). Los valores de ficocianina/Chl a (a) oscilaron entre 4,5 (tratamiento NH₄Cl) y 15 (tratamiento NaNO₃+NH₄Cl), la relación ficoeritrina/Chl a (b) se mantuvo en torno a 15 (tratamiento NaNO₃) y 38 (tratamiento NaNO₃+NH₄Cl). Mientras que la relación aloficocianina/Chl a (c) rondó entre 40 (tratamiento NaNO₃) y 100 (tratamiento NH₄Cl).

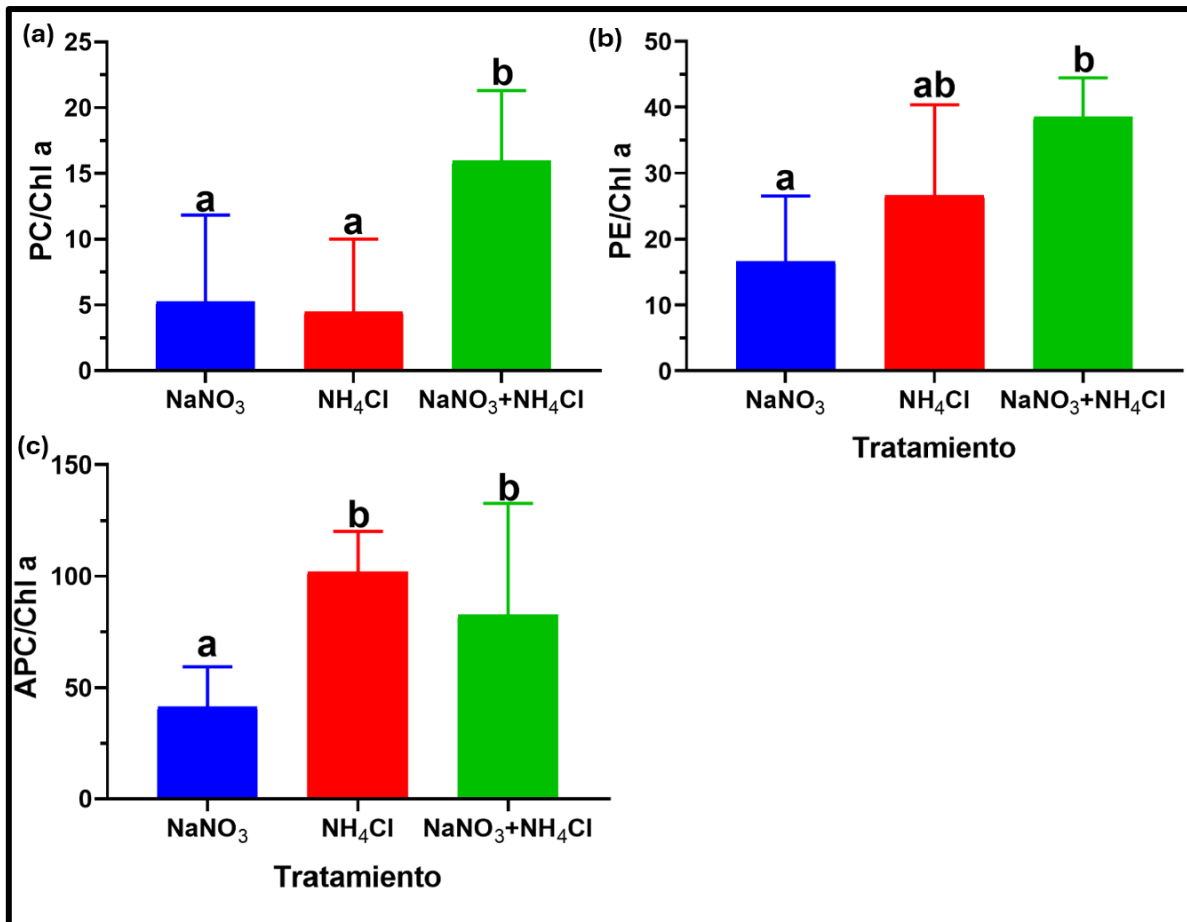


Figura 9. Relaciones pigmentarias compuestos ficobilínicos: (a) PC/Chl a; (b) PE/Chl a; (c) APC/Chl a. Las barras representan la media \pm desviación estándar (n=4). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

1.5.3 Relaciones pigmentarias de sumatoria de todos los pigmentos accesorios (Clorofilas+Carotenoides+ficobiliproteínas)

El análisis del ratio entre la suma de pigmentos accesorios y la clorofila a (Σ accesorios/Chl a) mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$). Las comunidades suplementadas con NaNO₃ presentaron el valor más alto de este índice, mientras que los tratamientos con NH₄Cl y la combinación NaNO₃+NH₄Cl exhibieron valores significativamente menores y estadísticamente similares entre sí.

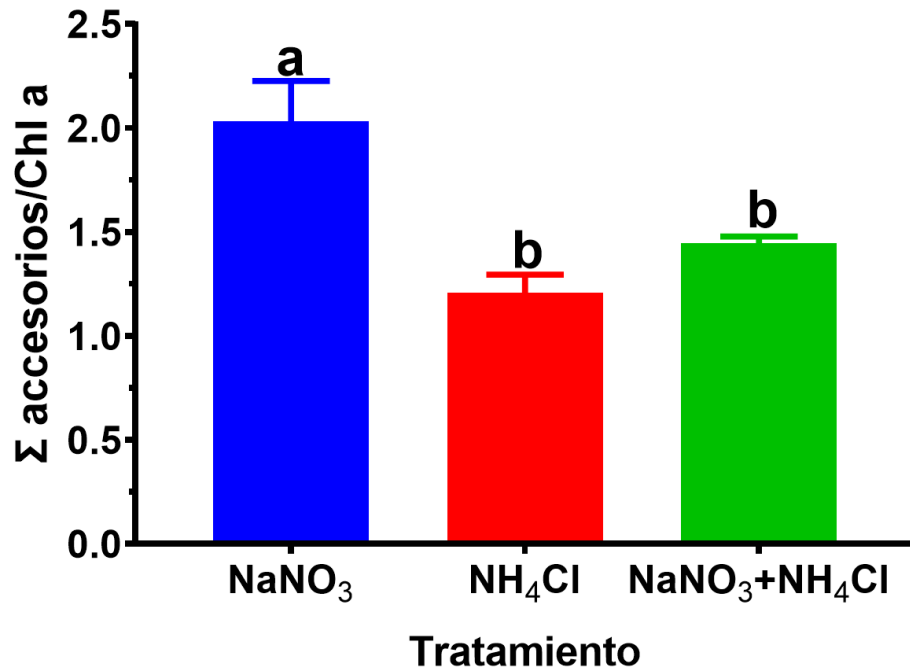


Figura 10. Relación entre la suma de pigmentos accesorios y la clorofila a (Σ accesorios/Chl a). Las barras representan la media \pm desviación estándar ($n=4$). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,05$).

2. Análisis Bioquímicos.

2.1 Proteínas totales

Para los porcentajes de proteínas totales obtenidos en los cultivos de la comunidad microalgal bajo los diferentes tratamientos nitrogenados, se observaron diferencias significativas entre todos los tratamientos ($p<0.05$), con el tratamiento suplementado con NH₄Cl mostrando el mayor contenido proteico, seguido por el tratamiento mixto y, finalmente, el tratamiento con NaNO₃.

Tabla 5. Contenido de proteínas (%) a partir de la biomasa seca en los tratamientos. Superíndices con igual letra indican que no hay diferencias significativas ($p < 0.05$).

Medio	% Proteínas totales
NaNO ₃	6,34 ± 0,58 ^a
NH ₄ Cl	9,63 ± 0,78 ^b
NaNO ₃ + NH ₄ Cl	8,17 ± 0,47 ^c

2.2 Actividades enzimáticas (NR, GS, GDH).

2.2.1 Nitrato reductasa (NR)

La actividad de nitrato reductasa (NR), expresada como nmol NADH oxidados·h⁻¹·mg proteína⁻¹, presentó sus valores más elevados en el tratamiento con NaNO₃, seguido por NH₄Cl y finalmente NaNO₃+NH₄Cl. A pesar de esta tendencia, el análisis estadístico no evidenció diferencias significativas entre tratamientos, lo que sugiere que, bajo las condiciones evaluadas, la fuente nitrogenada no generó cambios estadísticamente detectables en la actividad de NR.

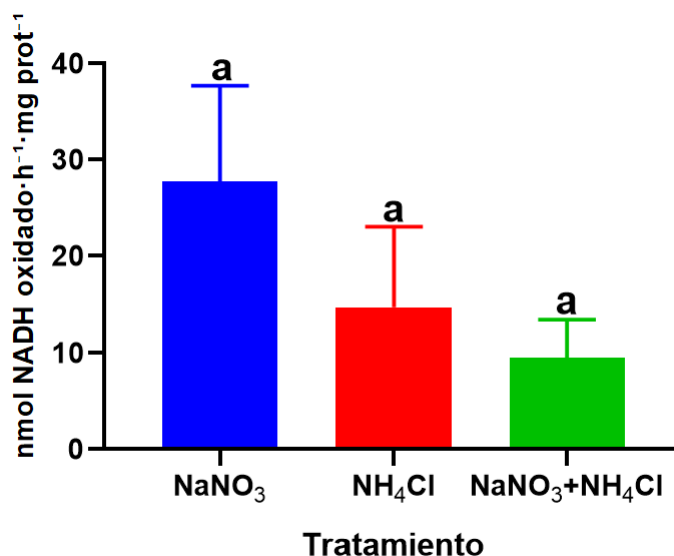


Figura 11. Actividad de la enzima nitrato reductasa (NR) en extractos de la comunidad microalgal expuesta a diferentes fuentes de nitrógeno. Los valores corresponden a la media ± desviación estándar

(n=4). Las barras de error indican la desviación estándar. Las diferencias significativas entre tratamientos se determinaron mediante la prueba de Kruskal–Wallis seguida de la prueba de Dunn ($p<0.05$).

2.2.2 Glutamina sintetasa (GS)

La actividad de glutamina sintetasa (GS), medida como $\text{nmol } \gamma\text{-glutamihidroxiato} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$, mostró un valor ligeramente superior en el tratamiento con NH_4Cl , seguido por NaNO_3 y $\text{NaNO}_3+\text{NH}_4\text{Cl}$ que presentaron valores similares. Sin embargo, las diferencias entre tratamientos no fueron estadísticamente significativas, indicando que la disponibilidad de distintas fuentes de nitrógeno no produjo variaciones marcadas en la actividad de GS.

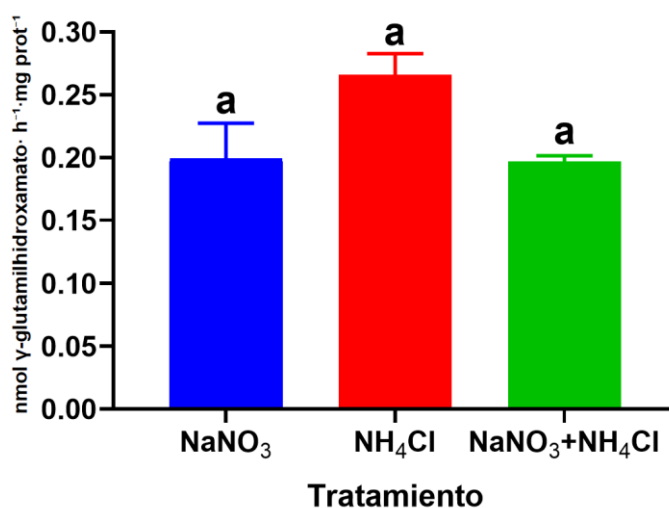


Figura 12. Actividad de la enzima glutamina sintetasa (GS) en extractos de la comunidad microalgal expuesta a diferentes fuentes de nitrógeno. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar (n=4). Las barras de error indican la desviación estándar. Las diferencias significativas entre tratamientos se determinaron mediante la prueba de Kruskal–Wallis seguida de la prueba de Dunn ($p<0.05$).

2.2.3 Glutamato deshidrogenasa (GDH aminación)

En el caso de la actividad de glutamato deshidrogenasa (GDH) en la reacción de aminación, expresada como $\text{nmol NADH oxidado} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$, el tratamiento con NaNO_3 presentó el valor medio más alto, aunque acompañado de una alta dispersión, mientras que los

tratamientos con NaNO_3 y $\text{NaNO}_3+\text{NH}_4\text{Cl}$ mostraron valores menores y similares entre sí. No se detectaron diferencias significativas entre tratamientos, lo que, sumado a la elevada variabilidad observada, sugiere que la respuesta de GDH podría estar influenciada por factores adicionales a la fuente nitrogenada.

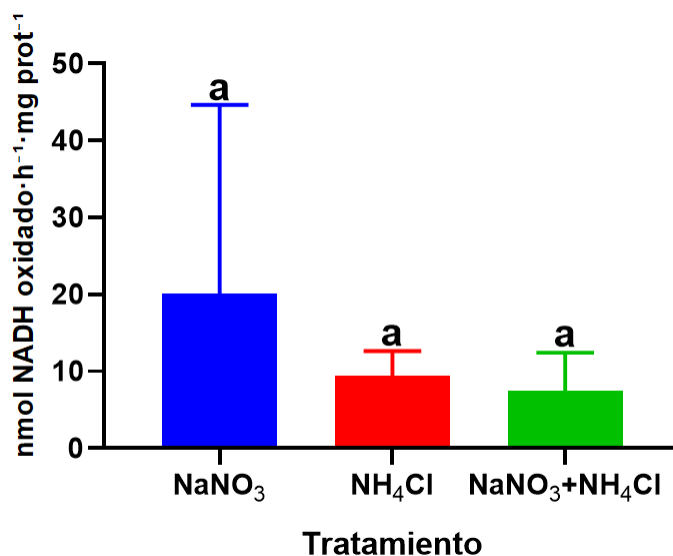


Figura 13. Actividad de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) en extractos de la comunidad microalgal expuesta a las diferentes fuentes de nitrógeno. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar ($n=4$). Las barras de error indican la desviación estándar. Las diferencias significativas entre tratamientos se determinaron mediante la prueba de Kruskal–Wallis seguida de la prueba de Dunn ($p<0.05$).

3. Determinación del potencial depurador de la comunidad microalgal.

3.1 Cuantificación de tasa y porcentaje de remoción de nutrientes

Al evaluar la remoción de nutrientes al día 19, se observó una alta eficiencia en la eliminación de compuestos nitrogenados en todos los tratamientos. En medios con nitrato (NaNO_3 y $\text{NaNO}_3+\text{NH}_4\text{Cl}$), la remoción de $\text{NO}_3\text{-N}$ alcanzó un 99,8%, mientras que en el medio con amonio (NH_4Cl) la eliminación de $\text{NH}_3\text{-N}$ fue de 98,4%. En el tratamiento mixto ($\text{NaNO}_3+\text{NH}_4\text{Cl}$), tanto la eliminación de $\text{NO}_3\text{-N}$, como de $\text{NH}_3\text{-N}$ presentaron porcentajes similares (99,8% y 98,6%, respectivamente), confirmando la capacidad de la comunidad

microalgal para asimilar de manera eficiente distintas fuentes inorgánicas de nitrógeno. En contraste, la remoción de fósforo (PO_4^3) resultó menos eficiente, con porcentajes que variaron entre 63,6% y 75%, siendo el tratamiento con NaNO_3 el que mostró el valor más alto.

Tabla 6. Tasa y porcentaje de remoción de nutrientes inorgánicos (N y P) al día 19 de cultivo en los diferentes tratamientos (NaNO_3 , NH_4Cl y $\text{NaNO}_3+\text{NH}_4\text{Cl}$). Se observa una alta eficiencia en la eliminación de compuestos nitrogenados, mientras que la remoción de fósforo fue menor.

Medio	Nutriente	C₀	Día 19 (mg·L⁻¹·D)	Día 19 (%)
NaNO₃	NO ₃ -N	41,2	2,15	99,8
	PO ₄ ³	164	6,4	75,0
NH₄Cl	NH ₃ -N	41,2	2,12	98,4
	PO ₄ ³	158	5,29	63,6
Mezcla	NO ₃ -N	20,6	1,08	99,8
	NH ₃ -N	20,6	1,06	98,6
	PO ₄ ³	166	5,87	67,1

DISCUSION

Dinámica de crecimiento y biomasa

Durante los primeros días (0 a 4) no se observó un crecimiento muy bajo en los tratamientos (Figura 3). Este comportamiento se puede deber a la presencia de una fase de aclimatación (fase lag) de la comunidad microalgal, la cual suele ser común en cultivos por lote de microalgas iniciados en condiciones controladas, durante la cual la población ajusta su metabolismo al nuevo ambiente antes de iniciar el crecimiento exponencial. En esta fase, las células reconfiguran su aparato fotosintético, sintetizan enzimas clave y adaptan sus rutas metabólicas a las condiciones fisicoquímicas del medio, lo que retrasa temporalmente la división celular (Lee et al., 2015). Por ejemplo, Matula & Nabity, (2021), reportaron que a *Chlorella vulgaris* le toma aproximadamente 3 días en aclimatarse hasta alcanzar un establecimiento de la fase de crecimiento exponencial.

A partir del día 4 se observa que la comunidad empieza a crecer en los tres tratamientos. Sin embargo, únicamente la comunidad microalgal del tratamiento suplementado con NaNO_3 como fuente de nitrógeno alcanzó una fase estacionaria en la curva de clorofila a, mientras que los tratamientos NH_4Cl y mezcla, la comunidad continuó en crecimiento sin alcanzar una distinguida fase estacionaria. Esto podría explicarse por varias razones fisiológicas y nutricionales: en medios enriquecidos con nitrato, la asimilación de N requiere pasos reductivos que consumen energía y electrones, lo que podría llevar a la acumulación de NO_2^- o incluso agotamiento relativo de nutrientes (como hierro o fósforo) necesarios para mantener el crecimiento fotosintético, generando restricciones que detienen temporalmente el incremento de biomasa (Kim et al., 2017). Tal desaceleración es típica cuando una variable comienza a limitar el crecimiento, pero aún no se ha restablecido un nuevo equilibrio, resultando en una meseta o fase estacionaria temprana (Kim et al., 2017). Por el contrario, en medios con amonio, la disponibilidad energética o sinergias metabólicas podrían permitir un crecimiento más sostenido sin alcanzar ese “freno temprano” (Kim et al., 2017). Esta interpretación es consistente con descripciones clásicas de fases de crecimiento en cultivos por lotes de microalgas, donde la fase estacionaria se define como un punto en que el

incremento de biomasa se iguala a la tasa de pérdida o agotamiento de recursos, resultando en densidad celular relativamente constante (Zhang et al., 2018).

Por otro lado, la ausencia de diferencias significativas en la concentración de clorofila a entre el tratamiento suplementados con NH_4Cl y $\text{NaNO}_3+\text{NH}_4\text{Cl}$ puede explicarse por la inhibición de la asimilación de NO_3^- por NH_4^+ descritas para microalgas y comunidades naturales. En presencia de NH_4^+ , muchas algas verdes de agua dulce ralentizan o cesan el uso de NO_3^- , porque el NH_4^+ se incorpora directamente vía GS/GOGAT con menor coste energético; así, el NO_3^- adicional del tratamiento mixto no aporta un beneficio aditivo en biomasa fotosintética (Pistorius et al., 1978). Esta dinámica se ha observado tanto en cultivos de agua dulce, como en *Chlorella vulgaris*, como en ensamblajes naturales donde el aumento de NH_4^+ reduce la captación de NO_3^- , con respuestas especie-dependientes en Clorófitas y cianobacterias (Domingues et al., 2011).

A pesar de que la curva de concentración de clorofila a evidenció diferencias significativas entre tratamientos, particularmente con valores finales mayores entre el tratamiento $\text{NaNO}_3+\text{NH}_4\text{Cl}$ respecto a NaNO_3 ; el análisis del peso seco (Tabla 1) no mostró diferencias estadísticamente significativas. Esta discrepancia puede explicarse por el carácter de proxy indirecto de biomasa de la clorofila a, cuya variación depende tanto del número de células presentes como de la cantidad de pigmento de clorofila por unidad de biomasa, la cual puede modificarse según la fuente de nitrógeno y las condiciones ambientales (Laws & Bannister, 1983). Frente a condiciones de limitación de nitrógeno, las microalgas ajustan su contenido de clorofila por célula como mecanismo fotoaclimatativo, pudiendo reducir la inversión en pigmentos y redirigir el carbono hacia la síntesis y acumulación de carbohidratos (a la forma de polisacáridos) o lípidos. En consecuencia, un mayor peso seco no siempre se acompaña de un incremento proporcional en clorofila a, reflejando cambios en la composición bioquímica más que en la biomasa total, fenómeno reportado en diversos géneros microalgales principalmente en clorofitas y cianobacterias como *Anabaena*, *Chlorella*, *Oedogonium*, *Oscillatoria* (Ramaraj et al., 2013).

Concentraciones absolutas y relaciones pigmentarias

Las concentraciones de pigmentos fotosintéticos mostraron patrones acordes con la química del nitrógeno disponible. La clorofila a (Chl a) aumentó en los tres tratamientos, pero la magnitud del pool pigmentario y el balance entre clorofilas y carotenoides dependieron de la fuente de N. Con nitrato (NaNO_3) como fuente única, carotenoides totales tendieron a incrementarse con mayor énfasis hacia el día 19 (Tabla 2), lo que sugiere una inversión sostenida en fotoprotección (Demmig-Adams & Adams, 1996; Ruban, 2016; Kuczyńska et al., 2015). Con amonio (NH_4Cl) como fuente única se observó una acumulación eficiente de Chl a acompañada de carotenoides elevados, coherente con el menor costo reductor de su asimilación (evita la reducción $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$) (Tabla 3). El tratamiento suplementado con la mezcla de ambas fuentes nitrogenadas mostró el perfil más robusto en términos absolutos (clorofilas y carotenoides) (Tabla 4), compatible con un mejor balance energético/redox que favorece la biosíntesis pigmentaria (Ruban, 2016).

En contraste, las concentraciones absolutas de PC, PE y APC en todos los tratamientos (Tabla 2, 3 y 4) fueron marcadamente menores que las de clorofilas y carotenoides, lo que indica que la biomasa estuvo dominada por taxones con antenas tipo LHC, como clorofitas (Kuczyńska et al., 2015), donde los carotenoides representan gran parte del pool pigmentario, mientras que las ficobiliproteínas (propias de cianobacterias/criptófitas) aportaron una fracción menor (Stadnichuk & Kusnetsov, 2023).

Las razones Chl b/Chl a, Chl c/Chl a y Car/Chl a, permitieron aislar cambios de composición y de ajuste fotoaclimático (Figura 8). En la comunidad suplementada con NaNO_3 todas las razones resultaron mayores que en los tratamientos con NH_4Cl , indicando una proporción superior de pigmentos accesorios por unidad de Chl a; esto es consistente con antenas más extensas y/o con un mayor aporte de grupos taxonómicos con Chl c (Kuczyńska et al., 2015), y con una mayor demanda de disipación no fotoquímica (xantofilas) bajo condiciones que exigen protección del aparato fotosintético (Demmig-Adams & Adams, 1996; Ruban, 2016). En tratamientos NH_4Cl y $\text{NaNO}_3+\text{NH}_4\text{Cl}$, las relaciones accesorias fueron más contenidas pese a las altas concentraciones absolutas, lo que sugiere antenas eficientes con menor necesidad relativa de fotoprotección, en línea con el mejor desempeño fotoquímico observado en la mezcla (Demmig-Adams & Adams, 1996). Las relaciones ficobiliproteicas

(Figura 9) no variaron entre tratamientos, lo que sugiere que la fracción cianobacteriana/criptófita de la comunidad no cambió de forma apreciable (o que la resolución del método y el muestreo tardío limitaron detectar diferencias).

En la figura 10 se muestra la sumatoria de pigmentos accesorios normalizada por Chl a (Σ accesorios/Chl a) donde fue mayor en NaNO_3 y menor en NH_4Cl y en la mezcla, en plena concordancia con las razones Car/Chl a. Este patrón sugiere antenas relativamente más extensas y/o mayor aporte de cromófitas en el tratamiento con NaNO_3 , compatible con una mayor demanda de fotoprotección y con el costo redox de reducir NO_3^- (Demmig-Adams & Adams, 1996). En contraste, los tratamientos con NH_4Cl y, sobre todo, $\text{NaNO}_3+\text{NH}_4\text{Cl}$, mostraron antenas más compactas (menor pool de pigmentos accesorio por unidad de Chl a) pese a concentraciones absolutas altas, lo que se alinea con su uso energético más eficiente y el NPQ más contenido observado previamente (Figura 7). La ausencia de cambios en ficobiliproteínas respalda que la composición de cianobacterias/criptófitas no varió, por lo que las diferencias reflejan principalmente fotoaclimatación modulada por la química del N (Kuczyńska et al., 2015).

Desempeño fotosintético

Los parámetros fotosintéticos evaluados ofrecen una visión complementaria sobre el estado fisiológico y la eficiencia de la comunidad microalgal bajo las distintas fuentes nitrogenadas (Ralph & Gademann, 2005). El parámetro fotobiológico F_v/F_m es un estimador del rendimiento máximo fotosintético del PSII, la cual refleja la integridad de este, cuando las células están adaptadas a la oscuridad. Según Castro-Varela et al., 2021, la disminución de este parámetro (valores inferiores a 0.6) indica que las células están expuestas a condiciones desfavorables, ya sea por variación de luz, nutrientes, temperatura, pH, entre otros. Lo que es posible considerar un estado de estrés al fotosistema P680 (PSII) (Ralph & Gademann, 2005). El comportamiento de F_v/F_m en los días 2 y 4 se presentan valores bajos y sin diferencias significativas entre tratamientos, estos valores se pueden deber a la fase de aclimatación de las comunidades microalgales, discutida previamente en la dinámica de crecimiento (Lee et al., 2015). Al día 7 de los tratamientos se presentan valores estables y relativamente altos ($\sim 0,8-0,9$), lo que concuerda con lo reportado por Parkhill et al. (2001),

quienes encontraron que este parámetro se mantiene constante ($\sim 0,65$) en cultivos continuos balanceados, incluso bajo limitación nutricional. Solo en condiciones de estrés agudo por nutrientes Fv/Fm disminuye significativamente. Esto sugiere que, en todos los tratamientos, la comunidad microalgal estaba aclimatada y en crecimiento relativamente estable, que refleja una alta integridad funcional del fotosistema II y que impide que Fv/Fm detecte diferencias nutricionales menores (Maxwell & Johnson, 2000).

De acuerdo a la Figura 5, se muestra la eficiencia fotosintética estimada a partir de RLCs (curvas rápidas luz) como la pendiente inicial del ajuste del modelo matemático tangencial propuesto por Eilers & Peeters (1988), donde refleja cuán eficientemente los fotones se convierten en transporte electrónico. Valores altos implican mayor aprovechamiento de la luz limitante, mientras que valores bajos sugieren restricciones en la captación/uso de energía, ya sea por cambios en la densidad de centros de reacción o en la composición pigmentaria (Henley, 1993; MacIntyre et al., 2002; Geider et al., 1996). A diferencia de Fv/Fm, que se mantuvo relativamente estable entre tratamientos (sin efectos claros de la forma de N), α ETR sí mostró sensibilidad a la fuente nitrogenada: presentó una dinámica unimodal con máximo alrededor del día 12 y valores superiores en NH_4Cl y, especialmente, en la mezcla $\text{NaNO}_3+\text{NH}_4\text{Cl}$ respecto de NaNO_3 , manteniéndose la mezcla ligeramente más alta en días 14–19. Bioenergéticamente, un α ETR mayor bajo disponibilidad de NH_4^+ es coherente con el menor costo de ATP y poder reductor de su asimilación, lo que explica los valores más altos en NH_4Cl y $\text{NaNO}_3+\text{NH}_4\text{Cl}$ (Sanz-Luque et al., 2015).

En paralelo, ETRmax (capacidad máxima de transporte de electrones) (Figura 6) aumentó con el tiempo en todos los casos, pero la mezcla $\text{NaNO}_3+\text{NH}_4\text{Cl}$ alcanzó los valores más altos al día 16 sobre los otros tratamientos ($p < 0,05$), y al día 19 siguió la misma tendencia, pero con un valor más contenido, probablemente por el agotamiento de nutrientes. Esta dinámica se entiende porque la reducción de NO_3^- a NH_4^+ vía NR/NiR consume NAD(P)H/ferredoxina generados por el propio transporte electrónico y compite con la fijación de C (Glibert et al., 2016); el NH_4^+ evita ese costo energético y de poder reductor y en proporciones balanceadas con NO_3^- , desahoga cuellos de botella redox, sosteniendo ETRmax más alto y evitando, a la vez, la represión/inhibición del uso de NO_3^- y los riesgos de exceso de NH_4^+ cuando este está

como fuente de N (Sanz-Luque et al., 2015). Dentro del marco de las RLCs, ETR_{max} resume la capacidad a alta luz, mientras que α ETR captura la eficiencia a baja luz; que ambos mejoren en el tratamiento mixto concuerda con una mejor economía fotoquímica a igual irradiancia (Ralph & Gademann, 2005).

El apagamiento no fotoquímico (NPQ) (Figura 7) que corresponde a la disipación del exceso de energía en forma de calor, mostró ligeras variaciones entre tratamientos, reflejando la activación de mecanismos fotoprotectores para prevenir daño fotooxidativo (Demmig-Adams & Adams, 1996). A lo largo del experimento, NPQ tendió a incrementarse de manera moderada, aunque sin un patrón claro a lo largo de los días y sin diferencias significativas entre tratamientos; aun así, se observó una tendencia a valores más altos cuando el N se suministró como fuentes únicas (NaNO₃ o NH₄Cl) a partir del día 14, mientras que la mezcla NaNO₃+NH₄Cl se mantuvo más contenida. Esto sugiere que, bajo fuentes únicas de N, las microalgas enfrentan un desbalance mayor entre captura de luz y uso metabólico (asimilación de C y N), requiriendo disipación no fotoquímica más intensa para evitar fotodaño; por el contrario, la mezcla habría favorecido una regulación más eficiente del flujo de energía gracias a un presupuesto redox más equilibrado durante la asimilación de N, con menor necesidad relativa de disipación (Ruban, 2016).

Composición química y enzimática

Las proteínas totales sintetizan el estado nitrogenado y la capacidad biosintética de la comunidad, ya que concentran gran parte del N celular ya sea en enzimas del ciclo de Calvin, GS/GOGAT/NR, subunidades de PSI/PSII y complejos de antena (Chen & Wang, 2020; Sanz-Luque et al., 2015). Los datos muestran que el patrón general es que formas reducidas de N (NH₄Cl o la mezcla) tienden a sostener fracciones proteicas mayores que el nitrato en solitario, porque evitan el peaje reductor de NO₃⁻→NH₄⁺ requerido antes de la síntesis de aminoácidos (Fernández et al., 2009). En la literatura, *Scenedesmus dimorphus* mostró valores proteicos mayores con la fuente NH₄NO₃ frente a otras fuentes nitrogenadas, incluida NaNO₃ (Bajwa et al., 2018). Además, se ha documentado que en *Dunaliella salina* que el contenido proteico puede ser ~2 veces mayor con amonio que con nitrato, subrayando el efecto de la forma de N sobre la asignación a proteínas (Wang et al., 2021). Sin embargo, El-

Araby et al. (2022), demostró que en *Nannochloropsis oculata*, las fuentes amoniacaes simples pueden dar respuestas dispares según la especie y la dosis. Del mismo modo, Kim & Lee, (2016) reafirman mediante el estudio con *Tetraselmis* sp. que el tipo de fuente nitrogenada modula de forma marcada la composición bioquímica (proteínas, lípidos, carbohidratos) y que las respuestas a amonio/nitrato son especie y concentración-dependientes. Debido a que aquí se trabajó con una comunidad microalgal nativa, es difícil hacer comparaciones puesto se desconoce en sí su composición. A pesar de esto, queda claro que las fuentes amoniacaes son más efectivas para la producción de proteínas que fuentes de nitrato.

Las actividades enzimáticas de NR, GS y GDH se midieron al día 19, con el N disuelto prácticamente agotado; por tanto, reflejan un estado tardío del metabolismo más que la fase de asimilación activa.

La actividad de NR mostró la tendencia esperable $\text{NaNO}_3 > \text{NH}_4\text{Cl} \geq \text{NaNO}_3 + \text{NH}_4\text{Cl}$, aunque sin diferencias significativas. Ello es coherente con la inducción por nitrato y la represión por amonio: cuando el N se ofrece solo como NO_3^- , la célula activa la ruta $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$ y NR tiende a elevarse; en presencia de NH_4^+ (solo o en mezcla) disminuye la necesidad de esa vía y la NR se mantiene más contenida (Sanz-Luque et al., 2015).

En la Figura 12, la actividad GS tampoco presentó diferencias significativas entre tratamientos, con una tendencia mayor en NH_4Cl respecto de NaNO_3 y la mezcla, consistente con que la vía GS/GOGAT es el camino principal de asimilación de amonio en microalgas y se favorece cuando el N llega en forma reducida (Fernández et al., 2009). Considerando el muestreo tardío y que el ensayo utilizado fue el “transferasa” (γ -glutamilhidroxamato), es esperable una actividad baja al final y una sensibilidad distinta respecto de los ensayos de NAD(P)H, por lo que las magnitudes numéricas no deben compararse entre enzimas.

Por último, la actividad GDH exhibió alta variabilidad y una tendencia a valores superiores en NaNO_3 frente a NH_4Cl y la mezcla (Figura 13). Esto es coherente con su papel secundario y reversible en el balance C/N: bajo NO_3^- la célula asume un mayor costo redox para reducir el nitrato, y GDH puede contribuir al reciclaje de glutamato/2-oxoglutarato y a la gestión del

NH_4^+ endógeno más que a la asimilación primaria de N (Lea & Mifflin, 1974; Lu et al., 2005; Sanz-Luque et al., 2015).

Remoción de nutrientes

En todos los cultivos, la remoción de nitrógeno fue casi completa al día 19 ($\text{NO}_3\text{-N}$ y $\text{NH}_3\text{-N} \approx 98\text{--}99,8\%$, con tasas $\sim 1,06\text{--}2,15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{D}$ según tratamiento), mientras que la de fosfato fue moderada ($63,6\text{--}75\%$, $\sim 5,3\text{--}6,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{D}$) (Tabla 6). Este desempeño en remoción de nitrógeno es consistente con reportes que muestran eficiencias altas en microalgas: por ejemplo, remociones de $\approx 90\text{--}99\%$ de nitrato en 5–12 días o Nitrógeno total (TN) $>80\text{--}95\%$ en distintos sistemas y especies (Habibi et al., 2019; Pham & Bui, 2020; Silambarasan et al., 2023; Zhang et al., 2023). Además, la alta remoción tanto de NO_3^- como de NH_4^+ concuerda con la capacidad de asimilar diversas formas de N de algunas especies, lo que explica eficiencias similares entre tratamientos y el buen rendimiento bajo fuentes de N mixto reportado en la literatura. (Pastore et al., 2020; Llamas et al., 2002; Perera, 2022).

En contraste, la remoción de P fue más variable y puede depender de “*luxury uptake*” (acumulación de polifosfato tras privación de P o bajo alta luz) y/o de condiciones que favorecen precipitación química, por lo que porcentajes en el rango 50–75%, como los obtenidos en este estudio, son comunes si no se induce explícitamente ese mecanismo (Lavriničs et al., 2021; Powell et al., 2009).

CONCLUSION

Este trabajo constituye una primera aproximación experimental, en condiciones controladas, del desempeño depurador de una comunidad microalgal nativa de una laguna urbana eutrófica frente a distintas fuentes de nitrógeno. El uso combinado de $\text{NO}_3 + \text{NH}_4$ fue la fuente nitrogenada mejor asimilada en conjunto: integra buena remoción de N con mejor desempeño foto-fisiológico (F_v/F_m , αETR , ETR_{max}) y menor estrés fotooxidativo (NPQ). Todos los tratamientos lograron una remoción muy alta de nitrógeno ($\approx 98\text{--}99,8\%$), moderada de fósforo ($\approx 64\text{--}75\%$) y reducción de coliformes, evidenciando la efectividad de esta comunidad microalgal como biofiltro en sistemas de tratamiento de aguas contaminadas. Las actividades enzimáticas siguieron el patrón predecible, aunque con nulas diferencias significativas entre tratamientos. Finalmente, se demuestra que, pese al desconocimiento actual sobre el comportamiento fisiológico y bioquímico de microalgas en cuerpos de agua urbanos, su integración en tecnologías de tratamiento representa una solución sustentable para la restauración de lagunas eutróficas, aportando al equilibrio ecológico y a la mitigación de impactos socioambientales.

BIBLIOGRAFIA

Abarzúa, A., Parra, O., Valdovinos, C. (2018). Eutrofización de lagos en la zona centro-sur de Chile. *Revista Geográfica del Sur*.

Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A., Ibraheem, I. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), 257–275. DOI: 10.1016/j.sjbs.2012.04.005.

Ahmad, I., Abdullah, N., Koji, I., Yuzir, A., & Mohamad, S. E. (2021). Potential of microalgae in bioremediation of wastewater. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*, 16(2), 413-429.

Akinnawo, S. O. (2023). Eutrophication: Causes, consequences, physical, chemical and biological techniques for mitigation strategies. *Environmental Challenges*, 12, 100733.

Alavianghavanini, A., Shayesteh, H., Bahri, P. A., Vadiveloo, A., & Moheimani, N. R. (2024). Microalgae cultivation for treating agricultural effluent and producing value-added products. *Science of The Total Environment*, 912, 169369.

Allan R. J. Eaglesham, Eric J. Hewitt, Inhibition of nitrate reductase from spinach (*Spinacea oleracea* L.) leaf by adenosine nucleotides, *Plant and Cell Physiology*, Volume 16, Issue 6, December 1975, Pages 1137–1149, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a075233>.

Almanza-Marroquín, V., Figueroa, R., Parra, O., Baeza, C., Yañez, J., & Urrutia, R. (2016). Limnological bases for the management of urban lakes in Concepción, Chile. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(2), 313-326.

Arrojo, M. Á., Regaldo, L., Calvo Orquín, J., Figueroa, F. L., & Abdala Díaz, R. T. (2022). Potential of the microalgae *Chlorella fusca* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) for biomass production and urban wastewater phycoremediation. *AMB Express*, 12(1), 43.

Bian, C., Liu, C., Zhang, G., Tao, M., Huang, D., Wang, C., ... & Hu, Z. (2023). A chromosome-level genome assembly for the astaxanthin-producing microalga *Haematococcus pluvialis*. *Scientific Data*, 10(1), 511.

Bajwa, K., Bishnoi, N. R., & Kirrollia, A. (2018). Selvan. ST (2018). A New Lipid Rich Microalgal SP *Scenedesmus Dimorphus* Isolated: Nile Red Staining and Effect of Carbon, Nitrogen Sources on its Physio-Biochemical Components. *European Journal of Sustainable Development Research*, 2(4), 43.

Bennett, A., & Bogobad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green algae. *Journal of Cell Biology*, 58(2). <https://doi.org/10.1083/jcb.58.2.419>

Bermejo, R. R., Álvarez-Pez, J. M., Fernández, F. G. A., & Grima, E. M. (2002). Recovery of pure b-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium 64 cruentum*. *Journal of Biotechnology*, 93(1). [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00385-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00385-6).

Borella, L., Marchese, D., Trivellin, N., & Sforza, E. (2023). Complementary chromatic adaptation as a strategy to increase energy conversion efficiency of microalgae-cyanobacteria consortia in continuous LED photobioreactors. *Energy Conversion and Management*, 294, 117549.

Buschmann, A. H., Riquelme, V. A., Hernández-González, M. C., Varela, D., Jiménez, J. E., Henríquez, L. A., ... & Filún, L. (2006). A review of the impacts of salmonid farming on marine coastal ecosystems in the southeast Pacific. *ICES Journal of Marine Science*, 63(7), 1338-1345.

Butreddy, A., Janga, K. Y., Ajjarapu, S., Sarabu, S., & Dudhipala, N. (2021). Instability of therapeutic proteins—An overview of stresses, stabilization mechanisms and analytical techniques involved in lyophilized proteins. *International journal of biological macromolecules*, 167, 309-325.

Cai T, Park SY, Li Y (2013) Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renew Sustain Energy Rev*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.030>

Carcaño-Montiel, M. G., Ferrera-Cerrato, R., Pérez-Moreno, J., Molina-Galán, J. D., & Bashan, Y. (2006). Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *Terra Latinoamericana*, 24(4), 493-502.

Carletti, M., Barbera, E., Filippini, F., & Sforza, E. (2024). Effect of ammonium/nitrate ratio on microalgae continuous cultures: Species-specificity of nutrient uptake and modelling perspectives. *Journal of Water Process Engineering*, 58, 104762.

Castro-Varela, P. A., Celis-Plá, P. S., Abdala-Díaz, R., & Figueroa, F. L. (2021). Photobiological effects on biochemical composition in *Porphyridium cruentum* (Rhodophyta) with a biotechnological application. *Photochemistry and Photobiology*, 97(5), 1032-1042.

Celis-Plá, P. S., Martínez, B., Korbee, N., Hall-Spencer, J. M., & Figueroa, F. L. (2017). Photoprotective responses in a brown macroalgae *Cystoseira tamariscifolia* to increases in CO₂ and temperature. *Marine Environmental Research*, 130, 157-165.

Chen, H., & Wang, Q. (2020). Microalgae-based nitrogen bioremediation. *Algal Research*, 46, 101775.

Costa, R. H., Villafranca, B. M., Voltolini, C. A., Guimarães, L. B., Hoffmann, H., Velho, V. F., & Mohedano, R. A. (2019). Effectiveness of phosphorus removal in an SBR using coprecipitation with ferric chloride, and its effects on microbial activity. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 36, 785-795.

Davies-Colley, R. J., Donnison, A. M., Speed, D. J., Ross, C. M., & Nagels, J. (1999). Inactivation of faecal indicator micro-organisms in waste stabilisation ponds: interactions of environmental factors with sunlight. *Water research*, 33(5), 1220-1230.

Demmig-Adams, B., Adams III, W. W., Barker, D. H., Logan, B. A., Bowling, D. R. y Verhoeven, A. S. (1996). Uso de fluorescencia de clorofila para evaluar la fracción de luz absorbida asignada a la disipación térmica del exceso de excitación. *Fisiología Plantarum*, 98(2), 253-264.

Demmig-Adams, B., & Adams III, W. W. (2006). Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New phytologist*, 172(1), 11-21.

Domingues, R. B., Barbosa, A. B., Sommer, U., & Galvao, H. M. (2011). Ammonium, nitrate and phytoplankton interactions in a freshwater tidal estuarine zone: potential effects of cultural eutrophication. *Aquatic sciences*, 73(3), 331-343.

Dor I (1980) Effect of the green algae isolated from wastewater on the activity of sewage bacteria. *Algae biomass: production and use*/[sponsored by the National Council for Research and Development, Israel and the Gesellschaft fur Strahlen-und Umweltforschung (GSF), Munich, Germany]; editors, Gedaliah Shelef, Carl J Soeder.

Eilers, P. H. C., & Peeters, J. C. H. (1988). A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecological modelling*, 42(3-4), 199-215.

El-Araby et al., N. (2022). The Growth and Biochemical Composition of *Nannochloropsis oculata* under Influence of Different Nitrogen Sources for Aquaculture Live Food. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 26(2), 459-475. doi: 10.21608/ejabf.2022.231584

Fernández, E., Llamas, Á., Galván, A., 2009. Chapter 3 - nitrogen assimilation and its regulation. In: *The Chlamydomonas sourcebook* (second edition), (Eds.) E.H. Harris, D.B. Stern, G.B. Witman, academic press. London, pp. 69-113.

Figuerola, F. L., Conde-Alvarez, R., & Gómez, I. (2003). Relations between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated chlorophyll fluorescence and oxygen evolution in macroalgae under different light conditions. *Photosynthesis Research*, 75(3), 259-275.

Geider, R. J., MacIntyre, H. L., & Kana, T. M. (1996). A dynamic model of photoadaptation in phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 41(1), 1-15.

Glibert, P. M., Wilkerson, F. P., Dugdale, R. C., Raven, J. A., Dupont, C. L., Leavitt, P. R., ... & Kana, T. M. (2016). Pluses and minuses of ammonium and nitrate uptake and

assimilation by phytoplankton and implications for productivity and community composition, with emphasis on nitrogen-enriched conditions. *Limnology and Oceanography*, 61(1), 165-197.

Guiry, M. D. (2012). How many species of algae are there? *Journal of phycology*, 48(5), 1057-1063.

Habibi, A., Nematzadeh, G. A., Shariati, F. P., Amrei, H. D., & Teymouri, A. (2019). Effect of light/dark cycle on nitrate and phosphate removal from synthetic wastewater based on BG11 medium by *Scenedesmus* sp. *3 Biotech*, 9(4), 150.

Hii, Y. S., Soo, C. L., Chuah, T. S., Mohd-Azmi, A., & Abol-Munafi, A. B. (2011). Interactive effect of ammonia and nitrate on the nitrogen uptake by *Nannochloropsis* sp.

Ibrahim MA, MacAdam J, Autin O, Jefferson B (2014) Evaluating the impact of LED bulb development on the economic viability of ultraviolet technology for disinfection. *Environ Technol* 35(1–4):400–406. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.829858>.

Inokuchi, R., Kuma, K. I., Miyata, T., & Okada, M. (2002). Nitrogen-assimilating enzymes in land plants and algae: phylogenic and physiological perspectives. *Physiologia Plantarum*, 116(1), 1-11.

Jeffrey, S. T., & Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und physiologie der pflanzen*, 167(2), 191-194.

Johnsen, G., & Sakshaug, E. (2007). Biooptical characteristics of PSII and PSI in 33 species (13 pigment groups) of marine phytoplankton, and the relevance for pulse-amplitude-modulated and fast-repetition-rate fluorometry 1. *Journal of Phycology*, 43(6), 1236-1251.

Kaloudas, D., Pavlova, N., & Penchovsky, R. (2021). Phycoremediation of wastewater by microalgae: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 2905-2920.

Kim, G., Mujtaba, G., & Lee, K. (2016). Effects of nitrogen sources on cell growth and biochemical composition of marine chlorophyte *Tetraselmis* sp. for lipid production. *Algae*, 31(3), 257-266.

Kim, H., Jo, B. Y., & Kim, H. S. (2017). Effect of different concentrations and ratios of ammonium, nitrate, and phosphate on growth of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* isolated from the Nakdong River, Korea. *Algae*, 32(4), 275-284.

Kuczynska P, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K. Photosynthetic Pigments in Diatoms. *Mar Drugs*. 2015 Sep 16;13(9):5847-81. doi: 10.3390/md13095847. PMID: 26389924; PMCID: PMC4584358.

Kumar, R. G., Shah, K., & Dubey, R.. (2000). Salinity induced behavioural changes in malate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase activities in rice seedlings of differing salt tolerance. *Plant Science*, 156(1), 23–34. doi:10.1016/s0168-9452(00)00224-7.

Lavrinovičs, A., Murby, F., Zīverte, E., Mežule, L., & Juhna, T. (2021). Increasing phosphorus uptake efficiency by phosphorus-starved microalgae for municipal wastewater post-treatment. *Microorganisms*, 9(8), 1598.

Laws, E.A., Bannister, T.T. (1983). Nutrient- and light-limited growth of *Thalassiosira fluviatilis* in continuous culture, with implications for phytoplankton growth in the ocean. *Limnology and Oceanography*, 28(5), 995–1008.

Lea, P., Blackwell, R., Chen, F. & Hecht, U. In *Methods in Plant Biochemistry* (1990).

Lee, E., Jalalizadeh, M., & Zhang, Q. (2015). Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review. *Algal research*, 12, 497-512.

Llamas, A., Igeño, M. I., Galván, A., & Fernández, E. (2002). Nitrate signalling on the nitrate reductase gene promoter depends directly on the activity of the nitrate transport systems in *Chlamydomonas*. *The Plant Journal*, 30(3), 261-271.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.

Lu, B., Yuan, Y., Zhang, C., Ou, J., Zhou, W., & Lin, Q. (2005). Modulation of key enzymes involved ammonium assimilation and carbon metabolism by low temperature in rice (*Oryza sativa* L.) roots. *Plant Science*, 169(2), 295-302.

Markou, G., Depraetere, O., & Muylaert, K. (2016). Effect of ammonia on the photosynthetic activity of *Arthrospira* and *Chlorella*: a study on chlorophyll fluorescence and electron transport. *Algal Research*, 16, 449-457.

Martínez Vásquez, A. B. (2024). *Evaluación de un sistema fotodepurador de capa fina para la laguna urbana Las Tres Pascualas, región del Biobío* (Doctoral dissertation, Universidad de Concepción).

Mathew, M. M., Khatana, K., Vats, V., Dhanker, R., Kumar, R., Dahms, H. U., & Hwang, J. S. (2022). Biological approaches integrating algae and bacteria for the degradation of wastewater contaminants—a review. *Frontiers in Microbiology*, 12, 801051.

Masojídek, J., Torzillo, G., & Koblížek, M. (2013). Photosynthesis in microalgae. *Handbook of microalgal culture: applied psychology and biotechnology*, 21-36.

Matula, E. E., & Nabity, J. A. (2021). Metabolic response of *Chlorella vulgaris* to a transient thermal environment for supporting simultaneous air revitalization and thermal control in a crewed habitat. *Acta Astronautica*, 187, 406-415.

Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of experimental botany*, 51(345), 659-668.

Naciones Unidas. (2015). Objetivos 6 y 7. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible>

Neilson, A.H., Lewin, R.A., 1974. The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative biochemistry. *Phycologia*. 13 (3), 227–264.

Parkhill, J.P., Maillet, G., Cullen, J.J. (2001). Fluorescence-based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress. *Journal of Phycology*, 37(4), 517–529.

- Parra, O. (2009). Situación ambiental de las lagunas de Concepción. Seminario “recuperemos las lagunas para los habitantes de concepción”. Concepción, Chile: Municipalidad de Concepción, ESSBIO, Universidad de Concepción, Centro EULA.
- Pastore, M., Barbera, E., Panichi, A., & Sforza, E. (2020). Application of photorespirometry to unravel algal kinetic parameters of nitrogen consumption in complex media. *Algal Research*, 47, 101837.
- Peralta, E., Jerez, C. G., & Figueroa, F. L. (2019). Centrate grown *Chlorella fusca* (Chlorophyta): Potential for biomass production and centrate bioremediation. *Algal Research*, 39, 101458.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M., De-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water research*, 45(1), 11-36.
- Pham, T. L., & Bui, M. H. (2020). Removal of nutrients from fertilizer plant wastewater using *Scenedesmus* sp.: formation of bioflocculation and enhancement of removal efficiency. *Journal of Chemistry*, 2020(1), 8094272.
- Pistorius, E. K., Funkhouser, E. A., & Voss, H. (1978). Effect of ammonium and ferricyanide on nitrate utilization by *Chlorella vulgaris*. *Planta*, 141(3), 279-282.
- Pizarro, G., Guzmán, L., et al. (2012). Floraciones algales en la Bahía de Concepción: causas y consecuencias ecológicas. *Revista Chilena de Historia Natural*.
- Powell, N., Shilton, A., Chisti, Y., & Pratt, S. (2009). Towards a luxury uptake process via microalgae—defining the polyphosphate dynamics. *Water research*, 43(17), 4207-4213.
- Ralph, P. J., & Gademann, R. (2005). Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquatic botany*, 82(3), 222-237
- Ramaraj, R., Tsai, D. D., & Chen, P. H. (2013). Chlorophyll is not accurate measurement for algal biomass. *Chiang Mai Journal of Science*, 40(4), 547-555.

Rathore, S. S., Chandravanshi, P., Chandravanshi, A., & Jaiswal, K. (2016). Eutrophication: Impacts of excess nutrient inputs on aquatic ecosystem. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 9(10), 89-96.

Razak, S. B. A., & Sharip, Z. (2020). The potential of phycoremediation in controlling eutrophication in tropical lake and reservoirs: A review. *Desalination and Water Treatment*, 180, 164-173.

Ruban, A. V. (2016). Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. *Plant physiology*, 170(4), 1903-1916.

Sanz-Luque, E., Chamizo-Ampudia, A., Llamas, A., Galvan, A., & Fernandez, E. (2015). Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Frontiers in plant science*, 6, 899.

Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). (2012). Instructivo técnico para Recuento de Coliformes y E. coli mediante Técnica Petrifilm® (AOAC Official Method 991.14 ó 998.08) [Instructivo técnico]. Servicio Agrícola y Ganadero. Recuperado de <https://www.sag.gob.cl/content/instructivo-tecnico-para-recuento-de-coliformes-y-e-coli-mediante-tecnica-petrefilm-r-aoac-official-method-99114-o-99808>.

Silambarasan, S., Logeswari, P., Sivaramakrishnan, R., Incharoensakdi, A., Kamaraj, B., & Cornejo, P. (2023). *Scenedesmus* sp. strain SD07 cultivation in municipal wastewater for pollutant removal and production of lipid and exopolysaccharides. *Environmental Research*, 218, 115051.

Sonarghare, P. C., Masram, S. C., Sonparote, U. R., Khaparde, K. P., & Kharkate, S. K. (2020). Causes and effects of eutrophication on aquatic life (a review). *International Journal for Environmental Rehabilitation and Conservation*, XI, 213-218.

Sousa, J.C., Ribeiro, A.R., Barbosa, M.O., Pereira, M.F.R, Silva, A.M. (2018). A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. *Journal of Hazardous Materials*, 344, 146-162. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2017.09.058.

Stadnichuk, I. N., & Kusnetsov, V. V. (2023). Phycobilisomes and phycobiliproteins in the pigment apparatus of oxygenic photosynthetics: from cyanobacteria to tertiary endosymbiosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2290.

tarkenburg, S. R., Polle, J. E. W., Hovde, B., Daligault, H. E., Davenport, K. W., Huang, A., ... & McKie-Krisberg, Z. (2017). Draft nuclear genome, complete chloroplast genome, and complete mitochondrial genome for the biofuel/bioprocess feedstock species *Scenedesmus obliquus* strain DOE0152z. *Genome Announcements*, 5(32), 10-1128.

Starr, RC; Zeikus, JA. 1993. UTEX-The culture collection of algae at the University of Texas at Austin 1993 list of cultures. *Journal of Phycology*29(s2):1-106.

Strickland, J. D. H. (1972). *Practical Handbook of Seawater Analysis*. Fisheries Research Board of Canada, 310.

Su, Y. (2021). Revisiting carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 762, 144590.

Syrett, P. J., & Morris, I. (1963). The inhibition of nitrate assimilation by ammonium in *Chlorella*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Enzymological Subjects*, 67, 566-575

Usman, M. O., Aturagaba, G., Ntale, M., & Nyakairu, G. W. (2022). A review of adsorption techniques for removal of phosphates from wastewater. *Water Science & Technology*, 86(12), 3113-3132.

Vollenweider, R. A., & Kerekes, J. (1982). *Eutrophication of waters: Monitoring, assessment and control*. OECD Cooperative Programme on Monitoring of Inland Waters (Eutrophication Control). Environment Directorate, OECD, Paris.

Wang, Y., Tibbetts, S. M., & McGinn, P. J. (2021). Microalgae as sources of high-quality protein for human food and protein supplements. *Foods*, 10(12), 3002.

Watzer, B., Spät, P., Neumann, N., Koch, M., Sobotka, R., Macek, B., ... & Forchhammer, K. (2019). The signal transduction protein PII controls ammonium, nitrate and urea uptake in cyanobacteria. *Frontiers in microbiology*, 10, 1428.

Wegmann, K., & Metzner, H. (1971). Synchronization of *Dunaliella* cultures. *Archiv für Mikrobiologie*, 78(4), 360-367.

World Health Organization. (2021). *Guidelines on recreational water quality: Volume 1—Coastal and fresh waters*. Geneva: World Health Organization.

Zhang, H. (2022). Lake Management and Eutrophication Mitigation: Coming down to Earth—In Situ Monitoring, Scientific Management and Well-Organized Collaboration Are Still Crucial. *Water*, 14(18), 2878.

Zhang, L., Han, J., Ma, S., Zhang, Y., Wang, Y., & Xu, J. (2023). Comprehensive evaluation of growth characteristics, nitrogen removal capacity, and nutritional properties of three diet microalgae. *Frontiers in Marine Science*, 10, 1117043.

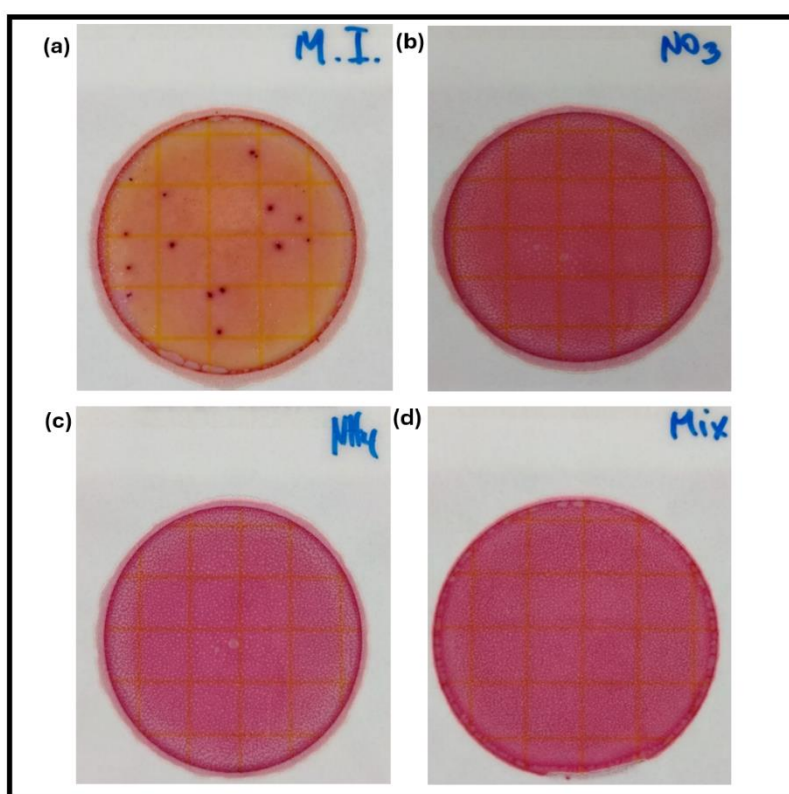
Zhang, Q., You, Z., & Miao, X. (2018). Variation of fatty acid desaturation in response to different nitrate levels in *Auxenochlorella pyrenoidosa*. *Royal Society Open Science*, 5(11), 181236.

Zhang, X., Rong, J., Chen, H., He, C., & Wang, Q. (2014). Current status and outlook in the application of microalgae in biodiesel production and environmental protection. *Frontiers in Energy Research*, 2, 32.

ANEXO

Anexo 1. determinación del potencial depurador de la comunidad microalgal a partir de la remoción de coliformes fecales

Como resultado exploratorio se determinó el potencial de la comunidad microalgal para remover coliformes fecales. Se utilizó el Instructivo técnico mediante técnica Petrifilm® (AOAC Official Method 991.14 y 998.08) como guía metodológica para la ejecución del análisis microbiológico (SAG, 2012).



El análisis microbiológico con placas 3M™ Petrifilm™ *E. coli*/Coliformes, la muestra inicial (M.I.) presentó 12 colonias a 10^0 y 1,0 mL sembrado, equivalente a $12 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ (colonias puntiformes rojo-violáceas visibles). En contraste, al término del ensayo, ninguno de los tratamientos mostró colonias discernibles (0 colonias/placa), es decir, valores por debajo del límite de detección del método ($<1 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$). Considerando $C_0=12$ $C_0=12$ $C_0=12$

CFU·mL⁻¹ y Cf<1C f<1Cf<1 CFU·mL⁻¹, la remoción de coliformes fue ≥91,7 % en todos los tratamientos, compatible con 100 % cuando se asume Cf=0 según el conteo observado.

La disminución de coliformes totales es consistente con lo observado en sistemas algales, donde la desinfección natural proviene principalmente de la luz solar (fotoinactivación UV/visible), reforzada por condiciones creadas por la fotosíntesis de las microalgas (oxígeno elevado y pH alto) (Davies-Colley et al., 1999). Además, que la interacción alga-bacteria favorece también la competencia por nutrientes y la producción de compuestos inhibitorios, que contribuyen a disminuir la carga de bacterias indicadores (Mathew et al., 2022). Además, la disminución de coliformes totales obtenida bajo el consorcio microalgal sugiere un impacto directo en riesgo sanitario: menos indicadores fecales implica menor probabilidad de exposición a patógenos entéricos (*E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*) durante usos recreacionales o de contacto incidental, y reduce eventos de gastroenteritis, dermatitis e infecciones oculares en poblaciones ribereñas (World Health Organization, 2021).

Anexo 2. Composición medio Bristol modificado (Starr & Zeikus, 1993)

Se prepara agregando a 988 ml de agua destilada; 1 ml de cada solución de macronutrientes (Tabla A1), 1 ml de solución de micronutrientes CHU10 (Tabla A2) y 5 ml de solución de micronutrientes PIV (Tabla A3).

Medio NaNO₃:

Reactivo	Gramos
NaNO ₃	0,25
CaCl ₂ x 2H ₂ O	2,5
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	7,5
K ₂ HPO ₄	7,5
KH ₂ PO ₄	17,5
NaCl	2,5

Medio NH₄Cl:

Reactivo	Gramos
NH ₄ Cl	0,15

Medio NaNO₃+NH₄Cl:

Reactivo	Gramos
NaNO ₃	0,12
NH ₄ Cl	0,07

Tabla A1. Solución de macronutrientes para medio de cultivo Bristol, cada uno de los 6 reactivos se preparan por separado, disolviéndolos en 100 ml de agua destilada.

Reactivo	Miligramos
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	19,6
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	44
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	20
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	12,6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	12,6
H_3BO_3	618
EDTA	50

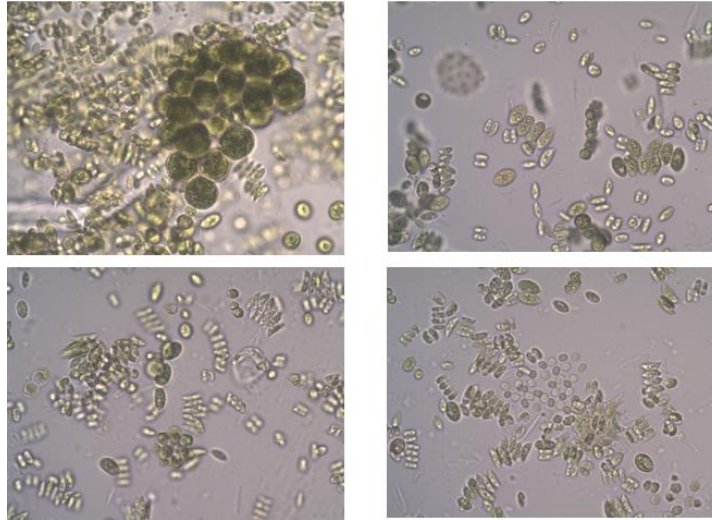
Tabla A2. Solución de micronutrientes CHU10 para medio de cultivo Bristol. Se disuelven los 7 reactivos juntos en 500 ml de agua destilada. Luego se afora a 1 litro.

Reactivo	Miligramos
$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	97
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	41
ZnCl_2	5
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	2
$\text{Na}_2 \text{ MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	4
EDTA	750

Tabla 3: Solución de micronutrientes PIV para medio de cultivo Bristol. Se disuelven los 6 reactivos juntos en 500 ml de agua destilada. Luego se afora a 1 litro.

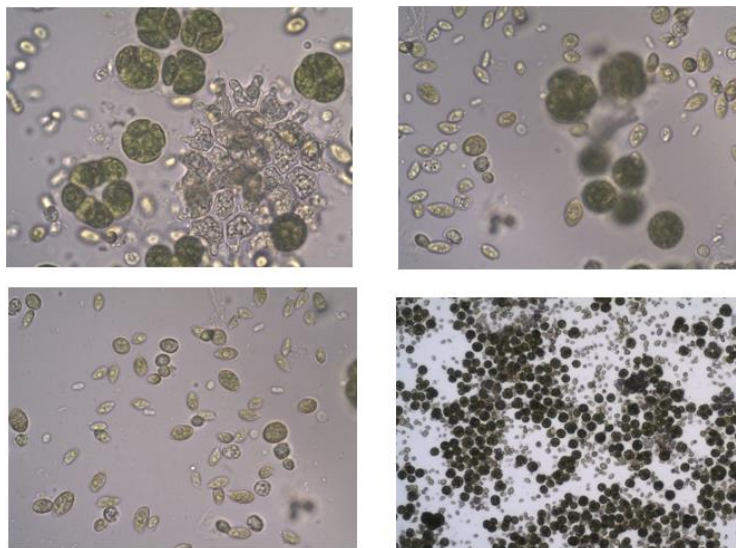
Anexo 3. imágenes al microscopio de comunidades microalgales.

Medio suplementado con NaNO_3 : La comunidad estuvo dominada por clorofitas clorococales del complejo *Scenedesmus* (*Tetradasmus/Desmodesmus*), observándose coenobios de 2–8 células elipsoidales en disposición lineal. Se distinguieron además colonias



esferoidales tridimensionales atribuibles a *Coelastrum* sp. y células unicelulares pequeñas compatibles con *Chlorella/Micractinium*. No se detectó aporte relevante de diatomeas

Medio suplementado con NH_4Cl : Predominaron clorofitas clorococales de la familia Chlorellaceae, con numerosas células esféricas y autosporangios con 4–8 autosporas compatibles con *Chlorella/Micractinium*. Se observaron además coenobios planos



asignables a *Pediastrum* sp. (borde lobulado) y, en menor proporción, formas elipsoidales pequeñas (*Monoraphidium/Kirchneriella*). No se detectó aporte relevante de diatomeas

Medio suplementado con NaNO₃+NH₄Cl: Se observó una comunidad mixta dominada por clorofitas clorococales. Predominaron células elipsoidales compatibles con el complejo *Scenedesmus* (*Tetrademus/Desmodesmus*), presentes como unidades sueltas, en pares y coenobios cortos (2–4 células), en general sin espinas conspicuas. Contribuyó además un contingente de células esféricas/subesféricas de la familia Chlorellaceae (*Chlorella/Micractinium*), con frecuentes autosporangios (tétradas y octetes). En menor proporción se registraron formas ovoides estrechas compatibles con *Monoraphidium/Kirchneriella*. No se detectó participación relevante de diatomeas.

