

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**EFFECTO DE TEMPERATURA Y DISPONIBILIDAD DE NITROGENO EN LA
ACTIVIDAD DE NITRATO REDUCTASA EN POBLACIONES DE *Macrocystis
pyrifera* EN LA LOCALIDAD DE PARGUA, ILQUE Y METRI EN LA REGIÓN DE
LOS LAGOS.**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

MARCELA ALEJANDRA SCHILLING INAY

TEMUCO – CHILE
2012

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**EFECTO DE TEMPERATURA Y DISPONIBILIDAD DE NITROGENO EN LA
ACTIVIDAD DE NITRATO REDUCTASA EN POBLACIONES DE *Macrocystis
pyrifera* EN LA LOCALIDAD DE PARGUA, ILQUE Y METRI EN LA REGIÓN DE
LOS LAGOS.**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

MARCELA ALEJANDRA SCHILLING INAY

PROFESOR GUIA: ALEJANDRO BUSCHMANN RUBIO

TEMUCO – CHILE
2012

**EFFECTO DE TEMPERATURA Y DISPONIBILIDAD DE NITROGENO EN LA
ACTIVIDAD DE NITRATO REDUCTASA EN POBLACIONES DE *Macrocystis
pyrifera* EN LA LOCALIDAD DE PARGUA, ILQUE Y METRI EN LA REGIÓN DE
LOS LAGOS.**

PROFESOR GUIA

: _____

Alejandro Buschmann Rubio

Biólogo Marino y Doctor en Biología
mención en Ecología.
Investigador del Centro i-mar,
Universidad de Los Lagos,
Puerto Montt.

PROFESOR CONSEJERO

: _____

Carolina Shene De Vidts

Ingeniero Civil Químico y Doctor en
Ciencias de la Ingeniería.
Investigadora de la Universidad de La
Frontera, Temuco.

CALIFICACION PROMEDIO TESIS

:

AGRADECIMIENTOS

Expresar mis sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que de alguna u otra forma contribuyeron directa o indirectamente en la realización de mi tesis.

Agradezco en forma especial a mi profesor guía Alejandro Buschmann Rubio por darme la oportunidad de trabajar con su equipo de trabajo en el Centro i-mar y a mi profesora co-guía Carolina Shene, quienes me orientaron y me brindaron su apoyo, por entregarme su experiencia como investigadores e insertarme en el mundo de la investigación.

Agradecer a mis padres, quienes fueron un pilar fundamental durante toda mi vida, siempre guiándome, demostrándome su cariño y amor, este esfuerzo realizado es por todos esos años de sacrificio y esfuerzo, y junto con mi hermano seamos unos profesionales y mejores personas.

A mi hermano que me hizo compañía durante los cuatro años en la Universidad que sin ti, no habría sido lo mismo, gracias por tu apoyo y comprensión aunque a veces teníamos nuestras discusiones, y a pesar de ello siempre estuvimos juntos apoyándonos el uno al otro lejos de nuestra ciudad y hogar.

A toda mi gran familia tíos (as), primos (as), sobrinos (as) que siempre me dieron su apoyo.

A la Sra. Ana quién nos trato como sus hijos y fue como una mamá, gracias por sus consejos, por el cariño entregado en estos años.

También agradecer a toda la comunidad i-mar quienes me brindaron su apoyo y colaboración en especial a Alejandra, Juan, Luis, Oriana, Cristian, Viviana, por sus consejos, confianza, y amistad, jamás espere conocer a tan maravillosas personas.

A mis grandes amigas Glenda, Daniela y María Paz quienes me entregaron su amistad, confianza, y que sin duda alguna fueron un pilar importante durante estos cinco años en que compartimos tantos momentos de alegría y trabajo.

Por último, agradecer a aquellos que ya no están y que desde el cielo me cuidan, a mi Abuela que fue una gran mujer de esfuerzo y me enseñó que hay que luchar por lo que uno quiere, a mis tíos, a Don Alejandro... y a Dios por escuchar mis ruegos, por su sabiduría y paciencia...

Gracias de corazón....

INDICE

1. INTRODUCCION	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1 Ambiente Marino en la Región de Los Lagos.....	3
2.2 Algas.....	4
2.3 <i>Macrocystis pyrifera</i>	5
2.3.1 Reproducción.	7
2.3.2 Distribución.	8
2.3.3 Factores que Afectan la Distribución del Alga.	9
2.3.4 Usos de <i>Macrocystis pyrifera</i>	9
2.4 Nitrógeno.....	11
2.5 Nitrato Reductasa (NR).....	12
2.5.1 Proceso de Reducción del Nitrato en Algas.....	13
3. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO	14
3.1 HIPÓTESIS	14
3.2 OBJETIVOS	15
4. METODOLOGÍA	16
4.1 Obtención de Muestras y Diseño Experimental.....	16
4.2 Actividad de Nitrato Reductasa.....	18
4.2.1 Curva de Calibración.	18
4.3 Medición de Nitrato Agua.....	18
4.3.1 Curva de Calibración.	19
4.4 Análisis Estadísticos.....	19
5. RESULTADOS	20
5.1 Actividad de Nitrato Reductasa en Tres Zonas de la Lámina en <i>Macrocystis pyrifera</i> . 20	20

5.2 Actividad de Nitrato Reductasa en las Localidades de Pargua, Ilque y Metri.....	21
5.3 Condiciones de Temperatura y Nitrato en Pargua, Ilque y Metri.....	22
6. DISCUSIÓN	24
6.1 Actividad de Nitrato Reductasa en la Lámina.....	24
6.2 Actividad Nitrato Reductasa en las Localidades de Pargua, Ilque y Metri.....	24
6.3 Actividad Nitrato Reductasa, Temperatura y Nitrato en Pargua, Ilque y Metri.....	24
7. CONCLUSIONES	27
8. LITERATURA CITADA	28
9. ANEXOS.....	28

INDICES FIGURAS

- FIGURA 1. *Macrocystis pyrifera*
- FIGURA 2. Ciclo reproductivo de *Macrocystis pyrifera*
- FIGURA 3. Ciclo del nitrógeno
- FIGURA 4. Mapa de la Región de Los Lagos
- FIGURA 5. Actividad de nitrato reductasa en las zonas alta, media y baja de la lámina de *Macrocystis pyrifera* en la localidad de Pargua, Ilque y Metri.
- FIGURA 6. Actividad de Nitrato Reductasa en las cuatro estaciones del año en las localidades de Pargua, Ilque y Metri.
- FIGURA 7. Relación entre la temperatura, localidades (Pargua, Ilque y Metri).
- FIGURA 8. Relación entre la temperatura y las estaciones del año (primavera, verano, otoño e invierno).
- FIGURA 9. Relación de concentración de NO_3^- en las localidades de Pargua, Ilque y Metri.
- FIGURA 10. Relación entre la concentración de NO_3^- y las estaciones del año (primavera, verano, otoño e invierno).
- FIGURA 11. Relación de la nitrato reductasa y la temperatura en las localidades de Pargua, Ilque y Metri para las cuatros estaciones del año.
- FIGURA 12. Relación de la nitrato reductasa y la concentración de nitrato en las localidades de Pargua, Ilque y Metri para las cuatro estaciones del año.

INDICE TABLAS

- TABLA 1. Clasificación y usos de macroalgas.
- TABLA 2. Clasificación taxonómica de Phaeophytas.

RESUMEN

En sistemas marinos la disponibilidad de nitrógeno puede ser limitante para la productividad primaria y por ello su fijación es un parámetro clave para determinar la dinámica de poblaciones de algas.

La nitrato reductasa (NR) es una enzima que reduce el nitrato para que las algas lo asimilen e incorporen moléculas de nitrógeno (N) para la formación de biomoléculas como proteínas, material genético. *Macrocystis pyrifera* L.C. Agardh, es un alga parda (Phaeophyta), su utilización se relaciona principalmente por producción de alginato, generación de biofertilizantes, el uso como biorremediadores y para la producción de bioetanol. Hay factores abióticos que afectan a la actividad de la nitrato reductasa en *Macrocystis pyrifera* y, que a su vez afecta directamente el desarrollo de esta alga debido a que en ciertas épocas del año generan condiciones de estrés ambiental (alta temperatura y baja salinidad) o su disponibilidad es limitante para su crecimiento.

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad de la enzima nitrato reductasa en relación frente a factores abióticos de temperatura y concentración de nitrato en condiciones naturales. La actividad enzimática y la concentración de nitrato fueron medidas usando espectrofotómetro UV a 540 y 543 nm respectivamente. Los resultados indican que la actividad de NR es diferente en la zona apical, media y basal de la lámina, y varió en las poblaciones de las tres localidades. No se encontró un efecto entre la actividad NR con temperatura y concentración de nitrato. Sin embargo se pudo constatar que la NR varía entre las diferentes estaciones del año.

SUMMARY

In marine systems, nitrogen availability may be limiting to primary productivity and hence its fixation is a key parameter in determining the dynamics of algal populations.

Nitrate reductase (NR) is an enzyme that reduces the nitrate to algae are the molecules assimilate and incorporate nitrogen (N) for the formation of biomolecules such as proteins, genetic material. *Macrocystis pyrifera* L.C. Agardh, is a brown algae (Phaeophyta), its exploitation is related mainly to alginate production, generation of bio-fertilizers, use as bioremediation and the production of bioethanol. There are abiotic factors affecting NR activity in *Macrocystis pyrifera* and which in turn directly affects the development of this alga because at certain times of year generate environmental stress conditions (high temperature and low salinity) or their availability is limiting for growth.

The objective of this study was to evaluate the activity of nitrate reductase enzyme against abiotic factors of temperature and concentration of nitrate in natural conditions. The enzyme activity and the concentration of nitrate were measured using UV spectrophotometer at 540 and 543 nm respectively. The results indicate that NR activity is different in the apical, middle and basal lamina, and varied in the populations of the three locations. No effect was found between NR activity with temperature and nitrate concentration. However it was found that the NR varies between different seasons.

1. INTRODUCCION

En los ambientes marinos hay diferentes factores abióticos que tienen una influencia sobre el desarrollo y crecimiento de microalgas y macroalgas. Dentro de los factores de mayor importancia que determinan la dinámica de las poblaciones de especies están las corrientes marinas, temperatura, los nutrientes y la luz, esta última aprovechada principalmente por aquellos organismos fotosintéticos. En particular el nitrógeno puede ser un elemento limitante para productores primarios en sistemas marinos templados y fríos.

En las algas, la asimilación de nutrientes en especial el nitrógeno lo incorporan mediante la absorción de moléculas de nitrato (NO_3^-), las que son reducidas por la actividad enzimática de nitrato reductasa, esta actividad puede ser afectada por factores tanto internos como externos, como el molibdeno, fitohormonas, el metabolismo del carbono (Crawford y Junior, 1993), luz, la temperatura y la disponibilidad de nitrato (Huber *et al.*, 1992, Caba *et al.*, 1995).

Las macroalgas son uno de los principales recursos utilizados, debido a la capacidad o cualidad para generar subproductos, ya sea, para su utilización en la industria alimenticia como base alimentaria para otros organismos marinos, biofertilizantes, productos farmacéuticos, entre otros. Por otra parte, la proliferación de investigaciones para la creación y utilización para la generación de biocombustibles como fuente energética, impulsado principalmente por los costos de los barriles de petróleo en el mercado internacional, en estas últimas dos décadas, impactando fuertemente a economía especialmente para países que no poseen este recurso energético o que tienen reservas limitadas, como es el caso de Chile (Jones y Mayfield, 2012).

Bajo este contexto, se busca convertir las diferentes especies de algas como agentes para generar biocombustible de forma sustentable debido a los costos asociados que involucra la creación de este tipo de combustible a partir de cultivos de maíz y caña de azúcar, que ocupan amplios espacios territoriales para su plantación y que anteriormente se ocupaba para la alimentación humana, lo que ha generado una sostenible alza en los precios de los alimentos en la última década.

Macrocystis pyrifera, es una macroalga que se utiliza para fines alimenticios, farmacéuticos, entre otras. Entender cómo funciona la dinámica en las poblaciones naturales de esta especie y que factores determinan su crecimiento y desarrollo nos permitirá comprender su funcionamiento.

Este estudio implica la evaluación de la actividad enzimática de nitrato reductasa en *M. pyrifera* frente a condiciones de temperatura y disponibilidad de nitrato en el mar durante un ciclo anual, en tres localidades Pargua (41°47'S; 73°25'O), Ilque (41°36'S; 73°4'E) y Metri (41°35'S; 72°42'O), ubicadas en la Región de Los Lagos. Para la actividad enzimática y los niveles de concentración de nitrato en el mar, se utilizó espectrofotometría UV, y para las mediciones de temperatura se utilizó un multiparámetro.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Ambiente Marino en la Región de Los Lagos.

La zona de estudio se ubica en la Región de Los Lagos entre los 40°14' y los 44°04' de latitud Sur y desde los 71°35' de longitud Oeste del Océano Pacífico.

Desde el punto de vista geográfico-territorial, esta región se encuentra dividida entre dos unidades, separadas por el Canal de Chacao. Desde Puerto Montt al Sur la geografía está caracterizada por la formación de islas, canales y fiordos por lo que las condiciones del hábitat marino es variado, ya que, hay zonas que están más expuestas al oleaje marino en donde las condiciones abióticas son diferentes a aquellas zonas que están protegidas por zonas rocosas (Buschmann *et al.*, 2004), las condiciones de temperatura y salinidad en zonas expuestas varían entre 8-16°C y 28-33‰ respectivamente y en zonas protegidas fluctúan entre 8-15°C y 22-31‰.

En cuanto a las características climáticas de esta región, se trata de un medio húmedo que se presenta durante todo el año, caracterizado por el Clima Templado Lluvioso, en donde, las temperaturas promedio son de 10,7°C en Castro y 9,6°C en las Isla de Guafo, es por la influencia oceánica que ayuda mantener la uniformidad térmica, de manera que los promedios mensuales no desciende bajo los 6°C en gran parte de la región (INE, 2007). En Puerto Montt la temperatura media anual de 11,2°C, siendo las extremas de 14,9°C en enero y 7,7°C en julio, lo que da una amplitud térmica anual de 7,2°C. La pluviosidad anual alcanza a 1840 mm.

Las condiciones de temperaturas en la zona de Metri oscilan entre los 4-22°C, vientos hasta 120 Km/h y lluvias de 1800 mm/año. Mientras tanto, los rangos de temperatura y salinidad se encuentran entre 10-20°C y 26-30‰ respectivamente (Buschmann, 1992).

2.2 Algas.

Las algas son organismos acuáticos, fotoautótrofos dependiente de dióxido de carbono y que en su conformación morfológica son menos complejas que las plantas terrestres. Estos organismos, en general, se caracterizan por la gran diversidad de formas, tamaños, mecanismo de reproducción y composición química, componiendo un grupo importante las talófilas, las cuales no presentan la diferenciación en raíz, tallo y hojas características de las plantas superiores, pero pueden alcanzar diferenciación de tejido y órganos desempeñando diferentes funciones, lo cual alcanza la máxima expresión en el género de *Macrocystis* del orden laminariales de las Phaeophytas (Kain, 1982).

Las macroalgas están clasificadas en tres tipos, las Chlorophyta, Rhodophyta y las Phaeophyta (Tabla 1). Debido a sus propiedades y características durante las últimas tres décadas se ha desarrollado un incipiente proceso de exportación de este recurso marino hacia el extranjero, específicamente a países asiáticos como Japón, China y Corea debido fundamentalmente por su utilización en la alimentación humana.

Las industrias exportadoras de algas pardas en Chile, deriva de la disponibilidad y abundancia del recurso que está presente en casi toda la costa chilena; una características de estos lugares es la gran cantidad de algas que varan en las playas, debido a las marejadas ocurridas con bastante periodicidad durante el año, constituyendo una ventaja en extracción del recurso.

Tabla 1: Clasificación y uso de macroalgas.

Tipo de alga	Características	Usos
Algas Rojas	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Contienen clorofila en un pigmento rojo llamado ficoeritrina ✓ Son marinas, crecen a poca profundidad en aguas templadas. Son pequeñas y ramificadas 	<ul style="list-style-type: none"> • Debido a sus proteínas se usan en la medicina y cosméticos. También se usa en fotografía, jaleas, etc.
Algas Verdes	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Pigmentos como el caroteno o la xantofila matizan con naranja o amarillo el verde de la clorofila en estas algas. ✓ Viven en el mar, tanto flotando como fijas en rocas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Tienen casi los mismos usos que las algas rojas. Además, en Oriente se usan mucho para hacer sushi y otros alimentos.
Algas Pardas	<ul style="list-style-type: none"> ✓ La ficoxantina, que contiene clorofila, les da un color verde oliva o pardo. ✓ Pueden llegar a alcanzar los 30 metros y viven en las rocas a 20 metros de profundidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Algunas variedades se usan como abono mientras que de otras se extrae el yodo. • De este tipo de algas se obtiene la algina, de gran importancia en la industria de los colorantes, plásticos, aislantes, explosivos y de telas impermeables.

(ProdalmarLTDA)

2.3 *Macrocystis pyrifera*.

Macrocystis pyrifera (L.) C. Agardh, conocida comúnmente como huiro o sargazo, es un alga parda (Phaeophyta) que en términos taxonómico se clasifica como: división: Chromophyta; Clase: Phaeophyceae; Orden: Laminariales; Familia: Lessoniaceae; Género: *Macrocystis*; Especie: *pyrifera* (Tabla 2) que pueden llegar a medir 30 o más metros de largo. Estructuralmente está conformada por un rizoide llamado disco o grampón que se adhiere a los suelos rocosos marinos, un caulóide llamado estipe y láminas que se asemejan a las hojas en plantas superiores, además poseen neumatocistos que le permite flotar y permanecer de forma vertical en los fondos marinos (Fig.1).

Tabla 2: Clasificación taxonómica de algas Phaeophytas.

	Clase	Orden	Familia	Género	
PHAEOPHYTA	Phaeophyceae	Ectocarpales	Ectocarpaceae	<i>Ectocarpus</i>	
			Ralfsiaceae	<i>Ralfsia</i>	
			Corynophlaeaceae	<i>Leathesia</i>	
			Chordariaceae	<i>Chordaria</i>	
				<i>Hapogloea</i>	
			Scytosiphonaceae	<i>Scytosiphon</i>	
				<i>Petalonia</i>	
		Splachnidiaceae	<i>Splachnidium</i>		
		Desmarestiales			<i>Desmarestia</i>
					<i>Carpomitra</i>
		Cutleriales			<i>Cutleria</i>
					<i>Zanardinia</i>
		Laminariales		Chordaceae	<i>Chorda</i>
				Laminariaceae	<i>Laminaria</i>
					<i>Saccoehiza</i>
					Lessoniaceae
					<i>Postelsia</i>
					<i>Nereocystis</i>
					<i>Pelagophycus</i>
			<i>Macrocystis</i>		
		Alariaceae	<i>Alaria</i>		
		Sphacelariales			<i>Sphacelaria</i>
					<i>Choristocarpus</i>
		Dictyotales			<i>Dictyota</i>
					<i>Padina</i>
		Fucales		Cystoseiraceae	<i>Cystoseira</i>
					<i>Halidrys</i>
Sargassaceae	<i>Sargassum</i>				
Himanthaliaceae	<i>Himanthalia</i>				
Fucaceae	<i>Fucus</i>				
	<i>Pelvetia</i>				
	<i>Ascophyllum</i>				
	<i>Durvillaea</i>				

(Live Seafood Chile S.A., 2005)

La importancia ecológica de esta alga deriva principalmente de su capacidad para formar auténticos bosques submarinos y grandes cordones o cinturones a lo largo del borde costero, constituyendo un refugio, soporte y alimentos para variadas especies submarinas como invertebrados, larvas, peces.



Figura 1: *Macrocystis pyrifera*.

2.3.1 Reproducción.

Macrocystis presenta un ciclo de vida con alternancia generacional pasando de una fase esporofítica diploide ($2n$) macroscópico a un gametofito haploide (n) microscópico en esta fase *M. pyrifera* tiene 16 cromosomas. En las plantas adultas que forman los bosques de algas, en su base hay láminas especializadas llamadas esporofilas las que maduran y forman los esporangios, las zonas concentradas de estas se llaman soros. Una vez maduras las zoosporas son liberadas al medio marino donde se asientan en sustratos rocosos para su germinación y, posterior crecimiento para así generar gametofitos microscópicos a través de numerosas divisiones mitóticas (North, 1994).

La fase esporofítica de *Macrocystis* produce por meiosis zoosporas haploides que originan los gametofitos machos y hembras microscópicos. Estos gametofitos producen células sexuales por mitosis y una vez ocurrida la fertilización de un gametofito femenino se produce un cigoto diploide ($2n$), el cual se desarrolla vía mitótica produciendo un esporofito diploide completando así el ciclo de vida (Fig. 2).

Las poblaciones que se encuentran al Sur de Chile, tienen condiciones de reproducción apropiadas durante todo el año, por lo que, *M. pyrifera* ha desarrollado una estrategia que permite a las plantas desarrollar esporas continuamente, en comparación con las plantas que están en el Norte de país que son más perennes y poseen una capacidad de regeneración mejor ya que no están sometidas a las fuertes tormentas presentes en la época de invierno en el Sur (Buschmann *et al.*, 2004).

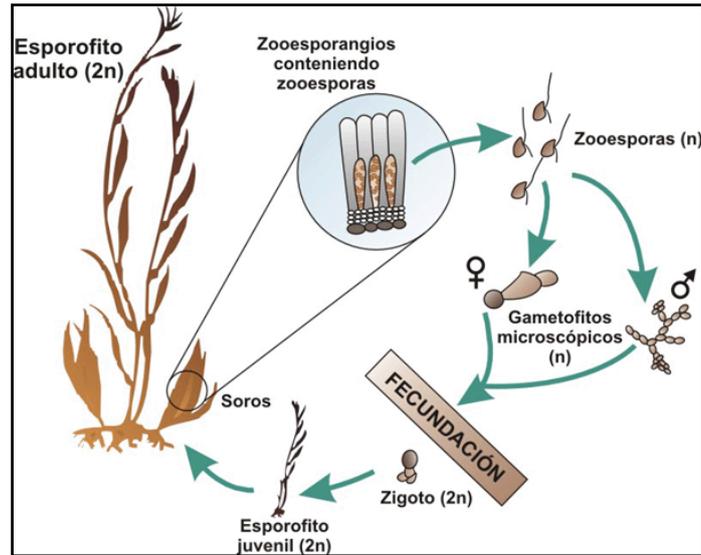


Figura 2: Ciclo reproductivo de *Macrocyctis pyrifera*.

<http://www.algaspardas.cl/reproduccion.htm>

2.3.2 Distribución.

Las poblaciones de *M. pyrifera* crecen en sustratos rocosos, en zonas poco profundas hasta los 25 m de profundidad, su distribución geográfica es bipolar (North, 1994) localizándose tanto en el Hemisferio Norte desde Alaska hasta México, a lo largo de la costa oeste y sureste de América del Sur desde Perú a Argentina, en regiones aisladas del sur de África, Australia, y Nueva Zelanda y alrededor de islas Sub-Antártica a 60°S (Neushul, 1971, Hay, 1986, Stegenga *et al.*, 1997).

En Chile se puede encontrar desde la Región de Valparaíso hasta el Cabo de Hornos en bahías abiertas al Océano Pacífico, así como, en canales y fiordos que son lugares donde están protegidas de la fuerte acción de las olas (Dayton, 1985).

En la zona de Cabo de Hornos se registran densos bosques submarinos sobre sustratos rocosos destacándose que a diferencia de lugares de mayor hidrodinamismo, “los ejemplares de bahías cerradas están epifitadas y aparentemente son menores en tamaño”. Es posible encontrar plantas a metros de profundidad y excepcionalmente a 50 m. Algunos datos mencionan que estas algas están fértiles casi todo el año (Santelices y Ojeda, 1984).

2.3.3 Factores que Afectan la Distribución del Alga.

Se ha demostrado que en Chile *M. pyrifera* muestra pequeñas diferencias genéticas de otras especies en el Hemisferio Sur y una fuerte diferencia con respecto a las especies de California (Coyer *et al.*, 2001).

En los ambientes marinos hay factores que determinan el funcionamiento y la vida de los todos los organismos marinos estos son: a) los solutos disueltos presente en el agua; b) la profundidad de la columna de agua; c) la disponibilidad y la cantidad de luz; d) la naturaleza del sustrato (roca, arena); e) circulación de las masas de agua (corrientes) y su temperatura; f) patrones que caracterizan una columna de agua salinidad, pH oxígeno disuelto, turbidez, nutrientes (Jones, 1997). Además, las altas temperaturas registradas, ocasionalmente, en el mar por efecto del fenómeno de “El Niño”, disminuyen drásticamente la biomasa y densidades de praderas de algas pardas en el área norte y centro sur del país (Vásquez *et al.*, 1998).

El hombre al extraer las poblaciones de esta alga afecta también su distribución por las siguientes razones: (a) Presiones de los mercados nacionales e internacionales por materia prima que aumentan o disminuye la presión de pesca, (b) Desempleo de los asentamientos humanos costeros. (c) Abundancia y disponibilidad de otros recursos marinos bentónicos, (d) Nivel de regulaciones de extracción de los recursos marinos, (e) Nivel de educación de pescadores artesanales y compromiso con medidas de conservación y (f) Disponibilidad e implementación de planes de manejo.

2.3.4 Usos de *Macrocystis pyrifera*.

Durante 1970 y 1980 *M. pyrifera* tuvo una explotación significativa (Neushul y Harger, 1987), relacionado principalmente por la producción de alginato (Gutierrez *et al.*, 2006) utilizado por las industrias cosméticas, farmacéutica y alimentaria por sus propiedades de como agente emulsionante, espesante y gelificante. En 1990 se introdujo a Chile el abalone (*Haliotis* spp.) molusco de carácter herbívoro que se alimenta principalmente de algas pardas

(Vásquez, 2008), lo que ha producido una extracción masiva de *Macrocystis*, también el cultivo de estas algas pardas ofrece un nuevo mercado para la generación de biofertilizantes y para propósitos biorremediadores en la remoción de nitrógeno y fósforo producto del cultivo del salmón y de choritos, los que generan un impacto significativo en el medio ambiente marino (Buschmann *et al.*, 2001, Vásquez, 1999) debido a la alta concentración de estos elementos en los desechos de estos cultivos.

Entre otras áreas que se destaca el uso de esta macroalga se encuentra la industria textil, del papel, la industria dental, la fabricación de electrodos de soldadura y otros artículos comerciales (Vásquez, 1999).

Los organismos activamente fotosintéticos producen biomoléculas como carbohidratos y lípidos, los que pueden ser utilizados para la generación de biocombustibles. El uso de algas para la producción de biocombustibles ha generado una alternativa viable para la elaboración de este producto, lo que lleva a una mitigación en el uso del petróleo, favoreciendo así las necesidades energéticas de países exportadores del petróleo, como Estados Unidos quienes crearon una norma en el año 2009 para la creación de combustibles renovables, obligando a la producción de 36 mil millones de galones de biocombustibles para el año 2022 (Somma *et al.*, 2010).

Más del 50 % del peso seco de *Macrocystis* corresponde a azúcares principalmente laminarina y manitol, lo que junto a procesos biotecnológicos y de fermentación se puede producir bioetanol y otros combustibles; en el sur de Chile una empresa norteamericana Bio Architecture Lab (BAL) junto a la Universidad de Los Lagos, desarrollan esta tecnología lo que a menor escala ha tenido éxito y se trabaja para el desarrollo a gran escala. Otro antecedente de la ventaja de esta macroalga en comparación del maíz o de la caña de azúcar es que se requiere un menor volumen de esta alga en comparación con las otras materias primas.

2.4 Nitrógeno.

El nitrógeno es uno de los elementos biogeoquímicos esencial para la formación de los organismos vivos, forma parte biomoléculas como son las proteínas, material genético, clorofila y de otras moléculas orgánicas que permiten el desarrollo celular.

La atmósfera terrestre está constituida por un 78% de nitrógeno gaseoso (N_2), aunque debido a su estabilidad es difícil de asimilar, por lo que, tiene que ser fijado combinándose con oxígeno y el hidrógeno. La fijación natural del nitrógeno esta dado por los relámpagos y la actividad de organismos fijadores como bacterias y algas, que pueden asociarse simbióticamente a otros organismos como las plantas superiores. El ciclo comprende diversos pasos que pasan en tanto en los ambientes terrestres como acuáticos, en forma general están comprendido por la nitrificación, desnitrificación, la fijación del nitrógeno (Fig.3).

El humano influye en el ciclo, incorporando nitrato artificial como fertilizante, lo que genera un impacto importante cuando éste se encuentra en cantidades mayores a lo que se necesita, por lo que, el nitrato se filtra hacia las napas subterráneas o se lava con las lluvias llegando a los cauces de los ríos y lagos, lo que produce un aumento de población de microalgas con un efecto conocido como eutricación, que es la disminución del oxígeno en las aguas por un crecimiento excesivo de algas.

El nitrógeno en el mar se encuentra en forma de nitrato (NO_3^- ; 0-40 $\mu\text{mol N Kg}^{-1}$), nitrito (NO_2^- ; 0-1 $\mu\text{mol N Kg}^{-1}$), y el amonio (NH_3 0-1 $\mu\text{mol N Kg}^{-1}$) (Tyrrell, 1999). Los nitritos se forman a partir de de la biodegradación de nitratos, amoniaco o de otros compuestos nitrogenados.

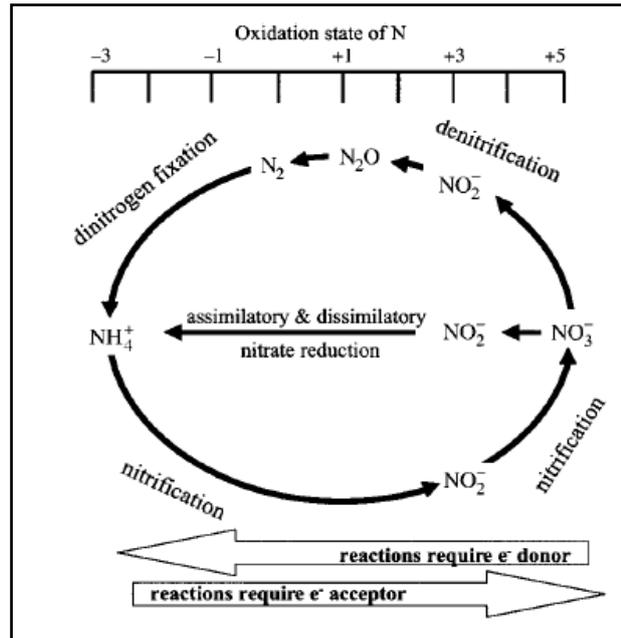


Figura 3: Ciclo del nitrógeno (Stolz y Basu, 2002).

2.5 Nitrato Reductasa (NR).

La nitrato reductasa es una proteína homodímera, formada por subunidades polipeptídicas de aproximadamente 100 kDa que está asociada con molibdeno, molidopterina, hierro, heme y flavin adenina dinucleótido (FAD) (Berges, 2010).

Las nitratos reductasas (NRs) se pueden encontrar en diversos organismos como las algas, plantas, hongos, archeas y bacterias (Campbell, 1999), por lo que se puede hacer una distinción a nivel taxonómico, es decir, entre NR eucariotas y procariotas, las primeras pertenecen a la familia de las sulfito oxidadas de enzimas de molibdeno mononucleares y contienen un cofactor pyranoterin simplificado, en cambio las segundas pertenecen a la familia de las reductasas dimetilsulfóxidas (DMSO) y contienen una forma modificada del cofactor (Chow *et al.*, 2004). Las NRs también pueden ser distinguidas por su función, localización en las células, estructura y del producto final de la vía de síntesis (Stolz y Basu, 2002).

2.5.1 Proceso de reducción del nitrato en algas.

El proceso de la reducción de nitrato a amonio se realiza en dos pasos, primero la nitrato reductasa cataliza la reducción de nitrato a nitrito, usando como agente reductor NAD(P)H lo que ocurre a nivel del citoplasma y el segundo paso, lo realiza la nitrito reductasa donde el nitrito es reducido a amonio usando como donador de electrones la ferredoxina reducida (Crawford *et al.*, 1986, Chow *et al.*, 2004) proceso llevado a cabo en los cloroplastos.

Las algas y otros organismos que son capaces de reducir el nitrato lo realizan para la incorporación del nitrógeno en biomoléculas (proteínas, material genético), generación de energía para la función celular, para disipar el exceso de energía mediante la respiración (Campbell, 2001, Richardson *et al.*, 2001).

La asimilación del nitrógeno está determinada por factores abióticos como la luz, temperatura y disponibilidad de nitrato (Huber *et al.*, 1992, Caba *et al.*, 1995), además, factores intracelulares que también determinan la actividad de NR como el molibdeno, fitohormonas, el metabolismo del carbono (Crawford y Junior, 1993).

3. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

El uso de los recursos marinos, y principalmente, de las algas ha permitido el desarrollo de varias actividades productivas, ya sea, para fines alimenticios, farmacéuticos, entre otros, generando un aumento de la extracción de estos recursos. Dentro de los cuales está la *Macrocystis pyrifera*, ha sido usada como parte fundamental en la dieta de moluscos como el abalón, también, esta alga parda ésta siendo utilizada para la generación de bioetanol, como biofertilizante e implica una alternativa para su uso como biorremediador, conllevando al aumento de su extracción y producción en el transcurso de la última décadas.

El crecimiento y desarrollo de este recurso marino ésta dado por diferentes factores los que pueden limitar su producción, es por esto, que entender cómo funciona la dinámica en las poblaciones naturales de esta especie, y cuáles son los factores determinantes para su crecimiento y desarrollo, nos llevará a comprender y establecer su funcionamiento, lo que permitirá utilizar tecnologías para simular su hábitat en condiciones artificiales y otros ambientes en donde esta especie no se encuentre y así poder extraer de forma sustentable, previniendo la extracción masiva y la depredación de este recurso marino en su área de reproducción natural.

Por lo anteriormente mencionado, este estudio radica en la necesidad de conocer los factores de tipo abiótico que están asociados al funcionamiento del nitrógeno que inciden en el crecimiento de *Macrocystis pyrifera*, en esta zona de nuestro país.

3.1 HIPÓTESIS

H01: La temperatura y concentración de nitrógeno en el mar no afecta significativamente la actividad de la enzima nitrato reductasa en las poblaciones de *Macrocystis pyrifera*.

Ho 2: Las poblaciones de *Macrocystis pyrifera* de Pargua, Ilque y Metri no difieren en la actividad de la nitrato reductasa a lo largo de un ciclo anual.

3.2 OBJETIVOS

General:

Evaluar la actividad de la enzima nitrato reductasa en diferentes condiciones de temperatura y concentración de nitrógeno que en ciertas épocas del año (primavera, verano, otoño e invierno) generan condiciones de estrés o son limitantes para el crecimiento de *Macrocystis pyrifera*.

Específicos:

1. Cuantificar la actividad de nitrato reductasa en la zona apical, media y basal de la lámina de *Macrocystis pyrifera*.
2. Conocer los cambios temporales de la nitrato reductasa en las tres poblaciones naturales de *M. pyrifera* de la Región de Los Lagos.
3. Determinar la correlación de la actividad de nitrato reductasa con temperatura y la disponibilidad de nitrato en el medio ambiente marino en estudio.

4. METODOLOGÍA.

Los experimentos fueron realizados en el Centro de Investigación y Desarrollo de Recursos de Ambientes Costero (i-mar), ubicado en la Ciudad de Puerto Montt, Región de Los Lagos, en el marco del proyecto Fondecyt 1110845.

4.1 Obtención de Muestras.

Las muestras de *M. pyrifera* fueron recogidas de tres localidades diferentes de la Región de Los Lagos. Se recolectaron muestras en Pargua ($41^{\circ}47'S$; $73^{\circ}25'O$), ubicada en la comuna de Calbuco; Ilque ($41^{\circ}36'S$; $73^{\circ}4'E$) y Metri ($41^{\circ}35'S$; $72^{\circ}42'O$), localizadas en la comuna de Puerto Montt. (Fig.4). De estas localidades se extrajeron 10 plantas a las que se le sacó una lámina para el análisis la actividad de nitrato reductasa (NR); y de agua para la determinación de la concentración de nitrato, además de la medición de temperatura mediante un Multiparámetro Horiba W-23XD, este procedimiento fue efectuado para otoño, invierno, primavera y verano.

Autor: Carlos Schilling Inay
Fotografías: Juan Rodríguez

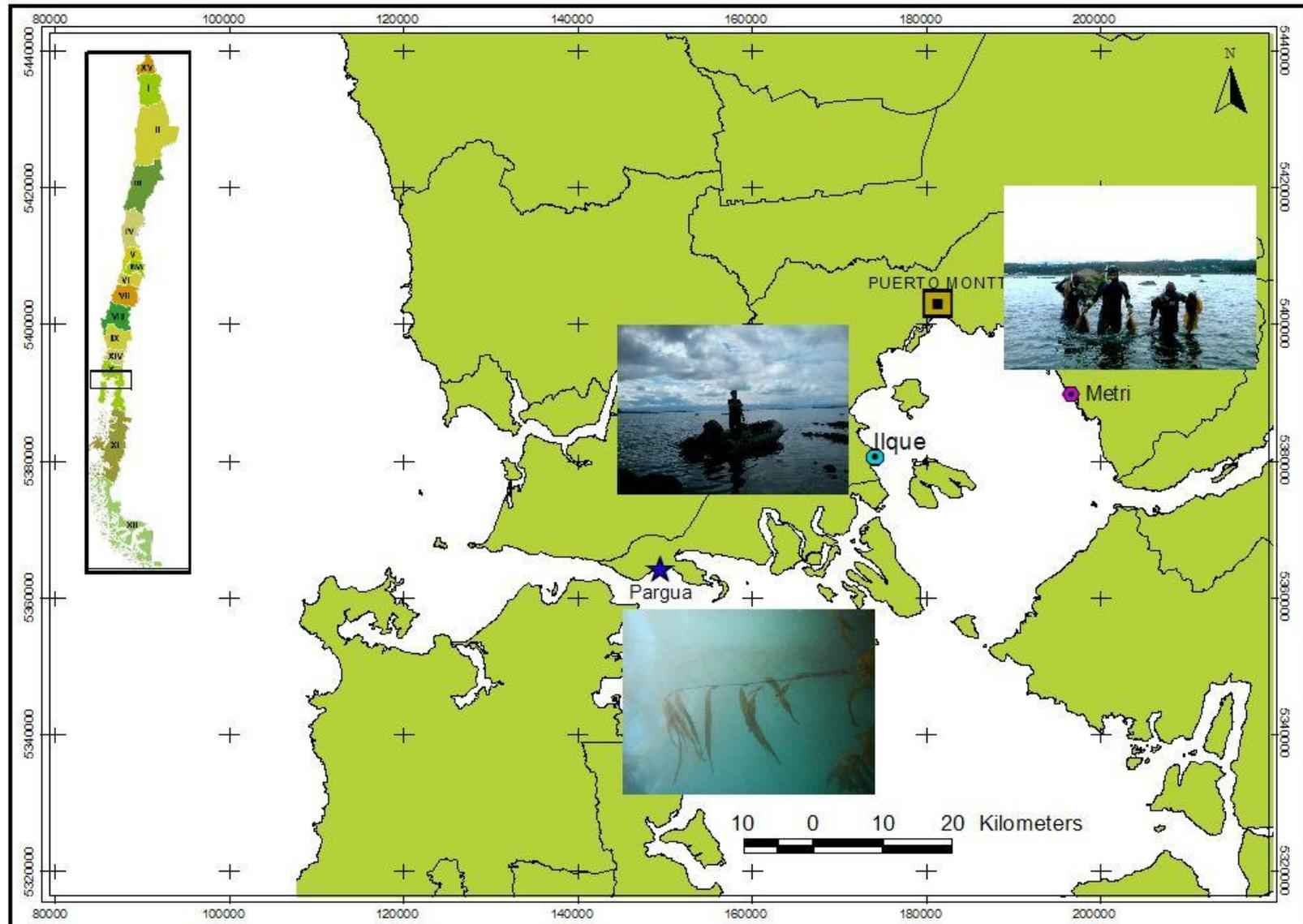


Figura 4: Mapa de la localización de zonas de muestreos en la Región de Los Lagos.

4.2 Actividad de Nitrato Reductasa.

Para medir la actividad de la enzima en las diferentes poblaciones de *M. pyrifera* se pesaron 300 mg de tejido cortado de tres partes (alta, media y baja) de una lámina del alga. El tejido fue incubado con 5 mL de la solución stock (0,3 M KNO₃, 0,5 mM glucosa, 0,2 M KH₂PO₄, 1mM EDTA y 1% v/v 1-propanol), durante 30 min a 15°C en oscuridad. De esta solución se tomó 1 mL y se adicionaron 1 mL de N-1-naphtylethylendiamine y 1 mL de sulphanimide dejando incubar por 30 min a 15°C, finalmente mediante el espectrofotómetro UV-VIS Tu-1800 se midió la absorbancia a 540 nm (Strickland y Parsons, 1972).

4.2.1 Curva de Calibración.

A partir de un estándar de concentración 1000 µM/L de nitrito de sodio (NaNO₂) se preparó otro volumen con una concentración 100 µM/L, y de este se prepararon diferentes soluciones con concentraciones de 0,1; 0,3; 0,5; 0,8 y 1,0 µM/L, de cada solución se tomaron 25 mL y se adicionaron 0,5 de mL de N-1-naphtylethylendiamine y 0,5 mL de sulphanimide finalmente se midió la absorbancia en espectrofotómetro UV-VIS Tu-1800 a 540 nm.

4.3 Medición de Nitrato Agua.

El método está basado en el protocolo de Morris y Riley (1963) con modificaciones sugeridas por Wood (1967).

Las muestras de agua fueron filtradas con un filtro de 0,4 mm espesor y el poro de 1,5µ en una bomba de vacío Welch 25xx series, el método se basa principalmente en el traspaso del agua de mar por una columna de cadmio por un tiempo mínimo de 4 min, en donde el nitrato es convertido a nitrito. Antes de que las muestras pasen por la columna se le adiciona 1 mL de cloruro de amonio diluido y se pasa la muestra en la columna, posteriormente a la muestra se le agrega 0,5 mL de sulphanimide se esperan 2 min y se le adiciona 0,5 mL de N-1-naphtylethylendiamine y se deja por 30 min, finalmente se leen las muestras en el espectrofotómetro UV-VIS Tu-1800 a 543 nm.

4.3.1 Curva de Calibración.

Se preparó una solución estándar con 1,02 g de nitrato de potasio analítico en 1000 mL de agua destilada, de esta solución se tomaron 4 mL y se diluyeron en 2000 mL de agua de mar sintética. De la solución estándar se tomaron 50; 37,5; 25; 12,5 y 0 mL y se aforaron con agua de mar sintética hasta los 50 mL (0; 12,5; 25; 37,7; 50 mL respectivamente). Las diluciones se pasaron por la columna de acuerdo a lo anteriormente planteado para las muestras y se adicionaron 0,5 mL de sulphanilamide y 0,5 mL de N-1-naphtylethyldiamine. Finalmente se leyeron las diluciones en espectrofotómetro a 543 nm.

4.4 Análisis Estadísticos.

Se evaluó la actividad de nitrato reductasa en tres zonas diferentes de una lámina de *Macrocystis pyrifera*, la actividad de la enzima frente a condiciones abióticas de temperatura y disponibilidad de nitrógeno en las tres localidades de la Región de Los Lagos y en las cuatro estaciones que comprende el año. El análisis estadístico realizado fue Análisis de Varianza para determinar diferencias entre las zonas de las láminas y en las localidades, y prueba de Tukey (para la determinar qué zona era diferente), y además se realizaron correlaciones de Pearson entre la actividad de nitrato reductasa y los factores abióticos estudiados temperatura y concentración de nitrato, mediante el programa SPSS versión 20.

5. RESULTADOS

5.1 Actividad de Nitrato Reductasa en Tres Zonas de la Lámina en *Macrocystis pyrifera*.

La actividad enzimática de nitrato reductasa en las zonas de la lámina (apical, media y basal) en la localidad de Pargua no hubo diferencias significativas ($F= 0,533$; $p=0,632$). En Ilque hubo diferencias significativas ($F=5,438$ y $p<0,006$), para estimar en que zona de la lámina existe tal diferencia, se realizó la prueba de Tukey; la comparación entre la zona apical y media de la lámina no hubo diferencia ($p=0,818$), por el contrario, en la zona apical y basal hubo diferencia ($<0,011$), en donde la zona apical de la lámina tuvo mayor actividad enzimática que la zona baja, de igual manera, en la parte media y basal ($<0,002$).

En el caso de la localidad de Metri y al igual que Pargua, no existe diferencia significativa ($F=0,960$ $p=0,386$) entre las zonas de la lámina (Fig. 5).

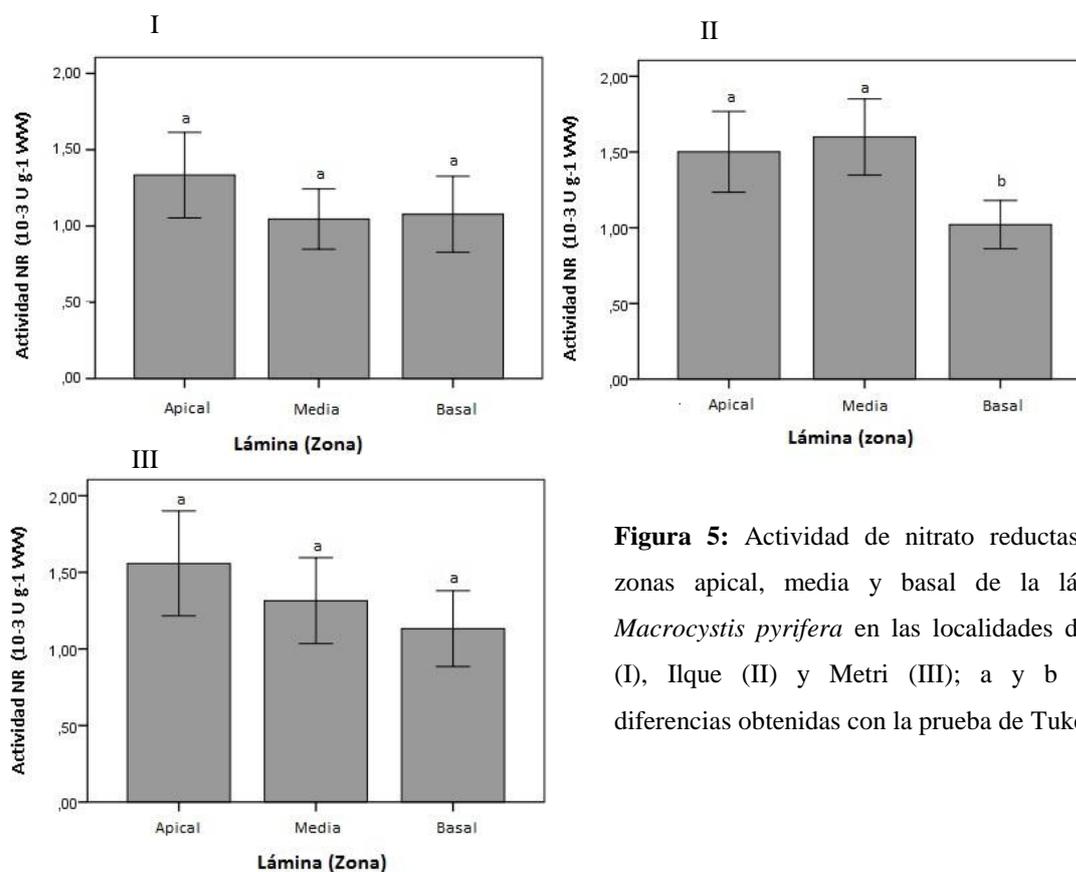


Figura 5: Actividad de nitrato reductasa en las zonas apical, media y basal de la lámina de *Macrocystis pyrifera* en las localidades de Pargua (I), Ilque (II) y Metri (III); a y b muestran diferencias obtenidas con la prueba de Tukey.

5.2 Actividad de Nitrato Reductasa en las Localidades de Pargua, Ilque y Metri.

El comportamiento de la actividad enzimática de nitrato reductasa en las localidades de Pargua, Ilque y Metri para las estaciones de primavera, verano, otoño e invierno hubo diferencia significativa ($F=3,101$; $p<0,046$).

En las localidades de Pargua y Metri tuvieron una actividad enzimática parecida con un aumento en la época de verano alcanzando $1,59$ y $2,19 \times 10^{-3} \text{U g}^{-1} \text{WW}$ respectivamente (Fig.6), que posteriormente en ambas localidades fue disminuyendo la actividad de la enzima en las época de otoño e invierno.

En la localidad de Ilque la actividad enzimática en primavera fue de $1,32 \times 10^{-3} \text{U g}^{-1} \text{WW}$ siendo más alta que para Pargua y Metri $0,859$ y $0,945 \times 10^{-3} \text{U g}^{-1} \text{WW}$ respectivamente, y que posteriormente declinó en verano alcanzando $1,03 \times 10^{-3} \text{U g}^{-1} \text{WW}$ condición totalmente contraria a las otras dos localidades; y que finalmente aumento en otoño e invierno alcanzando los $1,85 \times 10^{-3} \text{U g}^{-1} \text{WW}$.

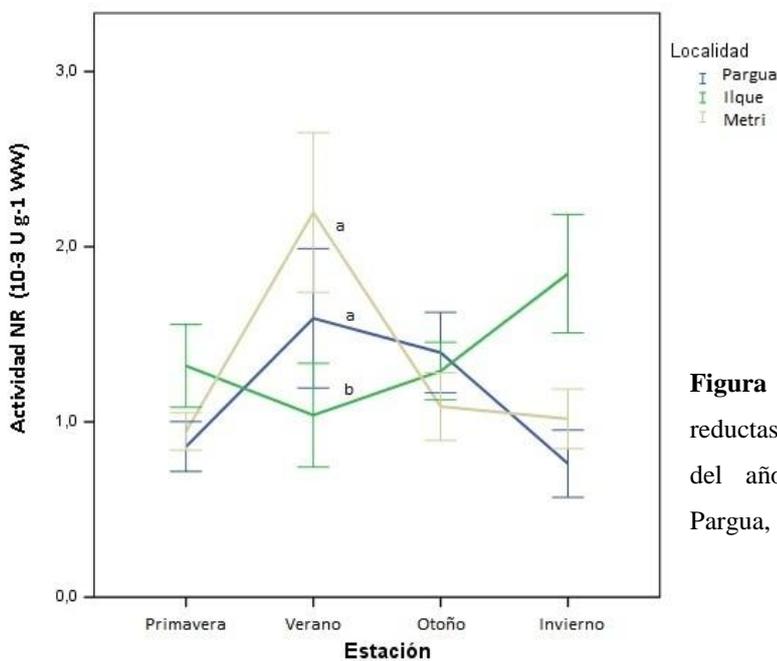


Figura 6: Actividad de nitrato reductasa en las cuatro estaciones del año en las localidades de Pargua, Ilque y Metri.

5.3 Condiciones de Temperatura y Nitrato en Pargua, Ilque y Metri.

La medición de temperatura para Pargua en primavera, verano, otoño e invierno fueron de 12, 3; 12,28; 11,9 y 10,26°C respectivamente. En Ilque de 13,61; 16,27; 10,21 y 10,15°C y en Metri fue de 15,47; 17,11; 9,56 y 9,1°C para primavera, verano, otoño e invierno. Se realizó una correlación de Pearson para verificar la relación de temperatura en las tres localidades (Pargua, Ilque y Metri); además se realizó otra correlación para verificar la relación de las cuatro estaciones del año y la temperatura.

El resultado del análisis estableció una correlación positiva, pero con un muy bajo coeficiente de relación (Fig.7) para localidad y la temperatura, en cambio entre la distintas estaciones (primavera, verano, otoño e invierno) y la temperatura estableció una correlación significativa y negativa con un $R^2 = 0,485$ (Fig.8).

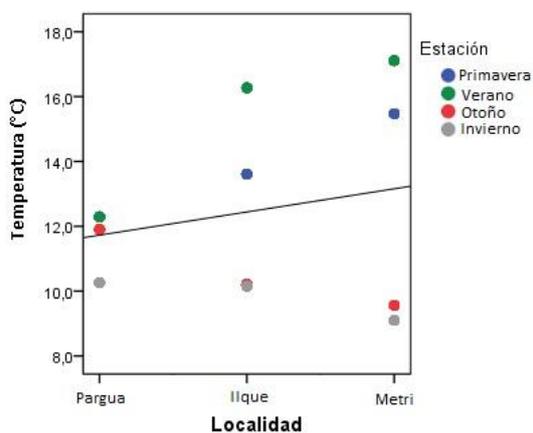


Figura 7: Relación entre la temperatura, localidades (Pargua, Ilque y Metri). R^2 lineal= 0,051.

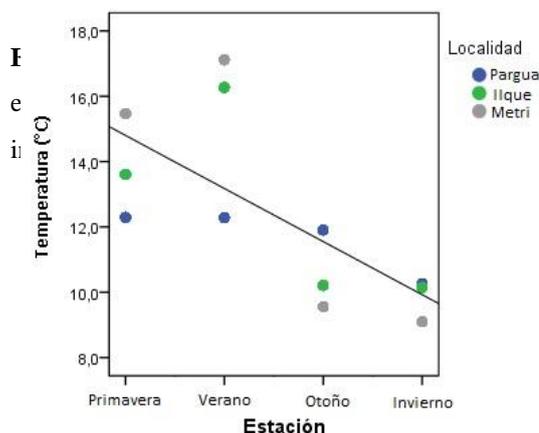


Figura 8: Relación entre la temperatura y las estaciones del año (primavera, verano, otoño e invierno). R^2 lineal=0,485.

La medición en concentración de nitrato (NO_3^-) en agua de mar en primavera, verano, otoño e invierno; en la localidad de Pargua fue de 14,78; 9,51; 20,95 y 18,71 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente, en Ilque de 10,34; 4,85; 5,85 y 26,97 $\mu\text{mol/L}$, y en Metri de 1,1; 14,24; 4,97 y 23,29 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente. El resultado de la correlación de Pearson estableció una relación negativa para la concentración de nitrato y las localidades, con un bajo coeficiente de

correlación (Fig.9). En cambio para la relación de nitrato y las estaciones del año fue significativa y positiva con un $R^2 = 0,364$ (Fig.10).

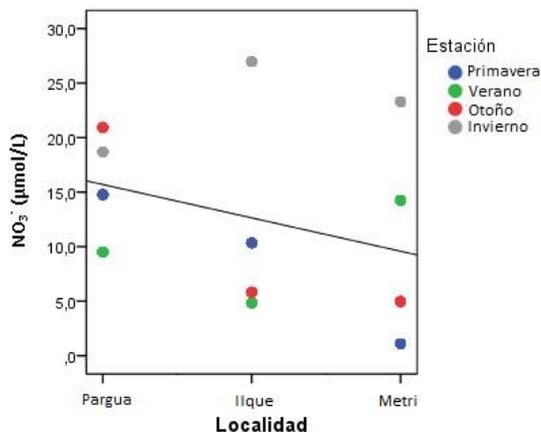


Figura 9: Relación de concentración de NO_3^- en las localidades de Pargua, Ilque y Metri. R^2 lineal= 0,101.

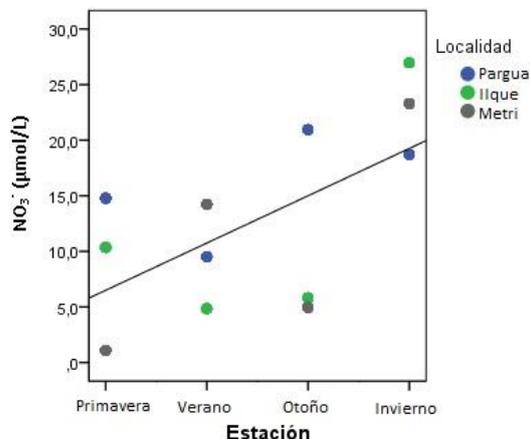


Figura 10: Relación entre la concentración de NO_3^- y las estaciones del año (primavera, verano, otoño e invierno). R^2 lineal= 0,364.

La correlación de Pearson estableció que la actividad enzimática de nitrato reductasa en relación con la temperatura fue positiva y $p < 0,010$ (Fig.11), al igual que la correlación entre nitrato reductasa y la concentración de nitrato con $p < 0,007$ (Fig.12). No obstante el R^2 0,02 indica que no hubo una relación entre temperatura y el nitrato respecto a la actividad de NR.

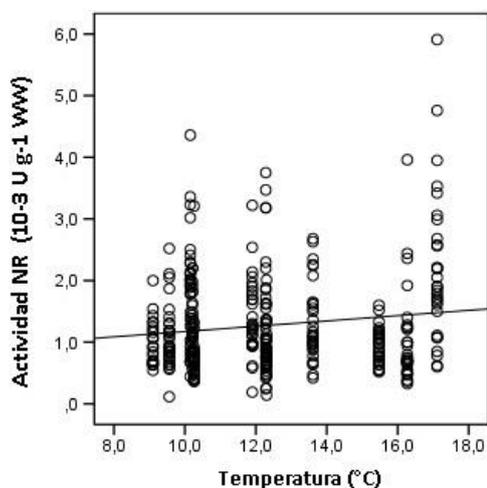


Figura 11: Relación de la nitrato reductasa y la temperatura en las localidades de Pargua, Ilque y Metri para las cuatro estaciones del año. R^2 lineal= 0,020.

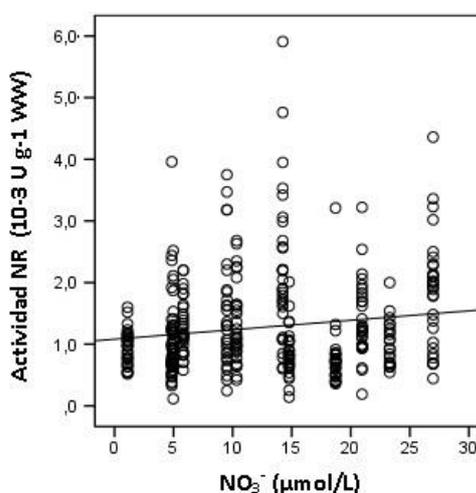


Figura 12: Relación de la nitrato reductasa y la concentración de nitrato en las localidades de Pargua, Ilque y Metri para las cuatro estaciones del año. R^2 lineal=0,023.

6. DISCUSIÓN

6.1 Actividad de Nitrato Reductasa en la Lámina.

La actividad de nitrato reductasa presentó valores entre los rangos de $0,518-5,91 \times 10^{-3} \text{U g}^{-1} \text{ WW}$; en otros estudios con Phaeophyta el rango de actividad estuvo entre los $0,5-2 \times 10^{-3} \text{U g}^{-1} \text{ WW}$ en *Fucus spiralis* (Figuroa y Viñegla, 2001), de $1,8 \times 10^{-3} \text{U g}^{-1} \text{ WW}$ en *Durvillaea antarctica*, y de $1 \times 10^{-3} \text{U g}^{-1} \text{ WW}$ en *Scytosiphon lomentaria* (Huovinen *et al.*, 2000).

La actividad enzimática de NR varió en las tres zonas (apical, media y basal) de la lámina, presentando una mayor actividad en la zona alta y media de $1,503$ y $1,599 \times 10^{-3} \text{U g}^{-1} \text{ WW}$ respectivamente y menor en la zona baja de $1,014 \times 10^{-3} \text{U g}^{-1} \text{ WW}$ para la localidad de Ilque, similar en *Fucus gardneri*, en donde la mayor actividad de nitrato reductasa se localizó en las zonas apical y media, y menor en la zona basal (Hurd *et al.*, 1995, Wallentinus, 1984).

En estudios de especies de *Fucus* y *Laminaria digitata*, hubo marcadas diferencias en la actividad de nitrato reductasa en diferentes momentos del año, NR fue mayor durante el invierno y comienzo de la primavera, alcanzando un máximo en marzo por *F. vesiculosus* y *F. serrato* y en abril de *L. digitata*; de verano hasta otoño los valores fueron mínimos, en agosto para todas las especies (Young *et al.*, 2007). En este estudio la actividad de nitrato reductasa para Pargua y Metri en verano fue mayor ($1,59$ y $2,19 \times 10^{-3} \text{U g}^{-1} \text{ WW}$ respectivamente) y en invierno fue menor ($0,76$ y $1,018 \times 10^{-3} \text{U g}^{-1} \text{ WW}$), por el contrario, Ilque tuvo una mayor actividad en invierno ($1,85 \times 10^{-3} \text{U g}^{-1} \text{ WW}$) y menor en verano ($1,03 \times 10^{-3} \text{U g}^{-1} \text{ WW}$).

6.2 Actividad Nitrato Reductasa en las Localidades de Pargua, Ilque y Metri.

La localidad de Pargua se ubica geográficamente en el Canal de Chacao en donde hay una exposición a los fuertes oleajes debido a que se comunica de forma directa con el Océano Pacífico, por el contrario, Ilque se encuentra en un lugar menos expuesto a los fuertes oleajes, de igual manera, Metri que también se ubica en un lugar protegido debido a que la Bahía está rodeada de rocas de granito.

La actividad enzimática de nitrato reductasa se comporto de forma diferente al comparar Ilque con Metri. En cambio Pargua mostró un comportamiento parecido en la actividad de NR con Metri, pero el hecho de que NR actué de forma diferente en las localidades sugiere a que existen otros factores abióticos que puedan gatillar tal condición, como la luz (Huber *et al.*, 1992, Caba *et al.*, 1995) que puede afectar sobre la proteína NR un efecto post-traducciona, o sobre la transcripción o la traducción de NR (Ninneman, 1987), como también factores intracelulares como el molibdeno (componente estructural de NR), el metabolismo del carbono (Crawford y Junior, 1993).

6.3 Actividad de Nitrato Reductasa, Temperatura y Nitrato en Pargua, Ilque y Metri.

La temperatura en las costas Chilenas exhibe un gradiente latitudinal ($>20^{\circ}\text{C}$ en el Norte y $<14^{\circ}\text{C}$ en el Sur). Estudios realizados sugieren que la diferencia de temperatura en los Océanos puede afectar las poblaciones de algas (Rinde, 2005). La temperatura registradas en la localidad de Metri en verano fue de $17,11^{\circ}\text{C}$ condición máxima entre Pargua e Ilque, la temperatura menor fue registrada en Metri de $9,1^{\circ}\text{C}$ en invierno relativamente similar para Otoño de $9,56^{\circ}\text{C}$. En Pargua las temperaturas para las estaciones fueron similares, debido a que este lugar está expuesto a los fuertes oleajes, existiendo un mayor flujo de corrientes marinas, lo que mantiene estable la temperatura en Verano, no así en Metri e Ilque que presento temperaturas sobre los 16°C .

Las actividades enzimáticas están determinadas por un aumento o disminución de la temperatura que afecta al transporte activo aumentando o disminuyendo la velocidad de absorción de nutrientes, la cinética de esta absorción posee una fase acelerada, en donde se absorbe nitrógeno en mayor medida y de forma rápida, a medida que las reservas de nitrógeno que necesita el alga están completas el nivel de absorción disminuye, independiente de la concentración que haya en el medio marino (Lartigue y Sherman, 2005). La actividad de la enzima nitrato reductasa es sensible a los cambios de temperatura con un rango estrecho de temperatura óptima (Gao *et al.*, 2000; Berges *et al.*, 2002). En éste estudio no se encontraron variaciones significativas de la nitrato reductasa asociada a la temperatura.

La mayoría de los nutrientes son transportados activamente al interior de las células (Lobban y Harrison, 1994), las moléculas de nitrato permite la actividad de la enzima nitrato reductasa (Solomonson y Barber, 1990) para la incorporación de nitrógeno al alga. La actividad de NR se incrementa siempre después de elevadas concentraciones de nitrato (Touchette y Burkholder, 2000), pero, generalmente en verano hay una disminución en la concentración de nutrientes como ocurre en Pargua $9,51 \mu\text{mol/L}$ e Ilque $4,85 \mu\text{mol/L}$. En éste estudio no hubo una relación significativa entre la disponibilidad ambiental de nitrógeno y la actividad de NR.

7. CONCLUSIONES

1. La actividad enzimática de nitrato reductasa varió significativamente entre las zonas de la lámina (apical, media y basal) en las poblaciones de *Macrocystis* de la localidad de Pargua en donde la zona apical y media hubo una mayor actividad que en la zona basal, en tanto que, en Ilque como en Metri no hubo diferencia en la actividad enzimática.
2. Las poblaciones de *Macrocystis* que se encontraban o no expuestas a los fuerte oleajes no determinó un efecto en la actividad de nitrato reductasa, ya que, tanto Ilque como Metri (lugares no expuestos a fuerte oleajes) la actividad enzimática durante primavera, verano, otoño e invierno fue totalmente contraria para ambas zonas, mientras que, Pargua zona expuesta a fuerte oleajes tuvo una actividad parecida a la localidad de Ilque, lo que existen factores tanto abióticos como intracelulares que afectan la actividad de la nitrato reductasa
3. La nitrato reductasa varió su actividad en las tres poblaciones de *Macrocystis* para las tres localidades estudiadas Pargua, Ilque y Metri.
4. La temperatura y nitrato, no tuvo un efecto significativo en la actividad enzimática de nitrato reductasa en *Macrocystis pyrifera* para las tres poblaciones, pese a la variabilidad temporal y espacial de los factores ambientales.

8. LITERATURA CITADA

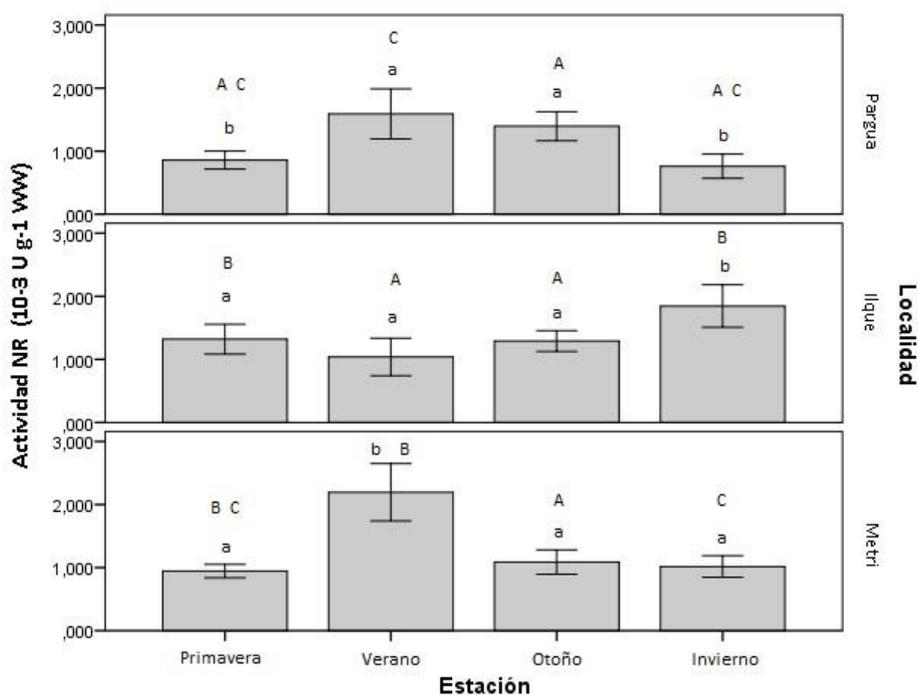
- BERGES, J.** (2010) Algal nitrate reductases. *European Journal Phycology*, 32, 3-8.
- BERGE J.A., VARELA D.E. y HARRISON P.J.** (2002) Effects of temperature on growth rate, cell composition and nitrogen metabolism in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *Marine Ecology Progress Series* 225, 139–146.
- BUSCHMANN, A.** (1992) Algal communities of a wave-protected intertidal rocky shore in southern Chile. *Coastal Plant Communities of Latin America*. San Diego, California, USA, 91-104
- BUSCHMANN, A., HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. C., AROCA, M. y GUTIERREZ, A.** (2001) Seaweed farming in Chile: A review. *The Global Aquaculture, Advocate* 4, 68-69.
- BUSCHMANN, A., VÁSQUEZ, J. A., OSORIO, P., REYES, E., FILÚN, L., HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. C. y VEGA, A.** (2004) The effect of water movement, temperature and salinity on abundance and productive patterns of *Macrocystis* spp. (Phaeophyta) at different latitudes in Chile. *Marine Biology*, 145, 849-862.
- CABA, J. M., LLUCH, C. y LIGERO, F.** (1995) Distribution of nitrate reductase activity in *Vicia faba*: Effect of nitrate and plant genotype. *Physiologia Plantarum*, 63, 667-672.
- CAMPBELL, W. H.** (1999) NITRATE REDUCTASE STRUCTURE, FUNCTION AND REGULATION: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 277-303.
- CAMPBELL, W. H.** (2001) Structure and function of eukaryotic NAD(P)H: nitrate reductase. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58, 194-204.
- COYER, J. A., SMITH, G. J. y ANDERSEN, R. A.** (2001) Evolution of *Macrocystis* spp. (Phaeophyta) as determined by ITS1 nad ITS2 sequences. *Journal of Phycology*, 37, 574-585.
- CRAWFORD, N. y JUNIOR, A.** (1993) The Molecular Genetics of Nitrate Assimilation in Fungi and Plants. *Annual Review of Genetics*, 27, 115-146.
- CRAWFORD, N. M., CAMPBELL, W. H. y DAVIS, R. W.** (1986) Nitrate reductase from squash: cDNA cloning and nitrate regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 8073-6.
- CHOW, F., DE OLIVEIRA, M. C. y PEDERSEN, M.** (2004) In vitro assay and light regulation of nitrate reductase in red alga *Gracilaria chilensis*. *Journal of Plant Physiology*, 161, 769-776.
- DAYTON, P. K.** (1985) The structure and regulation of some South American kelp communities. *Ecological Monographs*, 55, 447-468.

- FIGUEROA, F. y VIÑEGLA, B.** (2001) Effect of solar UV radiation on photosynthesis and enzyme activities (carbonic anhydrase and nitrate reductase) in marine macroalgae from Southern Spain *Revista Chilena Historia Natural*, 74, 237-249.
- GAO Y., SMITH G.J. y ALBERTE R.S.** (2000) Temperature dependence of nitrate reductase activity in marine phytoplankton: biochemical analysis and ecological implications. *Journal of Phycology* 36, 304-313.
- GUTIERREZ, A., CORREA, T., MUÑOZ, V., SANTIBAÑEZ, A., MARCOS, R., CÁCERES, C. y BUSCHMANN, A. H.** (2006) Farming of the giant kelp *Macrocystis pyrifera* in southern Chile for development of novel food products. *Journal of Applied Phycology*, 18, 259-267.
- HAY, C.** (1986) A new species of *Macrocystis* C. Ag. (Phaeophyta) from Marion Island, southern Indian Ocean. *Phycologia*, 25, 241-252.
- HUBER, S. C., HUBER, J. L., CAMPBELL, W. H. y REDINBAUGH, M. G.** (1992) Comparative studies of the light modulation of nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase activities in spinach leaves. *Plant Physiology*, 100, 706-12.
- HUOVINEN, P. S., OIKARI, A. O., SOIMASUO, M. R. y CHERR, G. N.** (2000) Impact of UV radiation on the early development of the giant kelp (*Macrocystis pyrifera*) gametophytes. *Photochemistry and Photobiology*, 72, 308-13.
- HURD, C., BERGES, J., OSBORNE, J. y HARRISON, P.** (1995) An *in vitro* nitrate reductase assay for marine macroalgae: optimization and characterization of the enzyme for *Fucus gardneri* (Phaeophyta). *Journal Phycology*, 31, 835-843.
- INE** (2007) División Político-Administrativa Censal. Chile. 221-225
- JONES, A. M.** (1997) Environmental Biology. IN Routledge (Ed.). New York, 215
- JONES, C. S. y MAYFIELD, S. P.** (2012) Algae biofuels: versatility for the future of bioenergy. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 346-351.
- KAIN, J. M.** (1982) Morphology and Growth of the Giant Kelp *Macrocystis pyrifera* in New Zealand and California. *Marine Biology*, 67, 143-157.
- LARTIGUE, J. y SHERMAN, T.** (2005) Response of *Enteromorpha* sp. (Chlorophyceae) to a nitrate pulse: nitrate uptake, inorganic nitrogen storage and nitrate reductase activity. *Marine Ecology-Progress Series*, 292, 147-157.
- LIVE SEAFOOD CHILE S.A.** (2005) Ampliación productiva: semillero de Abalón. Anexo G.
- LOBBAN, C. y HARRISON, P.** (1994) Seaweed ecology and physiology. *Cambridge University Press*, New York, 366.
- MORRIS, A. W. y RILEY, J. P.** (1963) The determination of nitrate in sea-water. *Analytica Chimica Acta*, 29, 272-279.

- NEUSHUL, M.** (1971) The biology of giant kelp beds (*Macrocystis*) in California: the species of *Macrocystis*. *Nova Hedwigia*, 32, 211-222.
- NEUSHUL, M. y HARGER, B.** (1987) Nearshore kelp cultivation, yield and genetics. In Bird KT, Benson PH (eds), *Seaweed Cultivation for Renewable Resources*. *Elsevier Science Publishers*, 69-93.
- NINNEMANN, H.** (1987). Photoregulation of eukaryotic nitrate reductase. In *Blue Light Responses : Phenomena and Occurrence in Plants and Microorganisms* (Senger, H., editor), CRC Press, Boca Raton, FL. 17-29
- NORTH, W. J.** (1994) Review of *Macrocystis* biology. IN *Biology of Economic Algae*. (Ed.). 447-527.
- PRODALMARLTDA** Rubro: Productos del mar
- RICHARDSON, D. J., BERKS, B. C., RUSSELL, D. A., SPIRO, S. y TAYLOR, C. J.** (2001) Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58, 165-78.
- RINDE, E.** (2005) Demographic variation in the kelp *Laminaria hyperborea* along a latitudinal gradient. *Marine Biology*, 146, 1051-1062.
- SANTELICES, B. y OJEDA, P.** (1984) Population dynamic of coastal forest of *Macrocystis pyrifera* in Puerto Toro, Navarino Island, Southern Chile. *Marine Ecology-Progress Series*, 14, 175-183.
- SOLOMONSON, L. P. y BARBER, M. J.** (1990) Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 41, 225-253.
- SOMMA, D., LOBKOWICZ, H. y DEASON, J.** (2010) Growing America's fuel: an analysis of corn and cellulosic ethanol feasibility in the United States. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 12, 373-380.
- STEGENGA, H., BOLTON, J. y ANDERSON, R.** (1997) Seaweeds of the South African west coast. *Contributions from the Bolus Herbarium*, 18, 1-655.
- STOLZ, J. F. y BASU, P.** (2002) Evolution of Nitrate Reductase: Molecular and Structural Variations on a Common Function *Chemical Biology* 3, 198-206.
- STRICKLAND, J. D. y PARSONS, T. R.** (1972) A practical Handbook of Seawater Analysis. *Ficheries Research Board of Canada*, Ottawa.
- TOUCHETTE, B. W. y BURKHOLDER, J. M.** (2000) Review of nitrogen and phosphorus metabolism in seagrasses. *Journal of Experimental Marine Biology Ecology*, 250, 133-167.
- TYRRELL, T.** (1999) The relative influences of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production. *Nature*, 400, 525-531.

- VÁSQUEZ, J. A.** (1999) The effect of harvesting of brown seaweed: A social ecological and economical important resource. *Word Aquaculture*, 30, 19-22.
- VÁSQUEZ, J. A.** (2008) Production, use and fate of Chilean brown seaweeds: re-sources for a sustainable fishery. *Journal of Applied Phycology*, 20, 457-467.
- VÁSQUEZ, J. A., CAMUS, P. A. y OJEDA, F. P.** (1998) Diversity, structure and functioning of rocky coastal ecosystem in northern Chile. *Revista Chilena Historia Natural*, 71, 479-499.
- WALLENTINUS, I.** (1984) Comparison of nutrient uptake rates for Baltic macroalgae. *Marine Biology*, 80, 215-225.
- WOOD, E. D., ARMSTRONG, F. A. J. y RICHARD, F. A.** (1967) Determination of nitrate in sea water by cadmium-copper reduction to nitrite. *Journal of the Marine Biology UK Association* 47, 23-31.
- YOUNG, E. B., LAVERY, P. S., ELVEN, B. V., DRING, M. J. y BERGES, J.A.** (2005) Nitrate reductase activity in macroalgae and its vertical distribution in macroalgal ephytites of seagrasses. *Marine Ecology-Progress Series*, 288, 103-114.
- YOUNG E.B., DRING M.J., SAVIDGE G., BIRKETT D.A., y BERGES J.A.** (2007) Seasonal variations in nitrate reductase activity and internal N pools in intertidal brown algae are correlated with ambient nitrate concentrations. *Plant Cell and Environment*, 30, 764-774.

9. ANEXOS



Anexo 1: Relación de la actividad enzimática de nitrato reductasa por localidad y estaciones del año.

Anexo 2: Tabla de los factores medioambientales determinadas por el Multiparámetro Horiba W-23XD, para las tres localidades y estaciones del año

		pH	OD (g/l)
Pargua	Primavera	8,27	9,01
	Verano	8,29	7,19
	Otoño	8,36	4,94
	Invierno	8,5	5,9
Ilque	Primavera	8,21	8,89
	Verano	8,53	6,96
	Otoño	8,3	4,3
	Invierno	8,59	6,1
Metri	Primavera	8,38	8,63
	Verano	8,6	8,28
	Otoño	8,37	4,29
	Invierno	8,19	3,62