

**INFLUENCIA DE LA DEFICIENCIA DE NITRÓGENO Y
FÓSFORO EN LAS INTERACCIONES COMPETITIVAS ENTRE
Chlorella vulgaris Y *Scenedesmus acutus***

LINA MARÍA GONZÁLEZ GONZÁLEZ

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al
Titulo de MSc**

Director

GABRIEL GUILLOT MONROY

Profesor asociado del Departamento de Biología

Co-director

LUIS CARLOS MONTENEGRO

Profesor asociado del Departamento de Biología

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

2010

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la respuesta de las especies clorofíceas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* ante la deficiencia de los macronutrientes fósforo y nitrógeno y las implicaciones que esto tiene sobre sus interacciones competitivas. Se evaluó el crecimiento poblacional, la tasa de crecimiento, tiempo de duplicación y capacidad de carga de cada especie en monocultivos y en cultivos mixtos con deficiencia de nutrientes. Adicionalmente, se determinaron los coeficientes de competencia α y β con los cuales se diseñaron los modelos de competencia de Lotka-Volterra para cada tratamiento.

Los resultados revelaron a *Chlorella vulgaris* como el competidor más fuerte, y al nitrógeno como el nutriente que más afecta el crecimiento poblacional de las dos especies. Los modelos de competencia de Lotka-Volterra derivados de los experimentos plantean tres situaciones de competencia diferentes: exclusión competitiva de *S. acutus* por *C. vulgaris* en el tratamiento control, competencia interespecífica de las dos especies que lleva a la exclusión de alguna de las dos en los tratamientos con deficiencia de nitrógeno y competencia intraespecífica y coexistencia en el tratamiento con deficiencia de fósforo.

Palabras claves: nutrientes, competencia, exclusión competitiva, coexistencia, capacidad de carga, tasa de crecimiento, crecimiento poblacional, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus acutus*.

ABSTRACT

The response of the chlorophyceans species *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus* in relation with phosphorus and nitrogen macronutrients deficiency was studied, as well as the implications of that deficiency over their competitive interactions. Population growth, rate growth, duplication time and carrying capacity were evaluated for each species, using monocultures and mixed cultures with nutrients deficiency. In addition, the Lotka-Volterra competition models were designed for each treatment using the calculated α and β competitive coefficients.

The results showed *Chlorella vulgaris* was the strongest competitor and nitrogen is the nutrient with the highest effect on the population growth of both species. The evaluated Lotka-Volterra competition models showed three different situations: *S. acutus* competitive exclusion by *C. vulgaris* in the control treatment, interspecific competition leads to the exclusion of anyone in the nitrogen deficient treatments and intraspecific competition and coexistence in the phosphorus deficiency treatment.

Key words: nutrients, competition, competitive exclusion, coexistence, carrying capacity, rate growth, population growth, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus acutus*.

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN	7
JUSTIFICACIÓN	8
1. OBJETIVOS	9
1.1 Objetivo general.....	9
1.2 Objetivos específicos.....	9
2. MARCO TEÓRICO	10
2.1. Composición del fitoplancton	10
2.1.1. El género <i>Chlorella</i>	11
2.1.2. El género <i>Scenedesmus</i>	12
2.2. Crecimiento poblacional	12
2.3. Nutrientes	13
2.3.1. Nitrógeno.....	16
2.3.2. Fósforo	18
2.4. Competencia	19
2.4.1. Competencia por recursos	20
3. METODOLOGÍA	22
3.1. Organismos de estudio y condiciones de cultivo	22
3.2. Medios de cultivo	23

3.3. Diseño experimental	24
3.4. Crecimiento poblacional	26
3.5. Análisis estadístico	26
4. RESULTADOS	27
4.1. Experimento 1. Curvas de crecimiento	27
4.2. Experimento 2. Efecto de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en el crecimiento poblacional de <i>Chlorella vulgaris</i>	28
4.3. Experimento 3. Determinación de la concentración baja de nitrógeno	30
4.4. Experimento 4. Efecto de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en el crecimiento poblacional de <i>Chlorella vulgaris</i>	33
4.5. Experimento 5. Efecto de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en el crecimiento poblacional de <i>Scenedesmus acutus</i>	35
4.6. Experimento 6. Efecto de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Scenedesmus acutus</i>	38
4.6.1. Modelos de competencia.....	43
4.6.2. Efecto de la competencia en el crecimiento poblacional de <i>Chlorella vulgaris</i>	44
4.6.3. Efecto de la competencia en el crecimiento poblacional de <i>Scenedesmus acutus</i>	47
5. DISCUSIÓN.....	49
5.1. Efecto de la deficiencia de nutrientes en el crecimiento poblacional de <i>Chlorella vulgaris</i>	49
5.2. Efecto de la deficiencia de nutrientes en el crecimiento poblacional de <i>Scenedesmus acutus</i>	50

5.3. Efecto de la deficiencia de nutrientes en las interacciones competitivas entre <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Scenedesmus acutus</i>	52
6. CONCLUSIONES	57
7. RECOMENDACIONES	58
8. AGRADECIMIENTOS	58
BIBLIOGRAFÍA	59
ANEXOS	65

INTRODUCCIÓN

Los sistemas ecológicos deben ser comprendidos como entidades de continua interacción entre sus componentes bióticos y abióticos que direccionan la dinámica inherente a los procesos de intercambio de materia y energía. En este sentido, el estudio de los principales eslabones que conforman las redes tróficas propias de cada ecosistema es importante para comprender su funcionamiento y estabilidad ecológica.

Las redes tróficas describen los hábitos alimenticios y las interacciones bióticas que existen entre los organismos que forman una comunidad, son patrones de energía y materiales que algunas veces incorporan flujos entre organismos y el ambiente abiótico o biótico muerto incluyendo descomponedores y detritos (Cohen *et al.*, 1993).

Cuando se altera la abundancia de una población en un determinado nivel trófico, se puede producir un efecto de cadena en la abundancia de los demás eslabones de la red trófica, efecto que es conocido como cascada trófica. De esta forma, las cascadas se definen como efectos recíprocos predador-presa que alteran la abundancia, biomasa o productividad de una población, comunidad o nivel trófico a través de más de un eslabón en la cadena alimenticia (Pace *et al.* 1999).

En las cascadas tróficas se alternan controles “top down” desde los consumidores y “bottom up” desde los recursos, de un nivel trófico al siguiente (Begon *et al.*, 2006). De esta forma, las redes tróficas se estructuran respondiendo a las condiciones del medio en relación a las diferentes poblaciones que conforman una comunidad: la disponibilidad de recursos establece un control “bottom up” determinando la abundancia de las poblaciones que conforman las redes tróficas en los niveles más bajos, mientras que la abundancia de predadores ejerce controles “top down” hacia los niveles tróficos menores.

Las comunidades de fitoplancton constituyen uno de los eslabones más importantes en las redes tróficas de los ecosistemas acuáticos tanto continentales como marinos, ya que son la base de la mayor parte de las cadenas alimentarias acuáticas, razón por la cual, es importante estudiar la dinámica de las poblaciones que conforman esta comunidad en los diferentes cuerpos de agua.

Las redes tróficas microbianas han demostrado ser una porción clave en el ciclaje de nutrientes de ambientes acuáticos. El estudio de las redes tróficas en comunidades planctónicas sugiere que la composición de una comunidad de fitoplancton puede estar controlada por la disponibilidad de recursos (controles bottom up), por la depredación (controles top down) y por la interacción de ambos factores (Turner *et al.*, 1998; Sommer, 1998; Cullen, 1991; Cohen *et al.*, 1993).

En este documento se evalúa la disponibilidad de nutrientes como factor modelador de las comunidades fitoplanctónicas y las diferentes respuestas que pueden presentar las poblaciones frente a variaciones en la disponibilidad de los macronutrientes fósforo y nitrógeno. Para esto se evaluó el crecimiento de dos poblaciones algales de las especies *Scenedesmus acutus* y *Chlorella vulgaris* sometidas a la competencia por estos recursos.

JUSTIFICACIÓN

Existe un creciente interés en el estudio de la transferencia de energía en las redes tróficas planctónicas debido a la importancia ecológica y comercial que tienen los ecosistemas acuáticos. Particularmente, el estudio de las interacciones que se presentan en los niveles tróficos más bajos de la cadena alimenticia es de vital importancia para entender una gran variedad de procesos que determinan el equilibrio de estos ecosistemas.

El comportamiento de la dinámica de las poblaciones ante las perturbaciones ambientales es clave para entender la estructura de las comunidades y el funcionamiento de las redes tróficas.

En este contexto, el estudio de los principales agentes que regulan la estructura de las comunidades fitoplanctónicas como es la disponibilidad de recursos, juega un papel importante para el avance del conocimiento de las redes tróficas planctónicas. Por tal razón, es importante asumir investigaciones orientadas hacia el estudio de las posibles respuestas de las poblaciones algales ante la deficiencia de recursos fundamentales como lo son el fósforo y el nitrógeno, ya que las comunidades fitoplanctónicas afectan directa o indirectamente todos los niveles tróficos de los ecosistemas acuáticos.

El nitrógeno y el fósforo son los principales nutrientes que afectan el crecimiento de las microalgas, por lo tanto, evaluar la manera en que su disponibilidad (deficiencia) dirige interacciones competitivas en las comunidades de fitoplancton es importante para predecir la composición de las comunidades en un determinado nivel de trofía.

Teniendo en cuenta que las especies que se evaluaron son de reconocido valor científico ya que han sido ampliamente estudiadas y utilizadas en procesos de biorremediación, bioindicación y como productoras de metabolitos secundarios, el conocimiento básico generado en esta investigación es de gran utilidad y brinda información importante para continuar con estudios relacionados.

1. OBJETIVOS

1.1 . Objetivo General

Evaluar el efecto de la deficiencia de los macronutrientes nitrógeno y fósforo, en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*.

1.2 . Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de la deficiencia de nitrógeno en el crecimiento poblacional de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*.
- Evaluar el efecto de la deficiencia de fósforo en el crecimiento poblacional de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*
- Determinar la concentración de nutrientes que favorece el crecimiento poblacional de cada especie, en un ambiente competitivo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Composición del fitoplancton

Dentro de los hábitats acuáticos, el plancton constituye el grupo de organismos pequeños o microscópicos que son nadadores relativamente débiles y por lo tanto se encuentran a merced de corrientes y oleaje. El fitoplancton es de vital importancia ya que constituye la base de las cadenas alimentarias acuáticas (Solomon *et al.*, 1996).

Conformado por cianobacterias y algas flotantes, el fitoplancton incluye una gran diversidad de formas, funciones y estrategias adaptativas (Reynolds, 2006). Además de constituir la fuente alimenticia básica en las redes tróficas de los ecosistemas acuáticos, también genera el oxígeno necesario para el metabolismo de los organismos consumidores (Lee, 2008).

La composición de las comunidades que constituyen el fitoplancton es muy variable, las condiciones físico-químicas del medio y factores como la presión de herbivoría y la competencia por recursos, determinan el tipo de especies que pueden ocupar determinado nicho, lo cual se explica por las diferentes estrategias de crecimiento de las algas, sus diferentes morfologías (tamaño, forma, etc.), movilidad y su metabolismo (fotosíntesis y utilización de los recursos) (Rodrigo *et al.*, 2007).

El mantenimiento de una población, expresada en número de individuos o en biomasa, se puede considerar como una medida del éxito de la ocupación de cierto ambiente por una especie. Cada especie alcanza una densidad máxima en puntos particulares del espacio o en diferentes momentos de tiempo, decreciendo su abundancia al alejarse de las condiciones que se pueden considerar óptimas (Margalef, 1983).

La luz y la disponibilidad de nutrientes son los principales factores que determinan la producción celular, mientras que las pérdidas en una población responden a la presión de herbivoría y a la sedimentación (Sze, 1998).

La presencia o ausencia de determinadas especies o grupos taxonómicos algales dentro de una comunidad fitoplanctónica, responde entonces a una serie de factores, dentro de los cuales se destacan la disponibilidad de luz y de nutrientes (particularmente de

fósforo, nitrógeno y silicio), la temperatura, el pH, la salinidad y la turbulencia (Sigeo, 2005).

En este orden de ideas, se puede establecer la diversidad de un ecosistema como una respuesta a la variabilidad de las condiciones medioambientales. De esta forma, una comunidad de fitoplancton presentará mayor diversidad en ambientes donde la mayor cantidad de especies puede sobrevivir cerca de su óptimo debido a un amplio rango de variación ambiental, a pesar de encontrar pocos individuos de cada especie; mientras que en ecosistemas con condiciones más extremas (alejadas del óptimo para la mayoría de especies), se presentará dominancia de unas pocas especies con un alto número de individuos (Lampert & Sommer, 2007). En consecuencia, la composición del fitoplancton tiene un importante valor diagnóstico en el establecimiento del estado trófico de los ecosistemas acuáticos, donde la disponibilidad de nutrientes se presenta como un factor determinante para la conformación de las distintas comunidades.

Uno de los grupos fitoplanctónicos más ampliamente distribuidos en las aguas continentales es el orden de las Chlorococales, algas verdes de la clase Chlorophyceae. Este grupo está conformado por células solitarias, agregados celulares y colonias bien definidas sin ninguna clase de flagelos en su fase vegetativa (Sze, 1998). Dos de los géneros más representativos y abundantes en el fitoplancton que presenta este grupo son los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*.

2.1.1. El género *Chlorella*

Este género está ampliamente distribuido en aguas dulces y saladas, y también en el suelo. *Chlorella* fue la primera alga aislada y llevada a cultivo axénico, fue el microbiólogo holandés Beijerinck quien lo consiguió en 1890 (Wehr & Sheath, 2003). Las células son esféricas, ovoides o elipsoides, solitarias o agrupadas. El protoplasto consta de un cloroplasto en forma de copa que puede contener o no un pirenoide, y de un citoplasma central incoloro, en el cual está inmerso el núcleo diminuto (Sze, 1998).

La reproducción asexual se presenta por medio de autosporas. En la reproducción asexual, las células maduras se dividen en porciones cada vez menores, hasta que se obtienen fragmentos uninucleados, cada uno de los cuales actúa como una zoospora (Dillard, 1989). *Chlorella vulgaris* es una de las especies de microalgas más estudiada

por su fácil cultivo, rápido crecimiento y su alto potencial en la producción de metabolitos secundarios.

2.1.2. El género *Scenedesmus*

Scenedesmus es un alga cenobial muy común, que frecuentemente se presenta casi como un cultivo puro en el plancton. Las células en la colonia se organizan en múltiplos de dos, las especies más comunes presentan cuatro u ocho células (Lee, 2008). Las células son elipsoides, ovoides o en forma de media luna, la pared celular es lisa y no presenta espinas. El cloroplasto es parietal y usualmente tiene un pirenoide. Este es probablemente el género de Chlorococcales más comúnmente reportado y frecuentemente abundante en aguas ricas en nutrientes, especialmente con un alto contenido de nitrógeno (Wehr & Sheath, 2003).

La reproducción, que en muchas especies es totalmente asexual, se realiza mediante la formación de autocolonias en el interior de cada célula adulta. Dichas autocolonias quedan en libertad por ruptura de la pared de la célula madre y después alcanzan gradualmente el tamaño y la ornamentación característica de la especie (Lee, 2008). Dentro de este género, *Scenedesmus acutus* es una especie ampliamente estudiada y cultivada principalmente como fuente de alimento en la industria de la piscicultura.

2.2. Crecimiento poblacional

El crecimiento de una población que se encuentra limitada por recursos está relacionado con su tasa de reproducción, los microorganismos generalmente se dividen una vez han doblado su tamaño celular. Por lo tanto, la limitación en el crecimiento se puede estudiar midiendo el incremento en el número de individuos (Lampert & Sommer, 2007).

El crecimiento de una población en cultivo, es una medida del incremento de la población en número de individuos a través del tiempo, el cual puede ser determinado por la tasa de crecimiento (μ):

$$\mu = (\ln N_{t_1} - \ln N_{t_0}) / (t_1 - t_0)$$

donde N_{t_1} es el número de células en el tiempo t_1 y N_{t_0} es el número de células al inicio del experimento (Oh-Hama *et al.*, 1992).

2.3. Nutrientes

Las células algales requieren elementos en proporciones relativamente fijas para poderse reproducir (Hecky & Kilham, 1988). La diversidad de especies en un ambiente acuático se encuentra determinada por la proporción que existe entre los nutrientes disponibles en el medio y los requerimientos nutricionales de cada especie. De esta forma, diferentes especies creciendo en una misma comunidad pueden estar limitadas por diferentes recursos (Le Rouzic & Bertru, 1997).

La composición química de las algas se encuentra directamente determinada por la toma de material inorgánico (cationes y aniones) del medio acuático circundante. La asimilación de nutrientes inorgánicos por las algas es importante ya que estos organismos representan la principal fuente de nutrientes en ecosistemas acuáticos continentales y marinos. La entrada de químicos inorgánicos en las células algales constituye la principal ruta de entrada en la cadena alimenticia con la subsecuente transformación en biomasa de herbívoros y carnívoros (Sigeo, 2005).

Los nutrientes inorgánicos pueden dividirse en dos grupos: macronutrientes, requeridos en grandes cantidades y micronutrientes, requeridos en concentraciones muy bajas. Los macronutrientes (incluye compuestos de nitrógeno, fósforo, silicio y azufre) son componentes fundamentales de macromoléculas y tienen un papel clave en la estructura celular. El silicio difiere de los demás macronutrientes por tener un limitado rol biológico, su importancia es estructural (no metabólica) y limitada al grupo de las diatomeas y de las crisofíceas (silicoflagelados) ya que necesitan de grandes concentraciones para la formación de sus frústulos. Por su parte, los micronutrientes tienen un papel metabólico específico en la fisiología de las microalgas. (Barsanti & Gualtieri, 2006; Sigeo, 2005; Sze, 1998; Lagus, 2009).

El concepto de factores limitativos desarrollado por Liebig es conocido como la ley del mínimo, la cual establece que el crecimiento es limitado por aquel nutriente cuya concentración esté cerca al mínimo nivel requerido. Cuando la concentración del nutriente limitante se incrementa, aumenta el crecimiento hasta que otro nutriente llega

a ser limitante (Graham & Wilcox, 2000). Conforme la población celular aumenta, más del nutriente limitante llega a ser incorporado en las células y menos está disponible para soportar crecimiento posterior. Por lo tanto, si no hay un reabastecimiento del nutriente, su concentración declina hasta que eventualmente es muy baja para soportar aumentos de biomasa y la población llega a su máximo.

El modelo de Droop asume que la tasa de crecimiento microalgal es una función de las reservas intracelulares del nutriente limitante: cuando está disponible, la abundancia del nutriente determina su tasa de asimilación y su almacenamiento intracelular (Droop, 1973). Si hay reproducción continua, la cantidad de recurso contenido en cada organismo disminuye (cuota celular). La reducción de la cuota celular lleva a un decremento en la tasa de crecimiento hasta que alcanza su valor mínimo, momento en el cual no puede haber más crecimiento (fase estacionaria) (Lampert & Sommer, 2007). De esta forma, el almacenamiento intracelular de nutrientes no limitantes puede jugar un papel significativo en la regulación del crecimiento de la comunidad algal (Le Rouzic & Bertru, 1997).

Por otra parte, la tasa a la cual los organismos consumen los nutrientes depende de la disponibilidad de estos, así como de la habilidad misma del organismo para consumirlos. Aún si un nutriente es muy abundante, existen límites en la tasa a la cual un organismo puede consumirlos. Los microorganismos tienen un número limitado de sistemas de transporte en su pared celular, limitando la cantidad de recursos disueltos que pueden ser transportados al interior de la célula por unidad de tiempo (Lampert & Sommer, 2007). Sin embargo, varios grupos algales pueden desarrollar una interesante adaptación para asegurar la disponibilidad de nutrientes mediante la asimilación excesiva de nutrientes usualmente limitantes durante periodos en que se presenten en altas concentraciones (Brönmark & Hansson, 2005).

La ecuación de Michaelis-Menten frecuentemente es utilizada para describir la relación entre crecimiento y concentración de nutrientes: $\mu = \mu_{\max}(S/(S + K))$, donde μ es la tasa de crecimiento, μ_{\max} es la máxima tasa de crecimiento, S es la concentración del nutriente limitante y K la concentración que permite la mitad de la máxima tasa de crecimiento, conocida como la constante de saturación media (Titman, 1976).

Por otra parte, Monod (1950) estableció un modelo matemático derivado de la ecuación de cinética química de Michaelis-Menten según el cual la tasa de crecimiento es dependiente de la disponibilidad externa del nutriente y asume que el crecimiento es equivalente a la velocidad de incorporación del nutriente: $\mu = \mu_{\max} S/(K_s+S)$, donde μ_{\max} es la máxima tasa de crecimiento cuando hay saturación del recurso, K_s es la constante de saturación media (masa/volumen) y S es la concentración del nutriente limitante (masa/volumen) que permanece en solución (Lampert & Sommer, 2007).

Tanto la asimilación de nutrientes como el crecimiento celular pueden variar con factores como la luz, el pH y la temperatura. La asimilación de un nutriente, particularmente aquel que es usualmente limitante como el fósforo, responde a su gradiente de energía libre entre el interior y el exterior de la célula. Por lo tanto, cualquier condición ambiental que limite la energía celular puede limitar la asimilación de nutrientes y como consecuencia el crecimiento celular. (Stevenson *et al.*, 1996; Tilman *et al.*, 1982).

Por otra parte, el movimiento del agua, de gran relevancia para algas perifíticas, puede mejorar significativamente la asimilación de nutrientes para algunas especies. El mecanismo para este fenómeno se basa en que el movimiento del agua disminuye la capa laminar alrededor del alga, aumentando de esta forma la difusión de nutrientes. Esto solo es cierto, en la medida en que exista un gradiente de concentración del nutriente entre el perifiton y el medio circundante (Stevenson *et al.*, 1996).

Además de la disponibilidad de nutrientes, la proporción celular en la cual estos son requeridos por las especies es determinante en la distribución y composición de las comunidades algales. La proporción a la cual ningún nutriente es limitante se define como la proporción óptima, la cual difiere entre diferentes especies. (Stevenson *et al.*, 1996).

Los nutrientes están presentes en las células algales en una proporción específica, conocida como la proporción de Redfield, que determina los requerimientos nutricionales de cada especie y cuyo valor depende de las condiciones bajo las cuales las especies crecen y compiten. Por consiguiente, la composición de especies en un determinado ecosistema estará determinada no solo por la disponibilidad de nutrientes sino también por su adecuada proporción, ya que los cambios en la proporción de

nutrientes generan cambios en las comunidades de fitoplancton y por consiguiente en las redes tróficas (Barsanti & Gualtieri, 2006).

Diferentes combinaciones de nutrientes tienen diferentes efectos en las comunidades fitoplanctónicas porque no todas las especies responden de la misma forma en su tasa de crecimiento ante la deficiencia de diferentes recursos (Tilman *et al.*, 1982).

La proporción óptima específica para cada especie puede variar dependiendo de varios factores como la tasa de crecimiento, temperatura, luz o disponibilidad de CO₂ (Lagus, 2009). Así mismo, las especies difieren en sus requerimientos de fósforo y nitrógeno y en la cinética de asimilación de nutrientes, por lo cual presentan diferentes proporciones óptimas.

En general, el fitoplancton requiere una proporción molar aproximada de 106:16:1 en átomos de carbono, nitrógeno y fósforo para el balance adecuado de los procesos fisiológicos de crecimiento. Desviaciones de esta proporción pueden sugerir limitación de nutrientes (Lagus, 2009).

De esta forma, la relación N:P es un valor que permite conocer el estado nutricional del fitoplancton, valores mayores a 20 indican una deficiencia en fósforo mientras que valores menores de 10, deficiencia en nitrógeno (Reynolds, 1984; Bulgakov & Levich, 1999; Smith & Bennett, 1999; Marinho & Moraes, 2002, Stevenson *et al.*, 1996).

2.3.1. Nitrógeno

El nitrógeno es uno de los componentes esenciales de muchas biomoléculas clave, como aminoácidos y nucleótidos. La síntesis de proteínas normalmente depende de un adecuado suministro de nitrógeno (Sze, 1998). Un incremento en la disponibilidad de nitrógeno inorgánico generalmente deriva en un incremento de la abundancia de productores primarios. Sin embargo, altos niveles de nitrógeno inorgánico que no pueden ser asimilados por los sistemas ecológicos pueden causar efectos adversos en los organismos menos tolerantes (Camargo & Alonso, 2006).

El nitrógeno se presenta de diferentes formas en el agua, incluyendo nitrógeno diatómico (N₂), amonio (NH₄⁺), nitrito (NO₂⁻), nitrato (NO₃⁻), otros óxidos de nitrógeno y nitrógeno en compuestos orgánicos. El amonio normalmente es bajo en aguas

oxigenadas donde las bacterias lo oxidan a nitrato (Sze, 1998). En hábitats naturales, las principales fuentes de nitrógeno son nitratos y sales de amonio, pero en aguas altamente contaminadas los compuestos orgánicos nitrogenados llegan a ser importantes y puede haber una relación entre algunos de los productos de excreción animal (amonio, urea, ácido úrico y aminoácidos) y el crecimiento de ciertos flagelados (Wetzel, 1981).

En medios de cultivo, el nitrógeno se suple usualmente en la forma de sales de amonio o nitratos ya que son estas las principales formas de nitrógeno que usan las microalgas, aunque la mayoría puede utilizar también nitritos, urea y otras formas de nitrógeno orgánico. El nitrógeno es aceptado en las vías metabólicas de las microalgas en forma de amonio, mientras que la asimilación de nitrato requiere de la transformación de nitrato a nitrito y luego a amonio mediante cuatro pasos de reducción que requieren energía, resultando más favorable para las algas usar el amonio cuando éste está disponible (Sze, 1998).

De esta forma, cuando hay suficiente cantidad de amonio y nitrato, la mayoría de las algas utilizan principalmente el amonio y el nitrato no es utilizado hasta que los iones de amonio han desaparecido. Esta preferencia está relacionada con el control de asimilación de nitrato. En general, la asimilación de amonio causa la retroalimentación, inhibición y represión de las enzimas responsables para la reducción del nitrato (Stewart, 1974).

A nivel bioquímico, la limitación de nitrógeno influye directamente en la formación de aminoácidos, lo cual a su vez limita la traslación del mRNA y por lo tanto se reduce la síntesis de proteínas. Por otra parte, la eficiencia del fotosistema II (PSII) disminuye inicialmente como una consecuencia de la disipación térmica de la energía de excitación absorbida en el lecho pigmentario, derivando en una reducción de la tasa de fotosíntesis, lo cual a su vez lleva a una reducción en la tasa de respiración (Barsanti & Gualtieri, 2006).

Usualmente el nitrógeno es limitante en el océano, pero es menos común que se presente como un nutriente limitante en aguas continentales, en donde el fósforo suele ser el nutriente limitante (Sze, 1998).

2.3.2. Fósforo

El fósforo juega un papel importante en la mayoría de procesos celulares, especialmente los que están implicados en la generación y transformación de energía metabólica, por lo que es indispensable para el crecimiento y reproducción de las microalgas (Stewart, 1974).

En bajas concentraciones, el fósforo puede limitar el crecimiento de algunas especies, sin embargo otras absorben fósforo en exceso y pueden sobrevivir por algún tiempo en aguas deficientes en fosfato (Round, 1973). Muchos grupos de algas tienen la habilidad de producir y almacenar polifosfatos en pequeñas vacuolas que pueden romperse por actividad enzimática y liberar moléculas de fosfato para ser utilizadas en el metabolismo celular (Brönmark & Hansson, 2005).

El fósforo total que se presenta en el medio acuático consiste en fósforo inorgánico disuelto, compuestos orgánicos de fósforo disuelto y fósforo orgánico en partículas suspendidas (Sze, 1998). El fosfato soluble está presente en pequeñas cantidades en aguas naturales, a excepción de algunas aguas contaminadas por ciertos materiales orgánicos (Round, 1973).

Mientras que las algas pueden utilizar el nitrógeno en diferentes formas, el fósforo casi exclusivamente debe ser asimilado en forma de fosfatos y es la concentración de este compuesto la que determina la tasa de crecimiento algal. La máxima biomasa algal que puede ser soportada por la cantidad total de fósforo presente depende de la cantidad de ortofosfatos que llega a estar disponible para las células en crecimiento (Sze, 1998, Brönmark & Hansson, 2005).

En el caso del fósforo, la limitación del crecimiento algal se produce debido a una limitación de la síntesis de ácidos nucleicos, la cual puede darse a nivel de la replicación del genoma o al nivel de la síntesis de RNA. La limitación puede afectar la conversión de energía fotosintética reduciendo la tasa de síntesis de proteínas en el aparato fotosintético, resultando en un efecto negativo en el proceso de fotosíntesis. Por otra parte, al presentarse altas tasas de crecimiento aumenta la demanda de RNA y particularmente de RNA ribosomal, por lo tanto la deficiencia de P deriva en menores tasas de crecimiento. La inhabilidad de producir ácidos nucleicos limita la división

celular generando un incremento en el volumen celular (Barsanti & Gualtieri, 2006; Hessen *et al.*, 2002)

Una respuesta más inmediata a la limitación de fósforo se da en la tasa de síntesis y regeneración de sustratos en el ciclo de Calvin-Benson, reduciendo así la tasa de utilización de luz para fijación de carbono. Las células pueden sufrir también un decremento en los fosfolípidos de membrana (Barsanti & Gualtieri, 2006).

Una razón por la cual las microalgas en aguas continentales están generalmente limitadas por fósforo es que el agua de escorrentía de cuencas no contaminadas generalmente tiene una proporción N:P de 30, sugiriendo que el fósforo es suministrado en menores cantidades que el nitrógeno. Debido a que los cuerpos de agua continentales son mucho más pequeños y superficiales que los océanos, están más directamente afectados por el impacto de tierras, ríos y cuencas que los rodean. Otra razón para esta diferencia entre aguas marinas y continentales puede ser que las primeras tienen altas concentraciones de azufre y bajas concentraciones de hierro. Esto lleva a una mayor captación de hierro por sulfuros en aguas marinas, esto es, menos moléculas de fosfato forman precipitados con hierro y en cambio permanecen en solución donde están disponibles para los organismos (Brönmark, C & Hansson, 2005).

2.4. Competencia

La competencia es una interacción en la cual un organismo consume un recurso que puede estar disponible y ser consumido por otro. Un organismo limita el recurso disponible para otro y como consecuencia se reduce el crecimiento, genera menor descendencia o se presenta un alto riesgo de mortalidad (Begon, 2006).

La competencia por recursos como luz y nutrientes inorgánicos (silicio, fosfatos y nitratos) es un importante factor determinante en la habilidad de diferentes poblaciones de especies de crecer y dominar el ambiente acuático. En casos en que se presenta la competencia por más de un nutriente, puede ocurrir un cambio en la dominancia algal acompañado de un cambio del balance de nutrientes (Sigeo, 2005).

Muchos organismos acuáticos tienen requerimientos similares y por lo tanto se espera encontrar competencia por deficiencia de recursos si las condiciones físicas permanecen

uniformes durante un buen periodo de tiempo. El tiempo requerido para que la competencia llegue a ser importante dependerá de la tasa de crecimiento y reproducción del potencial competidor, así como de la tasa de suministro relativo de recursos (Dodds, 2002).

Solo organismos que tienen un recurso común competirán, pero solo en situaciones en que exista deficiencia de dicho recurso. Si el recurso es tan abundante que no constituye una limitación para los consumidores, no se presentarán interacciones competitivas. Esto puede suceder, por ejemplo, cuando las poblaciones se mantienen en bajas densidades debido a otros factores como depredación o disturbios abióticos (Brönmark & Hansson, 2005).

El principio de exclusión competitiva establece que si dos o más especies compiten por el mismo recurso en el mismo hábitat solo una especie sobrevivirá. De acuerdo a esto, solo una especie puede ocupar un nicho específico, aunque puede haber solapamiento de nichos fundamentales (Lampert & Sommer, 2007).

El primer modelo matemático que se planteó para describir las relaciones competitivas se derivó de una expansión de la ecuación logística del crecimiento. El modelo de Lotka-Volterra extiende el efecto del incremento de la densidad poblacional a especies compitiendo por recursos y establece las siguientes ecuaciones para dos poblaciones:

$$1. \quad dN_1/dt = r_{\max 1} N_1(K_1 - N_1 - \alpha N_2)/K_1$$

$$2. \quad dN_2/dt = r_{\max 2} N_2(K_2 - N_2 - \beta N_1)/K_2$$

Donde N indica el número de individuos de cada especie y K sus respectivas capacidades de carga, r_{\max} la tasa de crecimiento cuando la población es cercana a cero y los coeficientes α y β indican el efecto de una especie sobre otra (Lampert & Sommer, 2007).

2.4.1. Competencia por recursos

La disponibilidad de recursos ha sido estudiada como uno de los principales factores que regulan las poblaciones fitoplanctónicas. Muchas de las investigaciones se han

centrado en determinar el potencial competitivo de las especies frente a variaciones en la concentración de nutrientes fundamentales.

Frecuentemente existe un “trade-off” entre la habilidad de crecer bien con una baja concentración de nutrientes y la habilidad de crecer bien con una alta concentración de nutrientes. Si un organismo puede crecer bien con una baja concentración de nutrientes, y el segundo lo hace con una alta concentración de nutrientes, serán competitivamente dominantes en diferentes concentraciones del recurso. Si sus habilidades competitivas son contrarias para un segundo nutriente, entonces serán capaces de coexistir bajo ciertas relaciones de nutrientes debido a que tienen nutrientes limitantes diferentes (Dodds, 2002).

Así por ejemplo, Titman (1976) estudió la competencia establecida entre dos especies de diatomeas continentales potencialmente limitadas por fosfato y silicato, determinando que la coexistencia puede ocurrir sólo cuando la tasa de crecimiento de cada especie es limitada por diferentes recursos.

En 1977, Tilman publicó los resultados de 76 experimentos de competencia por recursos entre *Asterionella formosa* y *Cyclotella meneghiniana*, con los cuales pudo concluir que *Asterionella* es dominante en condiciones de limitación por fósforo, mientras que *Cyclotella* domina bajo deficiencia de silicatos. El mismo autor estudió la competencia por recursos (fosfatos y silicatos) entre cuatro especies de diatomeas, concluyendo que las especies con los requerimientos más bajos de un determinado recurso fueron las competidoras superiores cuando eran sometidas a la deficiencia de dicho recurso (Tilman, 1981).

Por su parte, Fujimoto *et al.* (1997), estudiaron las habilidades competitivas de las cianobacterias *Microcystis aeruginosa* y *Phormidium tenue* sometidas a variaciones en la concentración de nutrientes (nitrógeno y fósforo) y temperatura, concluyendo que *M. aeruginosa* desplaza a *P. tenue* en proporciones bajas de N:P y altas temperaturas, mientras que *P. tenue* desplaza a *M. aeruginosa* en proporciones altas de N:P y bajas temperaturas, lo cual sugiere que la proporción de estos nutrientes y la temperatura son importantes factores ambientales que afectan la abundancia relativa de estas dos especies.

Así mismo, Sommer (1998) estudió la formación de diferentes ensamblados fitoplanctónicos en función de la disponibilidad de silicio y nitrógeno y encontró que la composición de fitoplancton estuvo dirigida por la competencia por nutrientes en el estado inicial de los cultivos. Razones medias de Si:N resultaron en una mezcla de dinoflagelados y diatomeas, mientras que razones altas aumentaron la concentración de diatomeas y razones bajas generaron una mayor concentración de dinoflagelados.

En 1999, Cottingham estudió las alteraciones antropogénicas que generan un aumento en la descarga de nutrientes y la estructura de las redes tróficas como principales agentes estresantes que afectan el fitoplancton de lagos, encontrando que la estructura de las redes tróficas puede influir en la extensión en que las poblaciones fitoplanctónicas de diferentes tallas responden al enriquecimiento de nutrientes, concluyendo que el tamaño es un excelente descriptor de los cambios en las comunidades fitoplanctónicas.

Por su parte, Passarge *et al.* (2006) desarrollaron un modelo de competencia combinando competencia por luz y nutrientes para cinco especies fitoplanctónicas, con lo cual pudieron demostrar que la competencia por luz y nutrientes puede ser predicha de manera muy precisa sobre un amplio rango de productividades.

Así mismo, Rodrigo *et al.* (2007), estudiaron la influencia de la concentración de nutrientes sobre la estructura y la función de una comunidad algal, determinando que la competencia por recursos es uno de los principales factores que afectan el ensamblado de microalgas y concluyeron que la oligotrofia reduce la biomasa de productores primarios pero aumentan la diversidad relajando la competencia.

3. METODOLOGÍA

3.1. Organismos de estudio y condiciones de cultivo

Se utilizaron las especies *Scenedesmus acutus* (cepa LAUN 001) y *Chlorella vulgaris* (cepa LAUN 002) para los experimentos, por ser dos especies de microalgas cosmopolitas de agua dulce de fácil cultivo y rápido crecimiento. Las cepas fueron suministradas por el Laboratorio de Cultivo de Algas del Departamento de Biología de

la Universidad Nacional de Colombia, en donde se desarrollaron todos los experimentos.

Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 23°C, iluminación artificial con lámparas fluorescentes de 39 W, 1400 lux y con una intensidad lumínica de $60 \mu\text{em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Se estableció un sistema de aireación con filtro de 0.2 μm , que mantuvo los cultivos en agitación continua y un fotoperiodo de 16 horas luz/ 8 horas oscuridad.

3.2. Medios de cultivo

Todos los cultivos se mantuvieron en medio BBM (Tabla 1) con variaciones en las concentraciones estándar de nitrógeno y fósforo para los tratamientos de deficiencia de nutrientes.

Tabla 1. Medio Basal de Bold (BBM) (Andersen, 2005)

Componente final	Concentración final en el medio (M)
Macronutrientes	
NaNO ₃	2.94×10^{-3}
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.70×10^{-4}
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3.04×10^{-4}
K ₂ HPO ₄	4.31×10^{-4}
KH ₂ PO ₄	1.29×10^{-3}
NaCl	4.28×10^{-4}
Solución EDTA alcalina	
EDTA	1.71×10^{-4}
KOH	5.53×10^{-4}
Solución ácida de hierro	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	1.79×10^{-5}
H ₂ SO ₄	
Solución de boro	
H ₃ BO ₃	1.85×10^{-4}

Solución de metales traza

ZnSO ₄ · 7H ₂ O	3.07 x 10 ⁻⁵
MnCl ₂ · 4H ₂ O	7.28 x 10 ⁻⁶
MoO ₃	4.93 x 10 ⁻⁶
CuSO ₄ · 5H ₂ O	6.29 x 10 ⁻⁶
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	1.68 X 10 ⁻⁶

3.3. Diseño experimental

Para todos los experimentos se estableció un sistema de cultivo batch. La unidad experimental fue una botella de 500 mL con un volumen de cultivo de 200 mL.

Experimento 1. Curvas de crecimiento

Inicialmente se determinaron las curvas de crecimiento de cada especie para identificar el momento en el cual las células se encontraban en fase exponencial y de esta forma se estableció la duración de los experimentos en diez días, teniendo en cuenta que las dos especies alcanzaron la fase estacionaria. Se desarrolló un diseño completamente al azar con tres replicas por especie.

Experimento 2. Efecto de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en el crecimiento poblacional de *Chlorella vulgaris*

Inicialmente, las concentraciones de nitrógeno y fósforo para los experimentos de deficiencia de nutrientes se establecieron con base en lo reportado por Rodrigo *et al.*, (2007) y de esta forma se establecieron cuatro tratamientos (Tabla 2). Se desarrolló un diseño completamente al azar con tres réplicas por tratamiento.

Tabla 2. Concentraciones de nitrógeno y fósforo utilizadas para el experimento 2.

Tratamiento	Concentración de nitrógeno (g/L)	Concentración de fósforo (g/L)
1. Control	4.12 x 10 ⁻²	5.34 x 10 ⁻²
2. Deficiencia de N	1.52 x 10 ⁻⁴	5.34 x 10 ⁻²
3. Deficiencia de P	4.12 x 10 ⁻²	6.2 x 10 ⁻⁶
4. Deficiencia de N y P	1.52 x 10 ⁻⁴	6.2 x 10 ⁻⁶

Experimento 3. Determinación de la concentración baja de nitrógeno

En el primer experimento con *Chlorella vulgaris* se observó que la concentración de nitrógeno no era adecuada para los experimentos ya que se limitaba demasiado el crecimiento y por lo tanto se realizó un experimento adicional para determinar la concentración de nitrógeno adecuada para las dos especies, para lo cual se evaluaron concentraciones de nitrógeno correspondientes al 0,4 %, 1 % y 3 % de la concentración estándar en medio BBM.

Para cada una de las especies se desarrolló un diseño completamente al azar con tres réplicas por tratamiento (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones de nitrógeno utilizadas para el experimento 3.

Tratamiento	Concentración de nitrógeno (g/L)
1. 0,4 % de la concentración en medio BBM estándar	1.52×10^{-4}
2. 1 % de la concentración en medio BBM estándar	4.12×10^{-4}
3. 3 % de la concentración en medio BBM estándar	1.24×10^{-3}

Experimentos 4 y 5. Determinación del efecto de la deficiencia de nutrientes en monocultivos de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*

Una vez determinada la concentración de nitrógeno se realizó un experimento en monocultivo con cada especie para evaluar el efecto de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en el crecimiento de cada población. Se desarrolló un diseño experimental completamente al azar, con arreglo factorial de 2 x 2, tomando como primer factor dos concentraciones de nitrógeno y como segundo factor dos concentraciones de fósforo, para un total de cuatro tratamientos (Tabla 4). Se realizaron tres réplicas por tratamiento.

Experimento 6. Determinación del efecto de la deficiencia de nutrientes en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*

Se estableció un inóculo inicial de 5 mL de cada especie con la misma densidad celular (3.6×10^6 células/mL). Se desarrolló un diseño experimental completamente al azar, con arreglo factorial de 2 x 2, tomando como primer factor dos concentraciones de

nitrógeno y como segundo factor dos concentraciones de fósforo, para un total de 4 tratamientos (Tabla 4). Se realizaron 3 replicas por tratamiento.

Tabla 4. Concentraciones de nitrógeno y fósforo utilizadas para los experimentos 4, 5 y 6

Tratamiento	Concentración de nitrógeno (g/L)	Concentración de fósforo (g/L)
1. Control	4.12×10^{-2}	5.34×10^{-2}
2. Deficiencia de N	1.2×10^{-3}	5.34×10^{-2}
3. Deficiencia de P	4.12×10^{-2}	6.2×10^{-6}
4. Deficiencia de N y P	1.2×10^{-3}	6.2×10^{-6}

3.4. Crecimiento poblacional

En todos los experimentos se tomaron diariamente 0.5 mL de cultivo y se fijaron con 0.1 mL de lugol. Posteriormente se determinó el crecimiento de las poblaciones algales mediante conteos en cámara de Neubauer. Con estos datos se graficaron las curvas de crecimiento poblacional correspondientes para cada uno de los tratamientos. Se realizó una comparación de las curvas de crecimiento de cada especie con y sin competencia basada en el porcentaje de número de células en cada tiempo en relación a la población máxima alcanzada en cada caso (100%). Las curvas de crecimiento se analizaron de manera descriptiva.

Adicionalmente, basándose en el crecimiento poblacional de cada especie en monocultivos y cultivos en competencia se determinaron los coeficientes de competencia α y β con los cuales se diseñaron los modelos de competencia de Lotka-Volterra para cada tratamiento.

3.5. Análisis estadístico

Se hicieron análisis de varianza (ANOVA) a una vía con nivel de significancia de 0.05 para determinar diferencias significativas entre tratamientos tomando como variables respuesta la tasa de crecimiento y la capacidad de carga para cada especie con y sin competencia. Se probó la normalidad de los datos y la homogeneidad de varianzas para cada variable respuesta con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene respectivamente ($\alpha = 0.05$). Se realizaron pruebas *post hoc* de Tukey para distinguir

entre medias diferentes que permitieran agrupar conjuntos de tratamientos con un $\alpha \leq 0.05$.

Se realizaron análisis de varianza de dos vías para analizar simultáneamente los efectos de las concentraciones de fósforo y nitrógeno como fuentes de variación en la tasa de crecimiento y la capacidad de carga de cada especie ($\alpha = 0.05$).

Adicionalmente se realizaron análisis de varianza de dos vías siendo los factores la concentración de nutrientes y la competencia para determinar diferencias estadísticamente significativas en la respuesta de cada especie en la tasa de crecimiento y la capacidad de carga ($\alpha = 0.05$).

Para las curvas de crecimiento se realizó estadística descriptiva con base en las desviaciones estándar.

Para todos los cálculos se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 17.0.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1. Curvas de crecimiento

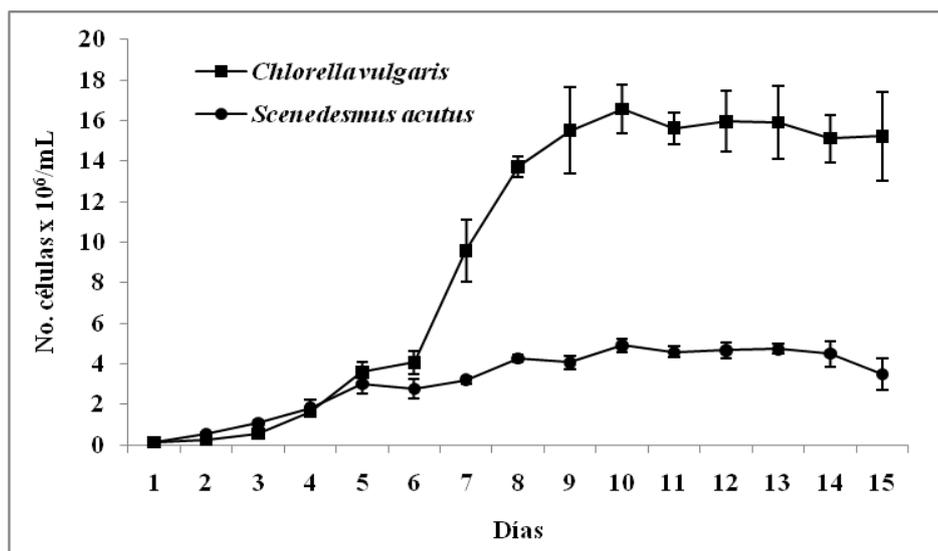


Figura 1. Curvas de crecimiento poblacional de *Scenedesmus acutus* y *Chlorella vulgaris*

El crecimiento poblacional de las dos especies de estudio en condiciones óptimas (medio BBM sin modificaciones y ausencia de competencia) presentó diferencias significativas en relación a la población máxima o capacidad de carga (K) que alcanzó cada una. Mientras *Chlorella vulgaris* alcanzó una población cercana a los 17'000.000 de células/mL, *Scenedesmus acutus* no superó los 5'000.000 de células/mL (Figura 1).

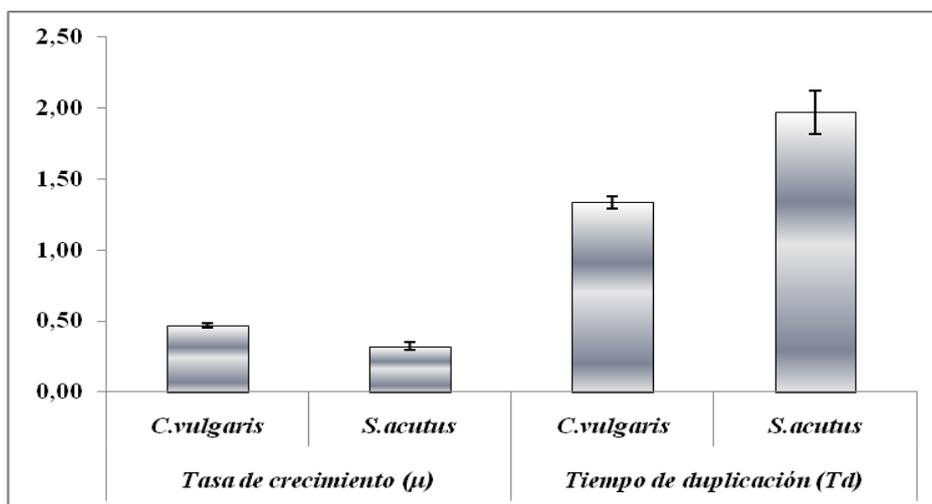


Figura 2. Tasas de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (Td) de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* en medio BBM sin modificaciones.

Por otra parte, *C.vulgaris* presentó una tasa de crecimiento mayor a la registrada por *S.acutus*, por lo cual esta última presenta un tiempo de duplicación mayor (Figura 2). De cualquier forma, en las curvas de crecimiento se puede observar que las dos especies alcanzan la fase estacionaria hacia el décimo día, por lo cual se estableció en 10 días la duración de los experimentos posteriores

4.2. Experimento 2. Efecto de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en el crecimiento poblacional de *Chlorella vulgaris*

Las curvas de crecimiento obtenidas en el primer experimento realizado con *C. vulgaris* muestran que la deficiencia de nutrientes limita significativamente el crecimiento, siendo el nitrógeno el nutriente que tiene el efecto más negativo (Figura 3).

En comparación con el tratamiento control, la población máxima se reduce casi a la mitad cuando es cultivada en medio con deficiencia de fósforo, mientras que con deficiencia de nitrógeno, se reduce aproximadamente en una sexta parte, presentándose

un crecimiento poblacional un poco mayor en el tratamiento con deficiencia de fósforo y nitrógeno en comparación al tratamiento con solo deficiencia de nitrógeno (Figura 4).

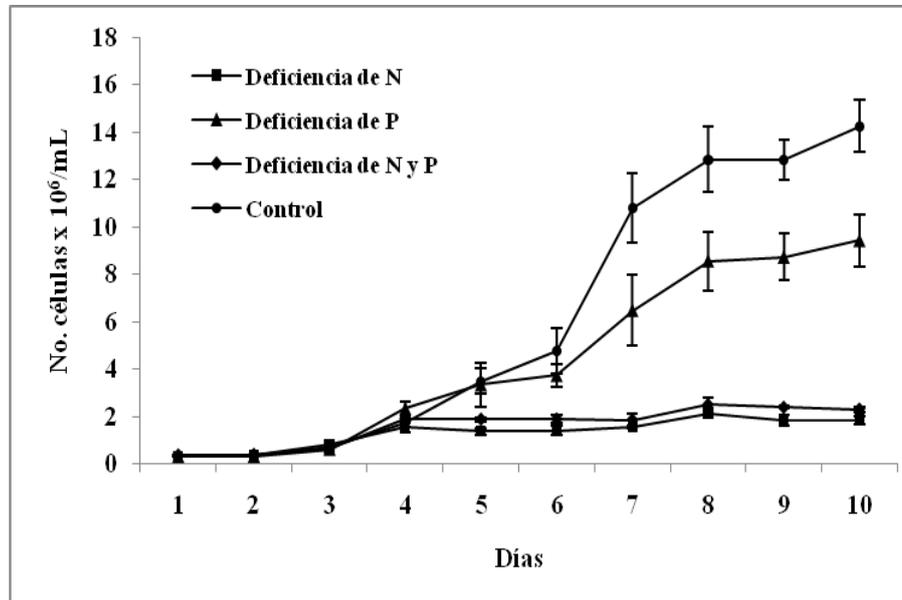


Figura 3. Curvas de crecimiento poblacional de *Chlorella vulgaris* en todos los tratamientos.

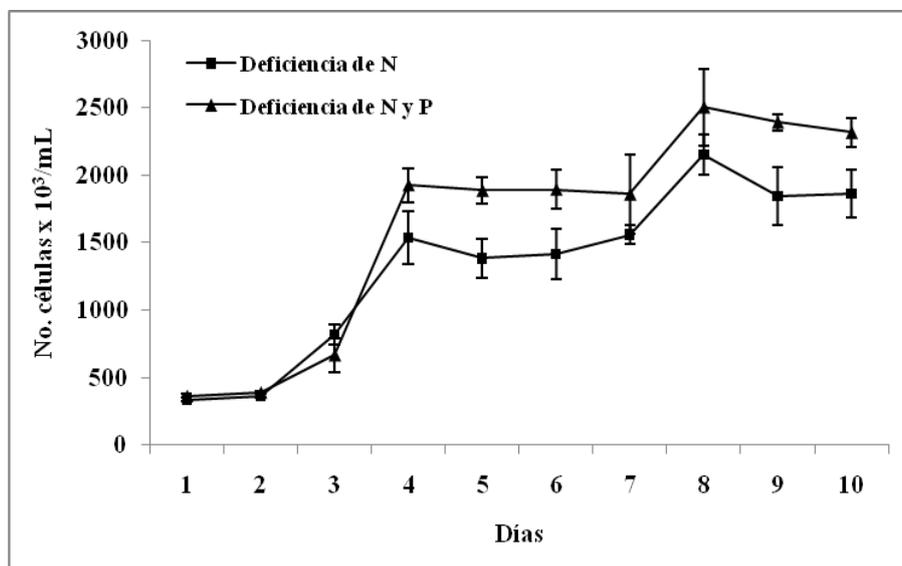


Figura 4. Curvas de crecimiento poblacional de *Chlorella vulgaris* en medio BBM con deficiencia de nitrógeno.

La concentración de nitrógeno establecida para los experimentos limitó demasiado el crecimiento celular y por lo tanto se decidió evaluar dos concentraciones más de nitrógeno para establecer una concentración más adecuada para los experimentos, en la

cual la deficiencia de nitrógeno tenga un efecto significativo sin ser un limitante tan fuerte para el crecimiento.

4.3. Experimento 3. Determinación de la concentración baja de nitrógeno

Al trabajar una concentración de nitrógeno del 0,4 % se observó un pico de crecimiento de *S. acutus* entre los días sexto y décimo con un tamaño poblacional máximo de aproximadamente 4'000.000 de células/mL, mientras que *C. vulgaris* presenta un crecimiento más gradual a lo largo del experimento (Figura 5).

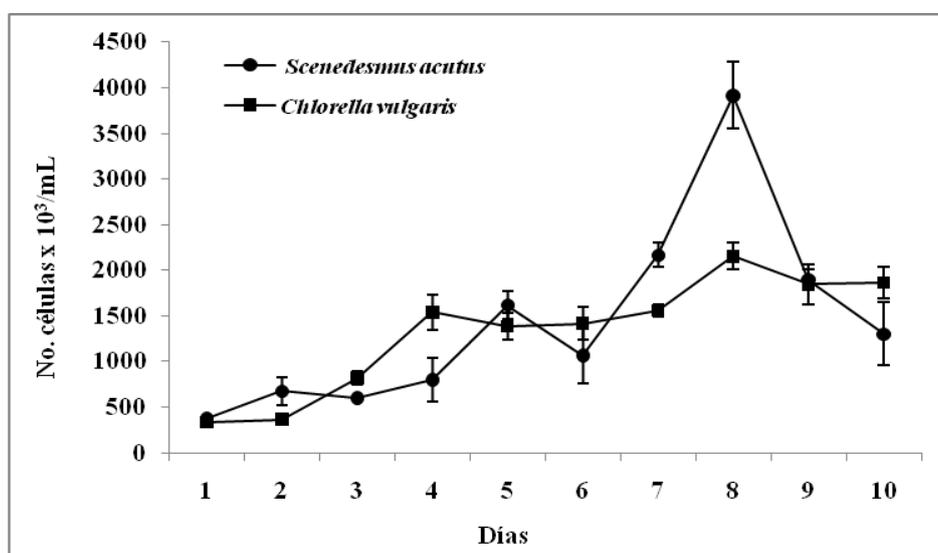


Figura 5. Curvas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* en medio BBM con una concentración de nitrógeno del 0.4 %.

Con una concentración de nitrógeno del 1% la población máxima de *C. vulgaris* aumenta significativamente. La población máxima de *S. acutus* permanece constante pero presenta un crecimiento más gradual que el presentado con el tratamiento anterior (Figura 6).

Al exponer los cultivos a una concentración de nitrógeno del 3%, se observa que *C. vulgaris* presenta un rápido crecimiento exponencial hacia los primeros días del experimento, mientras que *S. acutus* aumenta significativamente su población hacia los últimos días, presentando las dos especies una densidad poblacional máxima similar (Figura 7).

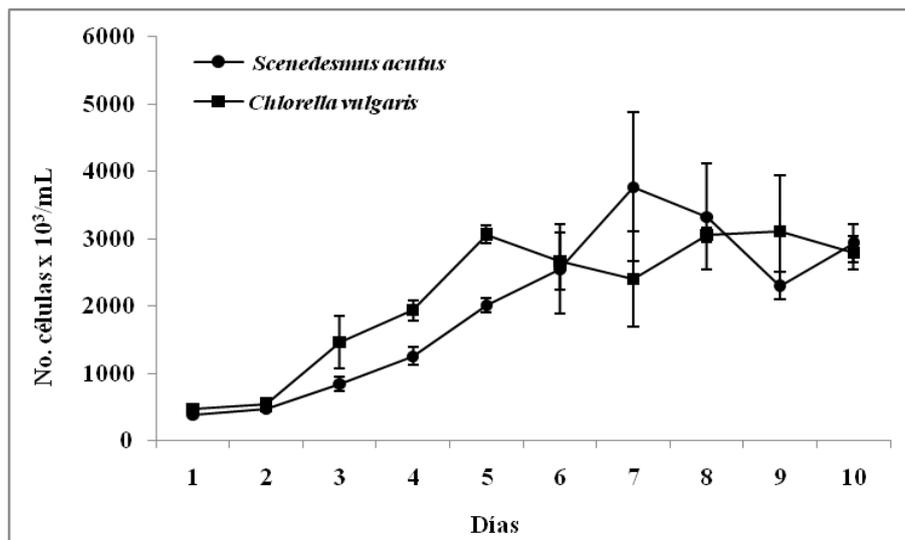


Figura 6. Curvas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* en medio BBM con una concentración de nitrógeno del 1 %.

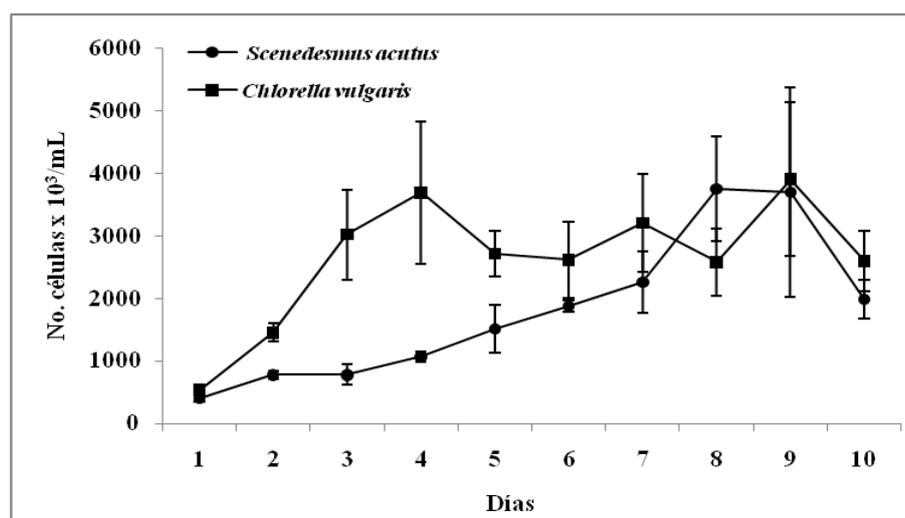


Figura 7. Curvas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* en medio BBM con una concentración de nitrógeno del 3 %.

Teniendo en cuenta las tasas de crecimiento (μ) (Figura 8) y el tiempo de duplicación (Td) (Figura 9) para las dos especies en cada tratamiento evaluado, se estableció en 3% la concentración óptima para desarrollar los experimentos ya que con esta concentración las dos especies presentaron tasas de crecimiento y tiempos de duplicación similares, y por consiguiente se excluyó cualquier ventaja en el crecimiento de una u otra especie. Con una concentración del 0.4% *C. vulgaris* presentó una tasa de crecimiento mucho

mayor que la de *S. acutus* mientras que el caso contrario ocurrió en una concentración del 1%.

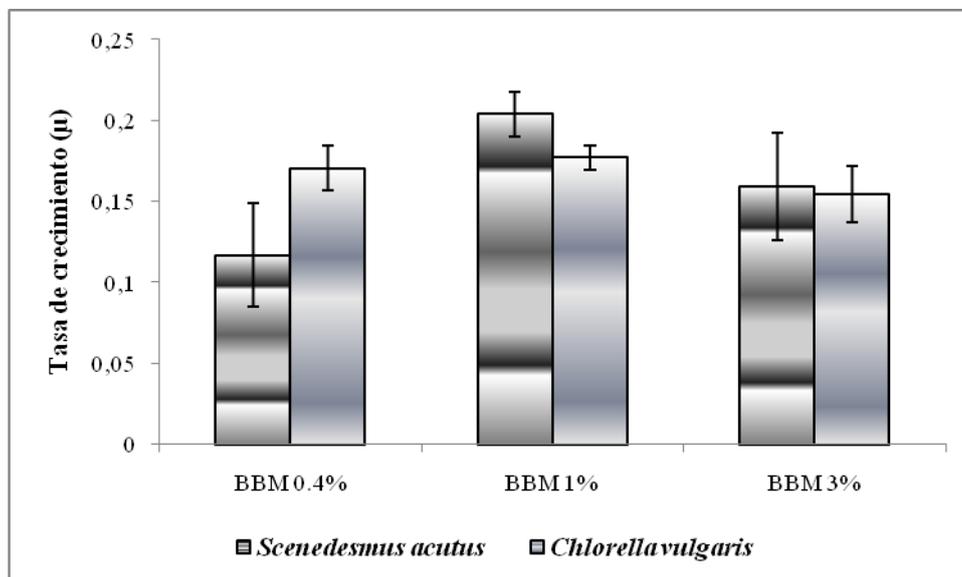


Figura 8. Tasa de crecimiento (μ) de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* en medio BBM con diferentes concentraciones de nitrógeno.

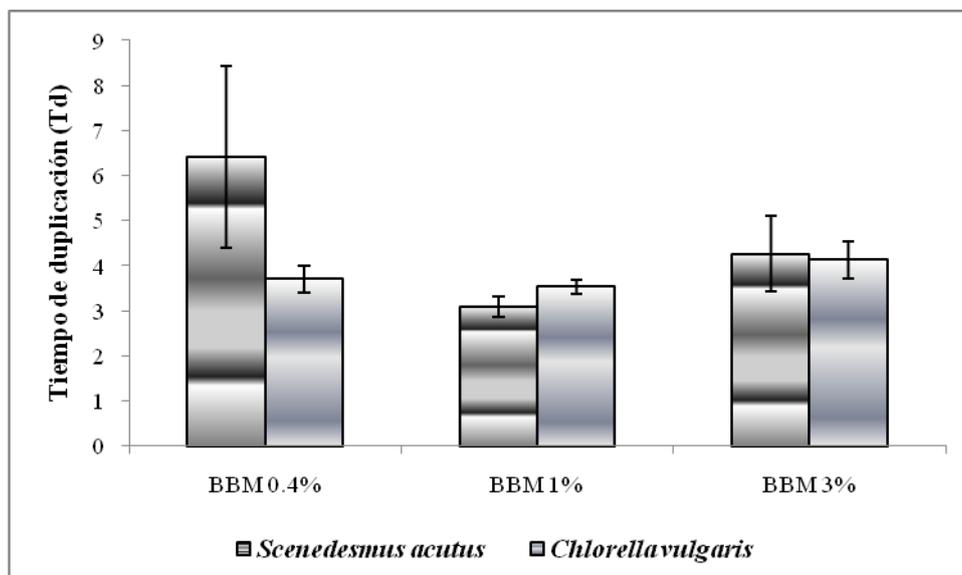


Figura 9. Tiempo de duplicación (Td) de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* en medio BBM con diferentes concentraciones de nitrógeno.

4.4. Experimento 4. Efecto de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en el crecimiento poblacional de *Chlorella vulgaris*

En este experimento se registraron tendencias similares a las registradas con el primer experimento de *C. vulgaris* aunque las curvas de crecimiento del cultivo en medio con deficiencia de nitrógeno registraron poblaciones finales mayores.

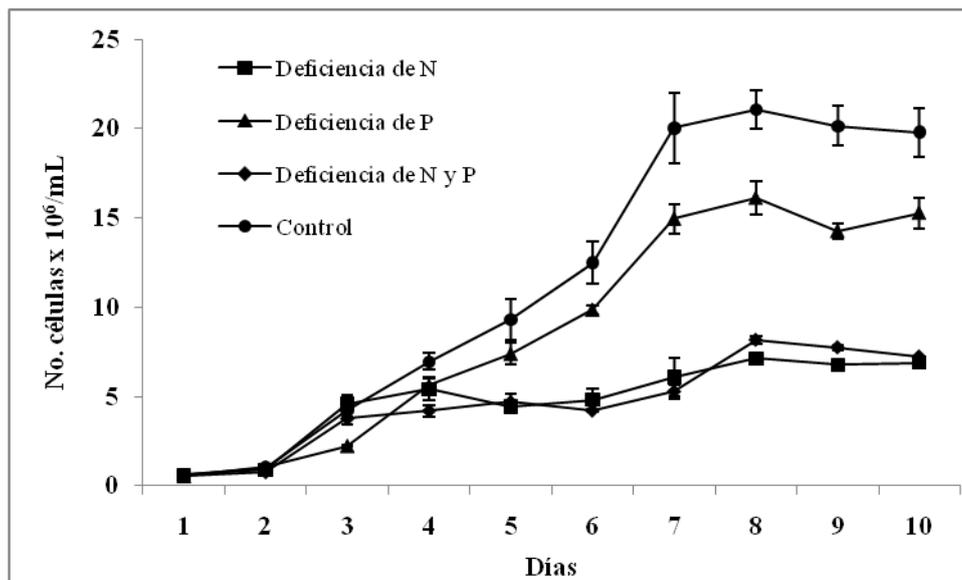


Figura 10. Curvas de crecimiento poblacional de *Chlorella vulgaris* en todos los tratamientos.

En la figura 10 se puede observar las curvas de crecimiento con cada tratamiento. El efecto de la deficiencia de nutrientes en el crecimiento es evidente, especialmente cuando el nutriente limitante es el nitrógeno, independientemente de que también se presente deficiencia de fósforo. De cualquier forma, la deficiencia de ambos nutrientes en el mismo tratamiento presenta una tasa de crecimiento un poco mayor a la presentada en el tratamiento con deficiencia de nitrógeno. Por el contrario, aunque la deficiencia de fósforo disminuye la tasa de crecimiento en comparación con el control, el efecto no es tan fuerte y la especie responde mejor ante la limitación de este nutriente. Un ANOVA de una vía sobre esta variable reveló diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Figura 11).

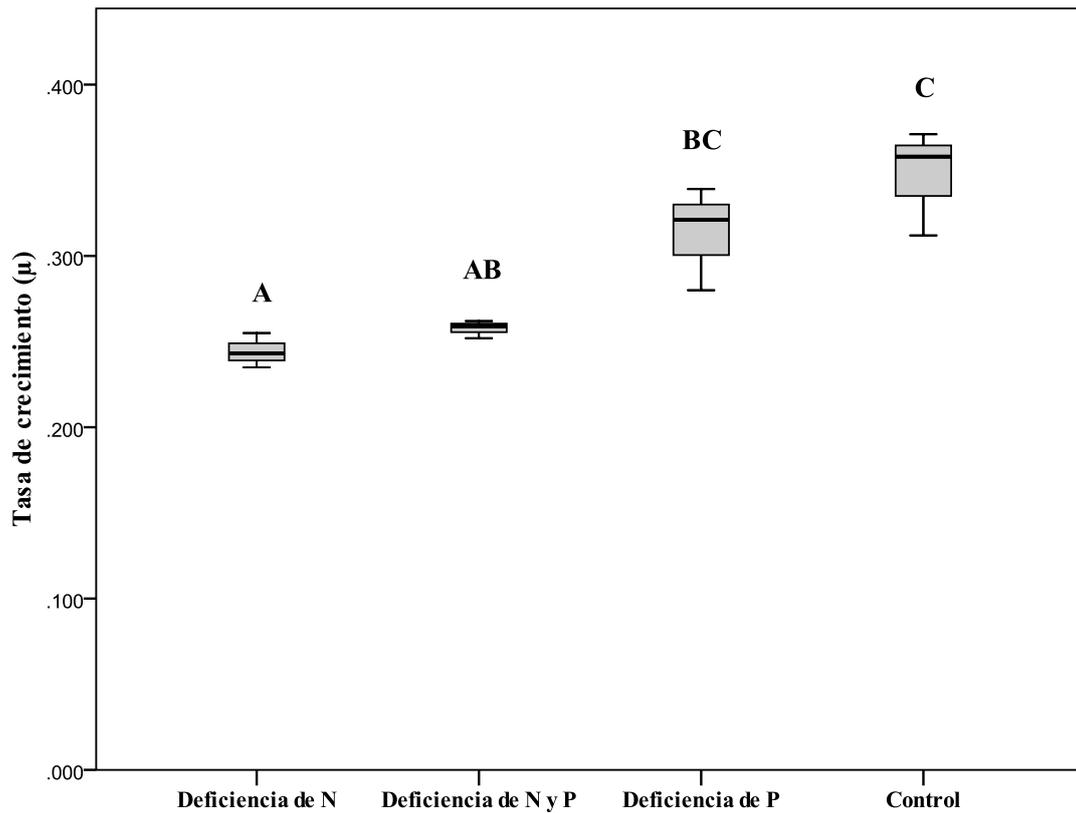


Figura 11. Box plot de la tasa de crecimiento (μ) de *Chlorella vulgaris* en todos los tratamientos. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos, según pruebas ANOVA de una vía seguida de un análisis *post-hoc* de Tukey a $p \leq 0.05$.

El análisis de varianza de dos vías sobre la tasa de crecimiento (Anexo 1) reveló que dicha tasa se ve afectada por la concentración de nitrógeno, mientras que ni la concentración de fósforo ni la interacción de ambos nutrientes tienen un efecto significativo.

El ANOVA de una vía realizado sobre la capacidad de carga (K) o población máxima que alcanza la especie revela diferencias significativas entre los tratamientos, siendo los tratamientos con deficiencia de nitrógeno los que más afectan la capacidad de carga de la especie (Figura 12).

El ANOVA de dos vías sobre la capacidad de carga (Anexo 1) indica que la concentración de fósforo, la concentración de nitrógeno y la interacción de los dos nutrientes tienen un efecto significativo en la respuesta de la población.

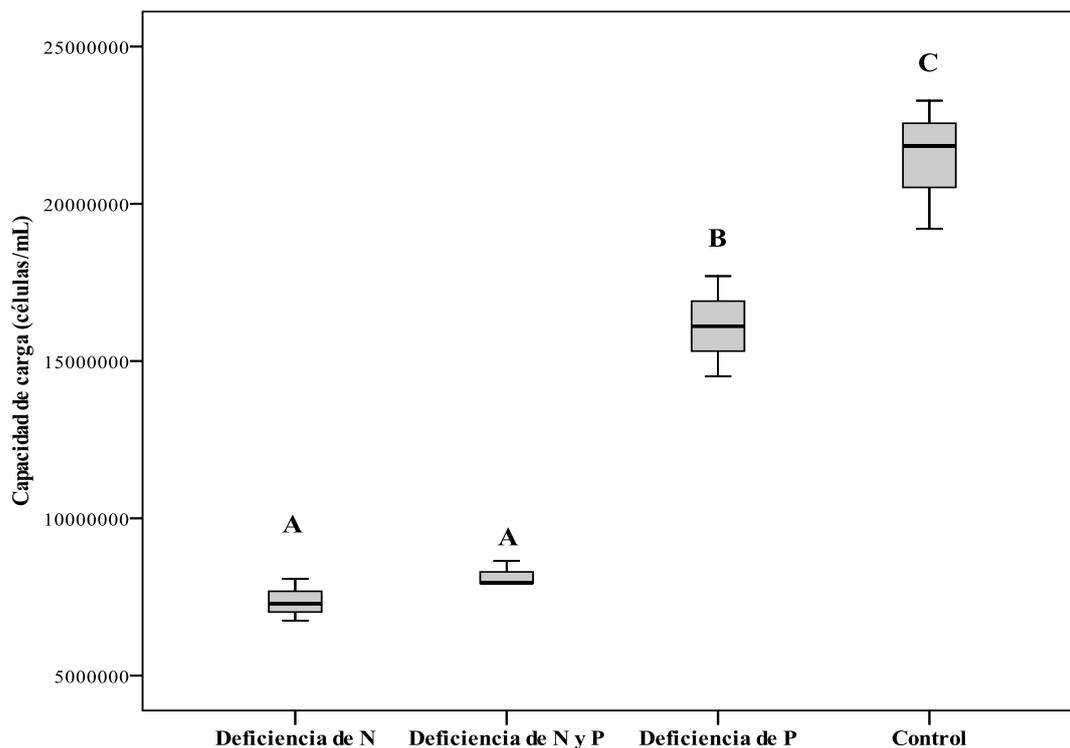


Figura 12. Box plot de la capacidad de carga (K) de *Chlorella vulgaris* en todos los tratamientos. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos, según pruebas ANOVA de una vía seguida de un análisis *post-hoc* de Tukey a $p \leq 0.05$.

4.5. Experimento 5. Efecto de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en el crecimiento poblacional de *Scenedesmus acutus*

El crecimiento poblacional de *S. acutus* en condiciones de deficiencia de nutrientes se reduce significativamente (un poco más de la mitad del crecimiento alcanzado por el control). Sin embargo, a diferencia de *C. vulgaris* que presenta un efecto negativo mayor al ser cultivada en medio deficiente de nitrógeno, *S. acutus* alcanza densidades poblacionales similares con los tres tratamientos de deficiencia de nutrientes. Por otra parte, en la fase inicial, se registra una mayor resistencia al crecimiento en condiciones de deficiencia de fósforo, aunque al finalizar el experimento la densidad más baja la presenta la población cultivada en medio con deficiencia de nitrógeno y fósforo (Figura 13).

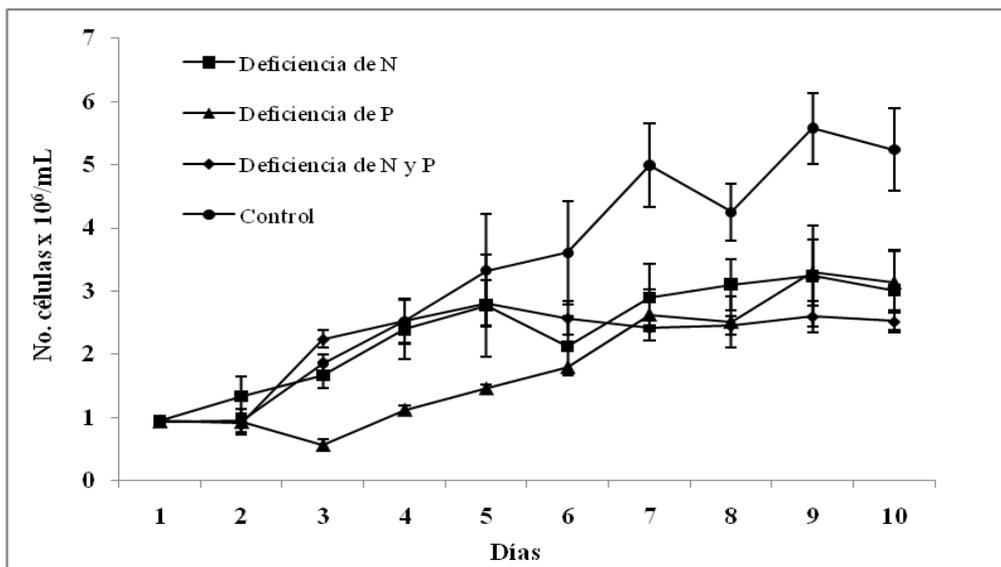


Figura 13. Curvas de crecimiento poblacional de *Scenedesmus acutus* en todos los tratamientos.

Los resultados del ANOVA de una vía sobre la tasa de crecimiento de *S. acutus* revelan diferencias estadísticas entre los tratamientos. El tratamiento con deficiencia tanto de fósforo como de nitrógeno es el que más reduce la tasa de crecimiento de la especie. A pesar de presentar una mayor resistencia inicial al crecimiento en deficiencia de fósforo, la tasa de crecimiento alcanza el mayor valor en comparación con los valores registrados para los tratamientos con deficiencia de nitrógeno (Figura 14).

Por otra parte, el ANOVA de dos vías sobre esta variable indica que la respuesta es afectada únicamente por la concentración de nitrógeno (Anexo 1).

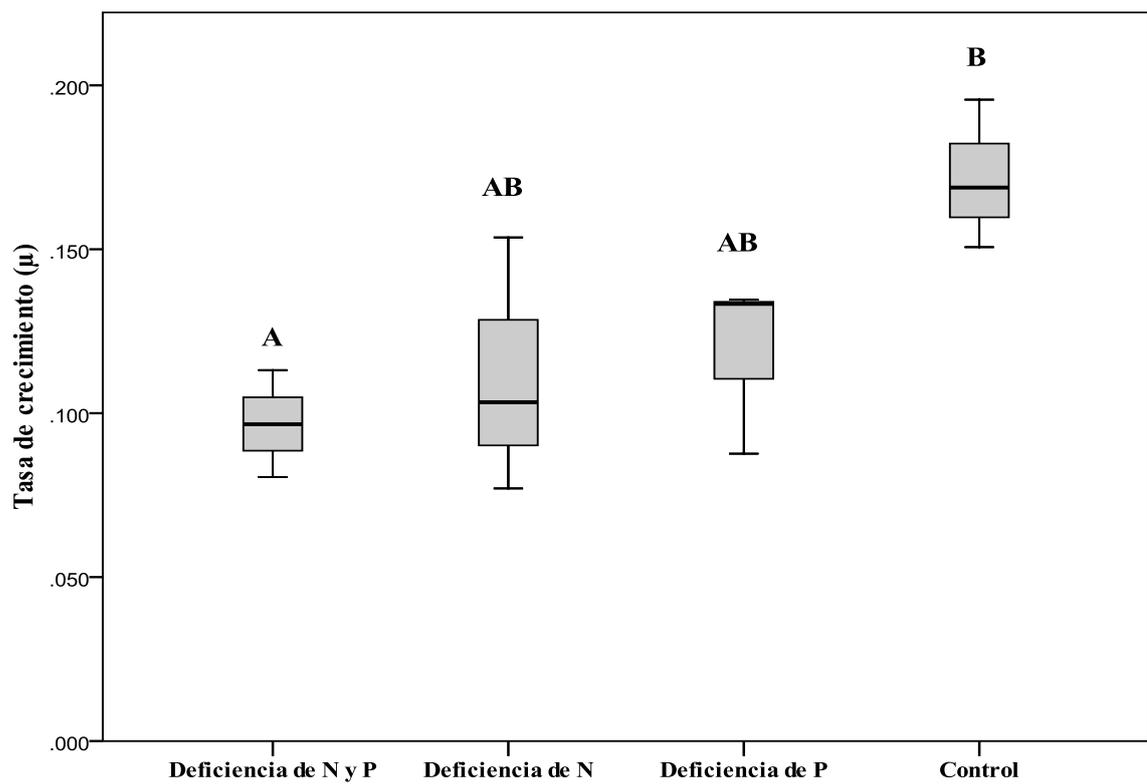


Figura 14. Box plot de la tasa de crecimiento (μ) de *Scenedesmus acutus* en todos los tratamientos. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos, según pruebas ANOVA de una vía seguida de un análisis *post-hoc* de Tukey a $p \leq 0.05$.

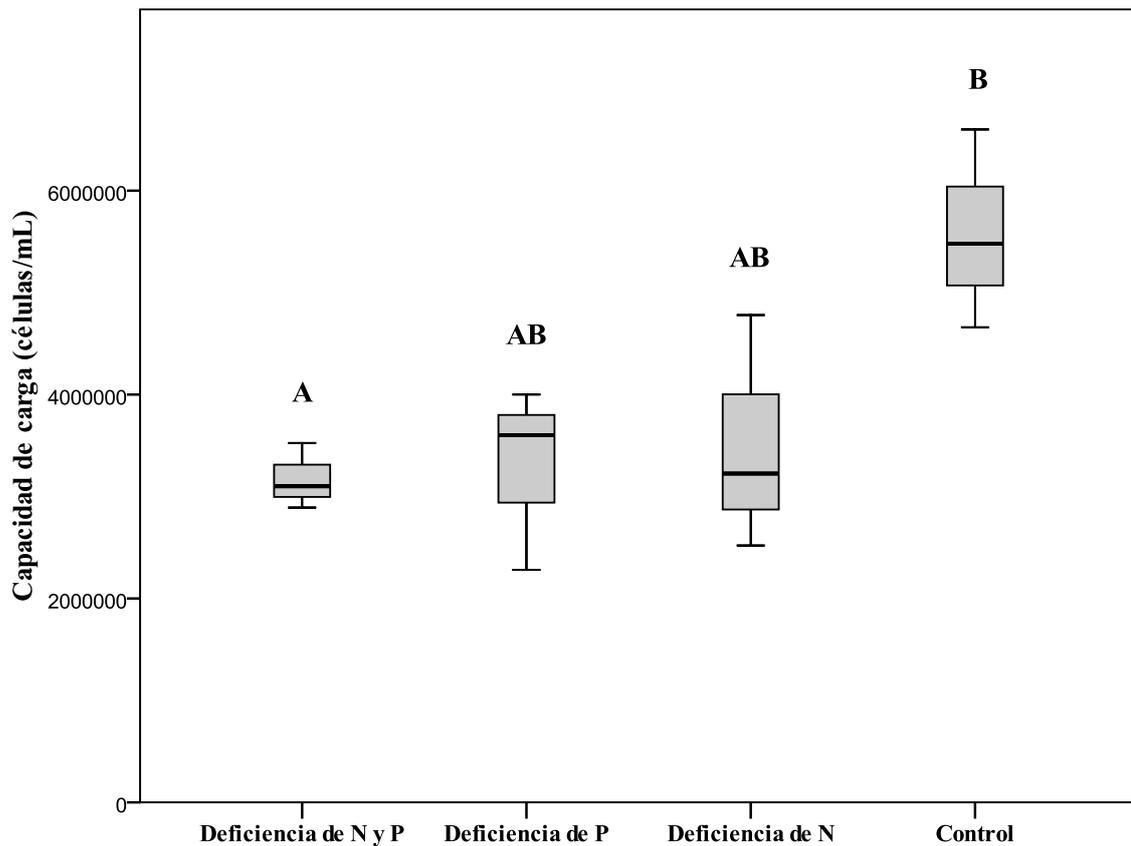


Figura 15. Box plot de la capacidad de carga (K) de *Scenedesmus acutus* en todos los tratamientos. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos, según pruebas ANOVA de una vía seguida de un análisis *post-hoc* de Tukey a $p \leq 0.05$.

El ANOVA de una vía realizado sobre la capacidad de carga (K) revela diferencias significativas entre los tratamientos siendo el tratamiento con deficiencia de los dos nutrientes el que alcanza una capacidad de carga menor (Figura 15). Por otra parte, el ANOVA de dos vías revela que la variable respuesta se ve afectada únicamente por la concentración de fósforo (Anexo 1).

4.6. Experimento 6. Efecto de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*

En el experimento de competencia, *Chlorella vulgaris* se reveló como el competidor más eficaz, alcanzando tasas de crecimiento más altas (Figura 16), tiempos de duplicación menores (Figura 17) y densidades más elevadas con todos los tratamientos.

Las dos especies presentan una respuesta en la tasa de crecimiento y el tiempo de duplicación similar a la presentada en los experimentos con ausencia de competencia. El tratamiento con deficiencia de fósforo es el que tiene un efecto menor en estos parámetros en las dos especies, mientras que la deficiencia de nitrógeno presenta el efecto más fuerte en *C. vulgaris* y la deficiencia de nitrógeno y fósforo afecta significativamente a *S. acutus*.

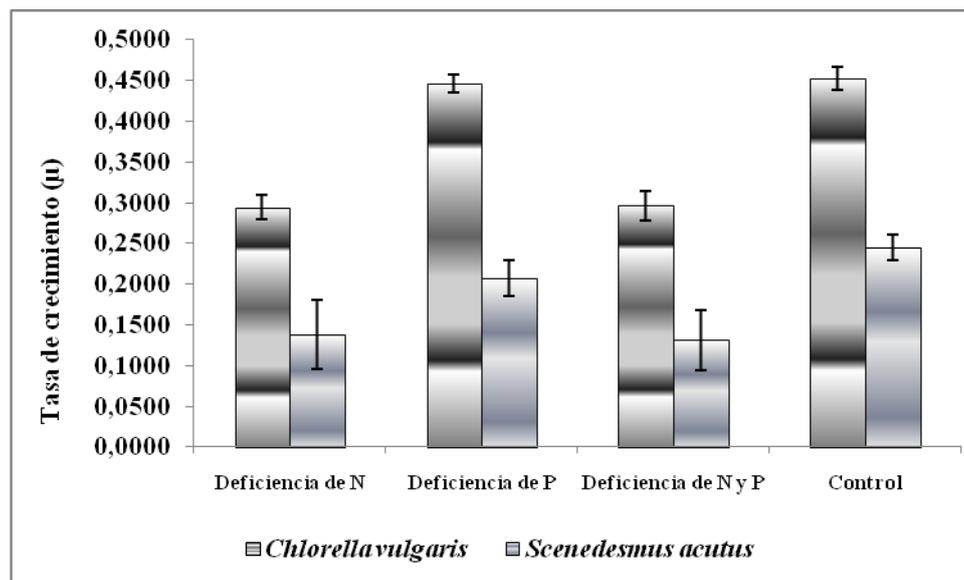


Figura 16. Tasas de crecimiento (μ) de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* en experimento de competencia.

Las curvas de crecimiento presentadas por las dos especies en el tratamiento control presentaron diferencias significativas en los tamaños poblacionales alcanzados al finalizar el experimento, siendo *C. vulgaris* la especie con la población más densa (aproximadamente 8 veces más que la población de *S. acutus*). Por otra parte, *S. acutus* presenta un ciclo de vida mucho más corto, iniciando la fase estacionaria y de muerte desde el tercer día, mientras que *C. vulgaris* tiene un crecimiento exponencial hasta el séptimo día (Figura 18).

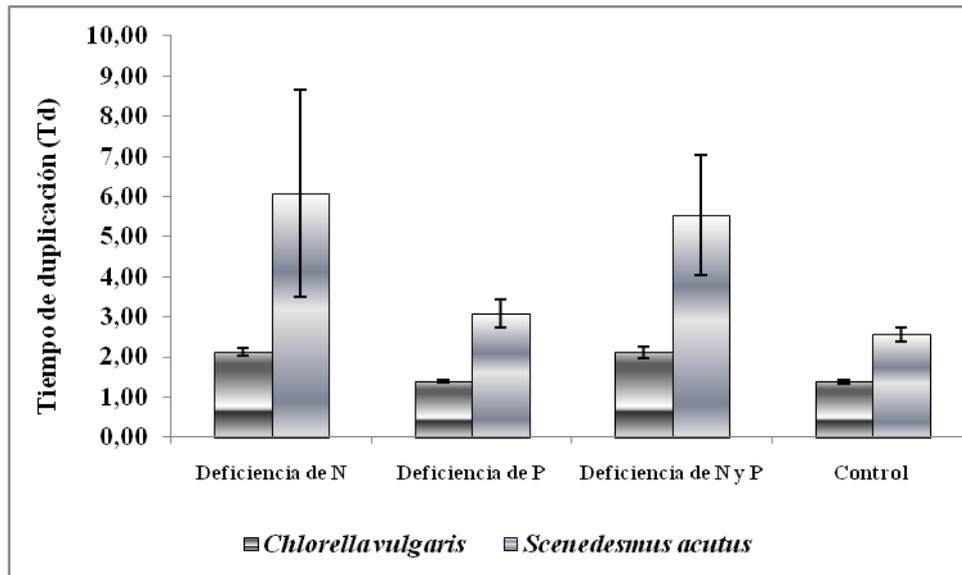


Figura 17. Tiempos de duplicación (Td) de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* en experimento de competencia.

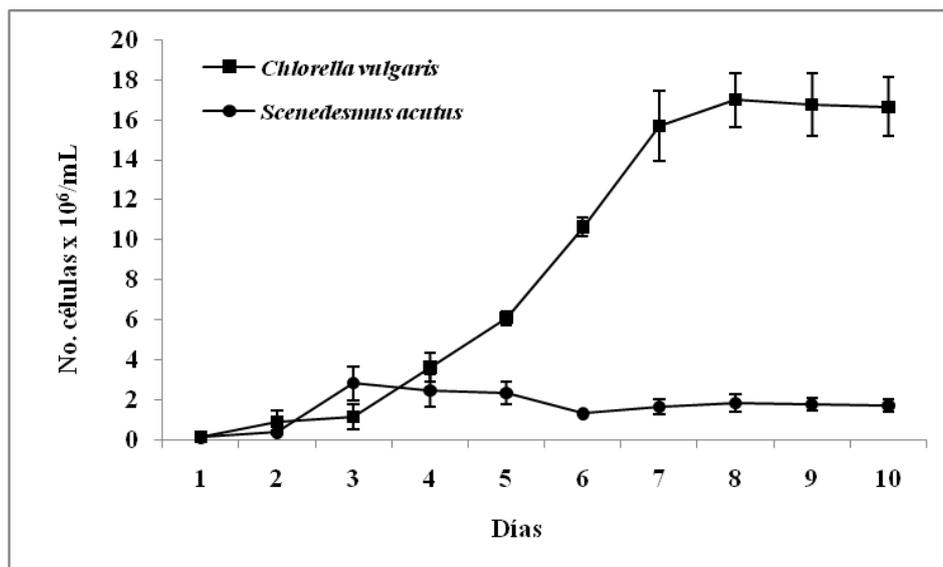


Figura 18. Curvas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* compitiendo en medio BBM (control).

En el tratamiento con deficiencia de nitrógeno se observó una tendencia similar en relación a la dinámica de las curvas de crecimiento de las dos especies. Sin embargo, es evidente que la deficiencia de este nutriente afecta el crecimiento tanto de *C. vulgaris* como de *S. acutus* ya que en ambos casos la población se redujo significativamente en comparación con el tratamiento control (Figura 19).

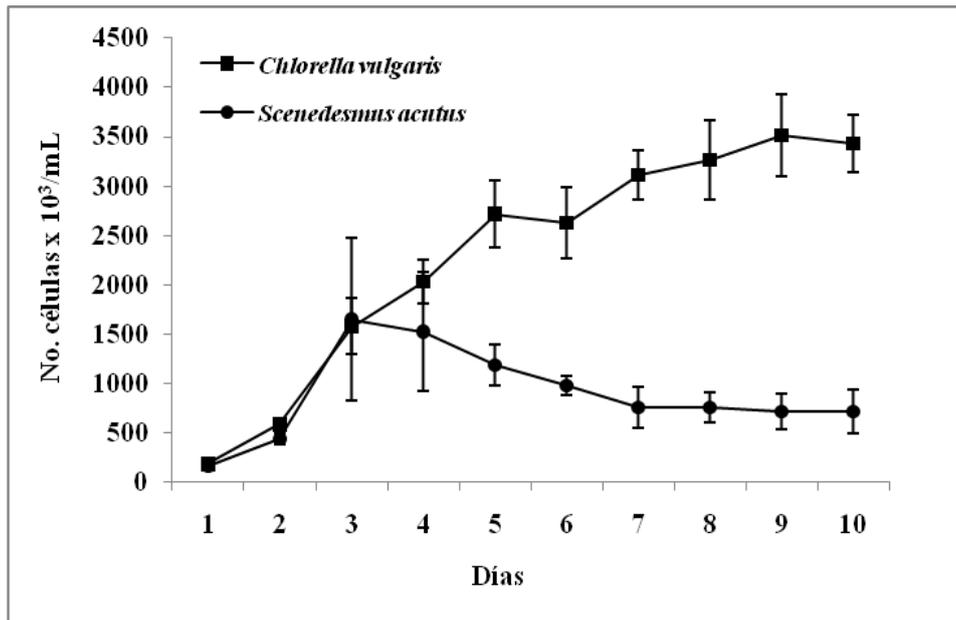


Figura 19. Curvas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* compitiendo en medio BBM con deficiencia de nitrógeno.

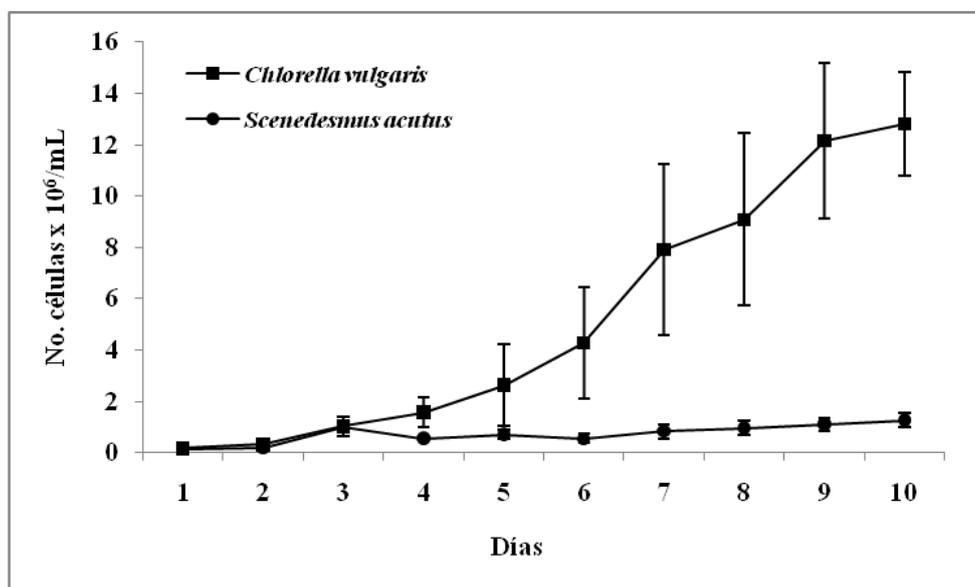


Figura 20. Curvas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* compitiendo en medio BBM con deficiencia de fósforo.

Las curvas de crecimiento de las dos especies en deficiencia de fósforo (Figura 20) presentan un comportamiento diferente al presentado ante la deficiencia de nitrógeno. Mientras *C. vulgaris* presenta un crecimiento progresivo a lo largo de todo el experimento y apenas hacia el noveno día alcanza la fase estacionaria, *S. acutus*

presenta un crecimiento exponencial hacia los últimos días del experimento. De cualquier forma, a pesar de que la deficiencia de fósforo afecta el tamaño poblacional de las dos especies, el efecto no es tan fuerte como el que se presenta ante la deficiencia de nitrógeno.

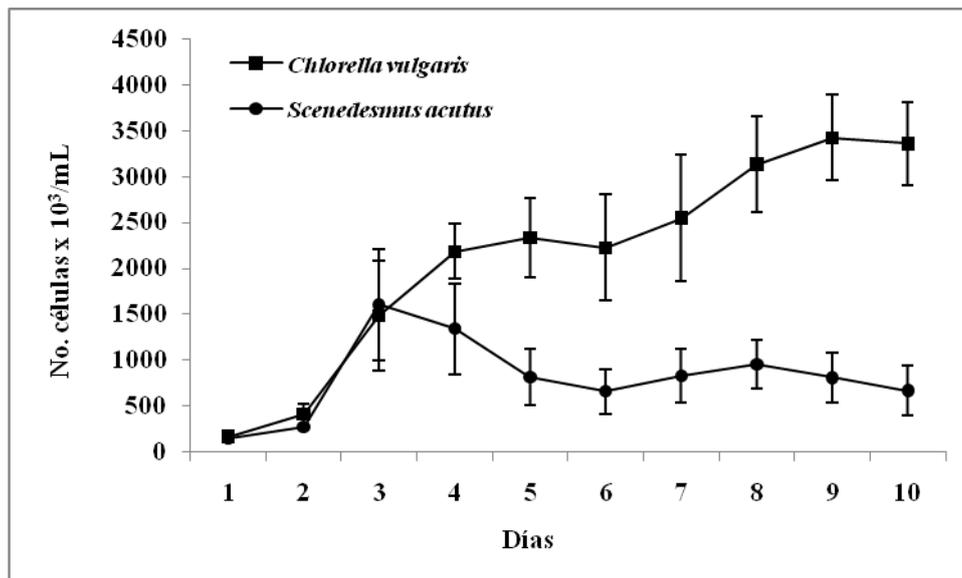


Figura 21. Curvas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* compitiendo en medio BBM con deficiencia de nitrógeno y fósforo.

La deficiencia de los dos nutrientes tiene un efecto similar a la deficiencia de nitrógeno en las curvas de crecimiento de las dos especies, reduciendo significativamente las dos poblaciones (Figura 21).

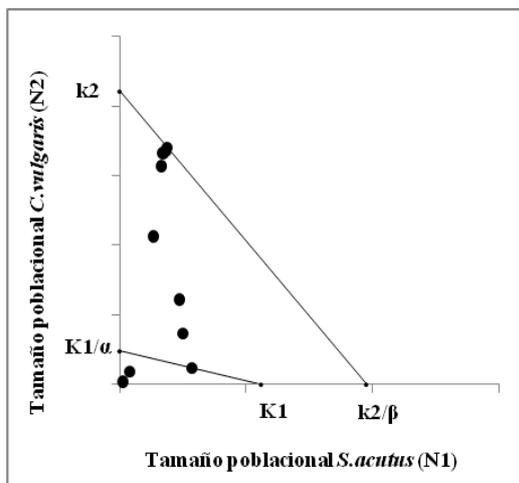
El ANOVA de dos vías sobre la tasa de crecimiento y la capacidad de carga revela que tanto los tratamientos como la competencia tienen un efecto significativo en estas variables para las dos especies en competencia. Adicionalmente, los resultados indican que existe una interacción entre estas dos fuentes de variación que afectan la respuesta en la tasa de crecimiento de *C. vulgaris* (Anexo 2).

4.6.1. Modelos de competencia

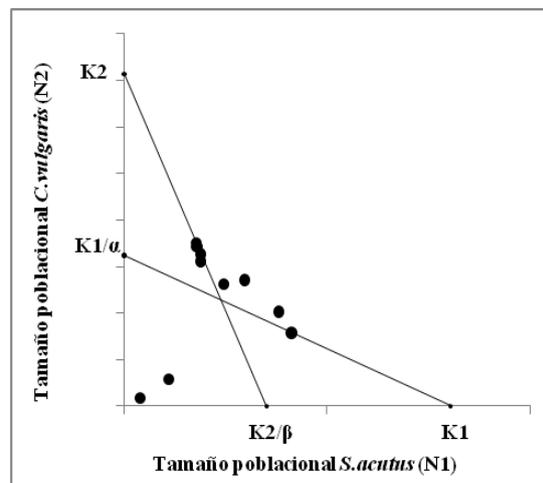
Los modelos de competencia para cada tratamiento derivados de los experimentos realizados dan como resultado tres situaciones distintas:

1. El modelo del tratamiento control (Figura 22.A) ilustra una situación en la cual *C. vulgaris* tiene una ventaja competitiva sobre *S. acutus*, lo cual derivará en la exclusión competitiva de esta última. De acuerdo al modelo, la población de *C. vulgaris* es regulada principalmente por competencia intraespecífica mientras que la población de *S. acutus* es regulada por la competencia con *C. vulgaris* (interespecífica).
2. Una situación muy diferente se presenta con los tratamientos con deficiencia de nitrógeno (Figura 22.B) y con deficiencia de nitrógeno y fósforo (Figura 22.D). En este caso, las dos especies están reguladas por competencia interespecífica en equilibrio inestable donde cualquiera de las dos especies puede ser excluida.
3. Finalmente, el tratamiento con deficiencia de fósforo (Figura 22.C) genera una condición de coexistencia en la cual las dos especies están reguladas principalmente por competencia intraespecífica, ninguna especie puede alcanzar una densidad capaz de eliminar a la otra y por el contrario, cada especie inhibe su propio crecimiento poblacional.

A



B



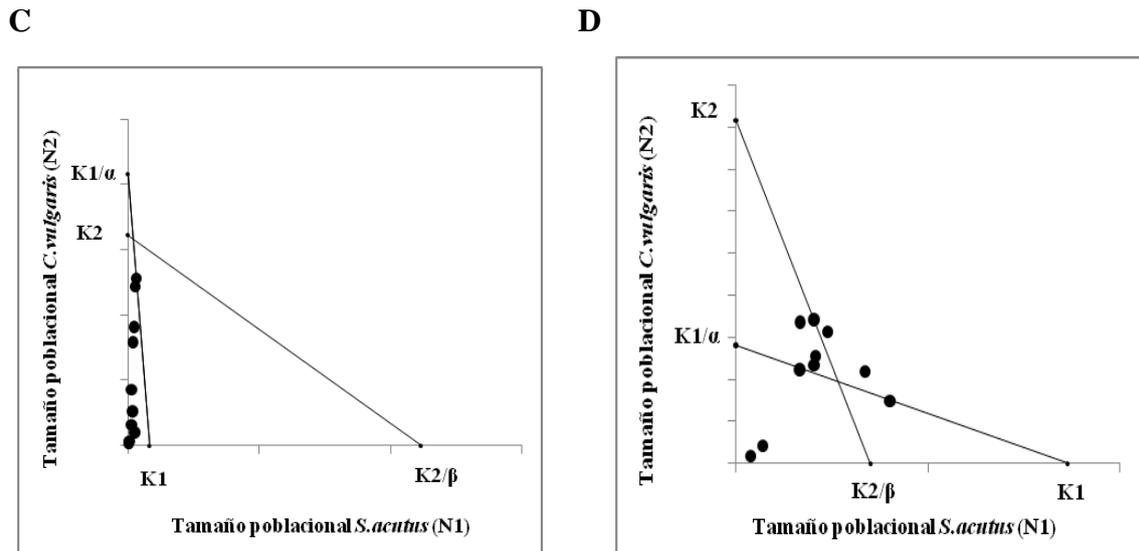


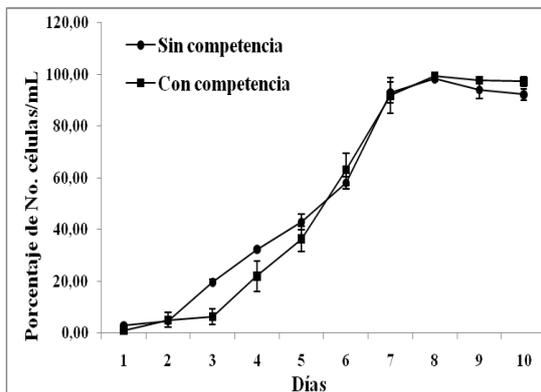
Figura 22. Modelos de competencia de Lotka-Volterra. Los puntos en la gráfica muestran las densidades poblacionales de las especies en cada tiempo a lo largo del experimento. A-Control. B-Deficiencia de nitrógeno. C-Deficiencia de fósforo. D-Deficiencia de nitrógeno y fósforo.

4.6.2. Efecto de la competencia en el crecimiento poblacional de *Chlorella vulgaris*

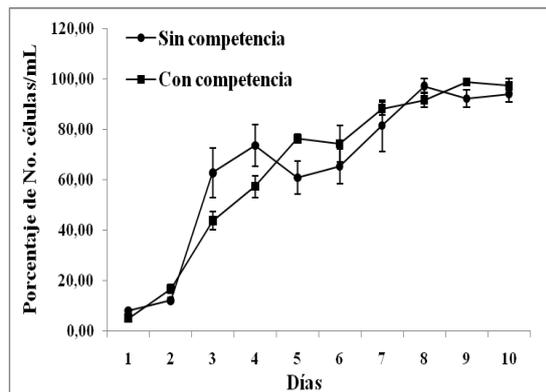
Las curvas de crecimiento de *C. vulgaris* con y sin competencia presentan un comportamiento muy similar en todos los tratamientos, especialmente en el tratamiento control. Las mayores diferencias se presentan con el tratamiento con deficiencia de fósforo en donde el crecimiento de *C. vulgaris* en competencia es más retardado y hacia el final del experimento apenas está alcanzando la fase estacionaria, mientras que sin competencia llega a la fase estacionaria hacia el séptimo día (Figura 23).

Por otra parte, los ANOVA de una vía realizados sobre la tasa de crecimiento (Figura 24) y la capacidad de carga (Figura 25) de *C. vulgaris* en competencia sí presentaron diferencias muy significativas en comparación con la respuesta que presentó la especie en ausencia de competencia. En ambos casos las variables evaluadas presentaron una separación de los tratamientos en dos grupos bien definidos, siendo los tratamientos con deficiencia de nitrógeno los que tienen un mayor efecto en la variable respuesta.

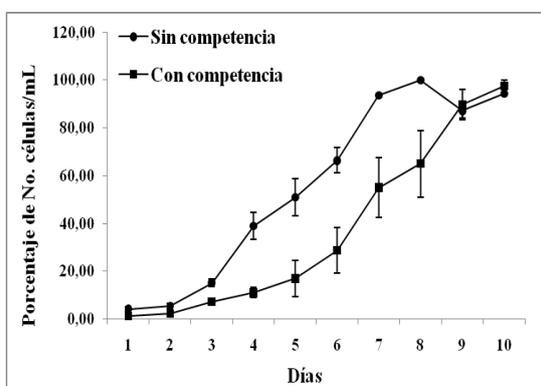
A



B



C



D

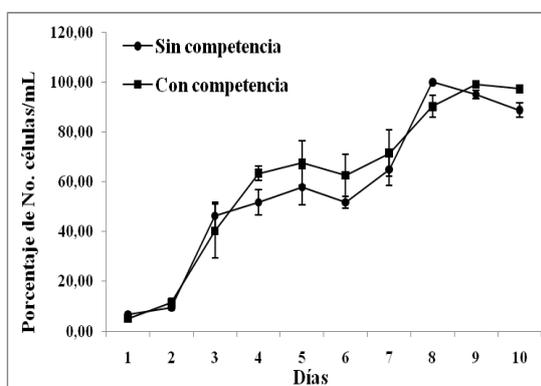


Figura 23. Comparación de las curvas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* con y sin competencia. A. Tratamiento control. B. Tratamiento con deficiencia de nitrógeno. C. Tratamiento con deficiencia de fósforo. D. Tratamiento con deficiencia de nitrógeno y fósforo.

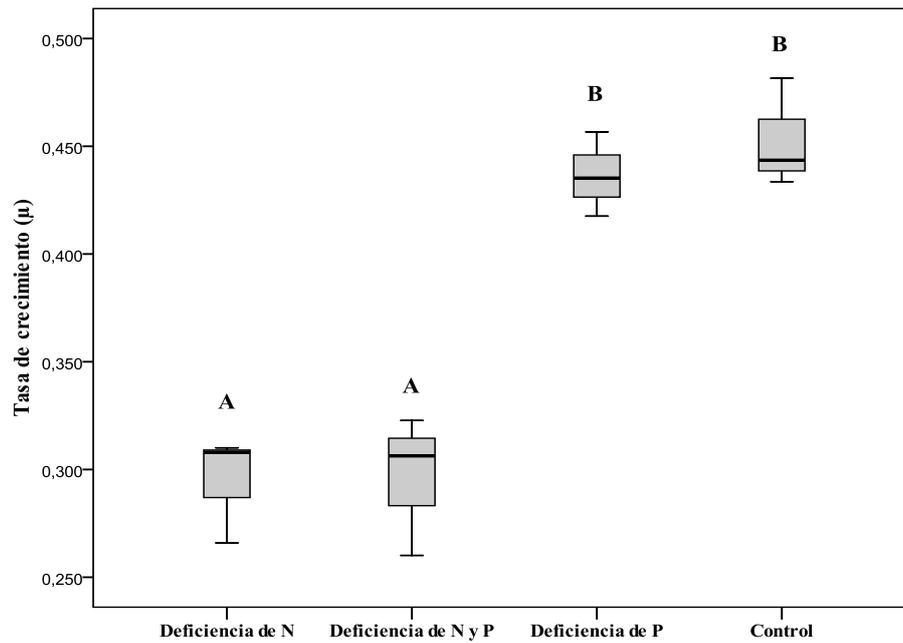


Figura 24. Box plot de la tasa de crecimiento (μ) de *Chlorella vulgaris* compitiendo en todos los tratamientos. Diferentes letras indican deferencias significativas entre los tratamientos, según pruebas ANOVA de una vía seguida de un análisis *post-hoc* de Tukey a $p \leq 0.05$

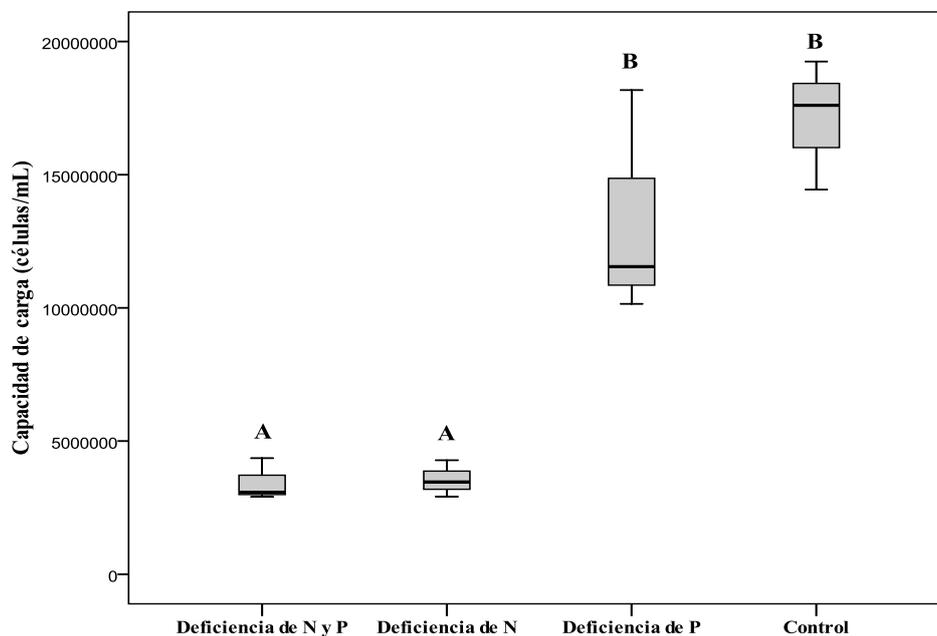


Figura 25. Box plot de la capacidad de carga (K) de *Chlorella vulgaris* compitiendo en todos los tratamientos. Diferentes letras indican deferencias significativas entre los tratamientos, según pruebas ANOVA de una vía seguida de un análisis *post-hoc* de Tukey a $p \leq 0.05$.

El ANOVA de dos vías realizado sobre las mismas variables refuerza estos resultados, revelando que el fósforo no afecta la respuesta y que no hay una interacción significativa entre los dos nutrientes (Anexo 3).

4.6.3. Efecto de la competencia en el crecimiento poblacional de *Scenedesmus acutus*

La competencia tiene un efecto más evidente en *S.acutus* en comparación con *C. vulgaris*, presentándose claras diferencias en la dinámica de crecimiento de la especie con y sin competencia.

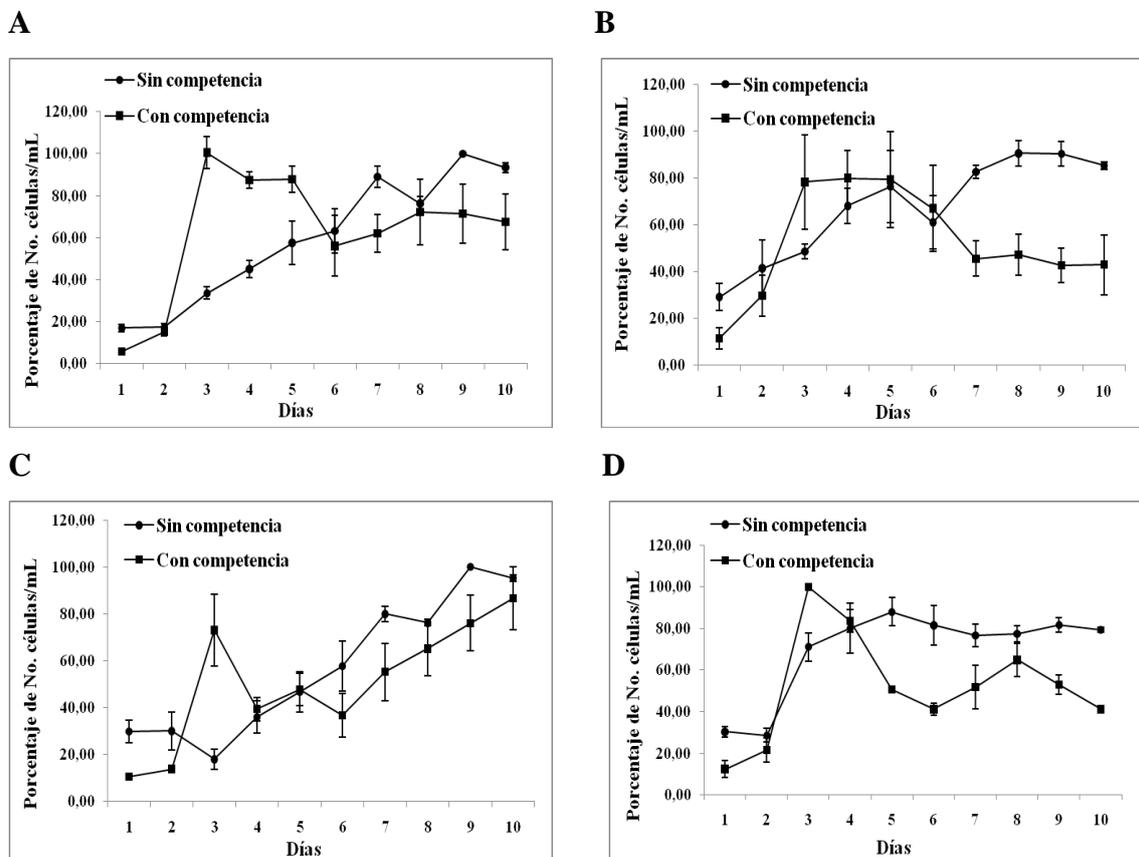


Figura 26. Comparación de las curvas de crecimiento de *Scenedesmus acutus* con y sin competencia. A. Tratamiento control. B. Tratamiento con deficiencia de nitrógeno. C. Tratamiento con deficiencia de fósforo. D. Tratamiento con deficiencia de nitrógeno y fósforo.

En las curvas de crecimiento se observa que la especie en competencia tiene un pico de crecimiento hacia el tercer día con todos los tratamientos, mientras que en ausencia de competencia la capacidad de carga se alcanza hacia los últimos días del experimento,

con excepción del tratamiento con deficiencia de fósforo y nitrógeno con el cual se alcanza la fase estacionaria en la mitad del experimento (Figura 26).

Los ANOVA de una vía realizados sobre la tasa de crecimiento (Figura 27) y la capacidad de carga (Figura 28) de *S. acutus* en competencia también presentaron diferencias significativas en comparación con la respuesta que presentó la especie en ausencia de competencia. En ambos casos no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, el ANOVA de dos vías realizado sobre las mismas variables revela que el nitrógeno tiene un efecto significativo sobre la tasa de crecimiento (Anexo 3).

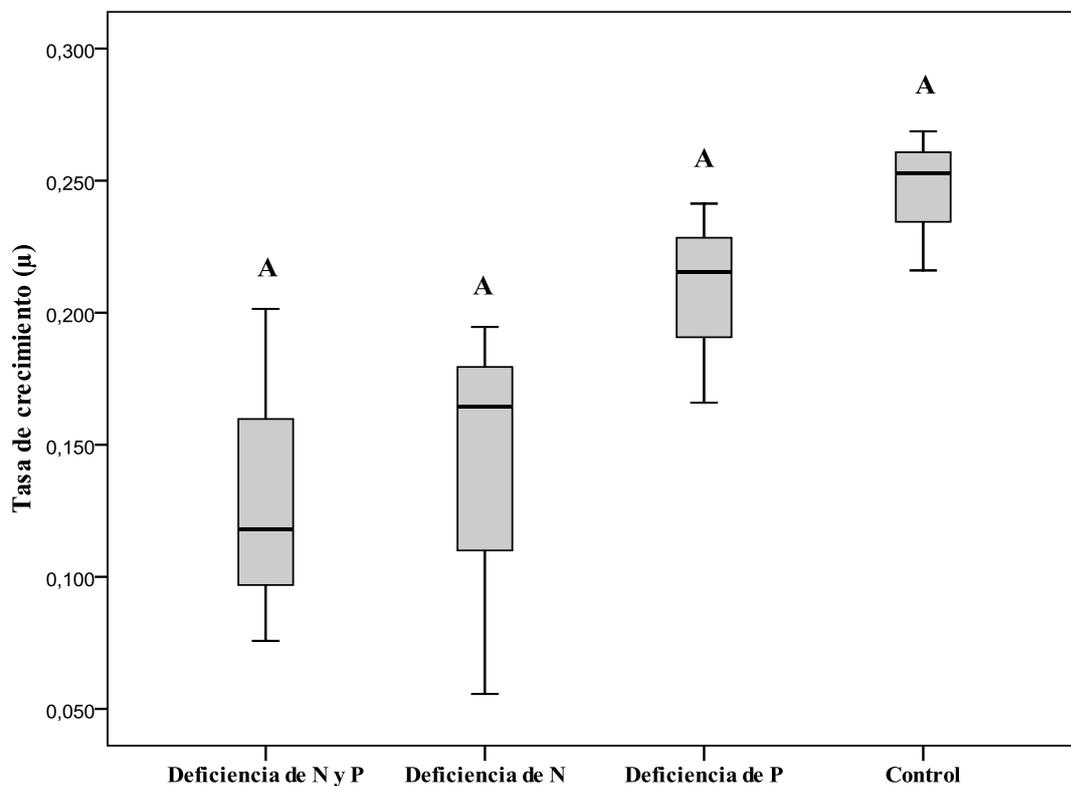


Figura 27. Box plot de la tasa de crecimiento (μ) de *Scenedesmus acutus* compitiendo en todos los tratamientos ($\alpha = 0.05$). Las mismas letras indican que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, según pruebas ANOVA de una vía a $p \leq 0.05$

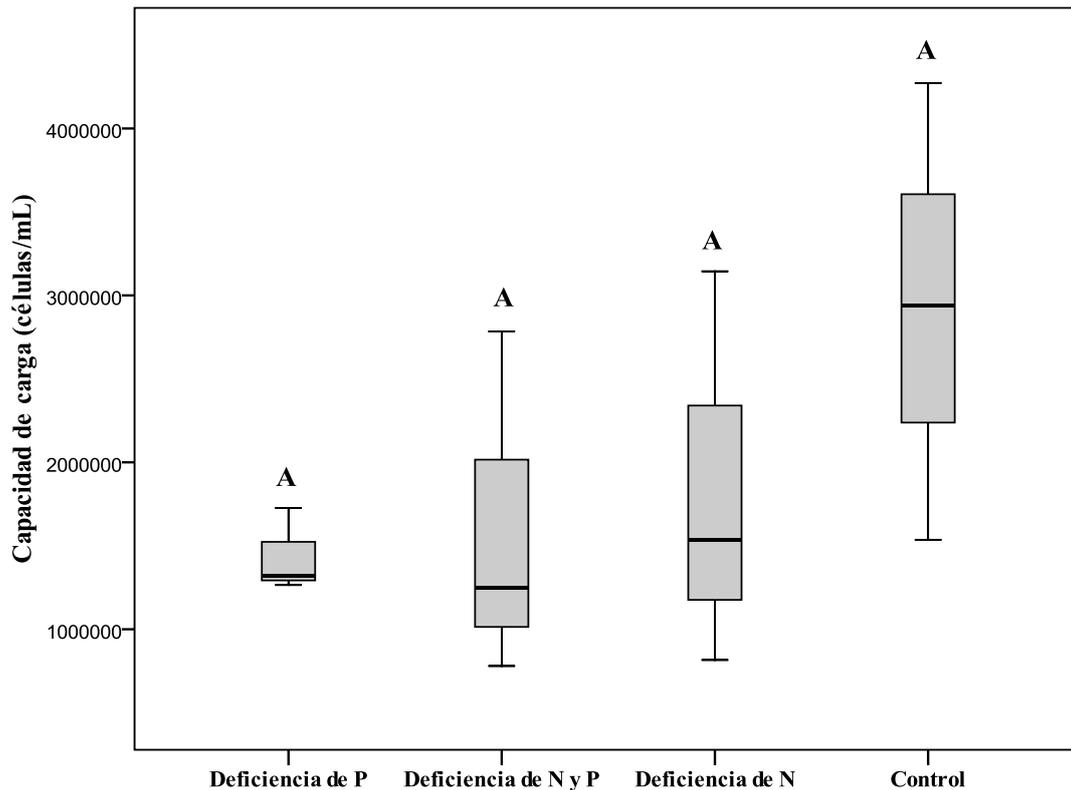


Figura 28. Box plot de la capacidad de carga (K) de *Scenedesmus acutus* compitiendo en todos los tratamientos ($\alpha = 0.05$). Las mismas letras indican que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, según pruebas ANOVA de una vía a $p \leq 0.05$

5. DISCUSIÓN

5.1. Efecto de la deficiencia de nutrientes en el crecimiento poblacional de *Chlorella vulgaris*

Las respuestas de la población de *C. vulgaris* frente a los diferentes tratamientos con deficiencia de nutrientes revelan que esta especie es particularmente susceptible a la deficiencia de nitrógeno en comparación con la deficiencia de fósforo ya que al disminuir la concentración del primero disminuye significativamente la tasa de crecimiento y la capacidad de carga de la especie, mientras que, a pesar de presentarse también una disminución estadísticamente significativa en los valores de estas variables

ante la deficiencia de fósforo en comparación con el tratamiento control, los resultados no son tan marcados.

La deficiencia de nitrógeno afecta considerablemente el crecimiento ya que limita la formación de aminoácidos que son los bloques constructores de las proteínas, las cuales están involucradas en muchos de los aspectos del crecimiento, incluyendo procesos estructurales y metabólicos. Si el suministro de nitrógeno no es suficiente no se pueden formar suficientes proteínas para mantener los niveles óptimos de crecimiento.

Por otra parte, la limitación en el crecimiento puede aumentar como consecuencia de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo. Diversos estudios han revelado que *Chlorella*, aunque tiene la habilidad de asimilar nitrato (NO_3^-), prefiere el amonio (NH_4^+), como fuente de nitrógeno (Stewart, 1974; Dvorakova-Hladka, 1971). Con amonio como fuente de nitrógeno se esperaría una disminución más discreta en el crecimiento. De cualquier forma, son pocos los medios de cultivo que utilizan amonio como fuente de nitrógeno, aunque en un medio natural la situación puede ser diferente y al encontrar amonio el decremento de la población puede no ser tan fuerte.

La deficiencia de los dos nutrientes no tiene un efecto acumulativo en la respuesta de la especie y por el contrario, la población responde un poco mejor con este tratamiento en comparación con la deficiencia de nitrógeno, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas. Sin embargo, el ANOVA de dos vías sobre la capacidad de carga de la especie revela una interacción entre el nitrógeno y el fósforo que están afectando la variable respuesta.

En un sentido biológico, es de esperarse que al disminuir la concentración de los dos nutrientes, la respuesta de la población en relación a la disminución únicamente de nitrógeno, sea comparativamente favorable ya que la relación N/P aumenta y se acerca más al óptimo.

5.2. Efecto de la deficiencia de nutrientes en el crecimiento poblacional de *Scenedesmus acutus*

En el caso de *S. acutus*, la respuesta ante la deficiencia de nutrientes es diferente, presentando un efecto similar en todos los tratamientos deficientes en nutrientes. A

pesar de ser evidente el efecto negativo que tiene dicha deficiencia en la tasa de crecimiento y capacidad de carga en comparación con el tratamiento control, no hay una diferencia tan marcada entre la deficiencia de nitrógeno y la deficiencia de fósforo como la que se presenta en *C. vulgaris*. Los valores en la tasa de crecimiento y la capacidad de carga no presentan una diferencia estadística significativa entre los tratamientos con deficiencia de nitrógeno y deficiencia de fósforo. Una respuesta similar fue reportada por Xin *et al.* (2010) quienes evaluaron el crecimiento de *Scenedesmus sp.* en concentraciones bajas de nitrógeno y fósforo y encontraron que la tasa de crecimiento de la especie no difiere significativamente entre los tratamientos.

Por otra parte, a diferencia de la respuesta de *C. vulgaris*, en este caso sí se presenta un efecto aditivo en la respuesta ante la deficiencia de los dos nutrientes, por lo cual con este tratamiento se presenta la tasa de crecimiento y la capacidad de carga más bajas. Esto se relaciona con los resultados reportados por Kunikane *et al.* (1984) en los cuales la respuesta en la tasa de crecimiento de *S. dimorphus* ante la deficiencia de nitrógeno y fósforo tiene un efecto negativo aditivo con los dos nutrientes en condiciones limitantes.

Por otra parte, los resultados revelan que el nitrógeno tiene un mayor efecto sobre la tasa de crecimiento por lo cual el tiempo de duplicación es mayor cuando hay deficiencia de nitrógeno, a pesar de alcanzarse una mayor capacidad de carga en comparación al tratamiento con deficiencia de fósforo. Esto puede explicarse por la resistencia inicial del crecimiento de la población ante la deficiencia de fósforo para luego iniciar un crecimiento exponencial más pronunciado que el presentado ante la deficiencia de nitrógeno, pero que alcanza una población máxima menor durante la duración del experimento.

Esta recuperación de la población observada ante la deficiencia de fósforo sugiere que a pesar de que a la especie la afecta significativamente su deficiencia, hace un uso eficaz de este nutriente adaptándose a la concentración presente en el medio. Por otra parte, el género *Scenedesmus* acumula rápidamente fósforo en cantidad excesiva si éste está disponible (Ramírez, 2000). Es posible que esta especie tenga la habilidad de producir y/o almacenar polifosfatos, lo cual la ayudaría a recuperar el crecimiento después de un periodo de resistencia. Se ha demostrado que muchas microalgas acumulan y almacenan fósforo como gránulos de polifosfato que utilizan como reserva de energía y almacenaje

de fósforo (Rhee, 1972; Kuesel *et al.*, 1989; Flynn, 1990; Brönmark & Hansson, 2005; Eixler *et al.*, 2006).

Adicionalmente, a pesar de alcanzar densidades poblacionales similares con todos los tratamientos de limitación de nutrientes, en deficiencia de nitrógeno se observó un blanqueamiento de los cultivos generado probablemente por una reducción en la síntesis de clorofila ya que la concentración de nitrógeno determina en gran medida la cantidad de clorofila sintetizada (Chu, 1943).

5.3. Efecto de la deficiencia de nutrientes en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*

La competencia por nitrógeno y fósforo entre las dos especies presentó a *C. vulgaris* como un potente competidor interespecífico ya que en todos los tratamientos presentó tasas de crecimiento y densidades poblacionales más altas que *S. acutus*, que se reveló como un competidor débil.

En general, el fitoplancton de menor tamaño es un mejor competidor ante la deficiencia de recursos, ya que posee tasas de crecimiento más altas (Agawin *et al.*, 2000; Marañón *et al.*, 2001; Lagus, 2009; Kagami & Urabe, 2011; Cuvín-Aralar *et al.*, 2004). Por otra parte, el biovolumen de *C. vulgaris* (aproximadamente $105,77 \mu\text{m}^3$) puede representar una ventaja competitiva ante *S. acutus*, ya que esta última tiene un biovolumen mayor (aproximadamente $145,63 \mu\text{m}^3$) y por lo tanto tiene una proporción área/volumen menor, por lo cual la absorción y el transporte de los nutrientes pueden ser más lentos. Las células más pequeñas de *C. vulgaris* tienen una mayor área superficial para la absorción de nutrientes en relación al volumen para su almacenamiento interno y por lo tanto el tiempo requerido para que la difusión desplace las sustancias hacia el interior es menor, convirtiéndola en una especie más eficiente para el transporte de nutrientes que *S. acutus*.

Por otra parte, al iniciar los experimentos con la misma concentración celular en las dos especies, la cuota celular de cada nutriente ($\mu\text{g N y/o P /célula}$) es la misma para cada especie, y por consiguiente, al ser *C. vulgaris* una célula más pequeña, la difusión de los nutrientes es más rápida acelerando la división celular y generando un crecimiento poblacional más pronunciado.

En general, la deficiencia de nitrógeno presentó un mayor impacto en el crecimiento de las dos poblaciones. La respuesta negativa es más marcada en *S. acutus* al combinarse con la deficiencia de fósforo mientras que en *C. vulgaris* se redujo, lo cual sugiere que en esta última la proporción N/P es más relevante para los procesos metabólicos que las concentraciones absolutas de estos nutrientes, mientras que en *S. acutus* sucede lo contrario. Aunque varios estudios han demostrado que la respuesta de una especie se encuentra más relacionada con la proporción de nutrientes en deficiencia que con sus concentraciones absolutas (Rhee, 1978; Turner *et al.*, 1998; Sommer, 1998; Lagus, 2009; Xin *et al.*, 2010), esta no es una regla imperiosa para todas las especies. Cuvin-Aralar *et al.* (2004) estudió la respuesta de una comunidad de fitoplancton de un lago eutrófico en Filipinas sometida a proporciones bajas de N/P y concluyó que las concentraciones absolutas de estos nutrientes son más relevantes al determinar la estructura de la comunidad que la proporción de los mismos.

Por otra parte, de la misma forma que en los monocultivos, la capacidad de carga de *S. acutus* en el tratamiento con deficiencia de fósforo presenta los valores más bajos. De cualquier forma, las diferencias entre tratamientos que se observan en las curvas de crecimiento para las dos especies en competencia no son estadísticamente significativas en el caso de *S. acutus*, por lo cual la respuesta de la especie en los diferentes parámetros evaluados está determinada principalmente por la competencia con *C. vulgaris*, independientemente de la deficiencia de nutrientes. Esto es evidente al comparar las curvas poblacionales de la especie en monocultivos y en competencia observándose tendencias muy diferentes en los dos casos. En todos los tratamientos, *S. acutus* en competencia acelera el crecimiento presentando un pico máximo hacia el tercer día a partir del cual, a excepción del tratamiento con deficiencia de fósforo, la población no se recupera. En el caso del fósforo, *S. acutus* parece tener una mayor habilidad de recuperación ante su deficiencia.

Por el contrario, en el caso de *C. vulgaris*, la deficiencia de nitrógeno en un ambiente competitivo parece afectarle mucho más que la deficiencia de fósforo y en este caso, a diferencia del monocultivo, los tratamientos con deficiencia de nitrógeno difieren significativamente del tratamiento con deficiencia de fósforo y del tratamiento control, mientras que estos dos últimos no difieren entre sí. De cualquier forma, las curvas comparativas de la especie en monocultivos y en competencia muestran un patrón

similar indicando que a diferencia de *S.acutus*, la respuesta en el crecimiento de *C. vulgaris* está determinada por la deficiencia de nutrientes, más que por la competencia.

Estudios anteriores han reportado diferentes respuestas en experimentos de competencia entre los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*. Grover (1991) reportó la exclusión de *Scenedesmus sp.* por parte de *Chlorella sp.* en varias situaciones de deficiencia de fósforo. La misma exclusión competitiva fue sugerida por Huisman *et al.* (1999) en relación a la competencia entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus protuberans* por luz.

Por el contrario, los estudios de Pisman *et al.* (2001) sobre la competencia por nitrógeno entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.* revelaron una ventaja competitiva de *Scenedesmus* sobre *Chlorella*, mientras Hulot *et al.* (2001) reportaron que el crecimiento de *Chlorella* es impedido por la presencia de *Scenedesmus*, posiblemente por la liberación de sustancias inhibitoras de crecimiento por parte de esta última, tal como lo reportó Jorgensen (1956) en sus estudios.

Las ventajas competitivas de cada especie en el presente estudio quedan demostradas en los modelos de Lotka-Volterra derivados de los experimentos. Teniendo en cuenta que cada especie creciendo en monocultivos presenta una curva de crecimiento sigmoide, la cual está determinada por la competencia intraespecífica que fija la capacidad de carga (K) de la especie, el modelo de Lotka-Volterra explora el comportamiento de dichas curvas en condiciones de competencia con otra especie y de esta forma, el modelo incluye la competencia interespecífica. Los valores de K y los coeficientes de competencia (α y β) de las dos especies en las condiciones experimentales de este estudio se ajustan a los supuestos del modelo y la dinámica de las curvas de crecimiento de las dos especies sugieren que estos supuestos se cumplen.

En el tratamiento control, *C. vulgaris* presenta una clara ventaja competitiva frente a *S.acutus*, y su crecimiento es controlado por la misma población, la competencia entre los miembros de la misma especie es más fuerte que la competencia con *S.acutus*, mientras que a esta última le sucede lo contrario y se ve significativamente afectada por *C. vulgaris*. Al no existir deficiencia de nutrientes, *C. vulgaris* tiene todas las ventajas competitivas sobre *S.acutus* y reduce significativamente el espacio en el cual esta puede crecer. En este caso $\alpha > K_1/K_2$ y $\beta < K_2/K_1$ por lo cual, de acuerdo a los supuestos del

modelo *C. vulgaris* lleva a la extinción a *S. acutus* (Kot, 2001; Begon, 2006; Lampert & Sommer, 2007).

La deficiencia de nitrógeno genera un modelo de competencia diferente en el cual las poblaciones de las dos especies están reguladas principalmente por la competencia interespecífica. En este caso, tanto en el tratamiento con deficiencia únicamente de nitrógeno como en el tratamiento con deficiencia de los dos nutrientes, las isoclinas de crecimiento de las dos especies se cruzan y generan dos espacios en los cuales una u otra especie puede excluir a la otra. En las dos situaciones $\alpha > K_1/K_2$ y $\beta > K_2/K_1$ lo que indica una competencia fuerte donde la sobrevivencia de cada especie está determinada por la situación inicial (Kot, 2001; Begon, 2006; Lampert & Sommer, 2007). La condición específica presentada para los dos tratamientos indica una tendencia a la exclusión de *S. acutus* ya que los puntos en la gráfica se ubican hacia la región en la que *C. vulgaris* crece y *S. acutus* disminuye, especialmente en el tratamiento con deficiencia de nitrógeno y fósforo, en el cual el espacio de crecimiento para *S. acutus* es más reducido en comparación al tratamiento con deficiencia de nitrógeno.

En contraste, el tratamiento con deficiencia de fósforo genera un modelo de competencia intraespecífica contrario al anterior y en este caso las especies compiten más fuertemente con los individuos de su propia especie. En este caso $\alpha < K_1/K_2$ y $\beta < K_2/K_1$, según el modelo esta situación indica que las especies compiten débilmente y en este caso el modelo predice coexistencia de las dos especies (Kot, 2001; Begon, 2006; Lampert & Sommer, 2007). Los puntos en la gráfica muestran que las dos especies se encuentran por debajo de sus isoclinas donde es posible la coexistencia. Aunque la proyección del experimento en el modelo muestra que el espacio de crecimiento para *S. acutus* es muy reducido en comparación con el de *C. vulgaris*, esta última se encuentra cerca a su capacidad de carga, mientras que *S. acutus* todavía puede soportar un crecimiento poblacional significativo. Si se proyecta esta situación en el tiempo, *S. acutus* podría alcanzar densidades poblacionales similares a las de *C. vulgaris* ya que, como se observa en la figura 23, al finalizar el experimento la población de *S. acutus* se encuentra en crecimiento.

Los resultados presentados no revelaron un “trade-off” entre las habilidades competitivas por fósforo y nitrógeno de las dos especies como se ha sugerido en la

mayoría de estudios de competencia por nutrientes en donde cada especie es limitada por un nutriente diferente (Titman, 1976; Tilman, 1977; Tilman, 1981; Shoener, 1983; Dodds, 2002). En este caso *C. vulgaris* parece ser un competidor más fuerte por los dos nutrientes y eventualmente puede excluir a *S. acutus*. Los resultados sugieren que las dos especies responden mejor ante la deficiencia de fósforo y son más susceptibles a la deficiencia de nitrógeno, aumentando en este caso la competencia interespecífica que lleva a la exclusión de una de las dos especies, mientras que en la competencia por fósforo se puede dar la coexistencia.

Por otra parte, los resultados muestran la gran capacidad que tiene *C. vulgaris* de adaptarse a diferentes medios. Las especies de *Chlorella* son consideradas de alta resistencia a cambios ambientales, incluyendo deficiencia de nutrientes, por eso está presente en todo tipo de ecosistemas acuáticos y la literatura reporta sus adaptaciones a diferentes condiciones ambientales (Bicudo & Menezes, 2006; Peña *et al.*, 2005; Wehr & Sheath, 2003). Por su parte, aunque el género *Scenedesmus* es el más común y cosmopolita de los géneros de algas verdes, la especie *S. acutus* es más característica de ambientes eutróficos donde la concentración de nutrientes es alta y por lo tanto la población no crece bien ante la deficiencia de nutrientes (Bicudo & Menezes, 2006; Ramirez, 2006; Wehr & Sheath, 2003).

De cualquier forma, este análisis se deriva de un experimento de laboratorio en donde el número de variables involucradas es bajo y las concentraciones de nutrientes son específicas. Dado que la habilidad para explotar los recursos está influenciada por el medio ambiente, cada especie será competitivamente superior en diferentes condiciones ambientales (Tilman *et al.*, 1982; Begon, 2006; Lagus, 2009). La evaluación de concentraciones diferentes, así como la variación de factores que afectan significativamente el crecimiento como luz, pH y temperatura puede llevar a resultados muy diferentes, más aún en sistemas naturales donde otras variables como la sedimentación, herbivoría, turbulencia, etc., pueden influir significativamente en la respuesta de las comunidades.

CONCLUSIONES

- La deficiencia de los macronutrientes fósforo y nitrógeno tiene un efecto negativo en el crecimiento poblacional, capacidad de carga y tasa de crecimiento en *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*, siendo el nitrógeno el nutriente que más limita el crecimiento de las dos poblaciones.
- En *Chlorella vulgaris* la deficiencia de fósforo no presenta un efecto negativo tan fuerte como el presentado por la deficiencia de nitrógeno, mientras que *Scenedesmus acutus* responde de manera similar ante la deficiencia de los dos nutrientes.
- Bajo las condiciones estudiadas, *Chlorella vulgaris* se presentó como un competidor más fuerte y *Scenedesmus acutus* como un competidor débil, aunque no se observó exclusión competitiva de esta última en ningún tratamiento.
- Los valores de las variables evaluadas en el experimento de competencia no presentaron diferencias significativas entre tratamientos para *Scenedesmus acutus*, indicando que la respuesta de la especie en los diferentes parámetros evaluados está determinada principalmente por la competencia con *Chlorella vulgaris*, independientemente de la deficiencia de nutrientes.
- Las curvas comparativas de *Chlorella vulgaris* en monocultivo y en competencia muestran un patrón similar indicando que la respuesta en el crecimiento está determinada por la deficiencia de nutrientes, más que por la competencia.
- Los modelos de competencia de Lotka-Volterra derivados de los experimentos plantean tres situaciones de competencia diferentes: exclusión competitiva de *Scenedesmus acutus* por *Chlorella vulgaris* en el tratamiento control, competencia interespecífica de las dos especies que lleva a la exclusión de alguna de las dos en los tratamientos con deficiencia de nitrógeno y competencia intraespecífica y coexistencia en el tratamiento con deficiencia de fósforo.

RECOMENDACIONES

Los resultados de esta investigación son un primer paso en el estudio de las relaciones competitivas entre dos especies cosmopolitas de amplio estudio como lo son *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*, para las cuales no se tiene antecedentes reportados de competencia. El comportamiento de las poblaciones ante la deficiencia de nutrientes fue estudiado bajo un número limitado de variables en sistemas cerrados. Se sugiere el estudio de otras variables como luz, temperatura y pH, así como la evaluación de diferentes concentraciones de nutrientes con el fin de reconocer las variables medioambientales que dirigen relaciones fuertes de competencia y determinan el establecimiento de una u otra especie en un determinado ambiente.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los profesores Gabriel Guillot y Luis Carlos Montenegro por su dirección en este proyecto y por su colaboración constante en esta etapa de maestría.

A los integrantes del Laboratorio de Cultivo de Algas y especialmente a Jimmy por su colaboración en la esterilización del material de trabajo.

Debo un agradecimiento enorme a la profesora Natalia Ruiz por su orientación, comprensión y apoyo incondicional a lo largo de todo este proceso.

A mi novio, familia y amigos por estar siempre a mi lado y no dejarme rendir a pesar de las dificultades.

BIBLIOGRAFÍA

- Andersen, R.A. 2005. Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press.
- Barsanti, L., Gualtieri. 2006. Algae. Anatomy, Biochemistry and Biotechnology. CRC Press.
- Begon, M., Townsend, C. R., Harper, J. L. 2006. Ecology, From Individuals to Ecosystems. Fourth Edition. Blackwell Publishing Ltd.
- Bicudo, C.M. & Menezes, M. 2006. Géneros de algas de aguas continentales de Brasil, clave para identificación y descripciones.
- Brönmark, C & Hansson, L.A. 2005. The Biology of Lakes and Ponds. Oxford, University Press.
- Bulgakov, N. Levich, A. 1999. The nitrogen: phosphorus ratio as a factor regulating phytoplankton community structure. Arch, Hydrobiol. 146:1 3-22p
- Camargo, J.A., Alonso, A. 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. Environmental International 32: 831-849.
- Chu, S. P. 1943. The Influence of the Mineral Composition of the Medium on the Growth of Planktonic Algae: Part II. The Influence of the Concentration of Inorganic Nitrogen and Phosphate Phosphorus. The Journal of Ecology 31 (2): 109-148.
- Cohen, J. E., Beaver, R. A., Cousins, S. H., DeAngelis, D. L., Goldwasser, L., Heong, K. L., Holt, R. D., Kohn, A. J., Lawton, J. H., Martinez, N., O'Malley, R., Page, L. M., Patten, B. C., Pimm, S. L., Polis, G. A., Rejmánek, M., Schoener, T. W., Schoenly, K., Sprules, W. G., Teal, J. M., Ulanowicz, R. E., Warren, P. H., Wilbur, H. M., Yodzis, P. 1993. Improving Food Webs. Ecology 74 (1): 252-258.
- Cottingham, K. L. 1999. Nutrients and Zooplankton as Multiple Stressors of Phytoplankton Communities: Evidence from Size Structure. Limnology and Oceanography 44 (3. 2): 810-827.

- Cullen, J.J. 1991. Hypotheses to Explain High-Nutrient Conditions in the Open Sea. *Limnology and Oceanography* 36 (8): 1578-1599.
- Cuvin-Aralar, M.L., Focken, U., Becker, K., Aralar, E.V. 2004. Effects of low nitrogen-phosphorus ratios in the phytoplankton community in Laguna de Bay, a shallow eutrophic lake in the Philippines. *Aquatic Ecology* 38: 387–401.
- Dillard, G. E. 1989. Freshwater Algae of the Southeastern United States. Part. 1. Chlorophyceae: Volvocales, Tetrasporales and Chlorococcales, *in*: Kies, L., Giessen, R. S., Eds., *Bibliotheca Phycologia*, Bd. 81. J. Cramer, Berlin, pp. 202, 37 pls.
- Dodds, W. K. 2002. *Freshwater Ecology. Concepts and Environmental Applications*. Academic Press.
- Droop, M.R. 1973. Some thoughts on nutrient limitation in algae. *J. Phycol* 9: 264-272.
- Dvorakova-Hladka, J. 1971. A Comparison of Growth Rate of Algae as Influenced by Variation in Nitrogen Nutrition in *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. *Jirina Biologia Plantarum (PRAHA)* 13 (1) : 1-11.
- Eixler, S., Karsten, U., Selig, U. 2006. Phosphorus storage in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cells and its dependence on phosphate supply. *Phycologia* 45 (1): 53–60.
- Fujimoto, N., Sudo, R., Sugiura, N., Inamori, Y. 1997. Nutrient-limited growth of *Microcystis aeruginosa* and *Phormidium tenue* and competition under various N:P supply ratios and temperatures. *Limnology and Oceanography* 42 (2): 250-256.
- Grover, J. P. 1991. Algae grown in non-steady continuous culture: population dynamics and phosphorus uptake. *Verh. Int. Verein. Limnol.* 24: 2661–2664.
- Hecky, R.E., Kilham, P. 1988. Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: a review of recent evidence on the effects of enrichment. *Limnology and Oceanography* 33 (4), Part 2: Comparative Ecology of Freshwater and Marine Ecosystems. 796-822

- Hessen, D. O., Faerovig, P. J., Andersen, T. 2002. Light, Nutrients, and P:C Ratios in Algae: Grazer Performance Related to Food Quality and Quantity. *Ecology* 83 (7): 1886-1898.
- Huisman, J., Jonker, R.R., Zonneveld, C., Weissing, F.J. 1999. Competition for Light between Phytoplankton Species: Experimental Tests of Mechanistic Theory. *Ecology* 80 (1): 211-222.
- Hulot, F.D., Morin, P.J., Loreau, M. 2001. Interactions between algae and the microbial loop in experimental microcosms. *OIKOS* 95: 231–238.
- Jorgensen, E. G. 1956. Growth inhibiting substances formed by algae. *Physiol. Plant.* 9: 712–726.
- Kagami, M., Urabe, J. 2011. Phytoplankton growth rate as a function of cell size: an experimental test in Lake Biwa. *Limnology* 2 (2): 111-117.
- Kot, M. 2001. *Elements of Mathematical Ecology*. Cambridge University Press.
- Kuesel, A.C., Sianoudis, J., Leibfritz, D., Grimme, L.H., Mayer, A. 1989. P-31 in-vivo NMR investigation on the function of polyphosphates as phosphate and energy source during the regreening of the green alga *Chlorella fusca*. *Arch Microbiol* 152:167-171.
- Kunikane, S., Kaneko, M., Maehara. 1984. Growth and nutrient uptake of green alga, *Scenedesmus dimorphus*, under a wide range of nitrogen/phosphorus ratio—I. Experimental study. *Water Research* 18 (10): 1299-1311.
- Lagus, A. 2009. Role of nutrients in regulation of the phytoplankton community in the archipelago sea, Northern Baltic sea. *Painosalama Oy - Turku, Finland*.
- Lampert, W. & Sommer, U. 2007. *Limnoecology*. Second Edition. Oxford University Press Inc., New York.
- Le Rouzic, B., Bertru, G. 1997. Phytoplankton community growth in enrichment bioassays: possible role of the nutrient intracellular pools. *Acta Ecológica* 18 (2): 121-133.
- Lee, R.E. 2008. *Phycology*. Fourth edition, Cambridge University Press, New York.

- Marañón, E., Holligan, P. M., Barciela, R., González, N., Mouriño, B., Pazó, M.J., Varela, M. 2001. Patterns of phytoplankton size structure and productivity in contrasting open-ocean environments. *Marine Ecology Progress Series* 216: 43-56.
- Margalef, R. 1983. *Limnología*. Ediciones Omega, S.A. Barcelona.
- Marinho, M. Moraes, V. 2002. Nutrient availability and physical conditions as controlling factors of phytoplankton composition and biomass in a tropical reservoir (Southeastern Brazil). *Arch, Hydrobiol.* 153 (3): 443-468.
- Monod, J. 1950. La technique de culture continue: theorie et applications. *Ann. Inst. Pasteur Lille* 79: 390–410.
- Oh-Hama, T., Miyachi, S. 1992. *Chlorella*. In Borowitzka, M. A. & Borowitzka, L. J. [Eds.] *Micro-algae Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 3-26.
- Pace, M. L., Cole, J. J., Carpenter, S. R., Kitchell, J. F. 1999. Trophic cascades revealed in diverse ecosystems. *Tree* 14 (12): 483-488.
- Passarge, J., Hol, S., Escher, M., Huisman, J. 2006. Competition for nutrients and light: stable coexistence, alternative stable states, or competitive exclusion? *Ecological Monographs*, 76 (1): 57-72.
- Peña, E.J., Palacios, M.L., Ospina-Álvarez, N. 2005. *Algas como indicadores de contaminación*. Programa Editorial Universidad del Valle. Cali, Colombia.
- Pisman, T.I., Pechurkin, N.X., Somova, L.A. 2001. Competition between links in “producer-consumer” trophic chains in an aquatic closed system with spatially separated components. *Adv. Space Res.* 27 (9): 1599-1603.
- Ramírez, J.J. 2000. *Fitoplancton de agua dulce: aspectos ecológicos, taxonómicos y sanitarios*. Editorial Universidad de Antioquia, Colombia.
- Rhee, G.Y. 1972. Competition Between an Alga and an Aquatic Bacterium for Phosphate. *Limnology and Oceanography* 17 (4): 505-514.

- Rhee, G.Y. 1978. Effects of N:P Atomic Ratios and Nitrate Limitation on Algal Growth, Cell Composition, and Nitrate Uptake. *Limnology and Oceanography* (23) 1: 10-25.
- Reynolds, C.S., 1984. The ecology of freshwater phytoplankton. Cambridge University Press. Londres.
- Reynolds, C. S. 2006. The Ecology of Phytoplankton. Cambridge University Press, New York.
- Rodrigo, M.A., Rojo, C., Larrosa, J., Segura, M., Moeys, M. 2007. Influencia de la concentración de nutrientes y la herbivoría sobre la estructura y la función de una comunidad algal. *Limnetica*, 26 (1): 183-198.
- Round, F.E. 1973. *Biologia das Algas*. Editora Guanabara Dois S.A. Rio de Janeiro.
- Sigeo, D. C. 2005. *Freshwater Microbiology Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in the Aquatic Environment*. John Wiley & Sons Ltd.
- Smith, V. Bennett, J. 1999. Nitrogen: phosphorus supply ratios phytoplankton community structure in lakes. *Arch, Hydrobiol.* 146:1 37-53p
- Solomon, P. E., Berg, L. R., Martin, D. W., Villee, C. 1996. *Biología de Villee*. Tercera Edición. Interamericana McGraw-Hill.
- Sommer, U. 1998. From Algal Competition to Animal Production: Enhanced Ecological Efficiency of *Brachionus plicatilis* with a Mixed Diet. *Limnology and Oceanography*, 43 (6): 1393-1396.
- Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L. 1996. *Algal Ecology, Freshwater Benthic Ecosystems*. Academic Press, USA.
- Stewart, W.D.P. 1974. *Algal physiology and biochemistry*. Blackwell Scientific Publications Ltd. Osney Mead, Oxford.
- Sze, P. 1998. *A Biology of the Algae*. Third edition. WCB/McGraw-Hill.
- Tilman, D. 1977. Resource competition between plankton algae: an experimental approach. *Ecology* 58 (2): 338-348.

- Tilman, D. 1981. Tests of resource competition theory using four species of lake Michigan algae. *Ecology* 62 (3): 802-815.
- Tilman, D., Kilham, S.S., Kilham, P. 1982. Phytoplankton Community Ecology: The Role of Limiting Nutrients. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 349-372.
- Titman, D. 1976. Ecological competition between algae: Experimental confirmation of resource-based competition theory. *Science, New Series*, 192 (4238): 463-465.
- Turner, R.E., Qureshi, N., Rabalais, N.N., Dortch, Q., Justic, D., Shaw, R.F., Cope, J. 1998. Fluctuating Silicate:Nitrate Ratios and Coastal Plankton Food Webs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (95) 22: 13048-13051.
- Wehr, J.D, Sheath, R.G. 2003. *Freshwater algae of North America. Ecology and classification.* Academic Press. USA.
- Wetzel, R.G. 1981. *Limnología.* Ediciones Omega. Barcelona, España.
- Xin, L., Hong-ying, H, Ke, G, Ying-xue, S. 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* *Bioresource Technology* 101: 5494–5500.

ANEXO 1. Resultados del ANOVA de dos vías ($\alpha = 0.05$) con las concentraciones de fósforo y nitrógeno como fuentes de variación sobre las especies en monocultivos. gl = grados de libertad. n = número de niveles en la fuente de variación.

Variable respuesta	Fuente de variación	n	gl	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Scenedesmus acutus</i>
Tasa de crecimiento (μ)	Nitrógeno	2	1	0.000	0.032
	Fósforo	2	1	0.454	0.065
	Nitrógeno x fósforo		1	0.106	0.257
Capacidad de carga (K)	Nitrógeno	2	1	0.000	0.067
	Fósforo	2	1	0.020	0.035
	Nitrógeno x fósforo		1	0.005	0.096

ANEXO 2. Resultados del ANOVA de dos vías ($\alpha = 0.05$) con el contenido de nutrientes y la competencia como fuentes de variación sobre las especies. gl = grados de libertad. n = número de niveles en la fuente de variación.

Variable respuesta	Fuente de variación	n	gl	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Scenedesmus acutus</i>
Tasa de crecimiento (μ)	Nutrientes	4	3	0.000	0.006
	Competencia	2	1	0.000	0.005
	Nutrientes x competencia		3	0.020	0.543
Capacidad de carga (K)	Nutrientes	4	3	0.000	0.012
	Competencia	2	1	0.010	0.000
	Nutrientes x competencia		3	0.410	0.765

ANEXO 3. Resultados del ANOVA de dos vías ($\alpha = 0.05$) con las concentraciones de fósforo y nitrógeno como fuentes de variación sobre las especies en competencia. gl = grados de libertad. n = número de niveles en la fuente de variación.

Variable respuesta	Fuente de variación	n	gl	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Scenedesmus acutus</i>
Tasa de crecimiento (μ)	Nitrógeno	2	1	0.000	0.019
	Fósforo	2	1	0.637	0.493
	Nitrógeno x fósforo		1	0.563	0.623
Capacidad de carga (K)	Nitrógeno	2	1	0.000	0.473
	Fósforo	2	1	0.216	0.199
	Nitrógeno x fósforo		1	0.240	0.335